

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NANOCÁPSULAS MULTIPAREDE CARREGADAS COM ETOPOSIDO E
FUNCIONALIZADAS COM DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA A TERAPIA
DIRECIONADA AO ADENOCARCINOMA DE PULMÃO**

SAMANTA DA SILVA GÜNDEL

Porto Alegre, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NANOCÁPSULAS MULTIPAREDE CARREGADAS COM ETOPOSIDO E
FUNCIONALIZADAS COM DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA A TERAPIA
DIRECIONADA AO ADENOCARCINOMA DE PULMÃO**

Tese apresentada por SAMANTA DA SILVA
GÜNDEL para obtenção do TÍTULO DE
DOUTORA em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Coorientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Porto Alegre, 2024

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovada em 23 de agosto de 2024, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alencar Kolinski Machado
Universidade Franciscana (UFN)

Profa. Dra. Letícia Cruz
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Profa. Dra. Elizandra Braganhol
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Profa. Dra. Leticia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Gündel, Samanta da Silva
NANOCÁPSULAS MULTIPAREDE CARREGADAS COM ETOPOSIDO E
FUNCIONALIZADAS COM DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA A
TERAPIA DIRECIONADA AO ADENOCARCINOMA DE PULMÃO /
Samanta da Silva Gündel. -- 2024.
204 f.
Orientadora: Adriana Raffin Pohlmann.

Coorientador: Guido Lenz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2024.

1. Câncer de pulmão. 2. Dano nuclear. 3.
Nanocápsulas. 4. Receptores EGF. 5. Senescência. I.
Pohlmann, Adriana Raffin, orient. II. Lenz, Guido,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Farmacêuticas Avançadas e Farmacometria (LATFAF) do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Sinalização Celular (LabSinal) do Instituto de Biociências da UFRGS. O projeto foi desenvolvido com financiamento da FAPERGS e do CNPq. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

*Dedico esta tese à minha mãe, Carmem Patricia da Silva Gündel.
Obrigada pelo amor incondicional e pelo apoio inabalável.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço às minhas orientadoras, Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres e Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann, pela oportunidade, pelo apoio, pela confiança e pelos ensinamentos compartilhados. Foi uma honra ser orientada por pesquisadoras que admiro tanto.

Ao Prof. Dr. Guido Lenz pela coorientação, pela disponibilidade e por suas valiosas contribuições, e aos colegas do LabSinal pelo acolhimento e conhecimentos compartilhados.

À Profa. Dra. Aline Ferreira Ourique, que me orientou durante minha graduação e iniciação científica, desempenhando um papel importante na minha formação acadêmica, expresso minha profunda gratidão e carinho.

Às minhas amigas, Fernanda Reis Favarin e Maiara Callegaro Velho, agradeço por estarem ao meu lado nos momentos de alegrias e nos momentos difíceis também. Que privilégio seguirmos juntas nesta caminhada.

À Danieli Rosane Dallemole que foi meu braço direito e esquerdo durante o doutorado. Obrigada pelo apoio, pelo carinho, pelas discussões científicas enriquecedoras e pelas palavras de incentivo nos momentos mais desafiadores.

Aos colegas e amigos do laboratório 405 (LATFAF), agradeço o companheirismo e os momentos de descontração regados à café. Em especial, à Profa. Dra. Karina Paese pelo acolhimento e carinho desde que cheguei ao LATFAF.

Aos meus avós, José Cláudio Bibiano da Silva e Ivone Quoos da Silva, e à minha tia, Andricia Teresinha da Silva, por todo o amor, apoio e compreensão. Mesmo com a distância, vocês sempre estiveram presentes de maneira incondicional, oferecendo palavras de encorajamento e carinho.

À minha mãe, Carmem Patricia da Silva Gündel, agradeço profundamente pelo amor incondicional e apoio constante. Nos momentos mais desafiadores, foi a sua presença, o seu carinho e as suas palavras de incentivo que me deram a força necessária para seguir em frente. Obrigada por ser meu porto seguro.

Por fim, agradeço à UFRGS, ao PPGCF e às agências de fomento (CAPES, FAPERGS, CNPq e INCT-NANOFARMA) que possibilitaram a realização desta pesquisa, e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta tese. Meu muito obrigada a todos.

RESUMO

O câncer de pulmão é o tipo de câncer mais comum e a principal causa de mortes relacionada ao câncer em todo o mundo. O etoposido (ETO), um inibidor da topoisomerase II, é um dos fármacos utilizados para a terapia do câncer de pulmão. No entanto, este fármaco apresenta baixa solubilidade aquosa e toxicidade inespecífica, ocasionando graves efeitos adversos sistêmicos e limitando sua eficácia terapêutica. A nanoencapsulação do etoposido pode ser uma alternativa para solucionar estas limitações. Além disso, a modificação da superfície das nanopartículas com estratégias visando os receptores do fator de crescimento epidérmico tipo 1 (EGFR) pode proporcionar um maior direcionamento e acúmulo em células tumorais de pulmão que superexpressam este receptor. Primeiramente, realizamos um levantamento bibliográfico sobre nanopartículas orgânicas com superfície modificada para a terapia direcionada ao câncer de pulmão. Essa pesquisa resultou na elaboração de um artigo de revisão que contempla detalhes importantes sobre os mecanismos de direcionamento às células tumorais, as principais técnicas para funcionalização da superfície, incluindo ligações covalentes e não-covalentes, e os alvos e receptores de maior interesse no câncer de pulmão. Posteriormente, desenvolvemos nanocápsulas de núcleo-lipídico contendo etoposido (NC ETO), revestidas com quitosana (NC ETO Q) e funcionalizadas com anfirregulina (AREG), fator de crescimento epidérmico (EGF), erlotinibe (ERL) ou fator de crescimento transformador-alfa (TGF- α) (NC ETO Q AREG, NC ETO Q EGF, NC ETO Q ERL e NC ETO Q TGF- α , respectivamente), e avaliamos o potencial citotóxico em células de adenocarcinoma de pulmão, resultando em dois artigos científicos experimentais. NC ETO foram desenvolvidas pela primeira vez, empregando a técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, e apresentaram distribuição homogênea de diâmetro médio (~150 nm), elevado teor de etoposido (~100%) e eficiência de encapsulação (~100%), estabilidade físico-química (28 dias sob refrigeração) e perfil de liberação biexponencial (~70% em 72 horas). Após o revestimento com quitosana e a funcionalização da superfície, obtidos através de reações interfaciais, houve um aumento do diâmetro médio (~175 nm), a distribuição manteve-se unimodal, inversão do potencial zeta (+12 mV), e as taxas de teor de etoposido (>95%) e eficiência de encapsulação (>90%) mantiveram-se elevadas. A citotoxicidade dos tratamentos foi avaliada, primeiramente, empregando método colorimétrico (ensaio MTT) em células de adenocarcinoma de pulmão (A549), onde observamos que em concentrações superiores à 3×10^{11} partículas/mL a redução da viabilidade celular está relacionada a partícula *per se*. Por isso, uma concentração inferior de partículas, equivalente à 10 μ mol de etoposido, foi selecionada para dar continuidade nos experimentos. Comparando etoposido em solução (ETO) e NC ETO (antes da modificação da superfície), houve uma redução da viabilidade celular 3x superior após 48h de

exposição à nanocápsula. Comparando a nanocápsula etoposido revestida não-funcionalizada (NC ETO Q) e as nanocápsulas etoposido revestidas e funcionalizadas, após exposição de 48h aos tratamentos, um aumento significativo da citotoxicidade foi observado com a NC ETO Q ERL. Também avaliamos a captação das nanocápsulas funcionalizadas por células A549, onde foi observado que após a funcionalização houve aumento significativo da internalização das nanocápsulas, provavelmente via endocitose mediada por receptor, neste caso EGFR. Posteriormente, as células A549 foram transduzidas com 53BP1-mApple, uma proteína fluorescente de marcação de dano nuclear, e acompanhadas em tempo real, durante 20 dias, utilizando uma plataforma automatizada (Incucyte®) de rastreamento de células vivas. As células foram analisadas quanto ao número de células vivas, morfologia, área nuclear e número de danos (*focis* de 53BP1). Para isso, utilizamos um *script* de programação em *Python* que permitiu realizar a quantificação da fluorescência nas células únicas transduzidas com 53BP1-mApple. Comparando ETO e NC ETO (antes da modificação da superfície), observamos que a nanocápsula promoveu danos nucleares significativos a longo prazo (20 dias), aumentando conseqüentemente a indução da senescência (caracterizada por uma maior área nuclear) e reduzindo significativamente a subpopulação proliferativa em comparação com o etoposido em solução. Após a modificação da superfície, foi verificada uma melhoria dos efeitos a longo prazo induzidos pela nanoencapsulação do etoposido, com a NC ETO Q AREG exibindo os maiores índices de senescência e dano nuclear, seguida da NC ETO Q ERL, NC ETO Q EGF, NC ETO Q TGF α , NC ETO Q, e ETO. Por fim, nossos resultados destacam a superioridade da nanoencapsulação, particularmente com funcionalização da superfície, no aumento dos efeitos citotóxicos a longo prazo e indução de senescência do etoposídeo em células de câncer de pulmão, sendo uma estratégia inovadora para superar as limitações deste tratamento e encorajando fortemente futuras investigações.

Palavras-chave: Câncer de pulmão; Dano nuclear; Nanocápsulas; Receptores EGF; Senescência.

ABSTRACT

Multi-wall nanocapsules loaded with etoposide and functionalized with different strategies for targeted therapy of lung adenocarcinoma

Lung cancer is the most common type of cancer and the leading cause of cancer-related deaths worldwide. Etoposide (ETO), a topoisomerase II inhibitor, is one of the treatments used in lung cancer therapy. However, this drug has low aqueous solubility and nonspecific toxicity, which can cause serious systemic adverse effects and limit its therapeutic efficacy. Nanoencapsulation of etoposide may provide an alternative approach to overcoming these limitations. Moreover, surface modification of nanoparticles with strategies targeting the epidermal growth factor receptor type 1 (EGFR) may enhance targeting and accumulation in lung tumor cells that overexpress this receptor. First, we conducted a literature review on surface-modified organic nanoparticles for targeted lung cancer therapy. This research culminated in the preparation of a review article that details the mechanisms of tumor cell targeting, the main techniques for surface functionalization, including covalent and non-covalent bonds, and the most relevant targets and receptors in lung cancer. Subsequently, we developed lipid-core nanocapsules containing etoposide (NC ETO), coated with chitosan (NC ETO C), and functionalized with amphiregulin (AREG), epidermal growth factor (EGF), erlotinib (ERL), or transforming growth factor- α (TGF- α) (NC ETO C AREG, NC ETO C EGF, NC ETO C ERL, and NC ETO C TGF- α , respectively), and evaluated their cytotoxic potential in lung adenocarcinoma cells, resulting in two experimental scientific articles. NC ETO were developed for the first time using the interfacial deposition technique of a preformed polymer, resulting in a homogeneous distribution of average diameter (~ 150 nm), high etoposide content ($\sim 100\%$) and encapsulation efficiency ($\sim 100\%$), physical-chemical stability (28 days under refrigeration), and a biexponential release profile ($\sim 70\%$ over 72 hours). After coating with chitosan and functionalizing the surface, achieved through interfacial reactions, there was an increase in the mean diameter (~ 175 nm), the distribution remained unimodal, inversion of the zeta potential ($+12$ mV), and the etoposide content ($>95\%$) and encapsulation efficiency ($>90\%$) remained high. The cytotoxicity of the treatments was initially evaluated using a colorimetric method (MTT assay) in lung adenocarcinoma cells (A549), where we observed that at concentrations higher than 3×10^{11} particles/mL, the reduction in cell viability was related to the particles per se. Therefore, a lower particle concentration, equivalent to $10 \mu\text{mol}$ of etoposide, was selected for further experiments. Comparing etoposide in solution (ETO) and NC ETO (before surface modification), we observed a threefold greater reduction in cell viability after 48 hours of exposure to the nanocapsules. Comparing the non-functionalized and

the coated (NC ETO C) and functionalized etoposide nanocapsules, a significant increase in cytotoxicity was observed with NC ETO C ERL after 48 hours of exposure. We also evaluated the uptake of functionalized nanocapsules by A549 cells, where it was observed that functionalization significantly increased nanocapsule internalization, likely via receptor-mediated endocytosis, specifically through EGFR. A549 cells were then transduced with 53BP1-mApple, a fluorescent protein that marks nuclear damage, and monitored in real time for 20 days using an automated live cell tracking platform (Incucyte®). Cells were analyzed for number of live cells, morphology, nuclear area, and number of damages (53BP1 foci). A Python programming script was used to quantify fluorescence in single cells transduced with 53BP1-mApple. Comparing ETO and NC ETO (before surface modification), we observed that the nanocapsules promoted significant nuclear damage over the long term (20 days), which consequently increased senescence induction (characterized by a larger nuclear area) and significantly reduced the proliferative subpopulation compared to etoposide in solution. After surface modification, an enhancement in the long-term effects induced by nanoencapsulation of etoposide was observed, with NC ETO C AREG showing the highest rates of senescence and nuclear damage, followed by NC ETO C ERL, NC ETO C EGF, NC ETO C TGF- α , NC ETO C, and ETO. In conclusion, our results highlight the superiority of nanoencapsulation, particularly with surface functionalization, in enhancing the long-term cytotoxic effects and senescence induction of etoposide in lung cancer cells, presenting an innovative strategy to overcome the limitations of this treatment and strongly encouraging future investigations.

Keywords: EGF receptors; Lung cancer; Nanocapsules; Nuclear damage; Senescence.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 CÂNCER DE PULMÃO	24
3.2 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) ..	26
3.2.1 Fator do Crescimento Epidérmico (EGF)	27
3.2.2 Fator de Crescimento Transformador-alfa (TGF-α)	27
3.2.3 Anfirregulina (AREG)	28
3.2.4 Erlotinibe (ERL)	28
3.3 ETOPOSIDO	29
3.4 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA ENTREGA DE ETOPOSIDO	31
3.5 NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO	32
3.6 REVESTIMENTO E FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO-LIPÍDICO	34
4 CAPÍTULO I	37
5 CAPÍTULO II	117
6 CAPÍTULO III	131
7 DISCUSSÕES GERAIS	177
8 CONCLUSÕES GERAIS	183
9 PERSPECTIVAS	185
REFERÊNCIAS	187

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, representando cerca de 9,6 milhões de mortes, ou seja, uma em cada seis mortes (OMS, 2018). Mundialmente, o câncer de pulmão apresenta a maior incidência de casos diagnosticados e as maiores taxas de mortalidade entre todos os tipos de câncer. Estima-se que em 2022 foram diagnosticados cerca de 2,5 milhões de casos de câncer de pulmão e ocorreram mais de 1,8 milhões de óbitos (*International Agency for Research on Cancer, 2024*).

O diagnóstico precoce do câncer de pulmão é um dos maiores desafios, sendo que na maioria dos casos o diagnóstico é obtido em estágio metastático avançado. A rápida disseminação metastática das células tumorais para órgãos distantes (principalmente sistema nervoso, ossos, fígado e glândulas suprarrenais) é a principal razão para a baixa taxa de sobrevivência de pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado, representando uma taxa de sobrevivência de 5 anos em apenas 10% dos casos (Mangal et al., 2017).

A quimioterapia intravenosa no câncer de pulmão é recomendada para tentar controlar a proliferação das células tumorais e prolongar a sobrevivência do paciente. O etoposido é um derivado semissintético da podofilotoxina, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como um dos fármacos utilizados na quimioterapia combinada para o tratamento do câncer de pulmão (Pooja et al., 2015). O etoposido é um potente inibidor da topoisomerase II, enzima responsável por quebras transitórias na fita dupla do DNA, e atua nas fases S (síntese) e G2 (crescimento) do ciclo celular, promovendo o processo apoptótico das células. No entanto, o etoposido apresenta como principais limitações a baixa solubilidade aquosa, a instabilidade química e a toxicidade inespecífica para tecidos normais (Choudhury et al., 2020).

Os sistemas nanoestruturados são considerados uma alternativa inovadora e promissora para a entrega de fármacos antineoplásicos, como o etoposido, pois podem possibilitar liberação sustentada e entrega direcionada às células tumorais. (Saliou et al., 2013). Abordagens baseadas em nanocarreadores orgânicos com a finalidade de melhorar as propriedades farmacocinéticas do etoposido incluem o uso de lipossomas (Mehrabi et al., 2016), nanopartículas lipídicas sólidas (Pooja et al., 2015; Wei et al., 2016), nanoemulsões (Leite et al., 2015), nanopartículas de PLGA (Fatma et al., 2016), nanocápsulas (Saliou et al., 2013), nanoesferas (Patlolla; Vobalaboina, 2008), entre outras (Choudhury et al., 2020).

As nanocápsulas de núcleo lipídico destacam-se como um sistema nanoestruturado promissor, pois apresentam um núcleo de organogel formado a partir da mistura de monoestearato de sorbitano e triglicerídeos de cadeia média, podendo proporcionar um aumento significativo da capacidade de encapsulação da substância ativa (Dallemole et al., 2023). Além da alta eficiência de encapsulamento do fármaco, acredita-se que a nanoencapsulação do etoposido pode apresentar como vantagens o aumento da solubilidade aparente, da biodisponibilidade e da estabilidade físico-química, sendo necessárias menores doses terapêuticas e, conseqüentemente, reduzindo os efeitos colaterais.

O revestimento e a funcionalização da superfície de sistemas nanoestruturados podem proporcionar propriedades adicionais, principalmente um maior direcionamento e acúmulo em células tumorais. O revestimento com quitosana, um copolímero policatiônico natural aprovado pela FDA, tem sido relatado como um promissor transportador de entrega de fármacos, devido à sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (Li et al., 2018). Além disso, permite uma maior internalização em células tumorais, pois a natureza catiônica da quitosana interage facilmente com as cargas negativas presentes na membrana celular (Li et al., 2017).

Por sua vez, a funcionalização refere-se à modificação da superfície destes sistemas, que pode incluir a conjugação de produtos químicos ou biomoléculas (como anticorpos, peptídeos, oligonucleotídeos, ácido fólico) (Prabhakar, 2015). Uma vez que células tumorais de pulmão superexpressam receptores do fator de crescimento epidérmico tipo 1 (conhecidos como EGFR1 ou HER1 ou ErbB1), estando presente em cerca de 40-80% de todos os casos de câncer de pulmão de células não-pequenas (Liu et al., 2017), infere-se que a funcionalização da superfície de nanopartículas com uma substância com afinidade por este receptor pode ser uma estratégia para aumentar o direcionamento e a eficácia de antineoplásicos para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão.

Considerando a alta incidência e mortalidade do câncer de pulmão e todas as limitações do tratamento, são necessárias novas alternativas para aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade inespecífica. O presente trabalho apresenta uma proposta inédita com a finalidade de desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico contendo etoposido, revestidas com quitosana e funcionalizadas com diferentes ligantes, e baseia-se na hipótese de promover uma potencialização da eficácia terapêutica a partir da combinação destas estratégias.

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanocápsulas de núcleo-lipídico carregadas com etoposido, revestidas com quitosana e funcionalizadas com diferentes ligantes e, avaliar seu potencial citotóxico no adenocarcinoma de pulmão.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar um levantamento bibliográfico sobre nanopartículas orgânicas com superfície modificada para a terapia direcionada ao câncer de pulmão, a fim de redigir um artigo de revisão;
- Revalidar um método analítico para a quantificação do etoposido;
- Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de núcleo-lipídico carregadas com etoposido;
- Avaliar a estabilidade físico-química e o perfil de liberação da formulação;
- Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de núcleo-lipídico carregadas com etoposido e revestidas com quitosana;
- Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de núcleo-lipídico carregadas com etoposido, revestidas com quitosana e funcionalizadas por complexação organometálica com diferentes substâncias direcionadas à receptores EGF;
- Verificar a viabilidade celular de células de adenocarcinoma de pulmão (A549) após exposição aos tratamentos;
- Avaliar a captação celular das nanocápsulas funcionalizadas pelas células A549;
- Acompanhar em tempo real e por longo período a citotoxicidade dos tratamentos em células A549 transduzidas com 53BP1;
- Estimar o efeito dos tratamentos no ciclo celular, na indução de senescência e na indução de danos nucleares.

3.1 CÂNCER DE PULMÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e, de acordo com a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, o número de óbitos por câncer irá aumentar cerca de 13,2 milhões por ano até 2030. O câncer de pulmão é o tipo mais comum de tumor maligno, representando mais de 2,4 milhões de casos diagnosticados por ano, e a principal causa de morte por câncer entre homens e mulheres, ocasionando mais de 1,8 milhões de óbitos por ano, conforme apresentado na Figura 1 (IARC, 2024).

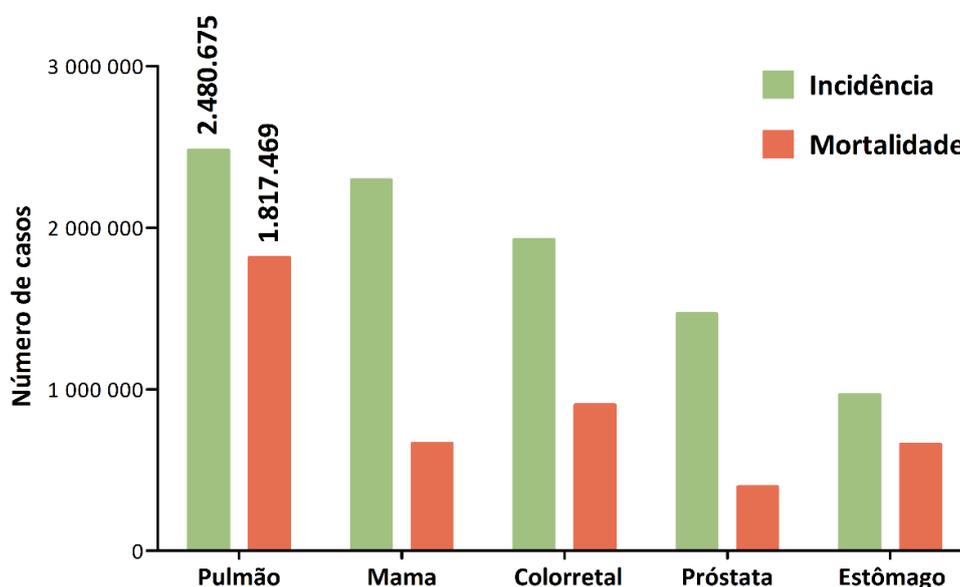


Figura 1. Números estimados de incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer no Mundo, em ambos os sexos e em todas as idades. Fonte: Elaborado pelo(a) autor(a) com dados disponibilizados pela *International Agency for Research on Cancer (IARC, 2024)*.

Com base em sua histologia, o câncer de pulmão pode ser dividido em dois principais tipos, o de pequenas células (SCLC, *Small Cell Lung Câncer*) e o de não-pequenas células (NSCLC, *Non-Small Cell Lung Câncer*), sendo o segundo o mais comum, representando mais de 85% dos casos. O NSCLC ainda pode ser subdividido em três subtipos: o carcinoma epidermóide (25 a 30% dos casos, inicia-se nas células que revestem o interior das vias aéreas), o adenocarcinoma (40% dos casos, tem início nos alvéolos e apresenta crescimento lento) e o carcinoma de grandes células

(10 a 15% dos casos, surge em qualquer parte do pulmão e tende a crescer e se disseminar rapidamente) (Chen et al., 2020).

Embora o tabagismo seja o principal fator de risco (80-90%) para o surgimento e está diretamente relacionado à patogênese do NSCLC, aproximadamente 10% dos casos ocorrem em pessoas que nunca fumaram. Como nem todas as pessoas que fumam desenvolvem câncer de pulmão, outros fatores, como os genéticos, podem influenciar no risco. O desenvolvimento do NSCLC em não fumantes pode ser causado pelo fumo passivo ou pela exposição à radiação e a agentes químicos cancerígenos. Ocorre principalmente em pessoas mais velhas, sendo que a idade média no momento do diagnóstico é de 70 anos (Testa et al., 2018).

Visto que, geralmente, o NSCLC não provoca sintomas nas fases iniciais, o diagnóstico normalmente é obtido apenas em estágio avançado com disseminação metastática (estágio IV), que ocorre rapidamente, limitando consideravelmente as chances de um tratamento curativo (Rodak et al., 2021). Sendo assim, a quimioterapia intravenosa no câncer de pulmão é recomendada para tentar controlar a proliferação das células tumorais e prolongar a sobrevivência do paciente. No entanto, as principais limitações da quimioterapia convencional estão relacionadas à baixa biodisponibilidade das substâncias quimioterápicas, sendo necessária administração de elevadas concentrações, e à toxicidade inespecífica, afetando tanto células tumorais como células saudáveis, ocasionando graves efeitos adversos (Iglesias et al., 2018; Hiddinga et al., 2021).

Avanços recentes a respeito da compreensão das vias de sinalização celular que controlam os processos de sobrevivência celular vêm identificando e esclarecendo as possíveis mutações genéticas que influenciam diretamente nos processos de resistência aos quimioterápicos e agressividade do tumor (Guo et al., 2022). No NSCLC, mutações recorrentes nos genes EGFR, K-RAS e B-RAF ocorrem mais comumente no adenocarcinoma de pulmão, sendo que a superexpressão de EGFR ou mutações no EGFR intracelular foram observadas em cerca de 60% dos casos (Karlsen et al., 2021). Uma vez que o EGFR é ativado por vários mecanismos, como superexpressão do receptor, mutação, dimerização do receptor dependente do ligante e ativação independente do ligante, sua inibição específica é um dos principais alvos para a terapia do NSCLC (Yewale et al., 2013).

3.2 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é uma proteína transmembrana de 170 kDa e um receptor tirosina quinase. É membro da família do receptor epidérmico humano (HER), que compreende quatro receptores distintos: EGFR1 (também conhecido como HER1/ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4) (Appert-Collin et al., 2015).

Os EGFRs são superexpressos em muitos tumores sólidos, incluindo câncer de mama, pâncreas, cabeça e pescoço, próstata, renal e NSCLC, tornando estes receptores alvos terapêuticos importantes. A quantidade de superexpressão de EGFRs determina a extensão da desregulação de suas funções naturais (regulação da proliferação celular, diferenciação, migração e sobrevivência) (O'Leary et al., 2020). O aumento da expressão do EGFR1 é uma das anormalidades mais precoces e frequentemente detectada no epitélio brônquico de pacientes com câncer de pulmão, estando presente em cerca de 40-80% de todos os casos de NSCLC (Liu et al., 2017).

Uma vez que a superexpressão depende da ativação via ligante-receptor, os ligantes de EGFR podem ser divididos em duas classes: os de alta afinidade (EGF, TGF- α , HB-EGF e β -celulina), que se ligam ao receptor com uma constante de dissociação entre 1 e 100 nM e, os de baixa afinidade (anfirregulina, epiregulina e epígeno), que se ligam com uma constante de dissociação maior que 100 nM (Yewale et al., 2013). EGF, TGF- α e AREG ligam-se especificamente apenas ao EGFR, mas não produzem respostas biológicas idênticas, enquanto HB-EGF, β -celulina, epiregulina e epígeno também se ligam aos receptores HER3 e HER4 (Singh et al., 2016).

A superexpressão destes receptores vêm sendo explorada como uma estratégia promissora como novos alvos terapêuticos, visto que pode possibilitar o direcionamento de substâncias quimioterápicas com maior especificidade ao tecido tumoral e, assim, reduzir a toxicidade inespecífica que afeta células saudáveis e potencializar a eficácia terapêutica (Rodak et al., 2021).

3.2.1 Fator do Crescimento Epidérmico (EGF)

O fator de crescimento epidérmico (EGF) foi um dos primeiros fatores de crescimento descobertos no início dos anos 1960, sendo descrito como um polipeptídeo capaz de estimular o crescimento e a diferenciação de células de origem epidérmica e mesodérmica. Foi demonstrado que o EGF se liga com alta afinidade a um receptor específico, EGFR, localizado na membrana celular e estimula a rápida ativação da proteína quinase (Weiner; Wu, 2017).

Através da ligação e ativação do EGFR, o próprio EGF ou combinado com outros fatores de crescimento, é responsável por desencadear diversas respostas biológicas, incluindo proliferação, diferenciação e migração celular. Em relação a sua relevância clínica, o EGF é um fator fundamental na cascata de cicatrização e tem sido amplamente utilizado clinicamente para acelerar o reparo de úlceras/feridas (Zeng; Harris, 2014). Por outro lado, a desregulação da ligação EGF-EGFR pode aumentar a proliferação e a migração de células tumorais através das vias Ras/Raf/MEK/ERK e PI3K/AKT. Além disso, a sinalização de EGFR induzida por EGF aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) pela dupla oxidase 1 (Sirokmány et al., 2014).

O EGF está envolvido na morfogênese dos dentes, cérebro, trato reprodutivo, pele, trato gastrointestinal, na diferenciação e função cardiovascular, regeneração epitelial e epitélio da córnea. É encontrado em altas concentrações (50-500 ng·mL⁻¹) na bile, urina, leite e fluido prostático, em concentrações médias (5-50 ng·mL⁻¹) em lágrimas, fluido folicular, esperma e plasma seminal, e em baixas concentrações (1-2 ng·mL⁻¹) no plasma, soro e saliva (Wee; Wang, 2017).

3.2.2 Fator de Crescimento Transformador-alfa (TGF-α)

O TGF-α foi o segundo ligante de EGFR a ser descoberto, e consiste em um peptídeo de 50 resíduos aminoácidos. A estrutura secundária do TGF-α é idêntica à do EGF e conserva as três pontes dissulfeto em sua estrutura. O TGF-α liga e transmite sinais exclusivamente através do EGFR. O TGF-α é sintetizado como uma proteína transmembrana glicosilada de 160 resíduos aminoácidos e 5,6 kDa.

O TGF- α está envolvido em diversas vias de sinalização celular, podendo atuar no aumento da proliferação por meio da ativação da sinalização a jusante do EGFR, mas também podendo mediar outras funções, como produção de muco e inibição da secreção de ácido gástrico. A expressão de TGF- α ocorre em células tumorais, bem como, em células epiteliais normais, neste caso, queratinócitos humanos cultivados (Singh; Coffey, 2014).

3.2.3 Anfirregulina (AREG)

A anfirregulina (AREG) é uma glicoproteína de 84 aminoácidos descoberta e caracterizada no final da década de 1980. Consiste em uma cadeia única hidrofílica, inicialmente sintetizada como um precursor transmembrana glicosilado de 252 resíduos de aminoácidos. Se liga e ativa o EGFR, pelo qual ela tem uma baixa afinidade quando comparada ao EGF e ao TGF- α . Apresenta na sua estrutura seis cisteínas envolvidas em ligações dissulfeto, que conferem a estrutura de três voltas. O domínio amino-terminal de AREG é hidrofílico e contém um domínio de ligação à heparina N-glicosilada. O domínio carboxi-terminal possui um domínio semelhante ao EGF e mostra notável homologia com outros membros da família, 38% de homologia ao EGF e 32% de homologia ao TGF- α (Busser et al., 2011).

A expressão de AREG pode ser induzida através da ativação da via AMPc/PKA através da prostaglandina E2, da via proteína quinase C, do hormônio da paratireóide, da policistina-1, da fumaça de tabaco ou da hipóxia, além de fatores de crescimento e citocinas. AAREG participa de uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento da glândula mamária, implantação do blastocisto, formação óssea, crescimento axonal e proliferação de queratinócitos (Berasain; Avila, 2014).

3.2.4 Erlotinibe (ERL)

O erlotinibe é um inibidor reversível e seletivo do EGFR, que atua inibindo a fosforilação da tirosina quinase e competindo com o ATP pelo sítio de ligação intracelular do receptor. É classificado como um derivado da 4-anilinoquinazolina, que pode induzir a parada do ciclo celular na fase G1 e, posteriormente, apoptose. Foi

aprovado em 2004 pela FDA, sendo indicado para o tratamento por via oral de pacientes com NSCLC ou câncer de pâncreas. No NSCLC, o erlotinibe é utilizado como tratamento de segunda ou terceira linha em casos metastáticos avançados, em combinação com outros quimioterápicos intravenosos (Piperdi; Perez-Soler, 2012).

3.3 ETOPOSIDO

Atualmente, o tratamento do NSCLC é definido de acordo com o estágio, sendo que, raramente casos de NSCLC são diagnosticados em um estágio inicial. No estágio I ou II, o tratamento indicado é a ressecção cirúrgica completa e, se não for possível, a radioterapia convencional pode ser considerada. Após a radioterapia, a combinação de quimioterápicos mais utilizada inclui cisplatina e etoposido. Nos estágios III e IV, a terapia padrão de primeira linha consiste na associação entre um agente alquilante (cisplatina ou carboplatina), com um inibidor da topoisomerase II (etoposido), ou um antimetabólito (docetaxel ou paclitaxel) ou um antimitótico (pemetrexede). Em casos de NSCLC metastático avançado que não respondem a terapia de primeira linha, pode recorrer-se à utilização da terapia direcionada, que inclui inibidores de tirosina-quinase (erlotinibe ou gefitinibe), ou à imunoterapia, baseada na utilização de anticorpos monoclonais (Bourreau et al., 2023).

Apesar dos avanços no tratamento do NSCLC, o prognóstico permanece limitado devido à presença de tumores localmente avançados ou metastáticos no momento do diagnóstico, bem como a aquisição de múltiplos mecanismos de resistência. A heterogeneidade do NSCLC é um dos principais agravantes na resistência às terapias quimioterápicas, sendo que apenas 15 a 20% dos pacientes em estágio metastático avançado respondem ao tratamento de segunda linha com a terapia direcionada ou imunoterapia (Herbst et al., 2018).

Dentre os quimioterápicos utilizados na prática, destacam-se os inibidores da topoisomerase por apresentarem a capacidade de interferir em processos vitais como transcrição e replicação celular. Neste contexto, o etoposido é um dos agentes antineoplásicos mais amplamente utilizado na quimioterapia combinada de primeira linha em casos de câncer testicular, câncer de pulmão, linfoma (Hodgkin e não-Hodgkin), leucemia, glioblastoma multiforme, câncer de mama e de ovário recidivantes ou refratários (Baldwin; Osheroff, 2005).

O etoposido ($C_{29}H_{32}O_{13}$ - $588,6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) é um derivado semissintético da podofilotoxina, extraída a partir dos rizomas de espécies do gênero *Podophyllum*, que foi sintetizado pela primeira vez em 1966 e aprovado em 1983 pela FDA para a terapia do câncer. As modificações químicas que diferem o etoposido da podofilotoxina e promovem seu potencial inibidor da topoisomerase II incluem: desmetilação (hidroxila) em C-4' do anel E, epimerização em C-4, presença de um carboidrato (glicose) em C-4, e condensação de um aldeído com a porção de glicose entre as posições 4" e 6" (Figura 2). Além disso, a estereoquímica da trans-lactona em C-2:C-3 é essencial para a manutenção da atividade citotóxica tanto da podofilotoxina quanto do etoposido (Meresse et al., 2004; Sinkule, 1984).

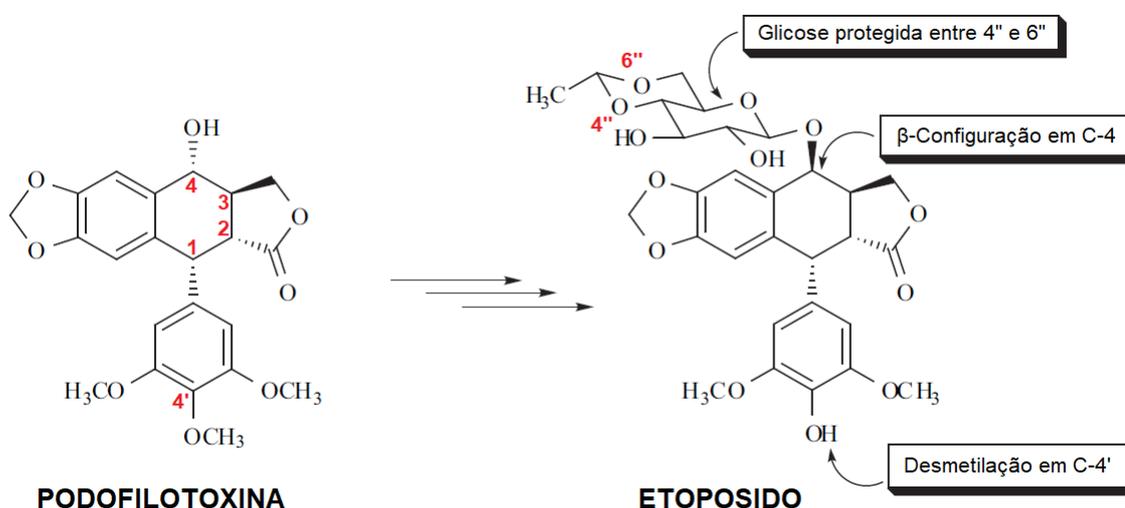


Figura 2. Estrutura química da podofilotoxina e do etoposido. Fonte: Elaborado pelo(a) autor(a) baseado em Meresse et al. (2004).

O etoposido atua inibindo a enzima topoisomerase II e, assim, bloqueando a síntese de DNA no estágio pré-mitótico. Seu mecanismo de ação envolve a ligação reversível à tubulina, impedindo a formação de microtúbulos e promove o processo apoptótico das células cancerígenas nas fases de síntese (S) e crescimento (G2) do ciclo celular. O etoposido desencadeia a apoptose mediada por caspases, que ocorre principalmente pela via do citocromo C/caspase 9. Também estimula a interação do ligante Fas ao seu receptor na membrana celular, ocasionando a formação de um complexo de sinalização indutor de morte (Motyka et al., 2023).

Os principais desafios da terapia com etoposido estão relacionados a sua baixa solubilidade aquosa ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), baixa biodisponibilidade, desenvolvimento de

mecanismos de resistência, inativação metabólica e graves efeitos colaterais, assim como ocorre com outros quimioterápicos. Uma vez que não possui toxicidade seletiva, os principais efeitos colaterais da terapia com etoposido incluem toxicidade gastrointestinal, toxicidade hematológica, alopecia reversível e reações alérgicas. A toxicidade hematológica representada por mielossupressão grave (leucopenia e trombocitopenia) desencadeia síndromes mielodisplásicas que frequentemente evoluem para leucemia mielocítica aguda (Kluska; Woźniak, 2021).

3.4 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA ENTREGA DE ETOPOSIDO

A nanotecnologia é definida como a compreensão e controle da matéria e processos na escala nanométrica, possuindo pelo menos uma de suas dimensões abaixo de 100 nanômetros, permitindo novas aplicações em diversos setores (ISO TC 229, 2005; Demetzos, 2016). O uso da nanomedicina, um ramo da nanotecnologia, vem destacando-se consideravelmente nos últimos anos e apresentando potencial aplicabilidade para a saúde humana, incluindo o tratamento do câncer, visto que, há uma busca crescente por tratamentos mais eficazes, direcionados para alvos específicos e com redução dos efeitos adversos (Martinelli et al., 2019).

Na terapia do câncer, os sistemas nanoestruturados são considerados uma alternativa inovadora e promissora para a entrega de fármacos antineoplásicos, como o etoposido, pois podem promover uma liberação sustentada e entrega direcionada às células tumorais (Hossen et al., 2019). Além disso, os sistemas nanoestruturados podem melhorar a solubilidade aparente de fármacos lipofílicos, aumentar a estabilidade físico-química, promover uma maior biodisponibilidade, sendo necessárias menores doses terapêuticas, e conseqüentemente, reduzindo possíveis efeitos adversos (Dang; Guan, 2020).

Abordagens nanotecnológicas para melhorar as propriedades farmacocinéticas e terapêuticas do etoposido incluem principalmente a aplicação de nanocarreadores orgânicos, como lipossomas (Kazemabadi et al., 2019; Mehrabi et al., 2016; Sengupta et al., 2001), nanoemulsões (Kretzer et al., 2012; Lo Prete et al., 2006; Tavares et al., 2011), nanopartículas lipídicas sólidas (Athawale et al., 2014; Reddy et al., 2004; Reddy et al., 2005; Reddy et al., 2006), carreadores lipídicos nanoestruturados (Jiang et al., 2016a; Jiang et al., 2016b; Khajavinia et al., 2012; Zhang et al., 2016),

dendrímeros (Sideratou et al., 2010), micelas poliméricas (Gaber et al., 2020; Ukawala et al., 2012; Varshosaz et al., 2014), nanopartículas de PLGA (Mitra et al., 2011; Pimple et al., 2012; Snehalatha et al., 2008; Snehalatha et al., 2013) e nanocápsulas convencionais (Ayyappan; Shanmugam, 2018; Saliou et al., 2013; Thiyagarajan et al., 2019).

Para aplicação *in vitro* e/ou *in vivo* no NSCLC, estudos já demonstraram o carregamento do etoposido em lipossomas PEGuilados (Kazemabadi et al., 2019), nanopartículas lipídicas sólidas funcionalizadas com transferrina (Pooja et al., 2015), carreadores lipídicos nanoestruturados (Zhang et al., 2011; Du; Yin, 2022), nanopartículas de PLGA (Pimple et al., 2012; Zhang et al., 2021), nanoesferas (Yordanov et al., 2013), nanocarreadores magnéticos de hidróxido duplo (Zhu et al., 2016), nanotubos de carbono funcionalizados com EGF (Chen et al., 2012), e nanopartículas de PLA (Yadav et al., 2014).

3.5 NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO

Diferentemente das nanocápsulas convencionais, as nanocápsulas de núcleo lipídico são compostas por uma parede polimérica, geralmente, de poli (ϵ -caprolactona) (PCL), um poliéster alifático biodegradável e biocompatível, ao redor do núcleo contendo dispersão de monoestearato de sorbitano e triglicerídeos de cadeia média (Venturini et al., 2011; Dallemole et al., 2023). Alguns estudos demonstraram que as nanocápsulas de núcleo lipídico apresentam capacidade de carga do fármaco e proteção contra instabilidade superior às nanocápsulas convencionais, provavelmente, devido à presença de monoestearato de sorbitano no núcleo oleoso (Ourique et al., 2010; Fiel et al., 2011; Poletto et al., 2015).

Nanocápsulas de núcleo lipídico foram desenvolvidas pela primeira vez por Jäger e colaboradores (2009) com a finalidade de avaliar a liberação sustentada do anti-inflamatório indometacina nanoencapsulado a partir da variação da viscosidade do núcleo e da área de superfície da partícula. Os resultados obtidos por modelagem matemática demonstraram uma maior meia-vida do fármaco diretamente proporcional ao aumento das concentrações de lipídios do núcleo. Além disso, estudos realizados por Bulcão e colaboradores (2013) avaliaram a toxicidade *in vivo* aguda e subcrônica das nanocápsulas de núcleo lipídico (não-carregadas) e não observaram nenhuma

toxicidade significativa, indicando que as nanocápsulas de núcleo lipídico podem ser um sistema seguro para entrega de fármacos.

Até o momento, não existem pesquisas disponíveis sobre a encapsulação do etoposido em nanocápsulas de núcleo lipídico, porém, o potencial antitumoral da nanoencapsulação de outros fármacos e substâncias neste sistema já foi relatado. Para a terapia do câncer de mama, foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo lipídico contendo metotrexato (Yurgel et al., 2014) ou doxorrubicina (Antonow et al., 2017), e ambas as formulações apresentaram maior internalização nas células tumorais e potencialização dos efeitos antineoplásicos em linhagens de células de adenocarcinoma mamário.

Para o tratamento do glioblastoma multiforme foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo lipídico contendo diferentes fármacos. Nanocápsulas contendo indometacina, trans-resveratrol, curcumina ou metotrexato foram desenvolvidas por Bernardi e colaboradores (2013), Figueiró e colaboradores (2013), Zanotto-Filho e colaboradores (2013) e Pereira e colaboradores (2018), respectivamente, e demonstraram potencial citotóxico superior em células de glioma, além disso, as formulações não ocasionaram citotoxicidade em células saudáveis, sugerindo a seletividade para as células tumorais.

Nanocápsulas de núcleo lipídico carregadas com melatonina foram capazes de reduzir a citotoxicidade e genotoxicidade induzidas pelo paraquat em uma linhagem de células pulmonares (Charão et al., 2015). Enquanto nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína foram capazes de induzir apoptose e parada do ciclo celular na fase G1, efeito que não foi observado com o fármaco livre (Schultze et al., 2014). Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína também foram desenvolvidas para o tratamento de leucemia mielóide crônica, e os resultados obtidos demonstraram melhora da estabilidade físico-química do fármaco, bem como, proteção contra radiação UVA e UVC. Além disso, foi observada uma atividade antitumoral mais prolongada das nanocápsulas em comparação com a tretinoína livre (Ourique et al., 2010).

3.6 REVESTIMENTO E FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO-LIPÍDICO

A modificação da superfície das nanopartículas surgiu como uma estratégia que visa aprimorar e/ou adicionar propriedades úteis para a utilização em aplicações biomédicas, principalmente, no que diz respeito ao aumento da absorção celular e ao direcionamento específico à sítios alvos, como tecidos tumorais (Seidu et al., 2022). O aumento da absorção celular baseia-se, principalmente, no direcionamento passivo de nanopartículas que se beneficiam do efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aumentado em células tumorais. Este efeito EPR possibilita o acúmulo passivo das nanopartículas no microambiente tumoral por meio de suas propriedades físicas, incluindo tamanho, forma e carga superficial (Sanità et al., 2020).

Neste contexto, nanopartículas revestidas com quitosana podem se beneficiar do efeito EPR aumentado no microambiente tumoral e apresentar vantagens para a entrega de drogas antitumorais. Além disso, a quitosana é um polímero catiônico de origem natural, considerado como não-tóxico, biodegradável e biocompatível (Bender et al., 2012; Zhang et al., 2019). Devido a sua natureza catiônica, a presença da quitosana na superfície das nanopartículas pode favorecer sua internalização, através de interações eletrostáticas com a membrana plasmática e/ou com componentes e proteínas celulares com carga negativa (Ding; Guo, 2022).

Por outro lado, o direcionamento específico à sítios alvos baseia-se no direcionamento ativo, que depende da ligação entre um ligante, presente na superfície das nanopartículas, com um receptor, presente na superfície celular. Esta ligação específica ligante-receptor pode induzir endocitose mediada por receptor, potencializando o acúmulo seletivo das nanopartículas nas células-alvo. Geralmente, a funcionalização da superfície de nanopartículas é realizada com pequenas proteínas, peptídeos, anticorpos e seus fragmentos, aptâmeros, oligossacarídeos, entre outros, que podem interagir especificamente com receptores de células-alvo (Menon et al., 2022).

Estudos anteriores realizados pelo grupo propuseram a funcionalização da superfície de nanocápsulas de núcleo-lipídico realizada por automontagem e reações interfaciais, através do complexo lecitina-quitosana-metal-ligante. Esta estratégia consiste, basicamente, em três etapas consecutivas de reações interfaciais: (1) interação eletrostática entre os grupamentos amino da quitosana (carga positiva) com

os grupamentos fosfatos (carga negativa) presentes na lecitina; (2) formação de um quelato a partir da interação de um íon metálico (Fe^{2+} , Zn^{2+} ou Au^{3+}) com o grupamento amino presente na quitosana; e (3) interação do quelato com um ligante que contém átomos de oxigênio e nitrogênio (Bender et al., 2014).

Nanocápsulas de núcleo-lipídico, revestidas com quitosana e funcionalizadas através do complexo organometálico com o íon Fe^{2+} foram desenvolvidas por Mayer e colaboradores (2015) e por De Marchi e colaboradores (2022a). No primeiro estudo, nanocápsulas de núcleo-lipídico não-carregadas foram preparadas e a sua superfície modificada com laronidase, que é utilizada como terapia de reposição enzimática na doença genética Mucopolissacaridose I (Mayer et al., 2015). No segundo estudo, foram desenvolvidas nanocápsulas carregadas com triclosan e funcionalizadas com ácido ascórbico, e sua aplicação foi avaliada *in vitro* em células de adenocarcinoma de pulmão (De Marchi et al., 2022a).

A complexação íon metálico Zn^{2+} foi amplamente explorada para diferentes aplicações. No câncer de mama, nanocápsulas de núcleo-lipídico, revestidas com quitosana e funcionalizadas com diferentes substâncias foram investigadas na terapia antitumoral *in vitro* (células MCF-7). Nanocápsulas de núcleo-lipídico carregadas com Doxorrubicina foram funcionalizadas com ácido arginilglicilaspártico (RGD) (Antonow et al., 2018) ou ácido fólico (Cé et al., 2021a), enquanto, nanocápsulas de núcleo-lipídico não-carregadas foram funcionalizadas com Bromelaína (Oliveira et al., 2017) ou Metotrexato (Oliveira et al., 2018).

O íon metálico Zn^{2+} também foi investigado na terapia antitumoral em células de glioblastoma, carcinoma hepatocelular (Dalle mole et al., 2021), câncer de ovário e câncer de bexiga (Cé et al., 2021b). Em ambos os estudos, as nanocápsulas de núcleo-lipídico foram carregadas com doxorrubicina, porém, tiveram sua superfície modificada com RGD ou ácido fólico, respectivamente. Utilizando o mesmo íon metálico, nanocápsulas de núcleo-lipídico não-carregadas, carregadas com furosemida ou carregadas com insulina foram funcionalizados com scFv-anti-LDL(-) (Cavalcante et al., 2021), captopril (Michalowski et al., 2020) ou imunoglobulina G (De Marchi et al., 2022b), respectivamente.

A substituição dos íons Zn^{2+} ou Fe^{2+} por Au^{3+} para formar o complexo organometálico na superfície das nanocápsulas foi proposta por Alves e colaboradores (2020). O íon Au^{3+} é substancialmente inerte, não tóxico e biocompatível, além disso, pode interagir com moléculas que contêm grupos tiol ou

amina, que estão presentes em anticorpos monoclonais, peptídeos e proteínas. Neste estudo, nanocápsulas de núcleo-lipídico não-carregadas tiveram a superfície modificada com o anticorpo Bevacizumabe e, foi avaliado sua atividade antitumoral *in vitro* em células de glioma, bem como, sua atividade antiangiogênica em membrana corioalantóide de embrião de galinha (Alves et al., 2020).

O texto completo do Capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 39 – 115, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico. Refere-se à um artigo de revisão sobre nanopartículas orgânicas com superfície modificada para a terapia direcionada ao câncer de pulmão. Foram abordados os dois principais mecanismos de direcionamento de nanopartículas (passivo e ativo), as principais técnicas de funcionalização de superfície, através de reações covalentes e não-covalentes, bem como, os principais receptores/alvos e ligantes/substâncias utilizados nos estudos selecionados.

O Capítulo 2 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 119 – 130.

Gündel SS, Dallemole DR, Alves ACS, Rosa SA, Oliveira FDP, Ourique AF, Lenz G, Guterres SS, Pohlmann AR. Nanoencapsulation of etoposide promotes increased long-term DNA damage, greater induction of senescence and reduces population regrowth of lung cancer cells. **J Drug Deliv Sci Technol** (2024) 100:106091. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106091>

O texto completo do Capítulo 3, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 133 – 176, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta do desenvolvimento e aplicação de nanocápsulas de núcleo-lipídico carregadas com etoposido, revestidas com quitosana e funcionalizadas com diferentes ligantes para a terapia direcionada a células de adenocarcinoma de pulmão.

O tratamento do câncer de pulmão apresenta inúmeras dificuldades, muitas das quais decorrem da complexidade biológica da doença e da sua propensão para diagnóstico tardio. Além disso, a heterogeneidade genética dos tumores pulmonares dificulta a escolha de um tratamento eficaz, pois diferentes subtipos de câncer podem responder de maneira variável às mesmas terapias (Esposito et al., 2010). A resistência adquirida aos medicamentos é outro desafio significativo; mesmo que os tratamentos iniciais sejam bem-sucedidos, as células cancerosas podem desenvolver mecanismos de resistência, tornando as terapias subsequentes menos eficazes (Xiang et al., 2024). Efeitos colaterais adversos dos tratamentos, como quimioterapia e radioterapia, também podem impactar negativamente a qualidade de vida dos pacientes e limitar a continuidade do tratamento (Lemjabbar-Alaoui et al., 2015).

A necessidade de terapias mais eficazes e específicas para o tratamento do câncer de pulmão tem se tornado uma prioridade na pesquisa oncológica, dado o elevado índice de mortalidade associado a essa doença e às limitações das terapias convencionais (Majeed et al., 2021; Sharma et al., 2022). Em resposta a esses desafios, o campo da oncologia tem explorado novas abordagens, como as terapias direcionadas, que aproveitam a presença de receptores específicos em células tumorais para permitir uma ação mais precisa dos agentes terapêuticos (Prajapati et al., 2024). Paralelamente, o uso de nanopartículas como vetores de fármacos emergiu como uma estratégia promissora, ao possibilitar a entrega controlada e seletiva de drogas diretamente nas células cancerígenas, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos e aumentando a eficácia do tratamento (Hristova-Panusheva et al., 2024). Essas inovações representam um avanço significativo na busca por tratamentos mais eficazes e menos invasivos para o câncer de pulmão, refletindo a importância de abordagens que combinem especificidade molecular com tecnologias avançadas de entrega de medicamentos (Chehelgerdi et al., 2023).

Conforme abordamos no Capítulo I, o desenvolvimento de nanopartículas com superfície modificada para o direcionamento ativo a receptores superexpressos no câncer de pulmão oferece diversas vantagens promissoras para a terapia oncológica. Essas nanopartículas podem ser projetadas para reconhecer e se ligar especificamente a moléculas ou receptores que são abundantemente expressos nas células cancerosas, mas ausentes ou presentes em níveis muito baixos nas células saudáveis. Essa especificidade permite uma entrega mais precisa do fármaco diretamente às células tumorais, minimizando os efeitos colaterais nos tecidos

normais e melhorando a eficácia terapêutica. Além disso, conforme destacamos no artigo de revisão, as nanopartículas orgânicas possuem uma ampla versatilidade, podendo ser produzidas por diferentes técnicas, com a capacidade de carregar inúmeras substâncias/fármacos com potencial antitumoral, bem como, permitem a modificação da superfície por técnicas variadas.

Há pelo menos 20 anos, nosso grupo de pesquisa criou um novo sistema nanoestruturado polimérico, denominado nanocápsulas de núcleo-lipídico, que se diferencia das nanocápsulas poliméricas convencionais pela presença de um núcleo de organogel, formado pela combinação de um lipídio sólido e um lipídio líquido. Essa característica confere propriedades adicionais às nanocápsulas e contribui para o aumento da eficiência de encapsulamento de fármacos lipofílicos. Nessas duas décadas, inúmeros fármacos/substâncias já foram carregados com sucesso nas nanocápsulas de núcleo-lipídico e uma ampla variedade de aplicações já foi investigada *ex vivo*, *in vitro* e/ou *in vivo*. Considerando a aplicação no câncer de pulmão, os fármacos tretinoína (Schultze et al., 2014) e erlotinibe (Bruinsmann et al., 2020) já foram encapsulados nas nanocápsulas de núcleo-lipídico.

Diante da versatilidade e potencialidade das nanocápsulas de núcleo lipídico, abordamos o desenvolvimento, caracterização e aplicação de nanocápsulas de núcleo-lipídico carregadas com etoposido, um quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de pulmão. Nosso sistema para encapsulação do etoposido apresentou eficiência de encapsulação superior (>90%) a outros sistemas já descritos anteriormente para o mesmo fármaco, como lipossomas (70%) (Sistla et al., 2009), nanopartículas de PLGA (60%) (Pimple et al., 2012) carreadores lipídicos nanoestruturados (75%) (Wang et al., 2014), e nanopartículas de PLA (48%) (Yadav et al., 2014). Além disso, demonstramos que as nanocápsulas de núcleo-lipídico modularam o perfil de liberação do etoposido, possibilitando uma liberação biexponencial, caracterizada por uma fase inicial rápida, seguida de uma fase de liberação sustentada, e que esse perfil foi aprimorado com o revestimento da superfície das nanocápsulas com quitosana.

Nos últimos 10 anos, nosso grupo vem aperfeiçoando a aplicação das nanocápsulas de núcleo-lipídico através da sua modificação de superfície, empregando uma nova estratégia de síntese baseada na formação de um complexo organometálico interfacial (complexo lecitina-quitosana-metal-ligante). Diferentemente dos demais métodos covalentes para a funcionalização da superfície

de nanopartículas, a nossa técnica não requer etapas complexas de purificação, uma vez que todas as reações interfaciais são realizadas em meio aquoso. Essa funcionalização da superfície é uma estratégia promissora para direcionar de forma mais eficaz e específica as nanopartículas para receptores superexpressos em células tumorais. No câncer de pulmão, alguns receptores podem estar presentes na superfície extracelular, incluindo EGFR, receptores de transferrina, receptores de folato, entre outros, sendo o EGFR o que apresenta maiores taxas de superexpressão.

Por isso, funcionalizar a superfície de nanopartículas com ligantes, anticorpos fármacos ou substâncias que possuem afinidade pelo EGFR pode fornecer terapias direcionadas mais potentes, aumentando a captação da nanopartícula, promovendo uma maior entrega de substância ativa intracelularmente, e reduzindo os efeitos em células normais. Considerando o exposto, no presente estudo, modificamos a superfície das nanocápsulas de núcleo-lipídico carregadas com etoposido através da funcionalização com diferentes substâncias que possuem afinidade pelo EGFR. Com a funcionalização, observamos uma maior internalização das nanocápsulas por células de adenocarcinoma de pulmão (A549), via endocitose mediada por receptor. Considerando as quatro substâncias utilizadas para a modificação da superfície, até o momento, nenhum outro estudo havia utilizado AREG, erlotinibe e TGF α como moléculas funcionalizantes em nanopartículas. Visando a terapia direcionada via EGFR no câncer de pulmão, mais frequentemente são utilizados anticorpos monoclonais (como o cetuximabe) ou o ligante EGF para a modificação da superfície.

O presente trabalho também traz um considerável avanço para a avaliação *in vitro* de nanopartículas. Pela primeira vez, relatamos a possibilidade de investigar os efeitos de nanopartículas utilizando cultura de células em tempo real e por longos períodos. Sabe-se que os testes convencionais para avaliação de nanopartículas em células tumorais *in vitro* enfrentam algumas limitações que podem comprometer a precisão e a relevância dos resultados. Apesar de serem fundamentais para resultados iniciais e de curto tempo, os métodos tradicionais frequentemente fornecem apenas informações estáticas, não capturando a dinâmica do comportamento celular ao longo do tempo. Neste contexto, novas alternativas como plataformas automatizadas de rastreamento em tempo real de células vivas oferecem benefícios significativos.

Utilizando uma plataforma automatizada, IncuCyte[®], examinamos os efeitos de longo prazo (20 dias) dos tratamentos na indução de danos ao DNA e senescência

em células de câncer de pulmão A549 transduzidas com um marcador de dano nuclear (53BP1-mApple). Nossos achados demonstraram a capacidade da nanoencapsulação em melhorar os efeitos citotóxicos do etoposido, garantindo sua eficácia a longo prazo, e que a funcionalização da superfície das nanocápsulas de núcleo-lipídico com substâncias com afinidade pelo EGFR, potencializou estes efeitos.

Neste estudo, desenvolvemos nanocápsulas de núcleo lipídico contendo etoposídeo e modificamos sua superfície por meio de revestimento com quitosana e funcionalização com diferentes ligantes (AREG, EGF, ERL ou TGF α), visando uma terapia direcionada ao EGFR superexpresso em células de câncer de pulmão (A549). A nanoencapsulação aumentou a solubilidade aparente do etoposídeo e permitiu modular seu perfil de liberação, resultando em uma liberação biexponencial, com uma fase inicial rápida seguida por liberação sustentada. A funcionalização da superfície intensificou a captação celular das nanocápsulas pelas células A549 via endocitose mediada por receptor, facilitando uma entrega intracelular mais eficaz do etoposídeo nanoencapsulado e ampliando seus efeitos citotóxicos. Observamos que a nanoencapsulação aprimorou os efeitos prolongados do etoposídeo, especialmente na indução de senescência e dano nuclear, e que esses efeitos foram potencializados pela funcionalização da superfície. Em conclusão, nossos resultados demonstram que a nanoencapsulação do etoposídeo, especialmente quando combinada com a funcionalização da superfície das nanocápsulas com ligantes direcionados ao EGFR, não só aprimora a eficácia citotóxica do fármaco, mas também prolonga seus efeitos ao longo do tempo, oferecendo uma estratégia promissora para o tratamento do câncer de pulmão.

Ainda serão realizados ensaios complementares para melhor compreender a interação das nanocápsulas funcionalizadas com os receptores EGF nas células A549. Já produzimos e padronizamos uma linhagem A549 transduzida com ERK, uma quinase controlada pela sinalização extracelular, que é a principal via de sinalização de receptores EGF. Considerando a ampla heterogeneidade, cada célula tumoral pode expressar ERK em diferentes intensidades, e, conseqüentemente, responder de forma diferente a cada tratamento. Por exemplo, uma célula com maior expressão de ERK pode atrair e internalizar uma maior quantidade de nanocápsulas funcionalizadas, enquanto uma célula com menor expressão de ERK pode internalizar menos nanocápsulas direcionadas. Para isso, será determinada a intensidade de fosforilação de ERK por *Western blot* após o tratamento com as nanocápsulas funcionalizadas, bem como o acompanhamento em tempo real da influência dos tratamentos sobre células A549 transduzidas com ERK. Em paralelo a isso, está sendo adaptado e validado um software que permite a identificação e a quantificação célula-a-célula da ativação ou inativação de ERK nas células A549 após os tratamentos. Os resultados obtidos serão adicionados ao artigo experimental do Capítulo III, a fim de complementar os resultados já obtidos.

Alves ACS, Lavayen V, Figueiró F, Dallemole DR, Dias AF, Cé R, Battastini AMO, Guterres SS, Pohlmann AR. Chitosan-coated lipid-core nanocapsules functionalized with gold-III and bevacizumab induced in vitro cytotoxicity against C6 cell line and in vivo potent antiangiogenic activity. **Pharm Res** (2020) 37:91. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02804-0>

Antonow MB, Asbahr ACC, Raddatz P, Beckenkamp A, Buffon A, Guterres SS, Pohlmann AR. Liquid formulation containing doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules: Cytotoxicity in human breast cancer cell line and in vitro uptake mechanism. **Mater Sci Eng C** (2017) 76:374-382. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.099>

Antonow MB, Franco C, Prado W, Beckenkamp A, Silveira GP, Buffon A, Guterres SS, Pohlmann AR. Arginylglycylaspartic acid-surface-functionalized Doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to target alpha(V) beta(3) integrin expressed on tumor cells. **Nanomaterials** (2018) 8(1):2. <https://doi.org/10.3390/nano8010002>

Appert-Collin A, Hubert P, Crémel G, Bennisroune A. Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. **Front Pharmacol** (2015) 6:283. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00283>

Athawale RB, Jain DS, Singh KK, Gude RP. Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. **Biomed Pharmacother** (2014) 68:231-240. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.01.004>

Ayyappan T, Shanmugam S. Anticancer activity of polymeric nanoparticles containing etoposide using albino rats as experimental animal model. **Asian J Pharm Clin Res** (2018) 11(12):255-257. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i12.28127>

Baldwin EL, Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. **Curr Med Chem Anticancer Agents** (2005) 5(4):363-72. <https://doi.org/10.2174/1568011054222364>.

Bender EA, Adorne MD, Colomé LM, Abdalla DSP, Guterres SS, Pohlmann AR. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with

polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **Int J Pharm** (2012) 426(1-2): 271-279. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.051>

Bender EA, Cavalcante MF, Adorne MD, Colomé LM, Guterres SS, Abdalla DSP, Pohlmann AR. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL(-)-functionalized nanocapsules. **Pharm Res** (2014) 31:2975-2987. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1392-5>

Berasain C, Avila MA. Amphiregulin. **Semin Cell Dev Biol** (2014) 28:31-41. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.005>

Bernardi A, Frozza RL, Hoppe JB, Salbego C, Pohlmann AR, Battastini AMO, Guterres SS. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. **Int J Nanomedicine** (2013) 8:711-729. <https://doi.org/10.2147/IJN.S40284>

Bourreau C, Treps L, Faure S, Fradin D, Clere N. Therapeutic strategies for non-small cell lung cancer: Experimental models and emerging biomarkers to monitor drug efficacies. **Pharmacol Ther** (2023) 242:108347. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108347>

Bulcão RP, Freitas FA, Venturini CG, Dallegrave E, Durgante J, Göethel G, Cerski CTS, Zielinsky P, Pohlmann AR, Guterres SS, Garcia SC. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicol Sci** (2013) 132(1):162-176. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs334>

Busser B, Sancey L, Brambilla E, Coll JL, Hurbin A. The multiple roles of amphiregulin in human cancer. **Biochim Biophys Acta - Rev Cancer** (2011) 1816(2):119-131. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.05.003>

Cavalcante MF, Adorne MD, Turato WM, Kemmerer M, Uchiyama MK, Asbahr ACC, Alves ACS, Farsky SHP, Drewes C, Spatti MC, Kazuma SM, Boss M, Guterres SS, Araki K, Brüne B, Namgaladze D, Pohlmann AR, Abdalla DSP. scFv-Anti-LDL(-)-metal-

complex multi-wall functionalized-nanocapsules as a promising tool for the prevention of atherosclerosis progression. **Front Med** (2021) 8:652137. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.652137>

Cé R, Couto GK, Pacheco BZ, Dallemole DR, Paschoal JD, Pacheco PS, Guterres SS, Seixas F, Collares T, Pohlmann AR. Folic acid-doxorubicin polymeric nanocapsules: A promising formulation for the treatment of triple-negative breast cancer. **Eur J Pharm Sci** (2021a) 165:105943. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105943>

Cé R, Lavayen V, Couto GK, De Marchi JGB, Pacheco BZ, Natividade LA, Fracari TO, Ciocheta TM, Alves ACS, Jornada DS, Guterres SS, Seixas F, Collares T, Pohlmann AR. Folic Acid-doxorubicin-double-functionalized-lipid-core nanocapsules: Synthesis, chemical structure elucidation, and cytotoxicity evaluation on ovarian (OVCAR-3) and bladder (T24) cancer cell lines. **Pharm Res** (2021b) 38:301-317. <https://doi.org/10.1007/s11095-021-02989-y>

Charão MF, Baierle M, Gauer B, Goethel G, Fracasso R, Paese K, Brucker N, Moro AM, Bubols GB, Dias BB, Matte US, Guterres SS, Pohlmann AR, Garcia SC. Protective effects of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat-induced cytotoxicity and genotoxicity in a pulmonary cell line. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen** (2015) 784-785:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.04.006>

Chehelgerdi M, Chehelgerdi M, Allela OQB, Pecho RDC, Jayasankar N, Rao DP, Thamaraiyani T, Vasanthan M, Viktor P, Lakshmaiya N, Saadh MJ, Amajd A, Abo-Zaid MA, Castillo-Acobo RY, Ismail AH, Amin AH, Akhavan-Sigari RA. Progressing nanotechnology to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation. **Mol Cancer** (2023) 22:169. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01865-0>

Chen C, Xie XX, Zhou Q, Zhang FY, Wang QL, Liu YQ, Zou Y, Tao Q, Ji XM, Yu SQ. EGF-functionalized single-walled carbon nanotubes for targeting delivery of etoposide. **Nanotechnology** (2012) 23:045104. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/4/045104>

Chen G, Zhang Y, Deng H, Tang Z, Mao J, Wang L. Pursuing for the better lung cancer therapy effect: Comparison of two different kinds of hyaluronic acid and nitroimidazole co-decorated nanomedicines. **Biomed Pharmacother** (2020) 125:109988. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109988>

Choudhury H, Maheshwari R, Pandey M, Tekade M, Gorain B, Tekade RK. Advanced nanoscale carrier-based approaches to overcome biopharmaceutical issues associated with anticancer drug 'Etoposide'. **Mater Sci Eng C** (2020) 106:110275. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110275>

Dallemole DR, Ciocheta TM, Frank LA, Alves ACS, Zoche BP, Guterres SS, Paese K, Pohlmann AR. Nanocápsulas de núcleo lipídico: Preparação, caracterização e aplicações biológicas. **Quim Nova** (2023) 46(10):983-997. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20230077>

Dallemole DR, Terroso T, Alves ACS, Scholl JN, Onzi GR, Cé R, Paese K, Battastini AMO, Guterres SS, Figueiró F, Pohlmann AR. Nanoformulation shows cytotoxicity against glioblastoma cell lines and antiangiogenic activity in chicken chorioallantoic membrane. **Pharmaceutics** (2021) 13:862. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060862>

Dang Y, Guan J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. **Smart Mater Med** (2020) 1:10-19. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2020.04.001>

De Marchi JGB, Cé R, Bruschi LFRS, Santos MK, Paese K, Lavayen V, Klamt F, Pohlmann AR, Guterres SS. Triclosan and α -bisabolol-loaded nanocapsule functionalized with ascorbic acid as a dry powder formulation against A549 lung cancer cells. **J Drug Deliv Sci Technol** (2022a) 74:103463. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103463>

De Marchi JGB, Cé R, Onzi G, Alves ACS, Santarém N, Silva AC, Pohlmann AR, Guterres SS, Ribeiro AJ. IgG functionalized polymeric nanoparticles for oral insulin administration. **Int J Pharm** (2022b) 622:121829. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121829>

Demetzos C. **Pharmaceutical Nanotechnology - Fundamentals and Practical Applications**. Chapter 1 - Introduction to Nanotechnology, p. 3. Singapore: Adis, 2016.

Ding J, Guo Y. Recent advances in chitosan and its derivatives in cancer treatment. **Front Pharmacol** (2022) 13:888740. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.888740>

Du M, Yin J. Dual-drug nanosystem: Etoposide prodrug and cisplatin coloaded nanostructured lipid carriers for lung cancer therapy. **Drug Des Devel Ther** (2022) 2022(16):4139-4149. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S386100>

Esposito L, Conti D, Ailavajhala R, Khalil N, Giordano A. Lung Cancer: Are we up to the Challenge? **Curr Genomics** (2010) 11(7):513-518. <https://doi.org/10.2174/138920210793175903>

Fatma S, Talegaonkar S, Iqbal Z, Panda AK, Negi LM, Goswami DG, Tariq M. Novel flavonoid based biodegradable nanoparticles for effective oral delivery of etoposide by P-glycoprotein modulation: an in-vitro, ex-vivo and in-vivo investigations. **Drug Delivery** (2016) 23(2):500-511. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.923956>

Fiel LA, Rebêlo LM, Santiago TM, Adorne MD, Guterres SS, Sousa JS, Pohlmann AR. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter** (2011) 7:7240-7247. <https://doi.org/10.1039/C1SM05508A>

Figueiró F, Bernardi A, Frozza RL, Terroso T, Zanotto-Filho A, Jandrey EHF, Moreira JCF, Salbego CG, Edelweiss MI, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AMO. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces in vitro and in vivo glioma growth. **J Biomed Nanotech** (2013) 9:516-526. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1547>

Gaber M, Elhasany KA, Sabra S, Helmy MW, Fang JY, Khattab SN, Bekhit AA, Teleb M, Elkodairy KA, Elzoghby AO. Co-administration of tretinoin enhances the anti-cancer efficacy of etoposide via tumor-targeted green nano-micelles. **Colloids Surf B**

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110997>

Guo Q, Liu L, Chen Z, Fan Y, Zhou Y, Yuan Z and Zhang W. Current treatments for non-small cell lung cancer. **Front Oncol** (2022) 12:945102. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.945102>

Herbst R, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. **Nature** (2019) 553:446-454. <https://doi.org/10.1038/nature25183>

Hiddinga BI, Raskin J, Janssens A, Pauwels P, Meerbeeck JPV. Recent developments in the treatment of small cell lung cancer. **Eur Respir Rev** (2021) 30:210079. <https://doi.org/10.1183/16000617.0079-2021>

Hristova-Panusheva K, Xenodochidis C, Georgieva M, Krasteva N. Nanoparticle-mediated drug delivery systems for precision targeting in oncology. **Pharmaceuticals** (2024) 17(6):677. <https://doi.org/10.3390/ph17060677>

Hossen S, Hossain MK, Basher MK, Mia MNH, Rahman MT, Uddin MJ. Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. **J Adv Res** (2019) 15:1-18. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.005>

Iglesias VS, Giuranno L, Dubois LJ, Theys J, Vooijs M. Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer: A Potential for NOTCH Targeting? **Front Oncol** (2018) 8:267. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00267>

International Agency for Research on Cancer (IARC). **Absolute numbers, Incidence and Mortality, Both sexes, in 2022.** (2024) Disponível em: https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&key=total&cancers=15&group_populations=1&multiple_populations=1&types=0_1&sort_by=value1

ISO TC 229. **Nanotechnology Standards Development Update.** International Organization for Standardization. 2005.

Jäger E, Venturini CG, Poletto FS, Colomé LM, Pohlmann JPU, Bernardi A, Battastini AMO, Guterres SS, Pohlmann AR. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **J Biomed Nanotech** (2009) 5:130-140. <https://doi.org/10.1166/jbn.2009.1004>

Jiang H, Geng D, Liu H, Li Z, Cao J. Co-delivery of etoposide and curcumin by lipid nanoparticulate drug delivery system for the treatment of gastric tumors. **Drug Deliv** (2016a) 23(9):3665-3673. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1217954>

Jiang H, Pei L, Liu N, Li J, Li Z, Zhang S. Etoposide-loaded nanostructured lipid carriers for gastric cancer therapy. **Drug Deliv** (2016b) 23(4):1379-1382. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1048491>

Karlsen EA, Kahler S, Tefay J, Joseph SR, Simpson F. Epidermal growth factor receptor expression and resistance patterns to targeted therapy in non-small cell lung cancer: A review. **Cells** (2021) 10:1206. <https://doi.org/10.3390/cells10051206>

Kazemabadi FZ, Heydarinasab A, Akbarzadeh A, Ardjmand M. Preparation, characterization and in vitro evaluation of PEGylated nanoliposomal containing etoposide on lung cancer. **Artif Cells Nanomed Biotechnol** (2019) 47(1):3222-3230. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1646265>

Khajavinia A, Varshosaz J, Dehkordi AJ. Targeting etoposide to acute myelogenous leukaemia cells using nanostructured lipid carriers coated with transferrin. **Nanotechnology** (2012) 23(405101):13p. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/40/405101>

Kluska M, Woźniak K. Natural polyphenols as modulators of etoposide anti-cancer activity. **Int J Mol Sci** (2021) 22(12):6602. <https://doi.org/10.3390/ijms22126602>

Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Drug-targeting in combined cancer chemotherapy: tumor growth inhibition in mice by association of paclitaxel and etoposide with a cholesterol-rich nanoemulsion. **Cell Oncol** (2012) 35:451-460. <https://doi.org/10.1007/s13402-012-0104-6>

Leite ACA, Solano TA, Tavares ER, Maranhão RC. Use of combined chemotherapy with etoposide and methotrexate, both associated to lipid nanoemulsions for atherosclerosis treatment in cholesterol-fed rabbits. **Cardiovasc Drugs Ther** (2015) 29:15-22. <https://doi.org/10.1007/s10557-014-6566-1>

Lemjabbar-Alaoui H, UI Hassan OU, YangYW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. **BBA-Rev Cancer** (2015) 1856(2):189-210. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>

Li J, Cai C, Li J, Li J, Li J, Sun T, Wang L, Wu H, Yu G. Chitosan-based nanomaterials for drug delivery. **Molecules** (2018) 23:2661. <https://doi.org/10.3390/molecules23102661>

Li K, Liang N, Yang H, Liu H, Li S. Temozolomide encapsulated and folic acid decorated chitosan nanoparticles for lung tumor targeting: improving therapeutic efficacy both in vitro and in vivo. **Oncotarget** (2017) 8(67):111318-111332. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22791>

Liu TC, Jin X, Wang Y, Wang K. Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies. **Am J Cancer Res** (2017) 7(2):187-202.

Lo Prete AC, Maria DA, Rodrigues DG, Valduga CJ, Ibañez OCM, Maranhão RC. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol-rich nano-emulsion. **J Pharm Pharmacol** (2006) 58:801-808. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.6.0010>

Majeed U, Manochakian R, Zhao Y, Lou Y. Targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer: current advances and future trends. **J Hematol Oncol** (2021) 14:108. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01121-2>

Mangal S, Gao W, Li T, Zhou Q. Pulmonary delivery of nanoparticle chemotherapy for the treatment of lung cancers: challenges and opportunities. **Acta Pharmacol Sin** (2017) 38:782-797. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.34>

Martinelli C, Pucci C, Ciofani G. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. **APL Bioeng** (2019) 3(011502):13p. <https://doi.org/10.1063/1.5079943>

Mayer FQ, Adorne MD, Bender EA, Carvalho TG, Dilda AC, Beck RCR, Guterres SS, Giugliani R, Matte U, Pohlmann AR. Laronidase-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules: Promising formulation for a more effective treatment of mucopolysaccharidosis type I. **Pharm Res** (2015) 32:941-954. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1508-y>

Mehrabi M, Esmaeilpour P, Akbarzadeh A, Saffari Z, Farahnak M, Farhangi A, Chiani M. Efficacy of pegylated liposomal etoposide nanoparticles on breast cancer cell lines. **Turk J Med Sci** (2016) 46:567-571. <https://doi.org/10.3906/sag-1412-67>

Menon I, Zaroudi M, Zhang Y, Aisenbrey E, Hui L. Fabrication of active targeting lipid nanoparticles: Challenges and perspectives. **Mater Today Adv** (2022) 16:100299. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.10029>

Meresse P, Dechaux E, Monneret C, Bertounesque E. Etoposide: Discovery and medicinal chemistry. **Curr Med Chem** (2004) 11(18):2443-2466. <https://doi.org/10.2174/0929867043364531>

Michalowski CB, Arbo MD, Altknecht L, Ancuti AN, Abreu ASG, Alencar LMR, Pohlmann AR, Garcia SC, Guterres SS. Oral Treatment of Spontaneously Hypertensive Rats with Captopril-Surface Functionalized Furosemide-Loaded Multi-Wall Lipid-Core Nanocapsules. **Pharmaceutics** (2020) 12(1):80. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010080>

Mitra M, Dilnawaz F, Misra R, Harilal A, Verma RS, Sahoo SK, Krishnakumar S. Toxicogenomics of nanoparticulate delivery of etoposide: potential impact on nanotechnology in retinoblastoma therapy. **Cancer Nanotechnol** (2011) 2:21-36. <https://doi.org/10.1007/s12645-010-0010-4>

Motyka S, Jaferník K, Ekiert H, Sharifi-Rad J, Calina D, Al-Omari B, Szopa A, Cho WC. Podophyllotoxin and its derivatives: Potential anticancer agents of natural origin in cancer chemotherapy. **Biomed Pharmacother** (2023) 158:114145. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114145>

O'Leary C, Gasper H, Sahin KB, Tang M, Kulasinghe A, Adams MN, Richard DJ, O'Byrne KJ. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-mutated Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). **Pharmaceuticals** (2020) 13:273. <https://doi.org/10.3390/ph13100273>

Oliveira CP, Büttendörfer SL, Prado WL, Beckenkamp A, Asbahr AC, Buffon A, Guterres SS, Pohlmann AR. Enhanced and selective antiproliferative activity of methotrexate-functionalized-nanocapsules to human breast cancer cells (MCF-7). **Nanomaterials** (2018) 8(1):24. <https://doi.org/10.3390/nano8010024>

Oliveira CP, Prado WA, Lavayen V, Büttendörfer SL, Beckenkamp A, Martins BS, Lüdtké DS, Campo LF, Rodembusch FS, Buffon A, Pessoa Jr A, Guterres SS, Pohlmann AR. Bromelain-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules: Formulation, chemical structure and antiproliferative effect against human breast cancer cells (MCF-7). **Pharm Res** (2017) 34:438-452. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-2074-2>

Ourique AF, Azoubel S, Ferreira CV, Silva CB, Marchiori MCL, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RCR. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: Development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **J Biomed Nanotech** (2010) 6:214-223. <https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1120>

Patlolla RR, Vobalaboina V. Folate-targeted etoposide-encapsulated lipid nanospheres. **J Drug Target** (2008) 16(4):269-275. <https://doi.org/10.1080/10611860801945400>

Pereira NRC, Loiola RA, Rodrigues SF, Oliveira CP, Büttendörfer SL, Guterres SS, Pohlmann AR, Farsky SH. Mechanisms of the effectiveness of poly(ϵ -caprolactone)

lipid-core nanocapsules loaded with methotrexate on glioblastoma multiforme treatment. **Int J Nanomedicine** (2018) 13:4563-4573. <https://doi.org/10.2147/IJN.S168400>

Pimple S, Manjappa As, Ukawala M, Murthy Rsr. PLGA nanoparticles loaded with etoposide and quercetin dihydrate individually: in vitro cell line study to ensure advantage of combination therapy. **Cancer Nanotechnol** (2012) 3:25-36. <https://doi.org/10.1007/s12645-012-0027-y>

Piperdi B, Perez-Soler R. Role of Erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer. **Drugs** (2012) 72(01):12 p. <https://doi.org/10.2165/1163018-S0-000000000-00000>

Poletto FS, Oliveira CP, Wender H, Regent D, Donida B, Teixeira SR, Guterres SS, Rossi-Bergmann B, Pohlmann AR. How sorbitan monostearate can increase drug-loading capacity of lipid-core polymeric nanocapsules. **J Nanosci Nanotechnol** (2015) 15:827-837. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9182>

Pooja D, Kulhari H, Tunki L, Chinde S, Kuncha M, Grover P, Rachamalla SS, Sistla R. Nanomedicines for targeted delivery of etoposide to non-small cell lung cancer using transferrin functionalized nanoparticles. **RSC Adv** (2015) 61:49122-49131. <https://doi.org/10.1039/C5RA03316K>

Prabhakar CN. Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. **Transl Lung Cancer Res** (2015) 4(2):110-118. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2015.01.01>

Prajapati A, Rangra S, Patil R, Desai N, Jyothi VGSS, Salave S, Amate P, Benival D, Kommineni N. Receptor-targeted nanomedicine for cancer therapy. **Receptors** (2024) 3(3):323-361. <https://doi.org/10.3390/receptors3030016>

Reddy LH, Adhikari JS, Dwarakanath BSR, Sharma RK, Murthy RR. Tumoricidal effects of etoposide incorporated into solid lipid nanoparticles after intraperitoneal administration in Dalton's lymphoma bearing mice. **AAPS J** (2006) 8(2):E254-E262.

Reddy LH, Sharma RK, Chuttani K, Mishra AK, Murthy RR. Etoposide-incorporated tripalmitin nanoparticles with different surface charge: Formulation, characterization, radiolabeling, and biodistribution studies. **AAPS J** (2004) 6(3):23.

Reddy LH, Sharma RK, Chuttani K, Mishra AK, Murthy RR. Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. **J Control Release** (2005) 105:185-198. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.02.028>

Rodak O, Peris-Díaz MD, Olbromski M, Podhorska-Okółów M, Dziegiel P. Current landscape of non-small cell lung cancer: Epidemiology, histological classification, targeted therapies, and immunotherapy. **Cancers** (2021) 13:4705. <https://doi.org/10.3390/cancers13184705>

Saliou B, Thomas O, Lautram N, Clavreul A, Hureauux J, Urban T, Benoit JP, Lagarce F. Development and in vitro evaluation of a novel lipid nanocapsule formulation of etoposide. **Eur J Pharm Sci** (2013) 50:172-180. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.06.013>

Sanità G, Carrese B, Lamberti A. Nanoparticle surface functionalization: How to improve biocompatibility and cellular internalization. **Front Mol Biosci.** (2020) 7:587012. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587012>

Schultze E, Ourique A, Yurgel VC, Begnini KR, Thurow H, Leon PMM, Campos VF, Dellagostin OA, Guterres SS, Pohlmann AR, Seixas FK, Beck RCR, Collares T. Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. **Eur J Pharm Biopharm** (2014) 87:55-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.02.003>

Seidu TA, Kutoka PT, Asante DO, Farooq MA, Alolga RN, Bo W. Functionalization of nanoparticulate drug delivery systems and its influence in cancer therapy. **Pharmaceutics** (2022) 14:1113. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051113>

Sengupta S, Tyagi P, Chandra S, Kochupillai V, Gupta SK. Encapsulation in cationic liposomes enhances antitumor efficacy and reduces the toxicity of etoposide, a topoisomerase II inhibitor. **Pharmacology** (2001) 62:163-171. <https://doi.org/10.1159/000056090>

Sharma P, Jhawar V, Mathur P, Dutt R. Innovation in cancer therapeutics and regulatory perspectives. **Med Oncol** (2022) 39(5):76. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01677-0>

Sideratou Z, Kontoyianni C, Drossopoulou GI, Paleos CM. Synthesis of a folate functionalized PEGylated poly (propylene imine) dendrimer as prospective targeted drug delivery system. **Bioorg Med Chem Lett** (2010) 20:6513-6517. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.058>

Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances [version 1; referees: 3 approved]. **F1000Research** (2016) 5(F1000 Faculty Rev):2270. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9025.1>

Singh B, Coffey RJ. From wavy hair to naked proteins: The role of transforming growth factor alpha in health and disease. **Semin Cell Dev Biol** (2014) 28:12-21. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.003>

Sinkule JA. Etoposide: A semisynthetic epipodophyllotoxin - Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent. **Pharmacotherapy** (1984) 4(2):61-73. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1984.tb03318.x>

Sirokmány G, Pató A, Zana M, Donkó A, Bíró A, Nagy P, Geiszt M. Epidermal growth factor-induced hydrogen peroxide production is mediated by dual oxidase 1. **Free Radic Biol Med** (2016) 97:204-211. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.028>

Sistla A, Smith DJ, Kobrinsky NL, Kumar K. Pharmacokinetics and tissue distribution of liposomal etoposide in rats. **Drug Deliv** (2009) 16(8):423-429. <https://doi.org/10.3109/10717540903223418>

Snehalatha M, Kolachina V, Saha RN, Babbar AK, Sharma N, Sharma RN. Enhanced tumor uptake, biodistribution and pharmacokinetics of etoposide loaded nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice. **J Pharm Bioallied Sci** (2013) 5(4):290-297. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.120081>

Snehalatha M, Venugopal K, Saha RN, Babbar AK, Sharma RK. Etoposide loaded PLGA and PCL nanoparticles II: Biodistribution and pharmacokinetics after radiolabeling with Tc-99m. **Drug Deliv** (2008) 15:277-287. <https://doi.org/10.1080/10717540802006500>

Tavares ER, Freitas FR, Diament J, Maranhão RC. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. **Int J Nanomedicine** (2011) 6:2297-2304. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24048>

Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung cancers: Molecular characterization, clonal heterogeneity and evolution, and cancer stem cells. **Cancers** (2018) 10:248. <https://doi.org/10.3390/cancers10080248>

Thiyagarajan A, Saravanabhavan S, Thangarasu V. Preparation and biopharmaceutical evaluation of novel polymeric nanoparticles containing etoposide for targeting cancer cells. **Turk J Pharm Sci** (2019) 16(2):132-140. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2018.21043>

Ukawala M, Chaudhari K, Rajyaguru T, Manjappa AS, Murthy RSR., Gude, R. Laminin receptor-targeted etoposide loaded polymeric micelles: a novel approach for the effective treatment of tumor metastasis. **J Drug Target** (2012) 20(1):55-66. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.610799>

Varshosaz J, Hassanzadeh F, Sadeghi-Aliabadi H, Firozian F. Uptake of etoposide in CT-26 cells of colorectal cancer using folate targeted dextran stearate polymeric micelles. **Biomed Res Int** (2014) 2014:11p. <https://doi.org/10.1155/2014/708593>

Venturini CG, Jäger E, Oliveira CP, Bernardi A, Battastini AMO, Guterres SS, Pohlmann AR. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp** (2011) 375:200-208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.12.011>

Wang J, Zhu R, Sun X, Zhu Y, Liu H, Wang S, Wang T. Intracellular uptake of etoposide-loaded solid lipid nanoparticles induces an enhancing inhibitory effect on gastric cancer through mitochondria-mediated apoptosis pathway. **Int J Nanomed** (2014) 9(1):3987-3998. <https://doi.org/10.2147/IJN.S64103>

Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor cell proliferation signaling pathways. **Cancers** (2017) 9:52. <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>

Wei Z, Zhang J, Wang Y, Fan J. Formulation development and systematic characterization of etoposide encapsulated solid lipid nanoparticles. **Nanomed: Nanotechnol Biol Med** (2016) 12(2):508. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.12.175>

Weiner LM, Wu C. **Cancer Therapeutic Targets**. Part I, Chapter 17 - EGFR, Immunology, p. 199-208. Chapter New York: Springer, 2017.

Yadav R, Kumar D, Kumari A, Yadav SK. Encapsulation of podophyllotoxin and etoposide in biodegradable poly-D,L-lactide nanoparticles improved their anticancer activity. **J Microencapsul** (2014) 31(3):211-219. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.834988>

Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. **Biomaterials** (2013) 34:8690e8707. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.100>

Yordanov G, Skrobanska R, Evangelatov A. Colloidal formulations of etoposide based on poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Preparation, physicochemical properties and cytotoxicity. **Colloids Surf B Biointerfaces** (2013) 101:215- 222. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.05.040>

Xiang Y, Liu X, Wang Y, Zheng D, Meng Q, Jiang L, Yang S, Zhang S, Zhang X, Liu Y, Wang B. Mechanisms of resistance to targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: promising strategies to overcoming challenges. **Front Immunol** (2024) 15:1366260. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1366260>

Zanotto-Filho A, Coradini K, Braganhol E, Schröder R, Oliveira CM, Simões-Pires A, Battastini AMO, Pohlmann AR, Guterres SS, Forcelini CM, Beck RCR, Moreira JCF. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **Eur J Pharm Biopharm** (2013) 83:156-167. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.019>

Zeng F, Harris RC. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. **Semin Cell Dev Biol** (2014) 0:2-11. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.011>

Zhang T, Chen J, Zhang Y, Shen Q, Pan W. Characterization and evaluation of nanostructured lipid carrier as a vehicle for oral delivery of etoposide. **Eur J Pharm Sci** (2011) 43:174-179. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.04.005>

Zhang E, Xing R, Liu S, Qin Y, Li K, Li P. Advances in chitosan-based nanoparticles for oncotherapy. **Carbohydr Polym** (2019) 222:115004. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115004>

Zhang M, Hagan CT, Foley H, Tian X, Yang F, Man Au K, Mi Y, Medik Y, Roche K, Wagner K, Rodgers Z, Min Y, Wang AZ. Co-delivery of etoposide and cisplatin in dual-drug loaded nanoparticles synergistically improves chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer models. **Acta Biomater** (2021) 124:327-335. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.02.001>

Zhang S, Lu C, Zhang X, Li J, Jiang H. Targeted delivery of etoposide to cancer cells by folate-modified nanostructured lipid drug delivery system. **Drug Deliv** (2016) 23(5):1838-1845. <https://doi.org/10.3109/10717544.2016.1141258>

Zhu R, Wang Q, Zhu Y, Wang Z, Zhang H, Wu B, Wu X, Wang S. pH sensitive nano layered double hydroxides reduce the hematotoxicity and enhance the anticancer efficacy of etoposide on non-small cell lung cancer. **Acta Biomater** (2016) 29:320-332. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.029>