

Galectina-3 e metabolismo

Ruolo di galectina-3 nel differenziamento e nell'infiammazione del tessuto adiposo e impatto sull'omeostasi glucidica

Claudia Blasetti Fantauzzi

Introduzione

Galectina-3 è una proteina espressa in numerosi tessuti e in grado di svolgere una varietà di ruoli in molteplici processi fisiologici e patologici. Per esempio, nostri studi precedenti hanno 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). In maniera interessante, ben 4 lavori differenti (2,3,4,5) hanno di recente dimostrato evidenze riguardo ad un ruolo della galectina-3 anche nello sviluppo della adiposità, della insulino-resistenza e del diabete stesso. Questi studi, tutti principalmente focalizzati sugli effetti metabolici e infiammatori della dieta ad alto contenuto di grassi, erano tuttavia in parte contrastanti tra di loro. In particolare, mentre Pang *et al.* e Pejnovic *et al.* suggeriscono un'azione protettiva di galectina-3 nello sviluppo della adiposità e del diabete sia spontanei che indotti da una dieta ad alto contenuto di grassi (2,3), Baek e collaboratori, al contrario, hanno dimostrato un ruolo stimolatorio della galectina-3 nella adipogenesi mediante una azione diretta di questa lectina sul PPAR γ (4). Infine, 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. Comunque, in generale, tutti questi dati, seppur contrastanti tra loro, probabilmente anche a causa di differenze di background e di età dei topi analizzati, suggerivano comunque un possibile ruolo di galectina-3 nella modulazione della adipogenesi e della omeostasi glucidica, sebbene rimanesse da chiarirne la funzione soprattutto in un contesto di assenza di stimolo obesogeno e diabetogeno.

Dati preliminari e Scopo

In quest'ottica, gli studi svolti grazie al contributo di una borsa di studio FO.DI.RI.-MSD 2014-2015 hanno consentito di ipotizzare un possibile legame tra il difetto di adipogenesi e l'alterata omeostasi glucidica negli animali knockout per galectina-3 (*Lgals3*^{-/-}). Questi studi hanno infatti dimostrato che, pur in assenza di differenze significative nella massa adiposa, i topi *Lgals3*^{-/-} a dieta standard di 2 mesi avevano un importante difetto nell'adipogenesi, evidenziato dalla presenza di adipociti più piccoli, immaturi e disfunzionali e al tempo stesso più numerosi. Questo difetto si associava ad un fenotipo pro-infiammatorio del tessuto adiposo e allo sviluppo spontaneo e precoce di insulino-resistenza a livello sia sistemico che del tessuto adiposo viscerale (VAT); coerentemente, questi topi mostravano ridotta tolleranza al glucosio già a 1 mese di età. Infine, la funzione β -cellulare andava incontro ad una drastica riduzione in maniera età-dipendente, con parallelo aumento della glicemia a digiuno a partire dai 3 mesi di vita.

Alla luce dei risultati ottenuti nel primo anno di borsa, l'estensione di questo progetto per un ulteriore anno ha avuto il duplice scopo di estendere l'analisi della struttura, funzione e signaling insulinico del tessuto adiposo in animali più vecchi, di 5 mesi di vita, età in cui i topi *Lgals3^{-/-}* manifestano a pieno il difetto nell'omeostasi del glucosio, e di indagare più nel dettaglio la sensibilità insulinica di questi topi a livello sistemico mediante clamp euglicemici iperinsulinemici, metodica considerata il gold standard per il calcolo della insulino resistenza. Ciò ha consentito di caratterizzare in maniera più approfondita le alterazioni della sensibilità insulinica che caratterizzano i topi deficienti per la galectina-3.

Materiali e Metodi

Tutte le analisi sono state effettuate su topi Wild Type (WT) e knockout per galectina-3 (*Lgals3^{-/-}*). L'insulino resistenza a livello sistemico è stata valutata mediante clamp euglicemici iperinsulinemici effettuati in collaborazione con il Prof. A. Giaccari, Università Cattolica di Roma, su topi di 2 e 5 mesi; le indagini sul tessuto adiposo e muscolo si sono invece concentrate su campioni raccolti da topi di 5 mesi di età. Colture di tessuto adiposo viscerale e di muscolo (gastrocnemio) sono state stimolate 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 dell'Akt dipendente dall'insulina 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 α , IL6 su VAT, SAT e BAT. Il livello sierico della citochina infiammatoria IL6 è stato valutato attraverso ELISA.

Risultati e Discussione

I clamp euglicemici iperinsulinemici hanno dimostrato una significativa riduzione della sensibilità insulinica in topi di 2 mesi di vita, confermando il dato preliminare dell'indice HOMA-IR e provando, in maniera inequivocabile, l'insorgenza spontanea dell'insulino-resistenza in topi *Lgals3^{-/-}* giovani anche a livello sistemico, oltre che del VAT e, in grado minore, del muscolo. In maniera inattesa, tuttavia, i medesimi esperimenti effettuati sui topi di 5 mesi hanno evidenziato un importante recupero della sensibilità insulinica sistemica nei *Lgals3^{-/-}*, i cui valori non differivano in maniera significativa da quelli dei controlli WT. In aggiunta, le analisi di attivazione dell'AKT e di assorbimento di glucosio dipendenti dall'insulina, effettuate su colture *ex vivo* di VAT dei topi di 5 mesi di età, confermavano il recupero netto e quasi totale della sensibilità insulinica di questo tessuto nei *Lgals3^{-/-}*. A conferma di questi dati, i livelli di espressione genica tissutale di GLUT4, IRS1 e INSR non risultavano differenti tra i 2 genotipi. Inoltre, dato che la capacità di assorbimento del glucosio del muscolo dei *Lgals3^{-/-}* di 5 mesi era perfettamente paragonabile a quello degli animali più giovani, risultando in entrambi i casi lievemente ridotto rispetto ai WT coevi, possiamo immaginare che la maggior parte della insulino resistenza sistemica riscontrata nei topi di 2 mesi derivasse dalla compromissione del signaling insulinico del tessuto adiposo.

Sorprendentemente, a differenza di quanto visto precedentemente nei topi più giovani, le analisi di espressione genica effettuate sul VAT dei topi più vecchi non evidenziavano differenze significative nei livelli di espressione genica dei marcatori di adipogenesi e di metabolismo lipidico tra i 2 genotipi. L'analisi morfometrica di questo tessuto, tuttavia, segnalava ancora adipociti di dimensione minore nei *Lgals3^{-/-}* rispetto ai WT. Questi risultati, quindi, indicavano chiaramente un

recupero, seppur non totale, dei livelli di maturazione del VAT dei *Lgals3*^{-/-} di 5 mesi di età a cui corrispondeva una ripresa della sua funzionalità e sensibilità insulinica. E' interessante notare come anche l'espressione genica di tutte le citochine proinfiammatorie esaminate tornasse a livelli basali paragonabili a quelli riscontrati nei topi WT, fatta eccezione per IL1 β la cui espressione si manteneva significativamente più alta nei *Lgals3*^{-/-}. Anche a livello serico non si riscontrava alcun aumento della IL6 che invece si aveva nei topi *Lgals3*^{-/-} di 2 mesi. Nonostante ciò, nel VAT *Lgals3*^{-/-} di 5 mesi permaneva una positività immunoistochimica per l'F4/80 identica a quella riscontrata nei topi più giovani, ad indicare la persistenza del medesimo grado di infiltrazione macrofagica. Tuttavia, l'incremento, rispetto ai WT coevi, del livello di mRNA di questo marcatore riscontrato solo nei topi più vecchi suggeriva un aumento nel livello di maturazione dei macrofagi infiltrati nel tessuto dei topi *Lgals3*^{-/-} di 5 mesi rispetto a quelli di 2 mesi.

In maniera interessante, come il VAT, anche il SAT dei topi *Lgals3*^{-/-} di 5 mesi andava incontro ad una correzione quasi totale del problema di maturazione, non mostrando differenze significative nei livelli di espressione genica della maggior parte dei marcatori di differenziamento adipogenico e di metabolismo lipidico rispetto ai controlli, pur conservando adipociti di dimensione ridotta. Inoltre, in maniera simile al VAT, anche il deposito sottocutaneo dei *Lgals3*^{-/-} di 5 mesi mostrava un rientro al livello dei WT dell'espressione delle citochine proinfiammatorie ad eccezione di IL1 β , che permaneva sovraespressa. Infine, anche il tessuto adiposo bruno di 5 mesi migliorava il suo stadio di maturazione e conseguentemente la sua funzionalità rispetto a quanto accadeva nel BAT di topi di 2 mesi, essendo i livelli di espressione dei marcatori di differenziamento cellulare e dell'UCP1 paragonabili a quelli dei WT coevi, pur continuando tuttavia a mostrare alti livelli di fibrosi.

Riassumendo, questi dati suggeriscono che la difettosa adipogenesi che caratterizza i topi *Lgals3*^{-/-} di 2 mesi venga corretta con il progredire dell'età. Come conseguenza, anche la funzione e la sensibilità insulinica del tessuto adiposo viscerale, compromesse nei topi *Lgals3*^{-/-} di 2 mesi di vita, vengono sostanzialmente ripristinate esitando in un recupero della sensibilità insulinica anche a livello sistemico. Tuttavia, la disfunzione del VAT, seppur temporanea, è in grado di indurre una iniziale iperinsulinemia compensatoria seguita da una riduzione della riserva funzionale β -cellulare, forse congenitamente compromessa in questi topi, e quindi dalla comparsa di iperglicemia. Questa sequenza di eventi, favorita da uno stile di vita caratterizzato da alimentazione incongrua e comportamenti sedentari, potrebbe verificarsi anche nel corso dello sviluppo del diabete di tipo 2 (DM2) dell'uomo. Infatti, studi recenti hanno evidenziato l'importanza di una difettosa adipogenesi nell'instaurazione della insulino-resistenza che si associa all'obesità e predispone all'insorgenza del DM2.

Concludendo, i risultati di questi esperimenti hanno contribuito a far luce sul ruolo della galectina-3 nella regolazione dell'adipogenesi e dell'omeostasi glucidica e, di conseguenza, nello sviluppo del DM2. Più in generale, il fenotipo metabolico del topo *Lgals3*^{-/-} consente di verificare il legame patogenetico tra difettosa adipogenesi, infiammazione a livello del VAT e sistemico, e alterazioni dell'omeostasi glucidica nella patogenesi del DM2.

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