

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## *CAPTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN SUJETOS SANOS MEDIADA POR EXOSOMAS*

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: Elena Grueso Navarro

TUTOR: Ramón Serrano Salom

CO-TUTORES: Pilar Sepúlveda Sanchís

Akaitz Dorronsoro González

*Curso Académico 2016/2017*

VALENCIA, 7 DE JULIO DE 2017

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>8</b>
Obtención de muestras	8
Composición en macronutrientes del desayuno.	9
Aislamiento de exosomas	9
Análisis por NTA	10
Microscopía electrónica	10
Westen Blot	10
Ensayos de citometría de flujo	11
Líneas celulares	13
Ensayos de captación <i>in vitro</i>	13
Análisis estadístico	14
<b>RESULTADOS</b>	<b>15</b>
Caracterización de exosomas provenientes del suero	15
Los exosomas aislados en condiciones de no ayuno (-Fs) presentan mayores niveles de CD36 que los exosomas aislados en condiciones de ayuno (+Fs)	16
Los exosomas circulantes son capaces de incorporar ácidos grasos libres <i>in vitro</i> de manera dependiente de CD36	17
Los exosomas aislados tras el desayuno, tienen una carga lipídica similar a los exosomas aislados en condiciones de ayuno	19
Los exosomas circulantes son captados <i>in vitro</i> por células de endotelio microvascular coronario y cardiomiocitos	21
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</b>	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>28</b>

## RESUMEN

El metabolismo lipídico es un proceso complejo que se encuentra desregulado en enfermedades como diabetes, aterosclerosis y obesidad. Un factor común en todas ellas es una elevada concentración de ácidos grasos libres en plasma. CD36, un receptor *scavenger* de clase B implicado en el transporte de ácidos grasos, está relacionado con el desarrollo de aterosclerosis y otras patologías metabólicas. En este contexto, hemos estudiado la capacidad de los exosomas circulantes para actuar como transportadores de ácidos grasos desde la sangre a los tejidos. Para ello, hemos aislado exosomas de suero de donantes sanos en condiciones de ayuno y tras un desayuno hipercalórico. Los resultados obtenidos demuestran que los exosomas son capaces de incorporar ácidos grasos libres desde el suero mediante un proceso dependiente de CD36. En conjunto, este estudio arroja luz sobre la pato-fisiología de enfermedades metabólicas relacionadas con el metabolismo lipídico.

### Palabras Clave:

Metabolismo, Exosomas, CD36, Transporte, Ácidos grasos libres.

*Lipid metabolism is a complex mechanism deregulated in metabolic diseases such as diabetes, atherosclerosis and obesity. A common factor for all of them is a high concentration of free fatty acids in plasma. CD36, a scavenger receptor class B implicated in free fatty acid translocation inside the cell, has been implicated in the development of atherosclerosis and other metabolic pathologies. In this context, we studied the capacity of circulating exosomes to carry free fatty acids from serum to different organs. In this regard, we isolated circulating exosomes from healthy donors under fasting and after a hypercaloric breakfast. The results obtained show that circulating exosomes are capable of incorporating free fatty acids directly from serum through a CD36 dependent mechanism. Taken together, this study shed some light on the pathophysiology of human diseases related to lipid metabolism.*

### Key words:

*Metabolism, Exosomes, CD36, Transport, Free Fatty Acids.*

# INTRODUCCIÓN

La función cardíaca es dependiente de la producción intracelular de ATP, que se obtiene a partir del catabolismo de la glucosa y los ácidos grasos. La oxidación de la glucosa es fundamental para la obtención de ATP en el tejido miocárdico; sin embargo, un 70% procede de la oxidación de ácidos grasos libres (AGL)(1). Dada la importancia de los lípidos para la correcta función del miocardio, y la limitada capacidad de los cardiomiocitos para sintetizar ácidos grasos, los mecanismos de captación lipídica son críticos para el correcto funcionamiento del corazón (2).

Los ácidos grasos libres son esenciales como fuente de energía para el organismo. Así mismo, se emplean en la síntesis de lípidos; desde componentes de membrana, hasta moléculas lipídicas con funciones de señalización. Sin embargo, a pesar de su importante función fisiológica, el aumento de la concentración de AGL afecta a la integridad de las membranas y produce efectos negativos como la disfunción mitocondrial, producción de ROS, inflamación y muerte celular (3)(4). Altas concentraciones de AGL en suero son habituales en pacientes obesos, y están asociadas al desarrollo de resistencia a insulina. Esto, favorece la aparición de diversas patologías cardiovasculares como la aterosclerosis (5)(6)(7) .

Actualmente existen dos hipótesis que explican la captación de AGL por las células. La primera hipótesis contempla que los AGL atraviesan la membrana celular como moléculas protonadas (no cargadas) en un mecanismo denominado *flip-flop*. Mediante este proceso, los AGL difunden desde el espacio extracelular atravesando las membranas externa e interna hasta llegar al citosol, de manera dependiente del gradiente de AGL entre la sangre y el interior celular. La segunda hipótesis, plantea que la captación está facilitada por proteínas transportadoras que asisten la internalización del lípido hasta el interior de la membrana. Este mecanismo, a diferencia del propuesto en la primera hipótesis, es independiente de la concentración en sangre de AGL (8)(9)(10).

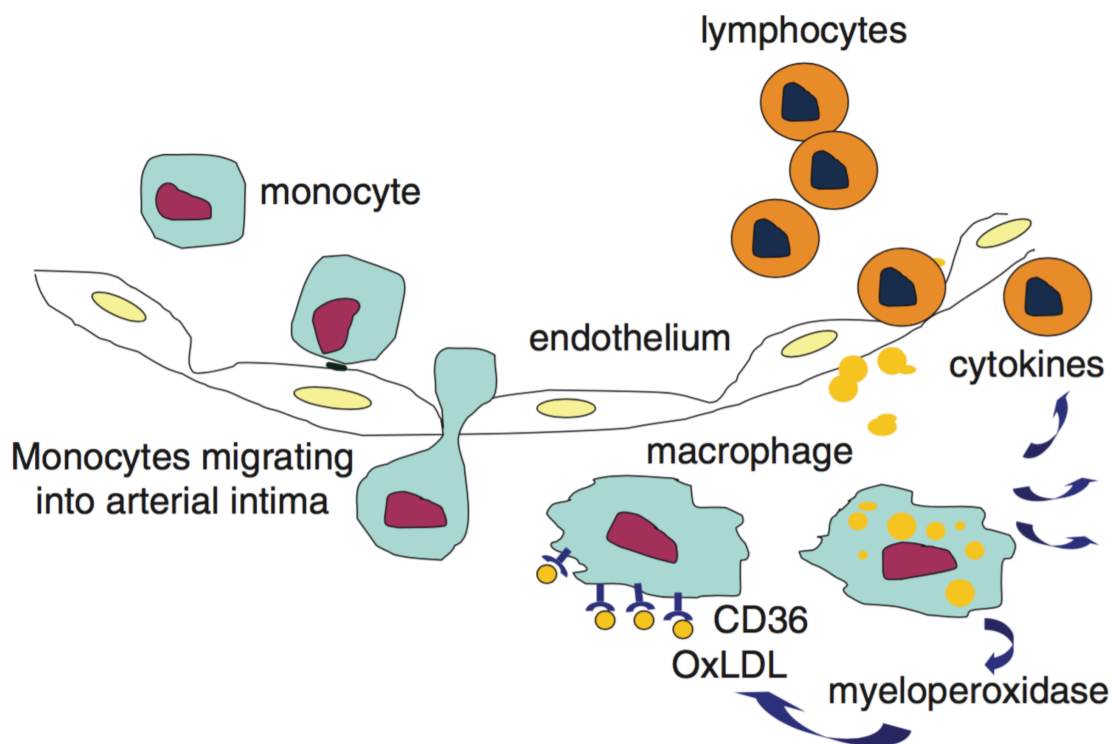
La existencia de una gran variedad de proteínas implicadas en el transporte de lípidos indica que la captación de AGL mediada por proteínas tiene un papel fundamental en su utilización por los tejidos. Algunas de estas proteínas, que además contribuyen a la captación lipídica en el corazón son; proteínas de transporte de ácidos grasos (FATP), proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), ACSL, y traslocasas de ácidos grasos (FAT). Ésta última, también conocida como CD36, es la principal intermediaria en la captación cardíaca de AGL (11)(12).



CD36 es una glicoproteína de membrana que pertenece a la familia de receptores *scavenger* de clase B. Fue inicialmente descubierta en plaquetas (13) y posteriormente caracterizada en numerosos tipos celulares incluyendo; monocitos(14), células endoteliales(15), adipocitos (16), células del músculo esquelético (17) y cardiomiocitos (18). CD36 está codificada en el ser humano por el gen *cd36*, localizado en el cromosoma 7 y compuesto por 15 exones. La proteína codificada está formada por una sola cadena peptídica de 472 aminoácidos y dividida en dos regiones transmembrana: dos pequeños dominios citoplasmáticos y un dominio extracelular más grande glicosilado, necesario para la traslocación de moléculas a través de la membrana celular (19).

La función de CD36 como transportador de AGL fue descubierta en 1993 (20), y aunque aún no se conoce con exactitud su mecanismo de acción, ha sido ampliamente estudiado su papel en el mantenimiento de la homeostasis lipídica, que incluye la regulación de la captación de AGL y del metabolismo de dichos ácidos grasos(21)(22). Además de su función como transportador lipídico, CD36 funciona como molécula señalizadora con diversos ligandos conocido como; trombospondina-1 (TSP-1), la forma oxidada de LDL (oxLDL), hexarelina, péptido fibrilar A $\beta$  amiloide y ácidos grasos libres de cadena larga (23).

Tanto por su función transportadora, como por la unión con sus ligandos, CD36 está implicado en diferentes patologías metabólicas y cardíacas como resistencia a insulina o aterosclerosis. Respecto a las funciones de señalización de CD36; la unión a TSP-1 es responsable de la inhibición de angiogénesis mediante la inducción de apoptosis celular. Por otro lado, la unión de CD36 a oxLDL es muy importante en el establecimiento de aterosclerosis. En este caso, los macrófagos internalizan oxLDL a través del CD36 presente en su membrana. Una vez en el interior celular, oxLDL induce la expresión de CD36 a través de la señalización por PPAR- $\gamma$ , lo que facilita una mayor captación de oxLDL en los macrófagos. La interacción entre CD36 y oxLDL induce a su vez la secreción de citoquinas que favorecen el reclutamiento e infiltración de células del sistema inmune a través del endotelio, favoreciendo así la inflamación de la pared arterial y el estrechamiento del lumen. Figura 1.



**Figura 1: Intervención de CD36 en el establecimiento de una placa de ateroma. Obtenida de Young MP. 2014. *CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis*. [Figura]. *Experimental & Molecular Medicine*, 46, e99.**

Una elevada concentración de AGL en suero es habitual en pacientes diabéticos con obesidad, donde los niveles de CD36 en plasma es cinco veces superior que en pacientes sanos (24). Esta condición patológica está íntimamente relacionada con el desarrollo de resistencia a insulina y el aumento de citoquinas pro-inflamatorias en sangre. Tanto la inflamación como la resistencia a insulina contribuyen al desarrollo de diabetes *mellitus* de tipo 2, hipertensión y aterosclerosis; todos ellos factores de riesgo del infarto de miocardio. Diferentes investigaciones han mostrado la correlación de elevadas concentraciones de AGL y CD36 en plasma de pacientes obesos con la presencia de exosomas circulantes (25)(26).

Las vesículas extracelulares (EVs) se han convertido, en la últimas décadas, en potentes vehículos de comunicación intercelular, como parte de un mecanismo altamente conservado que aparece desde los procariontes hasta los eucariotes superiores (27) . Los exosomas son un tipo de vesícula de pequeño tamaño (50-100nm) que se enmarca dentro del grupo de EVs, y cuya actividad biológica ha suscitado mucho interés. Esto es debido a la capacidad de los exosomas de contener

información biológica procedente de la célula donadora; y posteriormente ser captados por una célula receptora, que interpreta y responde a la información contenida en los exosomas. Con origen en los endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares, su presencia ha sido relacionada con numerosos procesos biológicos. Dada la estrecha relación entre los exosomas y los lípidos, el metabolismo lipídico es uno de ellos (28)(29).

En los últimos años, el descubrimiento de la presencia de exosomas en fluidos biológicos, ha despertado el interés por su uso como biomarcadores (30). En el caso de las patologías metabólicas existen numerosas evidencias de que la presencia y concentración de éstas vesículas en fluidos como la sangre, puede estar directamente relacionada con la aparición y/o progresión de diferentes patologías (31)(25)(26) . Por ejemplo, en pacientes con obesidad se han descrito niveles elevados de exosomas en comparación con pacientes sanos, los cuales se reducían drásticamente tras una cirugía bariátrica (26). Observaciones similares se han obtenido en estudios sobre hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes *mellitus* de tipo 2 (32).

Por todo lo anteriormente descrito, en este trabajo nos planteamos que los exosomas circulantes son capaces de captar ácidos grasos libres directamente desde el suero, y transportarlos a los tejidos para su metabolización. Además, consideramos que CD36 es un buen candidato como intermediario en esta captación lipídica.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Obtención de muestras

Un total de 47 voluntarios sanos han sido reclutados para este estudio. Se obtuvieron los datos de edad e Índice de Masa Corporal (IMC) de todos ellos resultando la edad media 28,4 años y 23.03 de IMC. Se recogieron de cada paciente 64 mL de sangre en dos extracciones de 34 mL cada una. La primera extracción (4 tubos x 8,5 mL), se tomó con el voluntario en condiciones de ayuno de al menos 5 horas (estado post-absortivo). Tras la obtención de las muestras, se agitaron los tubos suavemente durante 2 minutos a temperatura ambiente, y la muestra fue conservada en hielo hasta la separación del suero. Tras la primera extracción, los voluntarios tomaron un desayuno tipo consistente en: 250 mL de zumo de naranja, 200 mL de café con leche, 90 gr de croissant relleno de crema de chocolate y 250 gr de tortilla española. Tabla 1.

Pasados 20 minutos de la finalización del desayuno, se realizó la segunda extracción de sangre. Al igual que con la muestra previa, los tubos se agitaron 2 minutos y conservaron en hielo hasta el momento de inicio del protocolo de separación del suero. Las muestras de sangre obtenidas en condiciones de ayuno se denominaron *+Fs*, y las muestras obtenidas tras el desayuno *-Fs*. Para la obtención del suero, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 950 Gs durante 15 minutos. En todos los casos se siguieron los contenidos del Real Decreto 9/2014 por el que se regulan las actividades relativas a la utilización de tejidos humanos.

Los tubos utilizados para la toma de las muestras fueron SSTTM II Advanced (BD). Este tipo de tubos es recomendado para pruebas de análisis de suero, y está recubierto en su interior de silicona y partículas de sílice micronizadas que aceleran el proceso de coagulación y previenen la adherencia de hematíes a la pared del tubo. Para la separación del coágulo y el suero de la muestra, los tubos contienen un gel separador, que durante la centrifugación asciende por el tubo hasta separar las dos fases de la muestra. Para la extracción de las muestras de sangre, contamos con la colaboración del Servicio de Hemostasia del hospital La Fe (Torre B, Consultas Externas 704).

## Composición en macronutrientes del desayuno.

Este estudio fue realizado por el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (Ciudad Politécnica de la Innovación. Valencia).

	Cantidad	Energía (Kcal)	Proteína (gr)	Hidratos de Carbono (gr)	Fibra (gr)	Lípidos (gr)	AGS (gr)	AGM (gr)	AGP (gr)
<b>Zumo naranja natural</b>	300mL	135	1,8	31,5	0,3	0	0	0	0
<b>Café con leche</b>	80gr	189	9,3	13,8	0	10,8	7,2	3	0,6
<b>Azúcar blanco</b>	7 gr	28,56	0	7	0	0	0	0	0
<b>Tortilla patata</b>	106,8 gr	156,384	4,6224	11,1456	1,5984	10,0224	1,8144	6,3504	1,0368
<b>Pan blanco</b>	15,5gr	39,75	1,425	7,8	0,375	0,225	0,045	0	0
<b>Croissant choco</b>	64,2gr	260,01	4,815	35,31	1,4124	11,0424	6,3558	3,531	0,4815
<b>Total</b>		808,704	21,9624	106,5556	3,6858	32,0898	15,4152	12,8814	2,1183

**Tabla1:** Descripción de macronutrientes del desayuno. \*AGS: Ácidos Grasos Saturados, \*AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados, \*AGP: Ácidos Grasos Polinsaturados.

## Aislamiento de exosomas

Los exosomas fueron purificados por ultracentrifugaciones seriadas tal y como se describió anteriormente (33). El suero obtenido fue diluido 1:1 con PBS y se realizó una primera centrifugación a 200 Gs durante 30 minutos. Con este paso conseguimos limpiar la muestra de restos celulares y posibles coágulos del suero. El sobrenadante fue transferido a tubos de ultracentrífuga y se realizó una primera ultracentrifugación (Rotor 50.2 Ti, Beckman) durante 50 minutos a 12000 Gs para limpiar los restos celulares más pequeños. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 110000 Gs durante 2 horas para pelletear los exosomas, que fueron lavados con 20

mL de PBS frío. Antes de la siguiente centrifugación, la solución de exosomas fue filtrada a 0.22 micras, y centrifugada de nuevo dos veces más durante 70 minutos a 110000 Gs. Los pellets fueron resuspendidos en PBS filtrado a través de 0,22  $\mu\text{m}$  para ensayos funcionales, o en Ripa buffer (Sigma, R0278) suplementado con inhibidores de proteasa (Roche, 0589297001) y fosfatasa (Roche, PHOSS-RO) para ensayos de Western Blot.

### **Análisis por NTA**

Las muestras resuspendidas en PBS filtrado a 0.22  $\mu\text{m}$ , se diluyeron hasta alcanzar una concentración de vesículas adecuada para su posterior análisis. La población exosomal de la muestra, se analizó mediante Nanosight NS3000 System (Malvern Instruments). Este análisis fue realizado gracias a la colaboración del equipo de Polímeros Terapéuticos del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

### **Microscopía electrónica**

Las muestras resuspendidas en PBS se cargaron sobre rejillas con recubrimiento de Formvar y carbono, y se realizó un contraste con 2% de uranyl-acetato. Las muestras fueron fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit con cámara digital (Soft Image System, Morada). Este proceso fue llevado a cabo con la colaboración del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

### **Western Blot**

El pellet de exosomas fue resuspendido en Ripa Buffer (Sigma, R0278) y se cuantificó su contenido proteico mediante un ensayo de BCA (ThermoFisher, 23227). Un total de 30  $\mu\text{g}$  de proteína por pocillo fue cargado en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, con 1X de Laemmli Buffer (Biorad, 161-0747). Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore, IPVH00010). Después de la transferencia, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con agua MiliQ, y bloqueo de la membrana en TBS 1X y 5% de leche desnatada durante 1 hora, en agitación. Tras el bloqueo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de interés durante toda la noche a 4°C y en agitación. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con TBS 1X. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con TBS 1X. Las membranas fueron reveladas con

ECL Primer Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, RPN2232) y la señal luminiscente fue capturada mediante un revelador digital Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron: CD9 (1:1000, Santa Cruz, C-4), CD81 (1:500, Santa Cruz, 5A6), CD63 (1:500, Santa Cruz, H-193), TSG-101 (1:1000, Santa Cruz, C-2), CD36 (1:200, Santa Cruz, 5K65), FABP-3 (1:1000, Sigma, AV33823), FABP-1 (1:1000 R&D Systems, MAB2964) y ACSL1 (1:1000, Cell signalling, #4047). Todos los anticuerpos fueron diluidos en la solución bloqueo, a excepción de ACSL1, que fue diluido en TBS-Tween , BSA al 5% (Sigma, A7030) y Azida 0.02%. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anticuerpo anti-rabbit (1:10000, Dako, P0448) y anticuerpo anti-mouse (1:10000, Sigma, A9044-2ML).

## **Ensayos de citometría de flujo**

### Ensayo de captación de lípidos in vitro

El pellet de exosomas fue resuspendido en PBS filtrado a través de 0,22  $\mu\text{m}$ . Los exosomas de cada condición se dividieron en dos muestras, una sin tratar y la otra en la que bloqueamos CD36 mediante un anticuerpo. Incubamos durante toda la noche con el anticuerpo anti-CD36 (clone 99.1, Bioceros) en cámara fría y agitación. Preparamos una dilución (1.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) del lípido fluorescente Bodipy 500/510 C1,C12 (ThermoFisher, D3823) en HBSS con Rojo Fenol (Hyclone, SH30031 ) y la activamos incubando durante 10 minutos en el baño a 37 °C. A cada tubo de exosomas le añadimos un volumen de la solución con Bodipy, y Bodipy TR Ceramida 1mM (ThermoFisher, D7540), e incubamos a 37 °C durante 15 minutos, en agitación. Tras la incubación, lavamos con 20 mL de PBS filtrado frío. El pellet resultante tras el lavado se resuspendió en HBSS sin Rojo Fenol (Hyclone, SH30588) para su análisis en el citómetro de flujo.

### Ensayo de contenido lipídico exosomal

El pellet de exosomas fue resuspendido en HBSS con Rojo Fenol (Hyclone, SH30031 ) y se añadió a cada tubo Rojo Nilo (Thermo Fisher, N3013) a una concentración final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubaron las muestras a 37 °C durante 30 minutos, en agitación. Tras la incubación, se lavaron

con 20 mL de PBS filtrado y frío. El pellet fue resuspendido en HBSS sin Rojo Fenol (Hyclone, SH30588) para su análisis por citometría de flujo.

### Ensayo de captación lipídica en suero

El volumen de suero de cada condición fue dividido en dos. La mitad del suero fue depletado de exosomas mediante centrifugación durante toda la noche a 110000 Gs. La otra de mitad de suero se utilizó para el aislamiento de exosomas siguiendo el protocolo explicado anteriormente. El pellet de exosomas se resuspendió en HBSS sin Rojo Fenol (Hyclone, SH30588), y se dividieron en 5 cinco grupos. Ver tabla 2. Los grupos 4, 5, 9 y 10 fueron incubados overnight con anticuerpo anti-CD36 (clone 99.1, Bioceros) en cámara fría y agitación.

Al día siguiente, las muestras 2, 4, 7 y 9 fueron incubadas con suero +Fs, y las muestras 3, 5, 8 y 10 con suero -Fs, durante 10 minutos en baño a 37 °C. Las muestras control 1 y 6 fueron incubadas con HBSS sin Rojo Fenol (Hyclone, SH30588). Después los exosomas fueron teñidos como se explicó anteriormente en este apartado. Tras el marcaje, las muestras fueron lavadas con 20 mL de PBS frío y filtrado y resuspendidas en HBSS para su análisis por citometría de flujo.

Los análisis de citometría se han realizado con la colaboración del grupo de investigación en Citometría y Citómicas de la Universidad de Valencia, dirigido por el Dr. José Enrique O'Connor.

+Fs					-Fs				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HBSS	Suero	Suero	Suero	Suero	HBSS	Suero	Suero	Suero	Suero
	+Fs	-Fs	+Fs	-Fs		+Fs	-Fs	+Fs	-Fs
			Inhibidor	Inhibidor				Inhibidor	Inhibidor

**Tabla 2:** numeración de los tratamientos aplicados a cada una de las muestras de exosomas.



## **Líneas celulares**

Todas las células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Microvasculatura cardiaca humana (hMVEC-C ). Las células fueron cultivadas en medio EBM2 (Lonza, CC-3156) y suplementado con EGM2-MV SingleQuot Kit Supl. & Growth factors (Lonza, CC-4147).

Línea celular de cardiomiocito humano (AC10). Las células fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (1:1), con L-Glutamina, 200mM, HEPES 15 mM, suplementado con 10% de FBS (Sigma, F2442), 1% de Penicilina-Streptomina (Thermo,15140122) y 0.001% de Ciprofloxacino (Sigma, 17850).

## **Ensayos de captación *in vitro***

### Tinción de exosomas con PKH67-GL

Los exosomas se tiñeron siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el pellet de exosomas fue resuspendido en Diluent C. Preparamos una dilución 2X de PKH67-GL en Diluent C y añadimos un volumen de la solución 2X a los exosomas resuspendidos. Incubamos en oscuridad y a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras el tiempo de incubación, bloqueamos la tinción con una solución 1% BSA. Realizamos un lavado con 20 mL de PBS filtrado y frío.

### Ensayos de captación

Los ensayos de captación *in vitro* se realizaron en portas de vidrio compartimentados (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ , ThermoFisher, 154453). Cada tipo celular empleado se sembró a la densidad optimizada previamente para este experimento. Las células fueron sometidas a un ayuno durante 3 horas con medio de ayuno consistente en; medio de cultivo basal suplementado con 1% de ITS (Thermo, 41400045) 1% Aminoácidos no esenciales (Sigma, M7145), 1% Penicilina-Streptomina (Thermo,15140122), y 1% Vitaminas (Thermo, 11120052).

Pasado el tiempo de ayuno, las células se trataron con exosomas (20µg/mL) teñidos con Bodipy 500/510 o PKH67 GL y fueron incubados a 37 °C durante 15 minutos para su captación. Tras la

incubación, se realizaron 3 lavados con PBS filtrado. Se fijaron las células con PFA 4% durante 10 minutos a 4 °C y posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS filtrado. Los núcleos se tiñeron durante 10 minutos con DAPI (2mg/mL, Sigma, D9542) incubado a temperatura ambiente. Tras 4 lavados de 3 minutos con PBS filtrado, se procedió al montaje de los portas utilizando medio de montaje (Vectashield, Vector Labs, H-1000) y sellado de los portas. Las fotos fueron tomadas en microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems).

### **Análisis estadístico**

Los datos están representados como la media y la desviación estándar. Fueron analizados por T-student como muestras desapareadas y ANOVA para comparaciones múltiples. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software Graphpad Prism7. Las muestras fueron consideradas significativas con un p.valor <0.05 y un intervalo de confianza del 95%. Para la identificación de *outlayers*, sometimos las muestras a un análisis ROUT, y consideramos *outlayers* aquellas discriminadas con un nivel de agresividad Q=1%.

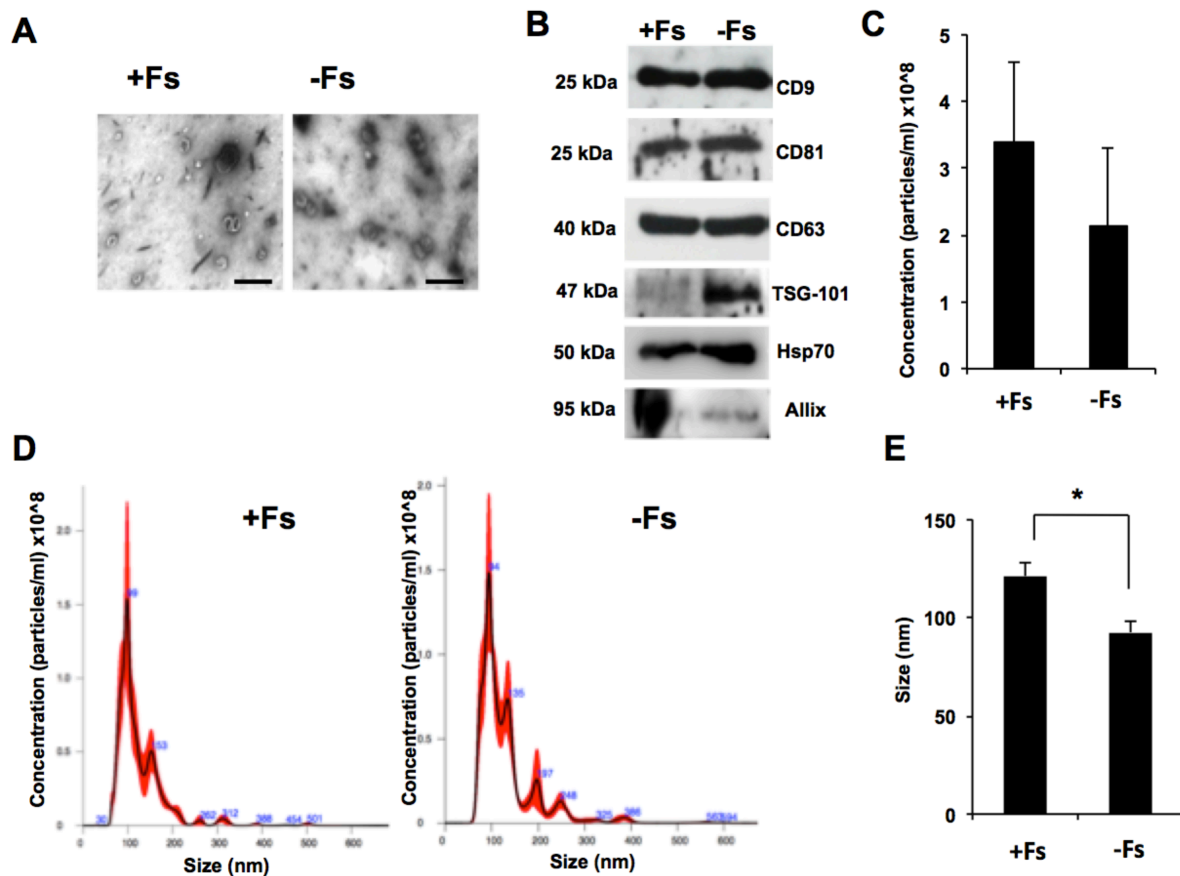
## RESULTADOS

### Caracterización de exosomas provenientes del suero

Los métodos para el aislamiento de estas microvesículas están en constante debate, y el aislamiento de exosomas por ultracentrifugación (UC) es el más ampliamente utilizado. Sin embargo, actualmente los métodos de aislamiento de exosomas a partir de fluidos biológicos consiguen menos pureza y eficiencia que los métodos de aislamiento a partir de medio condicionado de células (34). Con el objetivo de corroborar que el método de aislamiento utilizado nos permitía obtener exosomas, realizamos diferentes experimentos de caracterización de la muestra.

Las muestras fueron analizadas por microscopía electrónica (EM). Observamos que en ambas condiciones (+Fs, -Fs) los exosomas tienen forma redondeada y un tamaño adecuado (50-110 nm). (Fig.1A). Mediante análisis por Nanosight, corroboramos que el tamaño de las microvesículas se corresponde con el de los exosomas. (Fig.1D). Además, la población de exosomas -Fs muestra un tamaño significativamente menor que los exosomas procedentes del suero +Fs, siendo los exosomas +Fs de un tamaño de  $121\pm 14.3$  nm y los exosomas -Fs de un tamaño de  $92\pm 12.17$  nm. (Fig.1E). Respecto al número de partículas aisladas en cada condición, no observamos diferencias significativas. (Fig.1C).

Los exosomas contienen una gran cantidad de proteínas entre las que encontramos Hsp70, Tsg-101 y Allix. Sin embargo, la familia de proteínas con más presencia en los exosomas son las tetraspaninas, un tipo de proteína de membrana que entra en contacto con otras proteínas como integrinas, o los MHC de tipo I y II, lo que indica su implicación en la organización de complejos moleculares grandes (35). Con el objetivo de determinar el enriquecimiento de nuestra muestra en exosomas de suero, analizamos por Western Blot la presencia de las tetraspaninas: CD63, CD9 y CD81. Así como de Hsp70, Tsg-101 y Allix. Pudimos observar la presencia de todas ellas. (Fig. 1B).

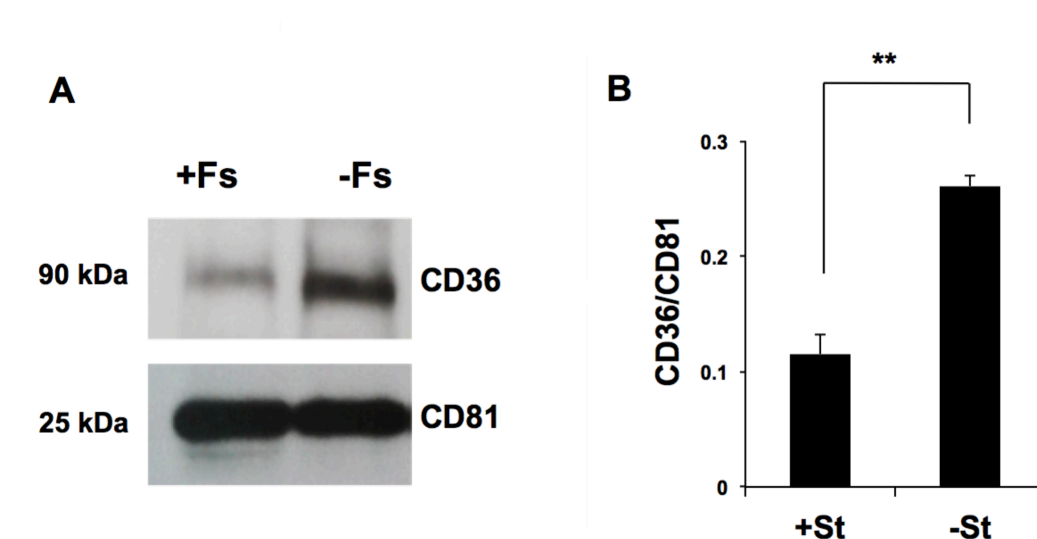


**FIGURA 1. Caracterización de los exosomas aislados de suero humano.** A) Microscopía electrónica de exosomas aislados de suero proveniente de voluntarios sanos en condiciones de ayuno (+Fs) y tras un desayuno rico hipercalórico (-Fs). La barra indica 100 nm. B) Análisis por Western Blot de la presencia en la muestra de tetraspaninas y otros marcadores de exosomas. C) Concentración media de exosomas en las muestras analizadas por Nanosight. D) Imagen representativa del análisis por Nanosight de las muestras de exosomas. E) Tamaño medio de exosomas de suero (+Fs, -Fs) analizados por Nanosight. (n=4, \*<0.05).

**Los exosomas aislados en condiciones de no ayuno (-Fs) presentan mayores niveles de CD36 que los exosomas aislados en condiciones de ayuno (+Fs)**

CD36 es una glicoproteína de membrana que se expresa de forma ubicua en numerosas células y tejidos, incluyendo plaquetas, eritrocitos, monocitos, células endoteliales y monocitos. Además de jugar un papel importante como molécula señalizadora, está implicada en el metabolismo lipídico,

en concreto en la captación de ácidos grasos libres (AGL), sobre todo de cadena larga (36). Sin embargo, su mecanismo de acción no es del todo conocido. La amplia expresión de CD36 en tejidos y células y su presencia en micropartículas circulantes, nos hizo pensar que esta glicoproteína podría también estar presente en los exosomas circulantes. Para ello, analizamos la presencia de CD36 en exosomas aislados de suero +Fs y -Fs mediante Western Blot. Pudimos observar que CD36 está presente en exosomas aislados de suero humano. (Fig. 2A). Además, la presencia de CD36 es mucho más mayor en la muestra aislada en condiciones +Fs, que en -Fs. (Fig. 2B).



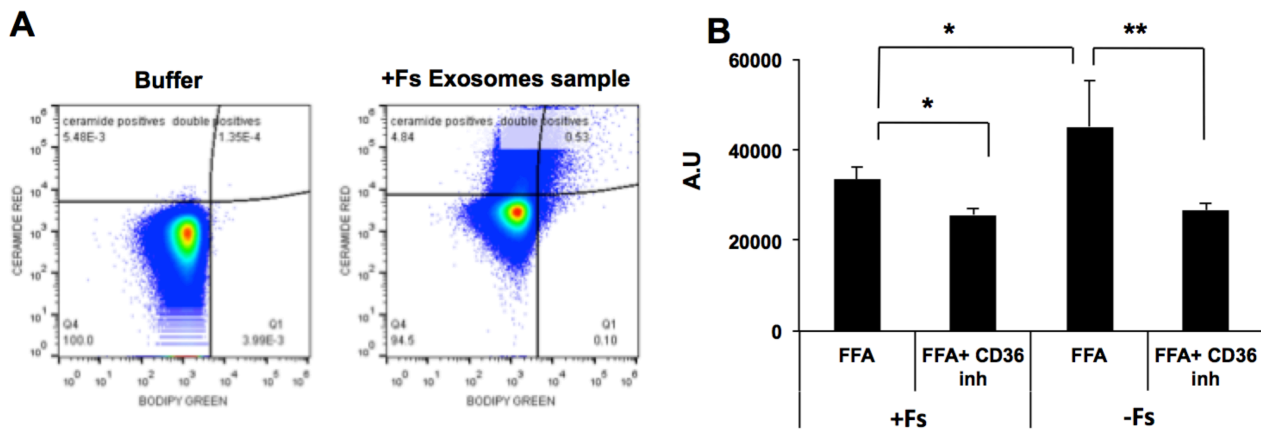
**FIGURA 2: CD36 se encuentra en exosomas humanos circulantes, con mayor presencia en exosomas aislados 20 minutos tras la ingesta calórica.** A) Western Blot de CD36 de exosomas aislados de suero +Fs y -Fs. B) Cuantificación de la señal de Western Blot (N=4, \*\*<0.01).

### **Los exosomas circulantes son capaces de incorporar ácidos grasos libres *in vitro* de manera dependiente de CD36**

Nuestros resultados demuestran que los exosomas -Fs presentan mayor cantidad de CD36 que los exosomas +Fs. Teniendo esto en cuenta, quisimos examinar si los exosomas aislados son capaces de captar activamente ácidos grasos, y si esta captación está mediada por CD36.

Para ello, incubamos las muestras con Bodipy 500/510 C1, C12. Bodipy es un análogo fluorescente de ácido graso ampliamente utilizado para el estudio del tráfico lipídico. Las muestras de exosomas aislados +Fs/-Fs fueron divididas en dos grupos. Previamente a la incubación con el lípido fluorescente, una muestra de cada condición fue incubada durante toda la noche con un inhibidor de CD36. Al día siguiente se midió la emisión de las muestras por citometría de flujo.

Observamos que los exosomas aislados tras el desayuno (-Fs) incorporaban más Bodipy que los exosomas aislados en condiciones de ayuno (+Fs). (Fig. 3). Además, las muestras tratadas con el inhibidor de CD36 mostraban una disminución significativa de captación de Bodipy en ambas condiciones (+Fs/-Fs). Los análisis estadísticos, nos indican una mayor significancia en la diferencia de emisión fluorescente en los exosomas -Fs en comparación con los exosomas +Fs.



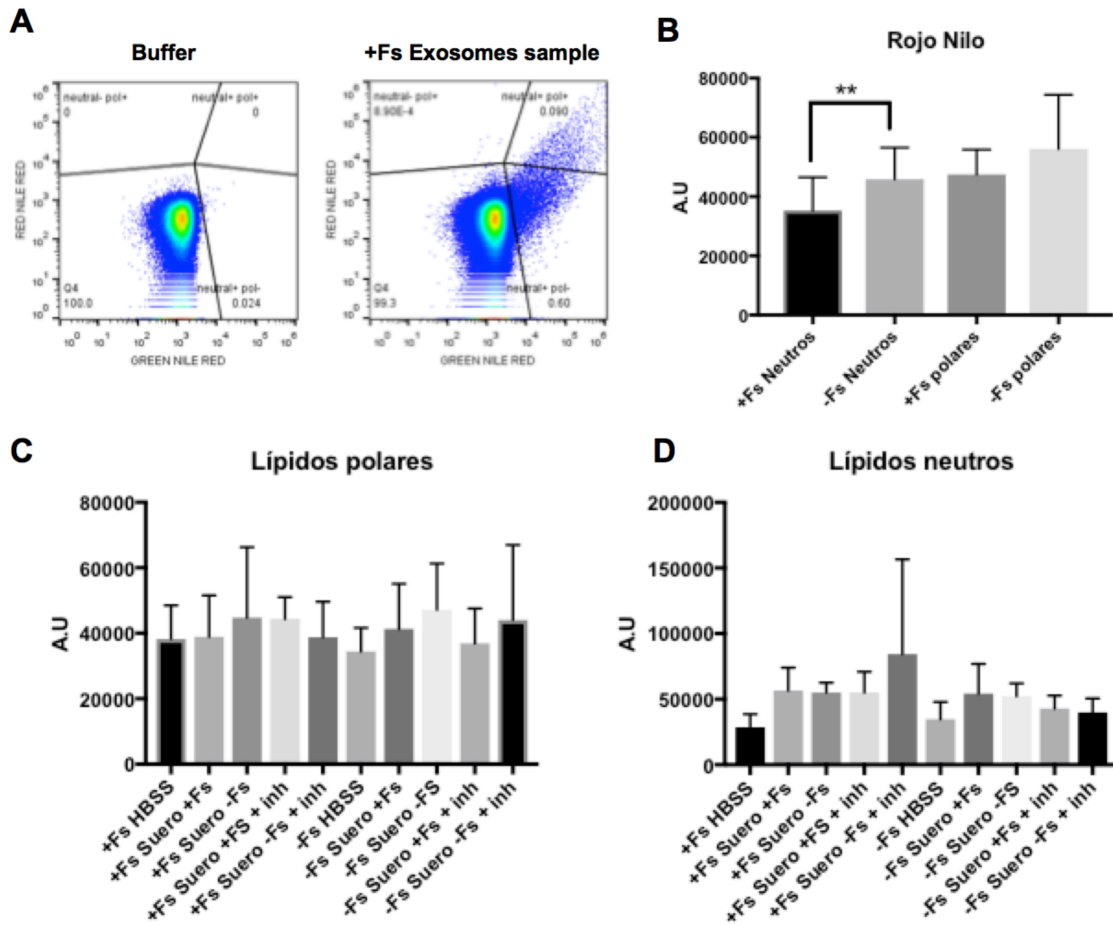
**FIGURA 3: Los exosomas circulantes son capaces de captar ácidos grasos libres de manera dependiente de CD36.** A) Imagen representativa del análisis por citometría de flujo de exosomas +Fs/-Fs incubados con Bodipy 500/510. B) Intensidad de señal fluorescente emitida por la muestra. (CD36 inh)(N=5, \*<0.05, \*\*<0.01).

### **Los exosomas aislados tras el desayuno, tienen una carga lipídica similar a los exosomas aislados en condiciones de ayuno**

La biogénesis de los exosomas es un proceso íntimamente relacionado con los lípidos, y su composición lipídica determina su origen y destino celular (29). La estrecha relación de los exosomas con los lípidos, y la presencia CD36 en ellos, nos hizo plantearnos la posibilidad de que los exosomas pudieran estar implicadas en el metabolismo o transporte de lípidos. Para ello realizamos un ensayo en el que los exosomas aislados en condiciones de ayuno (+Fs) y después de un desayuno hipercalórico (-Fs) fueron teñidos con Rojo Nilo. Esta tinción lipofílica nos permite determinar la proporción de lípidos apolares y polares presentes en la muestra, debido a que su espectro de emisión varía en función del grado de hidrofobicidad de los lípidos que tiñe (37). Así, los lípidos polares, como los fosfolípidos que forman la membrana celular y también de los exosomas, emiten en rojo; mientras que los lípidos apolares, como el colesterol o los triglicéridos, emiten en verde. (Fig. 4A). Una vez teñidos, los exosomas fueron analizados por citometría de flujo. Pudimos observar que los exosomas +Fs como -Fs presentaban un contenido lipídico distinto respecto a su contenido en lípidos neutros. (Fig. 4B). Por lo tanto, nuestros resultados indican que los exosomas circulantes poseen una carga lipídica diferente si son aislados en condiciones de ayuno, o tras una ingesta hipercalórica.

Para comprobar si este cambio en el contenido lipídico de los exosomas se debía a la célula de origen, o si por el contrario, los exosomas eran capaces de captar lípidos del medio; teñimos los exosomas aislados de ambas condiciones (+Fs/-Fs) con Rojo Nilo tras incubarlos durante 10 minutos con sueros +Fs y -Fs previamente depletados de exosomas. Después analizamos la emisión fluorescente de las muestras por citometría de flujo.

Lo que observamos tras el análisis de las muestras fue que existe una variabilidad muy elevada entre pacientes. Esto conduce a la necesidad de aumentar el número de réplicas de este experimento para obtener una población de muestras con una distribución normal, que nos permita realizar análisis estadísticos más relevantes. Sin embargo, aunque la diferencia entre los datos no es significativa, sí podemos observar una tendencia en las muestras. Mientras que respecto a los lípidos polares no observamos diferencias (Fig.4C); el contenido en lípidos neutros, como triglicéridos o colesterol sí parece mostrar una tendencia diferente entre los distintos grupos. (Fig. 4D).



**FIGURA 4: El contenido lipídico de los exosomas +Fs y -Fs es similar.** A) Imagen representativa del análisis por citometría de flujo de exosoma +Fs/-Fs incubados con Rojo Nilo. B) Intensidad de la señal emitida por las muestras teñidas con Rojo Nilo, en diferentes longitudes de onda en función de la presencia de lípidos polares y lípidos apolares. (N=8, P<0.05). C) Intensidad de emisión de fluorescencia roja (lípidos polares) de las muestras de exosomas +Fs/-Fs incubadas con HBSS y sueros +Fs/-Fs y teñidas con Rojo Nilo. (N=4, P<0.05) D) Intensidad de la emisión de fluorescencia verde (lípidos neutros) de las muestras de exosomas +Fs/-Fs incubadas con HBSS y sueros +Fs/-Fs y teñidas con Rojo Nilo.

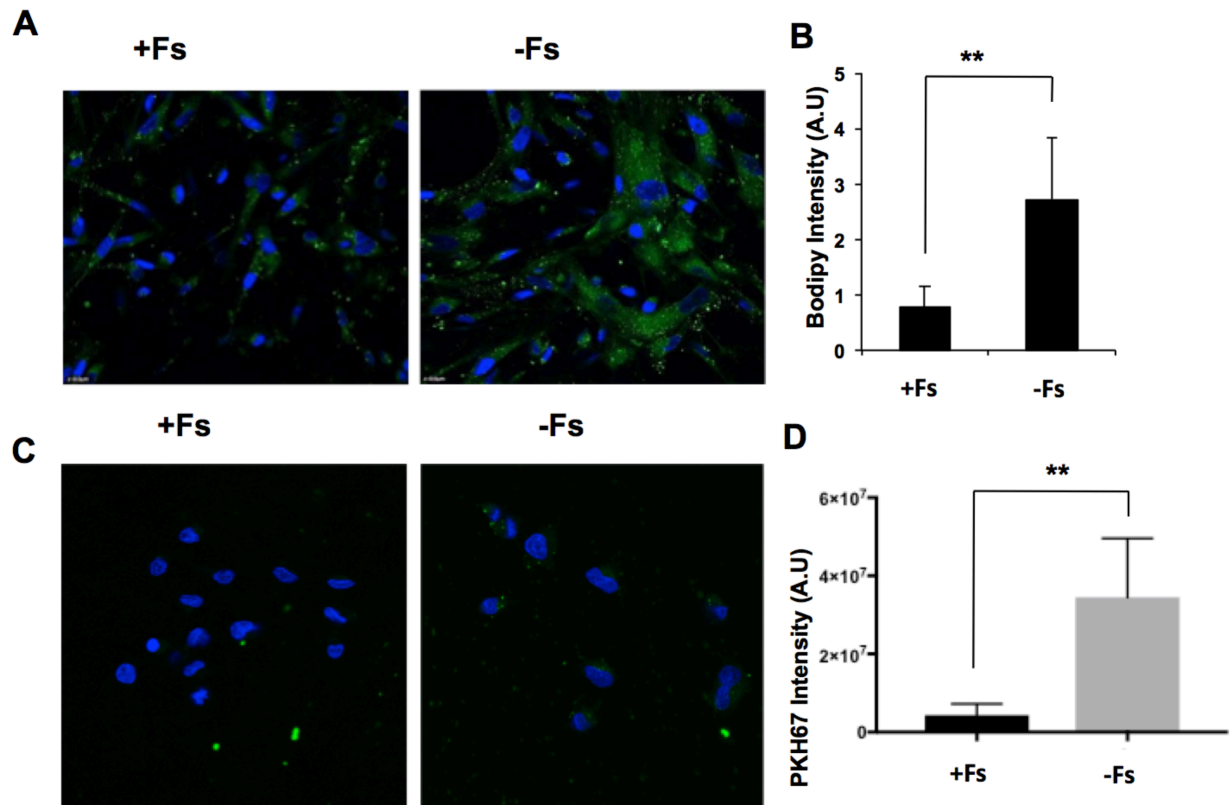
Observamos que las muestras de exosomas +Fs/-Fs incubadas con HBSS emiten una señal fluorescente menor en comparación con las muestras incubadas con sueros +Fs/-Fs, esto podría indicar que sí están captando los lípidos presentes en el suero. Además, la muestra de exosomas -Fs incubadas con inhibidor muestra una disminución de la emisión fluorescente. Creemos que la mayor presencia de CD36 en los exosomas -Fs, hace que el efecto del inhibidor sea más notable.



## **Los exosomas circulantes son captados *in vitro* por células de endotelio microvascular coronario y cardiomiocitos**

El corazón es uno de los órganos con mayor gasto lipídico; de hecho, presenta una expresión muy robusta de lipoproteín-lipasa (LPL), una enzima implicada en el proceso de hidrólisis de ácidos grasos esterificados, para la liberación de AGL. Estos AGL son captados por el tejido cardíaco a través del transportador CD36, ya que se ha visto que el ratón knock-out de CD36 produce una disfunción significativa de la captación de AGL por el corazón (38). Teniendo en cuenta la importancia de CD36 en el tejido cardíaco, y la presencia de este transportador en los exosomas circulantes aislados, nos planteamos la posibilidad de que estos exosomas estuvieran participando en un proceso de transporte de lípidos hacia tejidos como el corazón.

Quisimos estudiar si *in vitro*, los exosomas +Fs y -Fs, eran captados por las células. Como la primera barrera de entrada al miocardio es el endotelio, elegimos células humanas de endotelio microvascular cardíaco (hMVEC-C) y las incubamos con exosomas +Fs/-Fs cargados previamente con Bodipy 500/510. (Fig. 5A). Observamos que tanto los exosomas +Fs como los -Fs son captados por las células. Además, la diferencia de la señal fluorescente entre los dos grupos es significativa. (Fig. 5B). En este caso, la tinción con Bodipy 500/510, un análogo de ácido graso, es dependiente de la presencia de CD36, por lo tanto los exosomas -Fs, al presentar en su membrana mayor cantidad de CD36, captarán Bodipy de manera más eficiente. Esto nos hizo sospechar que la diferencia de señal entre ambos grupos, no estaría dando información respecto a qué tipo de exosomas son captados en mayor medida por las células. Para resolver esto, se realizó el mismo ensayo con cardiomiocitos humanos. (Fig. 5C). En este caso, la tinción utilizada fue PKH67, una tinción de membrana, ampliamente empleada en estudios con exosomas. Lo que observamos fue que las células incubadas con exosomas -Fs captaban más eficientemente que las células incubadas con exosomas +Fs. El análisis estadístico a partir de medidas de intensidad de fluorescencia determinada con el software *Image J* nos indicó diferencias significativas entre los cardiomiocitos incubados con exosomas +Fs y -Fs. (Fig. 5D).



**FIGURA 5: Los exosomas +Fs/-Fs son internalizados in vitro por células de endotelio microvascular coronario y cardiomiocitos.** A) Células de endotelio microvascular coronario (hMVEC-C) tratadas durante 15 minutos con exosomas +Fs/-Fs, previamente teñidos con Bodipy 500/510. Los núcleos están teñidos en azul (DAPI). B) Cuantificación de la fluorescencia emitida en verde. (N=4, \*\* <0.01). C) Línea celular de cardiomiocitos humanos (AC10) tratadas durante 15 minutos con exosomas +Fs/-Fs, previamente teñidos PKH67. Los núcleos están teñidos en azul (DAPI). D) Cuantificación de la fluorescencia emitida en verde. (N=2, \*\* <0.01).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Con el objetivo de determinar el papel de los exosomas circulantes en el metabolismo y transporte lipídico, en este trabajo hemos estudiado y caracterizado exosomas circulantes aislados de donantes sanos en condiciones de ayuno (+Fs), y tras un desayuno hipercalórico (-Fs). A la vista de los resultados obtenidos, podemos determinar que: a) los exosomas circulantes contienen CD36, b) la presencia de CD36 difiere entre exosomas +Fs y -Fs, siendo mayor en los exosomas aislados tras el desayuno, c) la carga lipídica de exosomas +Fs y -Fs es diferente, y d) los exosomas circulantes captan ácidos grasos libres (AGL) mediante CD36.

CD36 fue identificada inicialmente en plaquetas (13), y posteriormente se demostró su expresión en numerosos tejidos y células. Más tarde, Handberg *et al.* (24) determinaron la presencia de CD36 en plasma humano en forma soluble (sCD36), postulándola como un marcador de riesgo para el desarrollo de diabetes *mellitus* tipo II. Se consideró que sCD36 podría ser producto proteolítico de CD36 hasta que recientemente fue identificada en plasma la versión intacta de CD36 asociada a micropartículas (MPs) (39). Los resultados obtenidos con este trabajo, nos permiten confirmar que CD36 se encuentra presente en plasma de forma íntegra, y asociada a un tipo específico de micropartículas, los exosomas.

El transporte lipídico está mediado no solo por proteínas transportadoras (transportadores ABC, FABP) sino también por vesículas. Las corrientes de opinión actuales postulan que este transporte lipídico mediado por vesículas ocurre principalmente a nivel intracelular. Sin embargo, los exosomas liberados por una célula donadora transportan lípidos (esfingomielina, colesterol, fosfatidilserina, prostaglandinas y ácidos grasos libres) tanto en la membrana como en el lumen (29). Se ha visto que los exosomas transportan diferentes tipos de ácidos grasos que pueden formar parte del propio exosoma, o bien ser cargados durante la biogénesis de la vesícula en la célula donadora (40). En este trabajo, hemos demostrado por primera vez que los exosomas circulantes son capaces de cargar activamente AGL. Estos resultados demuestran que los exosomas están implicados en el transporte lipídico, y no como parte de un proceso pasivo, sino como un proceso regulado y activo. No menos importante, nuestros resultados muestran que la captación de AGL por los exosomas, está mediada por CD36. En los exosomas aislados de suero humano, la presencia de CD36 cambia significativamente entre las muestras de exosomas +Fs y -Fs, lo que confiere a estos dos grupos características diferentes respecto a la capacidad de

captación lipídica. En conjunto, estos hallazgos apuntan a que los exosomas presentes en circulación, o bien las células que los secretan, responden a estímulos metabólicos, cambian sus características y participan en el metabolismo y transporte lipídicos.

La presencia en exosomas de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico ha sido estudiado anteriormente (29), confirmando la presencia de tres clases de fosfolipasas A2, y otras enzimas implicadas en el metabolismo de eicosanoides. Sin embargo, no existen referencias en el caso de exosomas circulantes. A la vista de los resultados obtenidos, en este trabajo decidimos estudiar la presencia de tres proteínas que podrían estar implicadas en el transporte; las proteínas de unión a ácidos grasos FABP1 –específica de hígado-, y FABP3 –específica de corazón-; y proteínas implicadas en el metabolismo lipídico, ACSL1, primera enzima de la ruta para la metabolización de ácidos grasos. Nuestros resultados mostraron que estas proteínas no se encuentran presentes en los exosomas circulantes. Sin embargo, la presencia de otras muchas enzimas no queda descartada.

La composición lipídica de vesículas extracelulares (EVs) en fluidos biológicos está poco caracterizada, a excepción de las EVs procedentes de fluidos seminales (prostasomas) y orina (41). En este trabajo, hemos estudiado el contenido lipídico de los exosomas circulantes mediante el uso de la tinción Rojo Nilo, que nos permite determinar la cantidad relativa de lípidos neutros y lípidos polares que componen la muestra de exosomas. Hemos demostrado que el contenido lipídico de exosomas circulantes es diferente antes y después del desayuno. En cuanto a su contenido en lípidos polares no hemos detectado diferencias significativas entre los dos grupos de exosomas. Sin embargo, respecto al contenido en lípidos neutros sí observamos diferencias significativas entre exosomas +Fs y –Fs. Los lípidos neutros engloban principalmente a colesterol y triglicéridos, y se encuentran en el lumen de los exosomas. En concreto, el colesterol es uno de los componentes principales de los exosomas, y su acumulación en el endosoma de la célula donadora, es un factor fundamental en la regulación de la producción exosomal. El proceso por el cual los exosomas se cargan con lípidos neutros como el colesterol está bien estudiado, siendo la procedencia de dichos lípidos la célula donadora. En este trabajo hemos demostrado que la carga lipídica de los exosomas circulantes cambia en condiciones de ayuno y tras una ingesta calórica. Para comprobar si el proceso de carga de nuestros exosomas era dependiente de la célula de origen decidimos medir su contenido lipídico tras incubarlos con sueros +Fs y –Fs. Los resultados obtenidos nos indican que el contenido en lípidos polares no se ve afectado. Sin embargo, las

muestras evidencian una tendencia en la captación de lípidos neutros, por la cual los exosomas incubados con sueros +Fs y -Fs muestran mayor contenido en lípidos neutros en comparación con el grupo control. A falta de nuevos experimentos que reafirmen estos datos, creo que los exosomas circulantes también están siendo capaces de captar lípidos neutros como el colesterol, directamente desde el suero, por un mecanismo que puede implicar a CD36 entre otros.

El corazón, como otros muchos órganos, requiere de lípidos como fuente de energía. Los ácidos grasos libres aportan el 70% del ATP necesario para una función cardíaca normal; y la delección genética de CD36 ha demostrado la importancia de este transportador para la captación de lípidos en el músculo cardíaco (42). En este trabajo demostramos que los exosomas circulantes son captados por células de endotelio microvascular y cardiomiocitos humanos; y que los exosomas -Fs lo hacen de forma más eficiente. Estos resultados, aunque preliminares, apoyan la hipótesis de que los exosomas se cargan de lípidos en el torrente circulatorio y transfieren el contenido lipídico a tejidos específicos con como el corazón.

Los ácidos grasos libres (AGL) son esenciales como fuente de energía para el organismo; sin embargo, su concentración elevada conduce a efectos negativos como la disfunción mitocondrial, producción de ROS, inflamación y muerte celular (3). Además de su obtención mediante el proceso de lipólisis en el tejido adiposo, gran parte de los AGL provienen de la dieta. Tras su absorción, los lípidos son encapsulados en quilomicrones, que los transportan por la sangre hasta distintos tejidos para su utilización y almacenaje. Sin embargo, parte de los AGL se “saltan” alguno de los pasos en este proceso aumentando así el *pool* de AGL en plasma. Este mecanismo es denominado *spillover*. La concentración elevada de AGL, alimentada en gran parte por el mecanismo de *spillover*, está implicado en el desarrollo de diabetes mellitus tipo II, aterosclerosis e hipertensión (43)(44). Del mismo modo, niveles elevados de CD36 se han relacionado con la resistencia a insulina, y como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Teniendo estos factores en cuenta, en este trabajo proponemos que los exosomas circulantes, al presentar CD36 y ser capaces de captar AGL, podrían estar implicados de algún modo en este mecanismo de *spillover*.

Con este estudio, conseguimos demostrar que los exosomas circulantes son capaces de captar ácidos grasos libres en función de CD36 y que su contenido en lípidos varía entre las condiciones de ayuno y tras una comida hipercalórica. Todos estos resultados conducen a la idea de que los

exosomas circulantes están formando parte activa en el proceso de metabolismo y transporte de lípidos en el organismo. A partir de estos hallazgos, surgen nuevas preguntas que pueden ayudar a descifrar el papel de los exosomas en el metabolismo lipídico. En primer lugar, nos planteamos cuáles son los tejidos responsables de la liberación de los exosomas presentes en el suero, y si el origen estos exosomas es el mismo en condiciones de ayuno y tras una comida hipercalórica. Una posible aproximación sería la caracterización de los exosomas en función de su composición de integrinas, tal y como ha estudiado anteriormente el grupo de Hoshino *et al.* (45) en el caso de exosomas en el entorno metastásico.

Los resultados de los experimentos de captación *in vitro* obtenidos en este estudio sugieren que los exosomas cargados con lípidos desde la sangre, poseen un tropismo cardíaco, diferente al de los exosomas no cargados. Para poder confirmar estos resultados sería conveniente realizar experimentos *in vivo* que permitan localizar los exosomas aislados a partir de sueros +Fs y -Fs en diferentes órganos, y así determinar el tropismo de estas microvesículas a nivel fisiológico. A este respecto nuestra hipótesis de trabajo es que los exosomas cargados de lípidos tendrían un tropismo preferencial hacia tejidos con importante gasto lipídico, como es el caso del tejido cardíaco.

Como hipótesis de futuro, considero que sería de gran interés en el campo del metabolismo lipídico encontrar enzimas del metabolismo de AGL en los exosomas circulantes, ya que supondría un cambio en el concepto clásico del metabolismo celular. Anteriormente se ha demostrado que los exosomas derivados de cardiomiocitos se cargan de transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas y son capaces de activar la captación y metabolismo de glucosa en las células diana (46). En vista de nuestros resultados, los exosomas circulantes tienen un papel activo en el transporte de AGL. Creo que el hecho de que los exosomas tengan la capacidad de captar AGL aporta un propósito al *spillover* lipídico en plasma ya que dichas vesículas recogerían los AGL liberados para transportarlos a un órgano. Tras observar la ausencia de ACSL1, FABP1 y FABP3, consideramos interesante, como siguiente paso, estudiar la presencia en los exosomas circulantes de ATGL, HSL y MGL; principales enzimas implicadas en el proceso de hidrólisis de triglicéridos. La presencia de enzimas del metabolismo lipídico en exosomas circulantes, supondría la introducción dirigida en la célula diana no solo de lípidos de origen externo, sino también del conjunto de enzimas metabólicas asociadas a los mismos. Este proceso poco descrito actualmente abriría la puerta para comprender la etiología de diversas patologías metabólicas,

dando pie al diseño de nuevas terapias cuya diana serían los exosomas y su papel en el metabolismo lipídico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schönekeess BO. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1213(3):263–76.
2. Kim TT, Dyck JRB. The role of CD36 in the regulation of myocardial lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;1861(10):1450–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.03.018>
3. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, et al. FAT SIGNALS - Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;15(3):279–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.018>
4. Vallerie SN, Hotamisligil GS. The Role of JNK Proteins in Metabolism. *Sci Transl Med* [Internet]. 2010;2(60):60rv5-60rv5. Available from: <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.3001007>
5. Unger RH, Clark GO, Scherer PE, Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2010. p. 209–14.
6. Kraegen EW, Cooney GJ. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(3):235–41.
7. Taschler U, Radner FPW, Heier C, Schreiber R, Schweiger M, Schoiswohl G, et al. Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J Biol Chem*. 2011;286(20):17467–77.
8. Hamilton J a, Kamp F. How Are Free Fatty Acids Transported in. *Diabetes*. 1999;48:2255–69.
9. Hamilton J a. Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res*. 1998;39:467–81.
10. Abumrad N, Harmon C, Ibrahimi A. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J Lipid Res* [Internet]. 1998;39(12):2309–18. Available from: <http://www.jlr.org/content/39/12/2309.full>
11. van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF, Hasselbaink DM, Luiken JJ. Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. *Mol Cell Biochem*. 2002;239(1–2):9–15.



12. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC, Aasum E, et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* [Internet]. 2010;90(1):207–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20086077>
13. Tandon NN, Lipsky RH, Burgess WH, Jamieson GA. Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem*. 1989;264(13):7570–5.
14. Talle MA, Rao PE, Westberg E, Allegar N, Makowski M, Mittler RS, et al. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cell Immunol*. 1983;78(1):83–99.
15. Li Y-S, Shyy Y-J, Wright JG, Valente AJ, Cornhill JF, Kolattukudy PE. The expression of monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human vascular endothelium in vitro and in vivo. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 1993;126(1):61–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01772208>
16. Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*. United States; 1993 Aug;268(24):17665–8.
17. Schubert W. Triple immunofluorescence confocal laser scanning microscopy: spatial correlation of novel cellular differentiation markers in human muscle biopsies. *Eur J Cell Biol*. Germany; 1991 Aug;55(2):272–85.
18. Van Nieuwenhoven FA, Verstijnen CP, Abumrad NA, Willemsen PH, Van Eys GJ, Van der Vusse GJ, et al. Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun*. United States; 1995 Feb;207(2):747–52.
19. Park YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;46(6):e99. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/emm.2014.38>
20. Berger G, Caen JP, Berndt MC, Cramer EM. Ultrastructural demonstration of CD36 in the alpha-granule membrane of human platelets and megakaryocytes. *Blood* [Internet]. 1993;82(10):3034–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693034>
21. Coburn CT, Knapp FFJ, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA. Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem*. United States; 2000 Oct;275(42):32523–9.
22. Ibrahimi A, Abumrad NA. Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids.

Curr Opin Clin Nutr Metab Care. England; 2002 Mar;5(2):139–45.

23. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2001 Sep 15;108(6):785–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC200943/>
24. Handberg A, Levin K, Højlund K, Beck-Nielsen H. Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: A novel marker of insulin resistance. *Circulation*. 2006;114(11):1169–76.
25. Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM. Microvesicles and exosomes: New players in metabolic and cardiovascular disease. *J Endocrinol*. 2016;228(2):R57–71.
26. Stepanian A, Bourguignat L, Hennou S, Coupaye M, Hajage D, Salomon L, et al. Microparticle increase in severe obesity: Not related to metabolic syndrome and unchanged after massive weight loss. *Obesity*. 2013;21(11):2236–43.
27. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015;4:27066. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979354>
28. Record M, Poirot M, Silvente-Poirot S. Emerging concepts on the role of exosomes in lipid metabolic diseases. *Biochimie*. 2014. p. 67–74.
29. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1841(1):108–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.10.004>
30. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med* [Internet]. 2013;7(5):769–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24044569>
31. Tomlinson PR, Zheng Y, Fischer R, Heidasch R, Gardiner C, Evetts S, et al. Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2015;2(4):353–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/acn3.175>
32. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. *Circ Res* [Internet]. 2017;120(10):1674–86. Available from: <http://circres.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIRCRESAHA.117.309419>

33. Thierry, Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Curr Protoc Cell Biol* [Internet]. 2006;Chapter 3:1–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18228490>
34. Baranyai T, Herczeg K, Onodi Z, Voszka I, Mados K, Marton N, et al. Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One*. 2015;10(12):1–13.
35. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):569–79.
36. Jensen MD. 1 Free Fatty Acid Uptake in Humans with CD36 Deficiency Kazanna C. *Hames*. :1–28.
37. Diaz G, Melis M, Batetta B, Angius F, Falchi AM. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron*. 2008;39(7):819–24.
38. Kuang M, Febbraio M, Wagg C, Lopaschuk GD, Dyck JRB. Fatty Acid Translocase/CD36 Deficiency Does Not Energetically or Functionally Compromise Hearts before or after Ischemia. *Circulation*. 2004;109(12):1550–7.
39. Alkhatatbeh MJ, Mhaidat NM, Enjeti AK, Lincz LF, Thorne RF. The putative diabetic plasma marker, soluble CD36, is non-cleaved, non-soluble and entirely associated with microparticles. *J Thromb Haemost*. 2011;9(4):844–51.
40. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res* [Internet]. 2010;51(8):2105–20. Available from: <http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.M003657>
41. Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res* [Internet]. Failure:Problem in retrieving ISSN for S0163782716300492; 2017;66:30–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>
42. Park T-S, Yamashita H, Blaner WS, Goldberg IJ. Lipids in the heart: a source of fuel and a source of toxins. *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2007;18(3):277–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17495601>
43. Almandoz JP, Singh E, Howell LA, Grothe K, Vlazny DT, Smailovic A, et al. Spillover of fatty acids during dietary fat storage in type 2 diabetes: Relationship to body fat depots and

effects of weight loss. *Diabetes*. 2013;62(6):1897–903.

44. Miles JM, Nelson RH. Contribution of triglyceride-rich lipoproteins to plasma free fatty acids. *Horm Metab Res*. 2007;39(10):726–9.
45. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;527(7578):329–35. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature15756>
46. Garcia NA, Moncayo-Arlandi J, Sepulveda P, Diez-Juan A. Cardiomyocyte exosomes regulate glycolytic flux in endothelium by direct transfer of GLUT transporters and glycolytic enzymes. *Cardiovasc Res*. 2016;109(3):397–408.