

CAPÍTULO 9

Terapêutica de precisão para animais: Uma oportunidade para pecuária produtiva e sustentável

Humberto Melo Brandão, Pereira, M. M., Alessandro de Sá Guimarães, Carla Christine Lange, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito, João Bastista Ribeiro, Juliana Carine Gern, Wanessa Araújo Carvalho, Guilherme Nunes de Souza, Letícia Caldas Mendonça, Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva

Introdução

No âmbito nacional, o ingresso de novas pessoas na classe média brasileira, bem como a elevação de seu poder aquisitivo, promoveu o crescimento do consumo interno de proteínas de origem animal nos últimos anos. Por sua vez, no âmbito mundial, em outros países emergentes também tem se observado fenômeno semelhante, o que tem resultado em tendência de estabilidade com a elevação de preços e de consumo das principais *commodities* pecuárias (OECD-FAO, 2010). Tal comportamento criou um ambiente dicotômico, no qual existe um aumento da demanda mundial por alimentos e, ao mesmo tempo, há uma restrição mundial da disponibilidade de novas áreas agrícolas para atender essa demanda.

Analisando-se o segmento pecuário brasileiro, identifica-se uma clara oportunidade, principalmente para a bovinocultura, de assegurar o pleno abastecimento interno, bem como o de consolidar e expandir a participação brasileira em novos mercados internacionais. Todavia, para suprir essa lacuna de mercado, os produtores rurais além de enfrentar o crescente acirramento concorrencial entre os produtores de alimentos no mundo, também terão que aumentar a produtividade de forma sustentável e seguir as novas regras previstas pelo recém-aprovado Código Florestal.

Portanto, invariavelmente o incremento da produção bovina passará por verticalização da produção, sustentado pelo adensamento animal nas áreas produtivas e elevação da produtividade animal. Esse aumento da eficiência

produtiva, certamente virá acompanhado de novos desafios como, por exemplo, uso de mão de obra especializada; otimização dos nutrientes e recursos naturais utilizados nos sistemas produtivos; maior controle sanitário; aumento da necessidade de inibir, controlar e comprovar a inexistência de resíduos nos alimentos de origem animal; dentre outros.

Diante desses desafios, para que a pecuária brasileira responda a contextos nacionais e internacionais que, em muitos casos, podem superar o aspecto produtivo e transformar-se em barreiras ao consumo ou mesmo em ações protecionistas não tarifárias unilateral de importadores, tecnologias inovadoras precisam ser desenvolvidas e adotadas pelos produtores brasileiros de modo a atender os preceitos básicos modernos de sustentabilidade, produtividade, bem-estar animal, de qualidade e segurança alimentar. Neste contexto, fica clara a necessidade de maior atenção às variáveis vinculadas à saúde animal, não só por serem fatores influenciados pela dispersão de doenças durante o processo de adensamento animal, como também pela aproximação dos limiares fisiológicos associados ao aumento da produtividade animal. Para contornar esse problema, possivelmente se fará o uso mais intenso e frequente de fármacos, como por exemplo, antimicrobianos e antiparasitários.

Antevendo a agravação de problemas ligados ao uso incorreto e indiscriminado de fármacos na área animal (*i.e.* embargos às exportações pela presença de resíduos, seleção de patógenos, artrópodes e helmintos multiresistentes), que possivelmente será intensificado para se conseguir índices produtivos/sanitários maiores, o grupo de sanidade animal da Embrapa Gado de Leite há algum tempo vem discutindo estratégias para mitigar tal entrave. Neste contexto, surgiu o conceito de terapêutica de precisão, o qual pode se entender como o ramo da medicina veterinária que reúne o conjunto de tecnologias direcionadas para tratar e prevenir enfermidades animais fazendo o uso mínimo e otimizado de medicamentos, conseguindo dessa forma uma intervenção/abordagem terapêutica racional, eficiente, de baixo custo e que promova melhorias nos parâmetros de segurança alimentar (*e.g.* resíduos de antimicrobianos em alimentos) e ambiental (*e.g.* pesticidas e antiparasitários).

Neste contexto podem ser citadas diversas tecnologias, não se restringindo às doravante abordadas.

Farmacogenética e farmacogenômica

Com o advento das técnicas de genética molecular nos últimos 50 anos, um grande crescimento na base do conhecimento e da exploração da informação genética para o combate de doenças no homem e animais tem sido observado. O material genético de espécies animais de produção abriga rica coleção de variações genéticas com consequências úteis ou prejudiciais para a saúde e para a produtividade do rebanho. Essas variações estão, usualmente, na forma de *single nucleotide polymorphism* (SNPs), deleções ou inserções de nucleotídeos ou de genes inteiros, rearranjos cromossômicos, duplicação de genes, repetições em *tandem* (microssatélites), etc.. Embora essas variações constituam apenas pequena percentagem do genoma (cerca de < 1%), elas formam a base da biodiversidade ou da variabilidade individual em resposta aos estímulos do ambiente. Elas podem ser encontradas nos genes, tanto em regiões codificadoras, quanto em regiões reguladoras, com a habilidade para modificar a função do gene ou sua expressão, resultando, algumas vezes, em condições indesejáveis, como, por exemplo, no aparecimento de doenças.

As pesquisas genômicas relativas a doenças ou às diferenças terapêuticas entre os indivíduos geralmente estão associadas aos polimorfismos presentes nos genes que influenciam a farmacocinética ou a farmacodinâmica (CHOWBAY et al., 2005). Esses polimorfismos podem modificar a expressão e/ou a atividade de sítios de ligação de medicamentos (WEINSHIULBOUM, 2003) por influenciarem a estabilidade do RNA mensageiro correspondente, ou modificarem a estrutura da proteína, podendo levar à redução ou aumento da proteína codificada (THORISSON e STEIN, 2003).

Comparadas ao genoma humano e ao bovino (*Bos taurus*), o sequenciamento do genoma de algumas espécies domésticas, como caprinos, suínos e ovinos, estão ainda em fase inicial ou de planejamento. Com a

disponibilidade dessas informações genômicas, entretanto, poderá haver uma explosão de informações em estudos relativos às variações do genoma e vários aspectos relativos a doenças, produção e adaptação. Até o momento, todavia, as pesquisas genômicas em animais de produção são menos intensas e diferem em vários aspectos quando comparadas às feitas em humanos.

Um desses aspectos é em relação ao possível uso da farmacogenética e da farmacogenômica em animais domésticos. A farmacogenética, segundo Hughes (1999), consiste no estudo das variações interindividuais na sequência de DNA, relacionadas com a resposta aos fármacos, a eficácia e a segurança dos mesmos, ou seja, como a variabilidade genética está relacionada à variabilidade de resposta aos medicamentos por parte dos indivíduos. Todavia, apesar do conceito ser relativamente simples, estudos envolvendo farmacogenética são de extrema importância, em virtude da redução de riscos de toxicidade para os pacientes, bem como do aumento da eficácia dos medicamentos.

A farmacogenômica, resultante da união entre a farmacogenética e a genômica, pode ser definida como o estudo da expressão de genes individuais os quais são relevantes na susceptibilidade a doenças, bem como a resposta a fármacos em nível celular, individual ou populacional (PIRAZZOLI e RECCHIA, 2004). Ainda, de acordo com Azevêdo (2004), a farmacogenômica procura relações entre o metabolismo de drogas e os estudos moleculares de DNA ou RNA. Esse tipo de estudo lança mão de técnicas genômicas de mapeamento genético, sequenciamento de genomas e de bioinformática para facilitar as pesquisas.

Desse modo, as duas disciplinas podem ser diferenciadas em relação ao número de genes envolvidos. Enquanto a farmacogenética investiga um ou poucos genes, a farmacogenômica baseia-se na informação da atividade funcional e na expressão de vários genes ao mesmo tempo (ARRANZ e KERWIN, 2003).

Pesquisas em animais, envolvendo essas duas disciplinas, têm sido desenvolvidas principalmente em camundongos, ratos, suínos, coe-

lhos, macacos e cães, espécies consideradas como modelos animais. Por exemplo, a farmacogenética da enzima tiopurina metiltransferase (TPMT), a qual está relacionada ao metabolismo de drogas imunossupressoras no tratamento de câncer e de transplante de órgãos, tem sido extensivamente estudada em cães, em que se observa alto nível de polimorfismo para esse loco (MARSH e VAN BOOVEN, 2009). Para espécies ligadas à produção animal, os estudos ainda estão no estágio inicial.

Embora a individualização terapêutica ainda represente um desafio para o futuro, mesmo na espécie humana, vislumbra-se que a farmacogenética e a farmacogenômica serão ferramentas úteis no desenvolvimento de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas (METZGER et al., 2006). Certamente, os avanços advindos na espécie humana refletirão na produção animal nos próximos anos, como resultado direto da finalização do sequenciamento completo dos genomas de várias espécies. Esses sequenciamentos serão usados para a descoberta de variantes genômicas em genes candidatos que poderão estar associadas com respostas alteradas às drogas, tanto quanto para o desenvolvimento de arranjos de marcadores do tipo SNP que permitam o desenvolvimento de estudos de associação por todo o genoma para análises de ligação entre os genótipos e fenótipos de doenças.

Nanotecnologia

A Organização Internacional de Normatização (ISO), por intermédio do Comitê Técnico 229, define nanotecnologia como sendo a capacidade de compreensão e controle da matéria e dos processos em nanoescala, mas não exclusivamente, que resultem em materiais com pelo menos uma das dimensões abaixo de 100 nm, no qual o início de fenômenos dependentes do tamanho permitem novas aplicações ao material.

Quando utilizada com foco terapêutico, a nanotecnologia permite não só o emprego farmacológico de novas substâncias, como também modificação nos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de fármacos em formulações convencionais (ZIMMER et al., 1994).

Levando-se em consideração apenas a redução de tamanho da partícula, via de regra, o material tem sua reatividade aumentada em função da elevação da área de contato e, em muitos casos, pode exercer ou exacerbar seu efeito antimicrobiano, como é o caso da nanopartícula de própolis, que ao ter seu tamanho de partícula controlado, tem sua atividade antimicrobiana potencializada e, por ser livre de álcool, também pode ser aplicada diretamente sobre mucosas sem causar irritação ou desconforto para o animal (BRANDÃO et al., 2012).

Outro exemplo de aumento da atividade antimicrobiana em função da redução do tamanho é a nanopartícula de prata, que possui um longo histórico de uso em produtos cotidianos e, devido a sua baixa toxicidade, mais recentemente vem sendo utilizada com foco medicamentoso (NOWACK et al., 2011). Tal nanomaterial, em ensaios *in vitro* contra isolados bacterianos de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* oriundos de vacas com mastite, mostrou-se altamente promissor (KIM et al., 2007). Por sua vez, nanopartículas de dióxido de titânio foram associadas com vinte e três antibióticos diferentes para avaliação de efeitos antimicrobianos em amostras multirresistentes de *S. aureus*. Em todas as associações foi observado efeito sinérgico entre a nanopartícula metálica e o antimicrobiano, necessitando, portanto, de menos fármaco para inibir o crescimento microbiano (ROY et al., 2010).

Quando se nanoencapsular um fármaco “tradicional”, o nanomedicamento assume características próprias, muitas vezes associadas ao agente encapsulante e, como já abordado, pode ter seus padrões farmacocinéticos e farmacodinâmicos alterados; ficar protegido do meio externo (evitando ser degradado); apresentar liberação gradual; ser direcionado para um tecido ou grupo celular específico; e, apresentar redução da toxicidade. De uma forma geral, a terapia pode ficar mais efetiva, com redução da dose e número de aplicações do fármaco, aumento da concentração do princípio ativo no tecido/células de interesse, redução de sua concentração em tecidos periféricos, menores efeitos colaterais, redução na seleção de bactérias resistentes e pequena geração de resíduos nos produtos de origem animal.

Do ponto de vista de segurança alimentar os ganhos são claros, uma vez que ao modificar a biodistribuição, ou mesmo reduzir a concentração de um fármaco, este pode não conseguir vencer a permeabilidade seletiva da barreira hemato-glandular (ZIV e SULMAN, 1975) e, conseqüentemente pode ocorrer redução da secreção/concentração do medicamento em matrizes biológicas como, por exemplo, o leite.

Existem diversos exemplos bem sucedidos na literatura de nanoencapsulamento de fármacos, como a gentamicina que foi direcionada para o compartimento celular monocítico fagocitário com o auxílio de nanopartículas de poliácido láctico-co-glicólico para o combate de *Brucella* spp. (LOCARUZ et al., 2007). Esse aminoglicosídeo teve sua concentração aumentada no compartimento intracelular, sendo, portanto, mais efetivo. Em estratégia de direcionamento semelhante, nosso grupo desenvolveu uma nanopartícula capaz de direcionar antimicrobianos para polimorfonucleares (MOSQUEIRA et al., 2011) e, com isso, espera-se incrementar significativamente os índices de cura das mastites causados por *S. aureus* resistentes à fagocitose.

Outro exemplo de direcionamento foi o proposto por Schroeder e colaboradores (2008) para direcionar a metilprednisolona, um anti-inflamatório esteroidal, para regiões inflamadas do corpo de ratos. Vinte e quatro horas após a administração do sistema nanoestruturado, a concentração de anti-inflamatório no local sob avaliação foi o dobro da encontrada nas regiões controle. Tal resultado sugeriu uma potencial redução da dose e do número de aplicações do medicamento.

O efeito protetor do encapsulamento para o fármaco é evidenciado no “rejuvenescimento” de beta-lactâmicos nanoestruturados que, quando expostos às estirpes bacterianas produtoras de beta-lactamases, ficam protegidos da ação dessas enzimas e mantêm seu efeito bactericida (TUROS et al., 2007).

De uma forma geral, muitas são as opções e os benefícios advindos das diferentes abordagens da nanotecnologia para o tratamento das enfermi-

dades animais, sendo, portanto, forte a tendência de sua implementação no curto e médio prazo nos diferentes sistemas produtivos.

Terapia Gênica

A terapia gênica consiste na utilização de sistemas que promovam a inserção de material genético nas células e tecido alvo com o propósito de prevenir ou tratar doenças associadas com alterações genéticas. A técnica se baseia na introdução de uma cópia do alelo normal no local de genes alterados, na deleção de um gene ou a indução da super-expressão de um gene envolvido em uma patologia (LEDLEY, 1995; HESS e DOUGHERTY, 1997). Assim, essa abordagem utiliza genes como medicamentos.

Inicialmente, a terapia gênica surgiu apenas para o tratamento de doenças genéticas monogênicas. Contudo, com o desenvolvimento da biologia molecular surge a possibilidade de uso dessa abordagem no tratamento de doenças adquiridas, mediante a identificação dos genes e tecidos alvos acometidos (STRIBLEY et al., 2012). Os métodos utilizados e as modalidades de transferência gênica para as células *in vitro* ou *in vivo* são variados, destacando-se os métodos virais e não virais.

Os vírus possuem mecanismos naturais de entrega e de inserção de material genético nos genomas celulares, portanto, são extensivamente estudados para fins terapêuticos. Devido a seu ciclo replicativo, os vírus podem internalizar com eficiência DNA exógenos no genoma das células (GIACCA e ZACCHIGNA, 2012). Dentre os vetores virais mais utilizados, estão os adenovírus e retrovírus (LU e MADU, 2010) que têm sido avaliados em modelos experimentais para a terapia de câncer (AI-HENDY et al., 2000), doenças autoimunes (BROBERG et al., 2004), doenças neurodegenerativas (WEINBERG et al., 2012), entre outras. Porém, sua aplicação clínica é prejudicada pela a propriedade dos vírus induzirem respostas tóxicas e imunes (MARTIN e CAPLEN, 2007). Estes organismos podem ainda causar múltiplos eventos de integração no genoma celular, tornando mais prováveis os efeitos indesejados, como a ativação de oncogenes (ZHENG, 2010). Além disso, aspectos de biossegurança

devem ser considerados, pois os riscos, ainda que mínimos, podem existir nas estruturas construídas atualmente.

Desde a descoberta dos pequenos RNAs de interferência (RNAi) por Fire et al. (1998), pesquisadores ganhadores do prêmio Nobel em 2006, esses transcritos têm recebido atenção para sua utilização na terapia gênica. Os RNAi podem silenciar a expressão de genes específicos de forma pós-transcricional, uma vez que causam a degradação de sequências de RNAm e, conseqüentemente, impossibilitam a tradução da fita em proteína (TANG et al., 2012). A utilização direcionada desse processo biológico representa uma nova oportunidade para a inibição da expressão gênica *in vitro* e *in vivo* (AKHTAR e BENTER, 2007). Assim, os RNAi podem silenciar genes relacionados à manifestação de doenças.

Trabalhos utilizando RNAi já foram realizados *in vivo* em primatas não humanos no silenciamento de genes relacionados a doenças coronarianas (ZIMMERMANN et al., 2006); e no homem na inibição da replicação viral do HIV (DIGIUSTO et al., 2010). Por sua vez, Yanagihara e colaboradores (2006), demonstraram que o uso de RNAi pode ser eficaz na inibição da atividade de *S. aureus* resistentes a metacilina tanto *in vitro* quanto em modelos de infecção respiratória *in vivo*. O RNAi também se mostrou positivo na prevenção de infecção pelo vírus da febre aftosa em suínos (CONG et al., 2010). Contudo, o RNAi é uma molécula muito instável, sendo degradada *in vivo* por RNase. Essa característica exige diversos esforços para aumentar a estabilidade do RNAi dentro do organismo. Ainda, para o amplo desenvolvimento desse sistema terapêutico, é necessário um maior entendimento entre os processos de interação entre os RNAi e o material genético dos organismos (GLEBOVA et al., 2012).

Os lipossomos são esferas de membrana sintéticas formadas por bicamada lipídica que podem ser preenchidas com DNA e atuarem como vetores de transfecção. Essas construções demonstraram uso potencial no tratamento de câncer (SERIKAWA et al., 2006), regeneração óssea e neuronal (ONO et al., 2004; OBATA et al., 2010). As vantagens do

uso de lipossomos é a facilidade de síntese, boa reprodutibilidade e baixa imunogenicidade. Porém, as células transfectadas apresentam expressão transiente do gene exógeno devido à degradação e/ou perda da estabilidade do inserto (WIVEL e WILSON 1998). Isso ocorre em parte, pela presença de nucleases plasmáticas que promovem a rápida eliminação de DNA exógeno (HOUK et al., 2001) e pela agregação dos lipossomos com proteínas do organismo diminuindo sua eficiência (CHESNOY e HUANG, 2000).

A ampla aplicação da terapia gênica depende do desenvolvimento contínuo de métodos adequados para a entrega dos genes. De fato, o maior obstáculo nesse campo terapêutico envolve a construção de vetores apropriados para a transfecção dos genes/moléculas (NABEL, 1999). Recentemente, com o desenvolvimento da nanotecnologia, surgem infinitas possibilidades de engenhieramento de materiais na escala nanométrica para os mais diferentes objetivos. Os nanomateriais possuem propriedades únicas que os tornam adequados para atuarem como vetores específicos na terapia gênica (SRIKANTH e KESSLER, 2012). Vários trabalhos com enfoque terapêutico destacam o uso da nanotecnologia para a transfecção de DNA e pequenos RNA (LU et al., 2004; KAM et al., 2006; DELOGU et al., 2009; CHEUNG et al., 2010; LADEIRA et al., 2010; DO et al., 2012).

Os nanomateriais podem atingir o interior das células e, desta forma, serem veículos para uma terapêutica de precisão. Por exemplo, os nanotubos de carbono (NTC), uns dos nanomateriais mais estudados, possuem características desejáveis para serem utilizados como vetores de DNA, tais como: grande superfície de contato, estabilidade e flexibilidade (CHEN et al., 2003), além de penetrarem nas células por endocitose ou passarem livremente pela bicamada lipídica em vários tipos de células somáticas (AHMED et al., 2009). Os NTCs podem atingir o núcleo da célula, aumentando a eficiência de transfecção do transgene (CAI et al., 2005). O processo de encapsulamento dos ácidos nucleicos dentro de nanopartículas favorece sua proteção contra degradação por nucleases celulares (CHEUNG et al., 2010). Além disso, a ligação não-covalente

de ácidos nucléicos na superfície dos nanotubos aumenta a eficiência da liberação do conteúdo na célula (DELOGU et al., 2009).

Entretanto, a eficiência dos nanomateriais pode ser influenciada pelo o tamanho da nanopartícula e/ou pelo método de funcionalização (AHMED et al., 2009).

Portanto, a dificuldade da maioria dos métodos de transferência gênica está na obtenção de uma eficácia satisfatória. Os ensaios clínicos com terapia gênica tiveram início nos anos 90e os procedimentos são ainda altamente experimentais. Contudo com os recentes avanços tecnológicos, vislumbra-se o desenvolvimento de eficientes sistemas de entrega gênica, com eficácia terapêutica e pequena ou ausência de toxicidade.

Conclusão

Em suma, a adoção de tecnologias inovadoras, associadas ao conceito de terapêutica de precisão constitui uma oportunidade real de racionalizar o uso de insumos veterinários, prolongando suas “vidas” de mercado, minimizando o aparecimento de resistência antimicrobiana e antiparasitária, baixar os custos associados à terapia, promovendo o bem-estar animal e contribuindo para aumentar a segurança alimentar e ambiental.

Agradecimentos

Rede Agronano; Rede NANOBIOIMG; FAPEMIG (Edital 17/2010 Pronex CBB - APQ-04334-10)

Referências

AHMED, M.; JIANG, X.; DENG, Z.; NARAIN R. Cationic glyco-functionalized single-walled carbon nanotubes as efficient gene delivery vehicles. **Bioconjug Chem.** 20: 2017-2022, 2009.

AKHTAR, S.; BENTER, I.F. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest.* 117(12): 3623–3632, 2007.

AI-HENDY, A.; MAGLIOCCO, A.M.; AL-TWEIGERI, T.; BRAILEANU, G.; CREILIN, N.; LI, H.; STRONG, T.; CURIEL, D.; CHEDRESE, J. Ovarian cancer gene therapy: Repeated treatment with thymidine kinase in an adenovirus vector and ganciclovir improves survival in a novel immunocompetent murine model. **Am J Obstet Gynecol.** 182: 553-559, 2000.

ARRANZ, M. J.; KERWIN, R. W. Advances in the pharmacogenetic prediction of antipsychotic response. **Toxicology**, 192: 33-35, 2003.

AZEVEDO, E. S. Farmacogenômica: aspectos éticos. **Gazeta Médica da Bahia**, 74: 145-148, 2004.

BRANDAO, H. M.; VINHOLIS, M. M. B.; MOSQUEIRA, V. C. F.; MATTOSO, L. H. C.; BRITO, M. A. V. P.; RIBEIRO, C.; SOUSA, R. V.; BARBOSA, N. R.; LANGE, C. C. Compositions based on propolis nanocapsules which can be used as carriers for substances of interest, methods for producing same and use thereof. 2012, WO2012054999

CAI, D.; MATARAZA, J.M.; QIN, Z.; HUANG, Z.; HUANG, J.; CHILES, T.C.; CARNAHAN, D.; KEMPA, K.; REN, Z. Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing. **Nature Methods**, 2: 449-454, 2005.

CHEN, R.J.; BANGSARUNTIP, S.; DROUVALAKIS, K.A.; KAM, N.W.S.; SHIM, M.; LI, Y.; KIM, W.; UTZ, P.L.; DAI, H. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc Natl Acad Sc USA*, 100(9): 4984-4989, 2003.

CHESNOY, S.; HUANG, L. Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 29: 27-47, 2000.

CHEUNG, W.; PONTORIERO, F.; TARATULA, O.; CHEN, A.M.; HE, H. DNA and carbon nanotubes as medicine. **Adv Drug Deliv Rev.** 62(6): 633-49, 2010.

CHOWBAY, B.; ZHOU, S.; LEE, E. J. An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore. **Drug Metab Rev.** 37:327-78, 2005.

CONG, W.; JIN, H.; JIANG, C.; YAN, W.; LIU, M.; CHEN, J.; ZUO, X.; ZHENG, Z. Attenuated Salmonella choleraesuis-mediated RNAi targeted to conserved regions against foot-and-mouth disease virus in guinea pigs and swine. **Vet Res.** 41(3): 30, 2010.

DELOGU, G.L.; MAGRINI, A.; BERGAMASCHI, A.; ROSATO, N.; DAWSON, I.M.; BOTTINI, N.; BOTTINI, M. Conjugation of antisense oligonucleotides to PEGylated carbon nanotubes enables efficient knockdown of PTPN22 in T lymphocytes. **Bioconjug Chem.** 3: 427-431, 2009.

BROBERG, E.K.; SALMI, A.A.; HUKKANEN, V. IL-4 is the key regulator in herpes simplex virus-based gene therapy of BALB/c experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neurosci Lett.** 364 (3): 173-178, 2004.

DELOGU, G.L.; MAGRINI, A.; BERGAMASCHI, A.; ROSATO, N.; DAWSON, I.M.; BOTTINI, N.; BOTTINI, M. Conjugation of antisense oligonucleotides to PEGylated carbon nanotubes enables efficient knockdown of PTPN22 in T lymphocytes. **Bioconjug Chem.** 3: 427-431, 2009.

DIGIUSTO, D.L.; KRISHNAN, A.; LI, L.; LI, H. RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. **Sci. Transl. Med.** 2: 36-43, 2010.

DO, T.N.; LEE, W.H.; LOO, C.Y.; ZAVGORODNIY, A.V.; ROHANIZADEH, R. Hydroxyapatite nanoparticles as vectors for gene delivery. **Ther Deliv.** (5): 623-32, 2012.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 391:806-811, 1998.

GLEBOVA, K.V.; MARAKHONOV, A.V.; BARANOVA, A.V.; SKOBLOV, M.I.U. Therapeutic siRNAs and non-viral systems for their delivery. **Mol Biol (Mosk)**, 46(3): 371-86, 2012.

GIACCA, M.; ZACCHIGNA, S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. **J Control Release**. 161(2): 377-388, 2012.

HESS, P.; DOUGHERTY, G.J. Gene Therapy Monitoring: Clinical Monitoring for Efficacy and Potential Toxicity. **Mol Diagn**. (2): 147-155, 1997.

HOUK, B.E.; MARTIN, R.; HOCHHAUS, C.; HUGHES, J.A. Pharmacokinetics of plasmid DNA in the rat. **Pharm Res**. 18: 67-74, 2001.

HUGHES, J. E. Genomic technologies in drug discovery and development. **Drug discovery today**, 4: 6, 1999.

KAM, S.W.N.; LIU, Z.; DAI, H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. **Angew Chem Int Ed Engl**. 45: 577-581, 2006.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J.; PARK, S.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. H.; CHO, M. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 3: 95-101, 2007.

LADEIRA, M.S.; ANDRADE, V.A.; GOMES, E.R.M.; AGUIAR, C.J.; MORAES, E.R.; SOARES, J.S.; SILVA, E.E.; LACERDA, R.G.; LADEIRA, L.O.; JORIO, A.; LIMA, P.; LEITE, M.F.; RESENDE, R.R.; GUATIMOSIM, S. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. **Nanotechnology**. 21: 385101, 2010.

LEDLEY, F.D. Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. **Hum Gene Ther**. 6:1129-1144, 1995.

LOCAROZ, M.C.; BLANCO-PRIETO, M.J.; CAMPANERO, M.A.; SALMAN, H.; GAMAZO, C. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) particles containing gentamicin: pharmacokinetics and pharmacodynamics in *Brucella*

melitensis-infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 51:1185-90, 2007.

LU, Y.; MADU, C.O. Viral-based gene delivery and regulated gene expression for targeted cancer therapy, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7: 19–35, 2010.

LU, Q.; MOORE, J. M.; HUANG, G.; MOUNT, A. S.; RAO, A. M.; LARCOM, L. L.; KE, P, C. RNA polymer translocation with single-walled carbon nanotubes. **Nano Letters**. 4 (12): 2473-2477, 2004.

MARSH, S.; VAN BOOVEN, D. J. The increasing complexity of mercaptopurine pharmacogenomics. **Clin Pharmacol Ther.** 85:139–141, 2009.

MARTIN, S. E.; CAPLEN, N. J. Applications of RNA interference in mammalian systems. **Annu Rev Genomics Hum Genet.** 8:81-108, 2007.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. **Ribeirão Preto**. 39: 515-21, 2006.

MOSQUEIRA, V. C. F.; Araujo R. S.; BRANDAO, H. M. Nanoparticulate composition containing antimicrobials for intramammary animal administration, 2011, WO 2011150481.

NABEL, G. J. Development of optimized vectors for gene therapy. **Proc Natl Acad Sci USA**. 96:324–326, 1999.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. **Environmental Science & technology**. 45,1177-1183, 2011.

OBATA, Y.; CIOFANI, G.; RAFFA, V.; CUSCHIERI, A.; MENCIASSI, A.; DARIO, P.; TAKEOKA, S. Evaluation of cationic liposomes composed of an amino acid-based lipid for neuronal transfection. **Nanomedicine**. 6 (1): 70-77, 2010.

OEDC-FAO. Agricultural outlook 2010-2019 highlights, acessado em: 28/10/2012 <https://www.fao.org.br/download/OECDFAO_AgriculturalOutlook20102019.pdf>.

ONO, I.; YAMASHITA, T.; JIN, H.; ITO, Y.; HAMADA, H.; AKASAKA, Y.; NAKASU, M.; OGAWA, T.; JIMBOW, K. Combination of porous hydroxyapatite and cationic liposomes as a vector for BMP-2 gene therapy. **Biomaterials**. 25 (19): 4709-4718, 2004.

PIRAZZOLI, A.; RECCHIA, G. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: are they still promising? **Pharmacological Research**. 49: 357-361, 2004.

ROY, A. S.; PARVEEN, A.; KOPPALKAR, A. R.; PRASAD, M. Effect of nano-titanium dioxide with different antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, 1: 37-41, 2010.

SCHROEDER, A.; SIGAL, A.; TURJEMAN, K.; BARENHOLZ, Y. Using PEGylated nano-liposomes to target tissue invaded by a foreign body. **Journal of Drug Targeting**, 16: 591-595, 2008.

SRIKANTH, M.; KESSLER, J. A. Nanotechnology-novel therapeutics for CNS disorders. **Nat Rev Neurol**. 8(6): 307-318, 2012.

STRIBLEY, J. M.; REHMAN, K. S.; NIU, H.; CHRISTMAN, G. M. Gene therapy and reproductive medicine. *Fertil Steril*. 77 (4): 645-657, 2002.

SERIKAWA, T.; KIKUCHI, A.; SUGAYA, S.; SUZUKI, N.; KIKUCHI, H.; TANAKA, K. In vitro and in vivo evaluation of novel cationic liposomes utilized for cancer gene therapy. **J Control Release**. 113: 255-260, 2006.

TANG, D.; ZHU, H.; WU, J.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHAO, X.; CHEN, X.; DU, W.; WANG, D.; LIN, X. Silencing myostatin gene by RNAi in sheep embryos. **J Biotechnol**. 158 (3): 69-74, 2012.

THORISSON, G. A.; STEIN, L. D. The SNP Consortium website: past, present and future. **Nucleic Acids Res.**, 31:124-7, 2003.

TUROS, E.; REDDY, G. S. K.; GREENHALGH, K.; ABEYLATH, P. R. A.; JANG, S.; DICKEY, S.; LIMC, D. V. Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of b-lactam antibiotics against MRSA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 17: 3468–3472, 2007.

ZHENG, Z. Viral Oncogenes, Noncoding RNAs, and RNA Splicing in Human Tumor Viruses. **Int J Biol Sci.** 6(7): 730-755, 2010.

ZIMMER, A.; MUTSCHELER, E.; LAMBRECHT, G.; MAYER, D.; KREUTER, J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of an ophthalmic pilocarpine nanoparticle-delivery-system. **Pharm. Res.** 11:1435-42, 1994.

ZIMMERMANN, T. S. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. **Nature.** 441:111–114, 2006.

Ziv G, Sulman FG, Absorption of antibiotics by the bovine udder, **Journal of Dairy Science.** 58: 1637-1644, 1975.

YANAGIHARA, K.; TASHIRO, M.; FUKUDA, Y.; OHNO, H.; HIGASHIYAMA, Y.; MIYAZAKI, Y.; HIRAKATA, Y.; TOMONO, K.; MIZUTA, Y.; TSUKAMOTO, K.; KOHNO, S. Effects of short interfering RNA against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. **J. Antimicrob. Chemother.** 57 (1): 122-126, 2006.

WEINBERG, M. S.; SAMULSKI, R. J.; MCCOWN, T. J. Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease. **Neuropharm.** 2012. In Press

WEINSHILBOUM, R. Inheritance and drug response. **N Engl J Med.** 348:529-37, 2003.

WIVEL, N. A.; WILSON, J. M. Methods of gene delivery. **Hematol Oncol Clin North Am.** 12:483–501, 1998.