

Galectina-3 e metabolismo

Ruolo di galectina-3 nel differenziamento e nell'infiammazione del tessuto adiposo

Claudia Blasetti Fantauzzi

Introduzione

L'importanza funzionale della galectina-3 nell'ambito delle malattie metaboliche è un tema storico del nostro laboratorio, dove negli anni è stato dimostrato come questa lectina espliciti un ruolo protettivo nei confronti delle complicanze vascolari del diabete e della sindrome metabolica attraverso la sua funzione AGE/ALE recettoriale (1).

Recentemente sono emerse nuove e affascinanti, seppur contrastanti, evidenze riguardo ad un ruolo della galectina-3 anche nello sviluppo del diabete stesso. Due lavori hanno infatti mostrato un aumento dell'adiposità e dell'infiammazione sia sistemica che a livello del tessuto adiposo associata ad alterata omeostasi del glucosio in topi knockout per galectina-3 (*Lgals3^{-/-}*) nutriti con una dieta ad alto contenuto di grassi (2,3). Pang *et al.* hanno inoltre dimostrato che l'ablazione di galectina-3 era in grado di indurre alterazioni simili anche nei topi alimentati con dieta a normale contenuto di grassi e, soprattutto, che l'aumento della glicemia a digiuno e l'alterata risposta ad un carico di glucosio precedevano lo sviluppo dell'eccessiva adiposità e dell'infiammazione, a livello sia sistemico che del tessuto adiposo viscerale (VAT), a suggerire una compromissione primitiva della funzione β -cellulare (2).

In maniera discordante, Baek *et al.* (4) hanno più di recente dimostrato un ruolo stimolatorio di galectina-3 nella adipogenesi. Infatti, l'ablazione di questa lectina si associava ad una riduzione del peso corporeo in risposta sia all' HFD che all'invecchiamento. Inoltre, la galectina-3, interagendo in maniera diretta con il PPAR γ , era in grado di modularne la traslocazione nucleare e la conseguente attivazione e, per converso, il suo silenziamento rallentava il differenziamento delle cellule 3T3-L1 in adipociti maturi. Infine, i livelli plasmatici di glucosio non differivano tra i due genotipi, ancora una volta in contrasto con Pang *et al.* (2) e Pejnovic *et al.* (3), sebbene il metabolismo del glucosio non sia stato studiato in maniera sufficientemente approfondita da Baek *et al.* (4). In aggiunta a questi lavori, un recentissimo articolo del gruppo di Olefsky (5) ha dimostrato come la galectina 3 circolante secreta dai macrofagi di individui obesi sia in grado di interagire in modo diretto con il recettore insulinico inibendone il signaling a valle e instaurando l'insulino resistenza e l'intolleranza al glucosio.

L'insieme di questi dati, tutti principalmente focalizzati sugli effetti metabolici e infiammatori della dieta ad alto contenuto di grassi, seppure in parte contrastanti tra loro probabilmente anche a causa di differenze di background e di età dei topi analizzati, suggeriscono comunque un possibile ruolo di galectina-3 nella modulazione della adipogenesi e della omeostasi glucidica, sebbene rimanga da chiarirne la funzione soprattutto in un contesto di assenza di stimolo obesogeno e diabetogeno.

Scopo

Alla luce dei dati di letteratura, questo progetto ha avuto lo scopo di investigare il ruolo di galectina-3 nel mantenimento dell'omeostasi glucidica, focalizzandosi sulla sua possibile funzione nella modulazione dell'adipogenesi e, come conseguenza, nella regolazione della sensibilità insulinica non solo a livello del tessuto adiposo ma anche del muscolo e sistemico.

Materiali e Metodi

Tutte le analisi sono state effettuate su topi Wild Type (WT) e knockout per galectina-3 (*Lgals3*^{-/-}). Per le analisi metaboliche i topi avevano tra 1 e 5 mesi di vita; le indagini sul tessuto adiposo, invece, si sono concentrate su campioni raccolti da topi di 2 mesi di età. Mensilmente sono stati misurati il peso, la glicemia e l'insulinemia a digiuno, da cui sono stati calcolati l'indice HOMA-IR e HOMA-%B. Il test intraperitoneale di tolleranza al glucosio (IPGTT) è stato effettuato a 1 e 5 mesi di età. Colture di tessuto adiposo viscerale (VAT) e di muscolo (gastrocnemio) sono state stimulate con o senza insulina e un analogo del glucosio (2-DG) e indagate riguardo alla loro capacità di assorbire il glucosio in maniera insulino-dipendente mediante un kit colorimetrico (Sigma MAK083). Su colture di VAT è stato analizzato il livello di attivazione dipendente dall'insulina dell'Akt attraverso il Western blot. La struttura e la dimensione degli adipociti del VAT, del tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) e del tessuto adiposo bruno (BAT) sono state esaminate attraverso morfometria. L'infiltrazione macrofagica e il grado di infiammazione sono stati indagati mediante IHC per F4/80 e qPCR per F4/80, IL1 β , MCP1, TNF β , IL6 su VAT, SAT e BAT. I livelli sierici di citochine infiammatorie (IL-1 β , TNF- α e IL6) sono stati valutati attraverso ELISA. Cellule precursori stromali vascolari derivate da tessuto adiposo di topi WT e *Lgals3*^{-/-} di 6 settimane sono state isolate dal SAT e messe in coltura. I precursori sono stati coltivati in terreno di differenziamento adipogenico per 15 giorni e il livello di maturazione è stato indagato tramite la colorazione Oil-Red O e le analisi di espressione genica dei principali marcatori di differenziamento cellulare.

Risultati e Discussione

Questi studi hanno dimostrato che, pur in assenza di differenze significative nella massa adiposa, i topi *Lgals3*^{-/-} di 2 mesi di età avevano un importante difetto nell'adipogenesi, evidenziato dalla presenza di adipociti più piccoli, immaturi e disfunzionali e al tempo stesso più numerosi. In particolare, l'analisi morfometrica effettuata sul VAT di questi topi ha rivelato nei *Lgals3*^{-/-} una minore dimensione ma una maggiore densità degli adipociti. Inoltre, l'espressione dei geni adipogenici e lipogenici era ridotta, mentre quella dei marker di infiammazione risultava aumentata nel VAT dei *Lgals3*^{-/-}. In aggiunta, le analisi di immunoistochimica per l'F4/80 indicavano un aumento dell'infiltrato macrofagico nel tessuto *Lgals3*^{-/-} rispetto ai WT. Da notare come le medesime alterazioni si riscontrassero anche a livello del tessuto adiposo sottocutaneo bianco dei topi *Lgals3*^{-/-}, anche se, a differenza del VAT, in questo deposito non risultava esserci una significativa infiltrazione macrofagica, né erano evidenti zone caratterizzate da aumentata lipolisi che invece si riscontravano nel tessuto viscerale. In maniera interessante, l'estensione dell'analisi a livello del tessuto adiposo bruno ha evidenziato anche in questo caso alterazioni sia a livello istologico che molecolare. In particolare, il BAT dei *Lgals3*^{-/-} era caratterizzato da un minor accumulo lipidico e da ridotta espressione genica dei marcatori di adipogenesi, lipogenesi nonché dei geni specifici del fenotipo bruno, ma da una aumentata espressione di marcatori di fibrosi.

Infine, all' infiammazione tissutale si aggiungeva un modesto ma comunque significativo aumento di IL6 serica nei topi deficienti per galectina-3 rispetto ai WT.

Per verificare se le alterazioni riscontrate nel tessuto adiposo dei topi *Lgals3*^{-/-} dipendessero da un difetto nell'adipogenesi, cellule precursori stromali vascolari (ASC) sono state isolate dal tessuto adiposo dei topi *Lgals3*^{-/-} e WT e indotte al differenziamento adipogenico *in vitro* per 15 giorni. Come atteso, le ASC *Lgals3*^{-/-} mostravano una difettosa adipogenesi, con mantenimento di un fenotipo prettamente indifferenziato (fibroblasto-like) e negativo alla colorazione Oil-Red-O anche dopo 2 settimane dall'induzione del differenziamento, laddove le ASC dei WT si differenziavano in adipociti di forma tondeggianti pieni di gocce lipidiche positive alla colorazione. L'analisi trascrizionale di queste cellule confermava quanto notato a livello morfologico, con le ASC dei *Lgals3*^{-/-} indotte al differenziamento caratterizzate da un aumento di espressione di Pref-1, un marker dei preadipociti e inibitore del differenziamento, e più bassi livelli di geni adipogenici di metabolismo lipidico rispetto alle WT indotte. Degna di nota è anche la drastica riduzione dell'espressione della proteina disaccoppiante 1 (UCP1), marker specifico degli adipociti bruni e beige, sia nel SAT che nelle ASC indotte al differenziamento adipogenico dei topi *Lgals3*^{-/-}.

In maniera interessante, il fenotipo immaturo e pro-infiammatorio del tessuto adiposo viscerale era associato a una compromissione dell'attivazione dell'AKT dipendente dall'insulina e a una significativa riduzione dell'espressione genica del trasportatore di glucosio GLUT4 e di IRS1, a cui corrispondeva una drastica diminuzione della capacità del tessuto di assorbire il glucosio in risposta all'insulina. Seppur in minor misura rispetto al tessuto adiposo, anche nel muscolo si riscontrava una riduzione significativa dell'insulino sensibilità, risultando in una insulino-resistenza sistemica, come indicato dai risultati dell'indice HOMA-IR. Coerentemente, i topi *Lgals3*^{-/-} avevano valori di insulinemia doppi rispetto ai WT già a 1 mese di vita, a indicare un tentativo di compensazione della resistenza insulinica periferica. Tuttavia, in maniera dipendente dall'età, questo valore tendeva a diminuire fino a raggiungere livelli significativamente ridotti rispetto ai WT a 5 mesi di vita. A questo si associava una opposta tendenza all'aumento della glicemia a digiuno che diventava significativo a 3 mesi di età. Questo dato, unito alla spontanea insorgenza dell'intolleranza glucidica già a 1 mese di vita che poi si mantiene anche a 5 mesi, dove l'indice HOMA-%B risultava inoltre significativamente ridotto rispetto ai WT, suggerisce l'insorgenza in questi topi *Lgals3*^{-/-} di una compromissione della funzione β -cellulare in maniera dipendente dall'età.

Concludendo, questi dati suggeriscono l'ipotesi che la difettosa adipogenesi che caratterizza questi animali possa esitare nella formazione di tessuto adiposo disfunzionale e quindi capace di causare infiammazione ed insulino-resistenza sia locale che sistemica, che a lungo andare portano ad una riduzione della riserva funzionale β -cellulare, forse congenitamente compromessa in questi topi, e quindi alla comparsa di iperglicemia.

Bibliografia

1. Pugliese G, Iacobini C, Pesce CM, Menini S. Galectin-3: an emerging all-out player in metabolic disorders and their complications. *Glycobiology*. 2015; 25:136-150.
2. Pang J, Rhodes DH, Pini M, Akasheh RT, Castellanos KJ, Cabay RJ, Cooper D, Perretti M, Fantuzzi G. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in galectin-3 KO mice. *PLoS One*. 2013; 8:e57915.
3. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, Zdravkovic NS, Djukic AL, Arsenijevic NN, Lukic ML. Galectin-3 deficiency accelerates

high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes*. 2013; 62:1932-1944.

4. Baek JH, Kim SJ, Kang HG, Lee HW, Kim JH, Hwang KA, Song J, Chun KH. 2015. Galectin-3 activates PPAR γ and supports white adipose tissue formation and high-fat diet-Induced obesity. *Endocrinology*. 2015; 1:147-156.
5. Li P., Liu S., Lu M.,...Olefsky J.M. 2016. Hematopoietic-Derived Galectin-3 Causes Cellular and Systemic Insulin Resistance. *Cell* 2016; 167, 973–984