

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Bastarrachea, R., Chen, J., Kent, J., Nava, E., Rodríguez, E., Daadi, M., Jorge, B., Laviada, H., Comuzzie, A., Chen, S., & Grayburn, P. (2017). *Engineering brown fat into skeletal muscle using ultrasound-targeted microbubble destruction gene delivery in obese Zucker rats: Proof of concept design*. IUBMB Life, 69(9), pp. 745-755.

**Resumen.** La destrucción de microburbujas inducida por ultrasonido (UTMD, por sus siglas en inglés) es un medio novedoso de transferencia génica específica de tejido. Este enfoque infunde sistémicamente transgenes preacoplados a microburbujas lípidas llenas de gas que estallan dentro de la microvasculatura de los tejidos diana a través de una señal de ultrasonido que da como resultado la liberación de ADN y la transfección de células vecinas dentro del tejido. En un trabajo anterior se demostró que el adenovirus con ADNc de UCP-1, inyectado en las almohadillas de grasa del epidídimo de ratones, inducía la disminución localizada de la grasa, lo cual mejoró la tolerancia a la glucosa y disminuyó la ingesta de alimentos en ratones diabéticos obesos. Nuestro grupo demostró recientemente que la terapia génica por UTMD logró la regeneración de células beta en ratones y babuinos tratados con estreptozotocina (STZ). Planteamos la hipótesis de que la terapia génica con BMP7/PRDM16/PPARGC1A en músculo esquelético (SKM) de ratas Zucker obesas diabéticas (fa/fa) utilizando la tecnología UTMD produciría un fenotipo de tejido adiposo marrón (BAT, por sus siglas en inglés) con sobreexpresión de UCP-1. Este estudio se diseñó como un proyecto de prueba de concepto (PoC). A las ratas obesas Zucker se les administraron construcciones de ADNc plasmídico que codificaban un cóctel de genes con BMP7/PRDM16/PPARGC1A incorporado en microburbujas por vía intravenosa en el muslo izquierdo. Los controles recibieron la UTMD con plásmidos con un gen reportero DsRed. Un transductor de ultrasonido fue dirigido hacia el muslo para romper las microburbujas dentro de la microcirculación. Se tomaron muestras de sangre al inicio y después del tratamiento para medir los niveles de glucosa, insulina y ácidos grasos libres. El SKM se recolectó para la inmunohistoquímica (IHC). Los resultados que obtuvimos de la IHC

mostraron un patrón confiable de transferencia génica efectiva basada en la UTMD para incrementar la sobreexpresión en el SKM del gen UCP-1. Esto indica claramente que nuestra construcción de ADN plasmídico que codifica la combinación de genes PRDM16, PPARGC1A y BMP7 reprogramó tejido adulto del SKM en células adiposas marrones in vivo. Nuestro piloto estableció el PoC mostrando que la administración del cóctel genético al SKM en este modelo de rata de obesidad genética usando terapia génica de UTMD diseñó un fenotipo de BAT con sobreexpresión de UCP-1.

**Abstract.** Ultrasound-targeted microbubble destruction (UTMD) is a novel means of tissue-specific gene delivery. This approach systemically infuses transgenes precoupled to gas-filled lipid microbubbles that are burst within the microvasculature of target tissues via an ultrasound signal resulting in release of DNA and transfection of neighboring cells within the tissue. Previous work has shown that adenovirus containing cDNA of UCP-1, injected into the epididymal fat pads in mice, induced localized fat depletion, improving glucose tolerance, and decreasing food intake in obese diabetic mice. Our group recently demonstrated that gene therapy by UTMD achieved beta cell regeneration in streptozotocin (STZ)-treated mice and baboons. We hypothesized that gene therapy with BMP7/PRDM16/PPARGC1A in skeletal muscle (SKM) of obese Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats using UTMD technology would produce a brown adipose tissue (BAT) phenotype with UCP-1 overexpression. This study was designed as a proof of concept (POC) project. Obese Zucker rats were administered plasmid cDNA constructs encoding a gene cocktail with BMP7/PRDM16/PPARGC1A incorporated within microbubbles and intravenously delivered into their left thigh. Controls received UTMD with plasmids driving a DsRed reporter gene. An ultrasound transducer was directed to the thigh to disrupt the microbubbles within the microcirculation. Blood samples were drawn at baseline, and after treatment to measure glucose, insulin, and free fatty acids levels. SKM was harvested for immunohistochemistry (IHC). Our IHC results showed a reliable pattern of effective UTMD-based gene delivery in enhancing SKM overexpression of the UCP-1 gene. This clearly indicates that our plasmid DNA construct encoding the gene combination of PRDM16, PPARGC1A, and BMP7

reprogrammed adult SKM tissue into brown adipose cells in vivo. Our pilot established POC showing that the administration of the gene cocktail to SKM in this rat model of genetic obesity using UTMD gene therapy, engineered a BAT phenotype with UCP-1 over-expression.