

## Artículo original

## Nanocápsulas de capsaicina y su actividad antitumoral en células de glioblastoma humano

Martínez-Benavidez E. (1), Herrera-Rodríguez S.E. (2), Lugo-Melchor O.Y. (3), Hernández-Martínez J. (4), Higuera-Ciajara I. (5).

(1) Investigador Asociado, Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C (CIATEJ). (2) Investigador Titular, Unidad Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ. (3) Investigador Titular, Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos, CIATEJ. (4) Profesor Investigador de Tiempo Completo, Unidad de Servicios de Apoyo de Resolución Analítica (SARA). Universidad Veracruzana-Xalapa. (5) Investigador Titular, Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos, CIATEJ.

### Resumen

La nanoencapsulación con polímeros como el quitosano representa una alternativa biotecnológica para la administración dirigida y eficiente de moléculas con baja biodisponibilidad, pero con importante actividad biológica como la capsaicina. Se ha demostrado que la capsaicina modula procesos de apoptosis en varias células cancerosas, incluyendo células de glioblastoma multiforme. Sin embargo, el uso de la capsaicina es limitado debido a su baja solubilidad en agua y baja biodisponibilidad, por lo que el desarrollo de nuevos enfoques como el uso de sistemas nanoestructurados para la liberación de compuestos activos con estas características surgen como una alternativa con enorme potencial para la inhibición del crecimiento de células cancerosas. **Objetivo:** Evaluar el efecto antitumoral de las nanocápsulas de quitosano con capsaicina sobre células de glioblastoma. **Métodos:** Se realizó la formulación de dos nanosistemas de encapsulación (nanoemulsiones y nanocápsulas) y se evaluó la actividad antitumoral utilizando el método de MTT contra dos líneas de células de glioblastoma. **Resultados:** Las nanoemulsiones y las nanocápsulas con capsaicina redujeron significativamente la viabilidad celular de las líneas de glioblastoma H4 y U118MG en comparación con sus homólogos sin compuesto activo. Además, se observó que la capsaicina libre presentó un mayor efecto en la viabilidad celular comparada con temozolomida. **Conclusiones:** El diseño y desarrollo de sistemas nanoestructurados de quitosano es de enorme interés por sus potenciales aplicaciones como alternativa para el suministro de la capsaicina y evitar las propiedades adversas de la administración de la capsaicina libre.

**Palabras clave:** nanoencapsulación, quitosano, capsaicina, glioblastoma.

### Abstract

Nanoencapsulation using polymers such as chitosan is a biotechnological alternative for the targeted and efficiency administration of molecules with low bioavailability, but with important biological activity such as capsaicin. Capsaicin has been reported to induce apoptosis in several cancer cells, including glioblastoma multiforme cells. However, the use of capsaicin is limited due to its poor aqueous solubility and low bioavailability, so the development of new approaches such as the use of nanostructured systems for the release of active compounds with these characteristics represents an alternative of enormous potential for the inhibition of cancer cells. **Objective:** Evaluate antitumor effect of nanocapsules of chitosan with capsaicin on glioblastoma cells. **Methods:** Evaluation of antitumor activity using the MTT method against two glioblastoma cell lines of two encapsulation nanosystems (nanoemulsions and nanocapsules). **Results:** Capsaicin loaded nanocapsules and nanoemulsions did significantly reduced cell viability of glioblastoma lines H4 and U118MG compared to their unloaded counterparts. In addition, it is observed that free capsaicin had major effect on cell viability compared with temozolomide. **Conclusions:** Design and development of nanostructured chitosan systems is of great interest due to its potential applications as an alternative for the supply of capsaicin and to avoid the adverse properties of the administration of free capsaicin.

**Key words:** nanoencapsulation, chitosan, capsaicin, glioblastoma.

Recibido: 26/04/2019

Aceptado: 20/04/2020

RevSalJal • Año 7 • Número 2 • Mayo-Agosto 2020

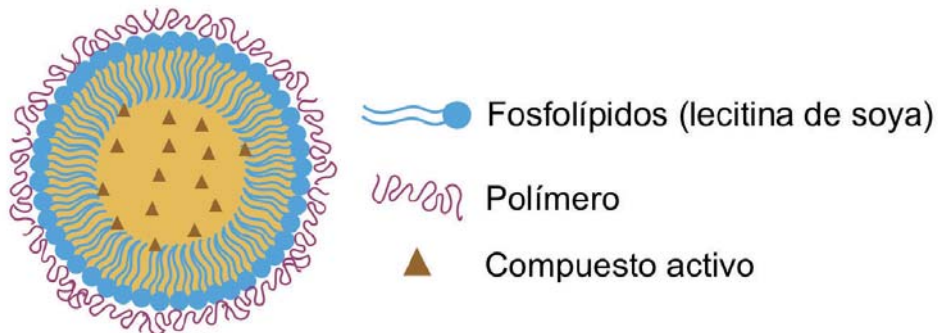
## Introducción

Actualmente, la nanotecnología ha permitido el desarrollo de nuevos enfoques para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer. Específicamente, el diseño de sistemas para la nanoencapsulación de fármacos o compuestos activos es un tema de enorme relevancia en las ciencias biomédicas. Los sistemas basados en nanotecnología exhiben características únicas debido a su tamaño de partícula nanométrico (alrededor de 5 - 10 nm con un límite superior de ~1000 nm), y tienen entre otras propiedades, la capacidad de encapsular moléculas pequeñas y biológicas, proteger los fármacos en entornos biológicos, mejorar la biodistribución del fármaco, proporcionar liberación controlada o liberación en respuesta a estímulos, además, de la flexibilidad para combinar agentes de diagnóstico e imagen para usos terapéuticos. De esta manera la nanoencapsulación de compuestos

activos es una técnica que tiene numerosas ventajas para la administración dirigida y la biodisponibilidad a través de las células.<sup>1,2</sup>

Particularmente, las nanocápsulas poliméricas son sistemas nano-vesiculares que exhiben una estructura típica núcleo-cubierta, donde las moléculas activas se encuentran confinadas en un reservorio o dentro de una cavidad que está rodeada por una membrana polimérica o recubrimiento, misma que puede estar compuesta de polímeros naturales o sintéticos. Mientras que la cavidad puede contener la sustancia activa en forma líquida o sólida o como una dispersión molecular<sup>2,3</sup> (Figura 1). Este tipo de nanosistemas son de gran interés debido a su potencial como plataformas efectivas de administración de fármacos, comprendiendo, péptidos, compuestos lipófilos y vacunas.<sup>4</sup>

**Figura 1.**  
**Representación esquemática de una nanocápsula polimérica**

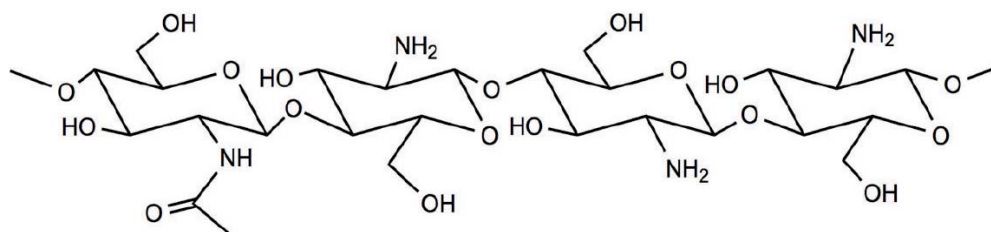


**Fuente:** Diseño basado en lo descrito por Mora-Huertas et al., y Goycoolea et al.<sup>3,4</sup>

Las nanocápsulas poliméricas elaboradas con biopolímeros biodegradables permitan mejorar la solubilidad de compuestos lipofílicos o compuestos poco solubles en agua, además, de proteger a las moléculas de condiciones ambientales y reducir la irritación tisular debido a la capa polimérica.<sup>2,3</sup> En este contexto, los polisacáridos como el quitosano (CTS) (Figura 2) han surgido como una nueva clase de materiales debido a sus sobresalientes propiedades físicas y biológicas; y dependiendo de los métodos y las materias primas utilizadas para la preparación,

se pueden obtener diferentes estructuras. Además, el quitosano es una entidad química que puede ser funcionalizada (modificada estructuralmente) de acuerdo con las propiedades finales deseadas o dependiendo de la especificidad de las moléculas con las cuales se desea acoplar.<sup>4-9</sup> De esta manera, la nanoencapsulación con polímeros como el quitosano representa una alternativa biotecnológica para la administración dirigida y eficiencia de moléculas con baja biodisponibilidad, pero con importante actividad biológica, como es el caso de la capsaicina.

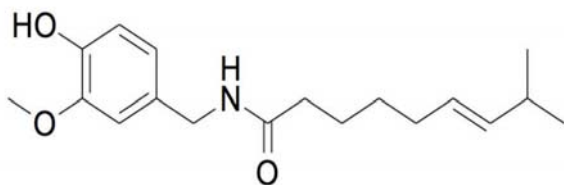
**Figura 2.**  
**Estructura química del quitosano**



Fuente: Modificado de Xinyu et al.<sup>2</sup>

Se ha demostrado que la capsaicina (Figura 3) modula procesos de apoptosis en varias células cancerosas, específicamente de páncreas,<sup>10</sup> pulmón,<sup>11</sup> próstata<sup>12</sup> y en células de glioblastoma multiforme (GBM) humano,<sup>13,14</sup> uno de los tumores más agresivos e invasivos del cerebro que a pesar del tratamiento estándar tiene un pésimo pronóstico, con una mediana de supervivencia de un año. Sin embargo, el uso de la capsaicina es limitado debido a su hidrofobicidad, baja afinidad y corta vida media, por lo que el desarrollo de nuevos enfoques como el uso de sistemas nanoestructurados para la liberación de compuestos activos con estas características surgen como una alternativa con enorme potencial para la inhibición de células cancerosas.

**Figura 3.**  
**Estructura química de la capsaicina**



Fuente: Kaiser et al.<sup>15</sup>

Los gliomas son los tumores más comunes del sistema nervioso central (SNC), lo cuales pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de célula en astrocitomas (astrocitos), oligodendrogliomas (oligodendrocitos) y ependimomas (ependimarias); y de acuerdo con el grado pueden ser caracterizados por bajo grado (grado II), alto grado o glioma maligno (grado III y IV). La forma de glioma más agresiva es el GBM (grado IV) y se caracterizan por una proliferación incontrolada, áreas de necrosis e infiltración difusa<sup>16,17</sup>. La terapia estándar contra los gliomas malignos incluye cirugía, radiación y

quimioterapia, o la combinación de éstas. Sin embargo, la quimiorresistencia es uno de los principales problemas en la terapia del glioma<sup>16,18</sup>. Por lo tanto, la búsqueda de compuestos activos eficaces junto con el diseño de sistemas de liberación resulta de gran relevancia para superar las limitantes actuales de los tratamientos convencionales.

En la literatura se pueden encontrar algunos reportes del uso de nanopartículas de quitosano modificado para la encapsulación de compuestos como curcuminoides<sup>19</sup>, doxorubicina<sup>14</sup> y lactoferrina<sup>20</sup> para el tratamiento de células de glioblastoma humano o de ratón. Por otro lado, se ha estudiado la interacción (o unión) de nanopartículas de CTS con receptores CD44 comúnmente sobreexpresados en células troncales de cáncer.<sup>21</sup> También se ha evaluado el efecto del quitosano en la inhibición de la angiogénesis, proceso que permite la microvascularización de tumores.<sup>22</sup> Sin embargo, aún es necesario estudios en diferentes modelos para confirmar dicho efecto.

El diseño y desarrollo de sistemas nanoestructurados de quitosano es de enorme interés por sus potenciales aplicaciones como sistemas de administración controlados para mejorar la biodisponibilidad de moléculas como la capsaicina. Además, la encapsulación de esta molécula podría atenuar las propiedades adversas de la administración de la capsaicina libre, como su citotoxicidad a concentraciones altas y su escasa solubilidad en agua.<sup>5</sup> Estudios previos han evaluado el papel que juega el grado de acetilación y el peso molecular del quitosano en las propiedades físicas y en la estabilidad bajo condiciones fisiológicas de las nanocápsulas de quitosano con capsaicina.<sup>4</sup> Además, Kaiser et al., (2015) compararon la citotoxicidad de capsaicina libre y de las nanocápsulas de quitosano con capsaicina en células epiteliales MDCK-C7 y su efecto en la integración de las uniones estrechas (tight junctions) y en la permeabilidad celular. Sin embargo, se desconoce si estos nanosistemas

tienen efecto en líneas celulares de glioblastoma humano, por lo que en este trabajo se planteó evaluar la actividad antitumoral de las nanocápsulas de quitosano con capsaicina en células de glioblastoma humano.

## Material y Métodos

**Formulación de nanosistemas:** Para la elaboración de los nanocápsulas (NC) se utilizó la técnica de emulsificación de acuerdo con el protocolo original desarrollado por Goycoolea et al., (2012) con las modificaciones pertinentes.<sup>4</sup> Este sistema en particular, permite la formación de nanocápsulas que comprenden un centro oleoso, lecitina y una capa de polímero, en este caso de quitosano (CTS). Además, se prepararon las nanoemulsiones (NE) con y sin capsaicina (CP) pero sin incluir quitosano en la fase acuosa.

**Caracterización de los nanosistemas:** La caracterización fisicoquímica se realizó en función del diámetro de tamaño, de partícula, forma y porcentaje de encapsulación de los nanosistemas formulados. La morfología de las nanocápsulas se observó por microscopía de transmisión (TEM) mediante tinción negativa en un equipo TEM 200CX. También se evaluó el potencial zeta para obtener información sobre la carga superficial y estabilidad de los nanosistemas. La distribución del tamaño de partícula se determinó utilizando dispersión de luz dinámica en un instrumento Nano ZS90 de la marca Malvern.<sup>4</sup> La eficiencia de encapsulación (EE)

fue calculada a partir de la cantidad total de CP en la preparación de los nanosistemas y la cantidad de CP no encapsulada presente en el sobrenadante.<sup>5</sup>

**Actividad antitumoral de los nanosistemas:** Se evaluó la actividad antitumoral contra dos células de glioblastoma (H4 y U118 MG) mediante el método de MTT (Bromuro de 3 - (4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol) con algunas modificaciones.<sup>5</sup> Las células fueron colocadas en placas de 96 pozos (2,500 células para H4 y 5,000 células para U118MG) y se dejaron para su adhesión durante 24 h. Después de este tiempo, los tratamientos fueron colocados y se incubó durante 3 días. CP y temozolomida (TMZ) se evaluaron a 300 mM, para los nanosistemas con CP se evaluó una alícuota correspondiente a una concentración final de CP a 300 mM. La concentración de CTS aplicada fue la misma para las nanocápsulas. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

## Resultados y discusión

**Formulación de los nanosistemas:** Se fabricaron las nanocápsulas formadas con el polímero de quitosano con capsaicina, a una concentración de 10 mM (NC CTS CP). También, se prepararon nanocápsulas de quitosano sin compuesto activo (NC CTS). La concentración de quitosano en las nanocápsulas fue de 1 mg/mL. Además, se prepararon las nanoemulsiones con y sin CP, las cuales no llevan la capa polimérica (NE CP y NE).

**Tabla 1.**  
**Propiedades fisicoquímicas de los nanosistemas**

Muestra	Promedio (d.nm)	PdI	Potencial Z mV	% EE
NE	171 ± 1	0.18 ± 0.02	- 54 ± 6	-
NE CP	149 ± 12	0.13 ± 0.02	- 48 ± 10	86 ± 2
NC CTS	188 ± 15	0.13 ± 0.01	+ 38 ± 1	-
NC CTS CP	172 ± 2	0.12 ± 0.02	+ 39 ± 3	94 ± 3

Fuente: Datos originales.

**Caracterización de los nanosistemas:** En la Tabla 1, se presentan los resultados del tamaño de partícula y potencial Z. Los resultados muestran que el tamaño de partícula de las nanocápsulas se encuentra en un rango aproximado de 140 a 200 nm de diámetro (índice de polidispersidad PDL 0.12 – 0.18). Por otra parte los valores de potencial Z establecen que estos sistemas son estables, ya que valores mayores a (+/-) 30 mV

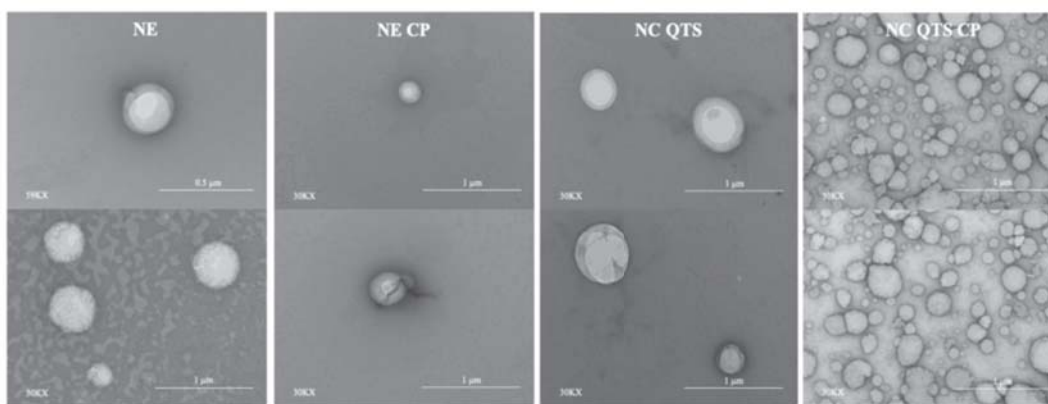
indican la presencia de repulsión eléctrica entre las nanocápsulas y, en consecuencia, se evita la agregación de las partículas. Las nanoemulsiones presentaron carga negativa (-48 a -54 mV), mientras que los valores para las nanocápsulas con CTS exhiben valores positivos, debido a los grupos amino (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) libres distribuidos en la superficie de las nanocápsulas (+38 a +39 mV).

Por otra parte, los nanosistemas unidos a capsaicina, NE CP y NC CTS CP, mostraron un porcentaje de encapsulación de 86 y 94 %, respectivamente (Tabla 2). El nanosistema con capa polimérica presentó mayor eficiencia para encapsular la CP, la alta eficiencia de encapsulación de capsaicina coincide con lo reportado por Goycoolea y colaboradores (2012).

La estructura de las nanoemulsiones y nanocápsulas fue investigada por microscopía electrónica de

transmisión mediante tinción negativa en un equipo TEM 200CX. En la Figura 4 se presentan las imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los nanosistemas estudiados, todos los sistemas presentaron una morfología esférica con tamaños dentro del rango determinado por la dispersión dinámica de la luz (Tabla 1). Las imágenes TEM de las nanocápsulas revelaron una estructura núcleo-cubierta que incluye una superficie delgada con topografía irregular.

**Figura 4.**  
**Representación de imágenes TEM utilizando tinción negativa de los nanosistemas con y sin compuesto activo. NE, NE CP, NC CTS Y NC CTS CP.**



**Fuente:** Datos originales.

Actividad antitumoral de los nanosistemas: Se evaluó la viabilidad celular empleando los tratamientos contra dos líneas celulares de glioblastoma U118MG y H4 utilizando el método del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. En la Figura 5, se presentan los resultados obtenidos. En ambos casos el control solvente y la solución acuosa de CTS no presentaron actividad inhibitoria importante comparado con el control de viabilidad. Este resultado contrasta con lo reportado por Goycoolea y colaboradores (2012), quienes observaron una inhibición significativa en la viabilidad de células epiteliales MDCK-C7 cuando estas fueron tratadas con una solución de polímero de CTS. Por otra parte, en el gráfico se adicionaron los controles de CP y temozolomida (TMZ) libre para observar el efecto sobre las células con mayor claridad. La TMZ es el principal fármaco quimioterapéutico para GBM. La TMZ es un agente alquilante oral que es estable en el pH ácido y generalmente se aplica en las etapas iniciales de la terapia con GMB. Puede utilizarse en asociación con la radioterapia para mejorar la supervivencia media de los pacientes. Aunque la TMZ tiene algunas ventajas en la terapia del cáncer,

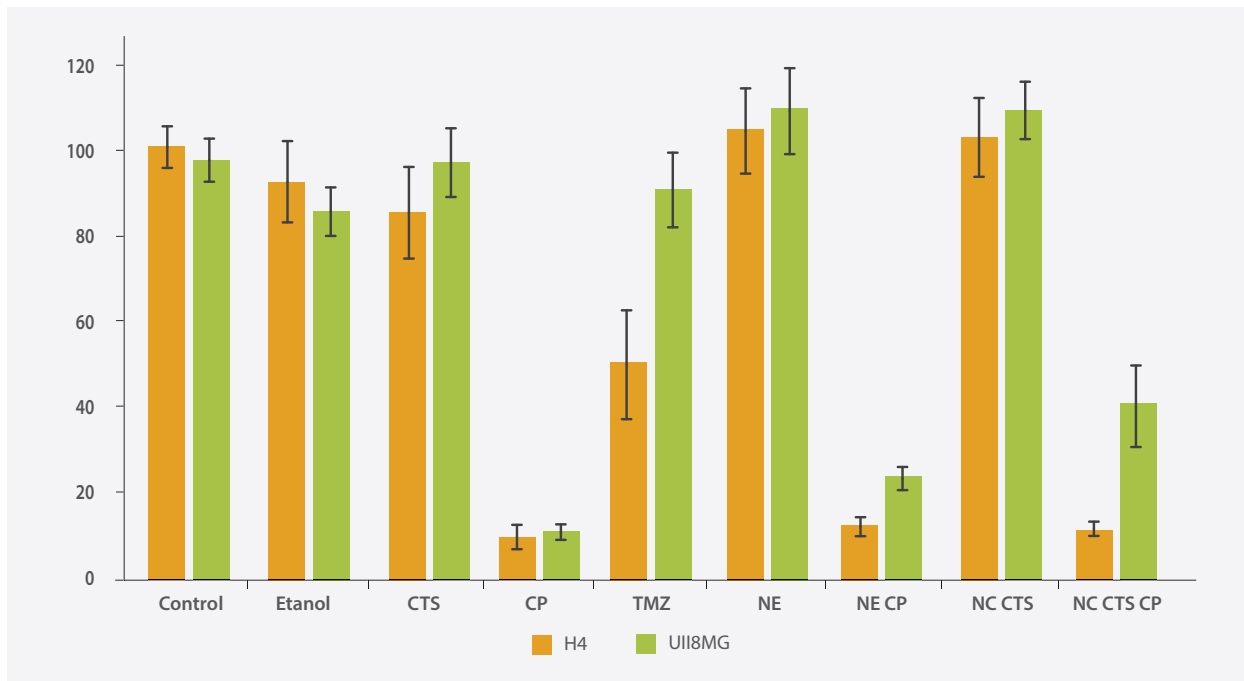
existen varias dificultades en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Lo cual parece estar relacionado con la aparición de quimiorresistencia y la incapacidad de la TMZ para inducir la muerte de células tumorales<sup>18,23</sup>. Por lo que la búsqueda de compuestos activos eficaces junto con el diseño de sistemas de liberación a través de nanocápsulas surge como una herramienta con enorme potencial en este campo.

En la Figura 5, se observa que la CP libre presentó un mayor efecto sobre la viabilidad celular (5 – 12%) comparada con la TMZ (50 – 90%), estudios previos *in vitro* han demostrado que la CP modula los procesos de apoptosis, diferenciación celular y autofagia en líneas de glioblastoma<sup>24, 14,25,26</sup>, estos resultados evidencian la importancia farmacológica de CP para el tratamiento del glioblastoma. Los nanosistemas cargados con CP se evaluaron a la misma concentración (300  $\mu$ M) y la concentración del quitosano en las nanocápsulas se aplicó a la misma concentración (30  $\mu$ g/mL). Como se muestra en la Figura 5, las nanoemulsiones y las nanocápsulas con CP redujeron significativamente

la viabilidad celular de las líneas de glioblastoma en comparación con sus homólogos sin compuesto activo. Si bien, se observó mayor efecto en la línea celular H4 para

NE CP y NC CTS CP, la inhibición celular en U118MG también fue significativa comparada con los tratamientos sin capsaicina.

**Figura 5.**  
**Determinación de la viabilidad celular de los diferentes tratamientos contra la línea celular H4 y U118MG utilizando el ensayo de MTT**



**Líneas celulares:** H4 y U118MG. **Tratamientos:** Control de crecimiento celular: Control 100%; Control solvente: Etanol; Solución acuosa de quitosano (CTS). Capsaicina 300  $\mu$ M (CP) y Temozolomida 300  $\mu$ M (TMZ). Nanosistemas con o sin compuesto activo: NE, NE CP, NC CTS y NC CTS CP.

**Fuente:** Datos originales.

## Conclusiones

En este estudio se evaluó el efecto en líneas celulares de glioblastoma humano de dos sistemas utilizados para la nanoencapsulación de capsaicina. Las nanoemulsiones y nanocápsulas unidas a capsaicina presentaron una importante inhibición en la viabilidad celular de H4 y U118MG. Por otra parte, se observó que la capsaicina libre presenta un mayor efecto en la viabilidad celular comparada con temozolomida, que es el principal fármaco quimioterapéutico para GBM, este resultado sugiere que la capsaicina puede ser un candidato prometedor para el tratamiento de glioblastoma humano. Sin embargo, es necesario el desarrollo de nuevos enfoques como el uso de sistemas nanoestructurados como alternativa para el suministro de la capsaicina y evitar las propiedades

adversas de la administración de la capsaicina libre, como su citotoxicidad a concentraciones altas y su escasa solubilidad en agua. Por otro parte, se está trabajando para profundizar en los mecanismos moleculares relacionadas al efecto inhibitorio de las nanocápsulas de quitosano con capsaicina en las células de glioblastoma humano.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento, a través del Proyecto de Fronteras de la Ciencia FON.INST./44/2016.

Contacto: Dr. Inocencio Higuera Ciapara  
Email: inohiguera@ciatej.mx

## Referencias bibliográficas

- Agrahari V. 2018. Novel drug delivery systems, devices, and fabrication methods. *Drug Delivery and Translational Research* 8:303-306
- Xinyu R, Yinghua X, Xiaomei H, Tao C, Yingming W, Yuanyuan L. 2011. Applications of Polymeric Nanocapsules in Field of Drug Delivery Systems. *Current Drug Discovery Technologies* 8:173-187.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385:113-142.
- Goycoolea FM, Valle-Gallego A, Stefani R, Menchicchi B, David L, Rochas C, Santander-Ortega MJ, Alonso MJ. 2012. Chitosan-based nanocapsules: physical characterization, stability in biological media and capsaicin encapsulation. *Colloid and Polymer Science* 290:1423-1434.
- Kaiser M, Pereira S, Pohl L, Ketelhut S, Kemper B, Gorzelanny C, Galla HJ, Moerschbacher BM, Goycoolea FM. 2015. Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. *Scientific Reports* 5:10048.
- Kleine-Brueggene H, Zorzi GK, Fecker T, El Gueddari NE, Moerschbacher BM, Goycoolea FM. 2015. A rational approach towards the design of chitosan-based nanoparticles obtained by ionotropic gelation. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 135:99-108.
- Santos-Carballal B, Aaldering LJ, Ritzefeld M, Pereira S, Sewald N, Moerschbacher BM, Gotte M, Goycoolea FM. 2015. Physicochemical and biological characterization of chitosan-microRNA nanocomplexes for gene delivery to MCF-7 breast cancer cells. *Scientific Reports* 5.
- Smith J, Wood E, Dornish M. 2004. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharmaceutical Research* 21:43-49.
- Ye YJ, Wang Y, Lou KY, Chen YZ, Chen RJ, Gao F. 2015. The preparation, characterization, and pharmacokinetic studies of chitosan nanoparticles loaded with paclitaxel/dimethyl-beta-cyclodextrin inclusion complexes. *International Journal of Nanomedicine* 10:4309-4319.
- Pramanik KC, Boreddy SR, Srivastava SK. 2011. Role of Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes in Capsaicin Mediated Oxidative Stress Leading to Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *Plos One* 6.
- Brown KC, Witte TR, Hardman WE, Luo H, Chen YC, Carpenter AB, Lau JK, Dasgupta P. 2010. Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway. *Plos One* 5:e10243.
- Mori A, Lehmann S, O'Kelly J, Kumagai T, Desmond JC, Pervan M, McBride WH, Kizaki M, Koeffler HP. 2006. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Research* 66:3222-3229.
- Amantini C, Mosca M, Nabissi M, Lucciarini R, Caprodossi S, Arcella A, Giangaspero F, Santoni G. 2007. Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. *Journal of Neurochemistry* 102:977-990.
- Jeon JH, Choi YJ, Han IH, Choi BK, Cha SH, Cho WH. 2012. Capsaicin-induced apoptosis in the human glioblastoma U87MG cells via p-38 MAPK and Bcl-2/Bax signaling pathway. *Molecular & Cellular Toxicology* 8:69-76.
- Kaiser M, Higuera I, Goycoolea FM. 2017. Capsaicinoids: Occurrence, Chemistry, Biosynthesis, and Biological Effects. In E. M. Yahia (Ed.). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, Volume I, Second Ed.* (499-513). John Wiley & Sons Ltd.
- Glaser T, Han I, Wu LQ, Zeng X. 2017. Targeted Nanotechnology in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Pharmacology* 8.
- Suk K. 2012. Proteomic Analysis of Glioma Chemoresistance. *Current Neuropharmacology* 10:72-79.
- Carmo A, Carvalheiro H, Crespo I, Nunes I, Lopes MC. 2011. Effect of temozolomide on the U-118 glioma cell line. *Oncology Letters* 2:1165-1170.
- Yang L, Gao SY, Asghar S, Liu GH, Song J, Wang X, Ping QN, Zhang C, Xiao YY. 2015. Hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for delivery of curcuminoid and its in vitro evaluation in glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules* 72:1391-1401.
- Xu Y, Asghar S, Yang L, Li H, Wang Z, Ping Q, Xiao Y. 2017. Lactoferrin-coated polysaccharide nanoparticles based on chitosan hydrochloride/hyaluronic acid/PEG for treating brain glioma. *Carbohydrate Polymers*. 157(10):419-428.
- Rao W, Wang H, Han J, Zhao S, Dumbleton J, Agarwal P, Zhang W, Zhao G, Yu J, Zynger DL, Lu X, He X. 2015. Chitosan-Decorated Doxorubicin-Encapsulated Nanoparticle Targets and Eliminates Tumor Reinitiating Cancer Stem-like Cells. *CAN Nano* 9(6):5725-5740.
- Goertz O, Lauer H, Hirsch T, Daigeler A, Harati K, Stricker I, Lehnhardt M, von der Lohe L. 2016. Evaluation of angiogenesis, epithelialisation and microcirculation after application of polyhexanide, chitosan and sodium chloride in rodents. *International Wound Journal* 13:1161-1167.
- Pourgholi F, Hajivalili M, Farhad JN, Kafil HS, Yousefi M. 2016. Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 77:98-107.
- Gil Y-G, Kang M-K. 2008. Capsaicin induces apoptosis and terminal differentiation in human glioma A172 cells. *Life Sciences* 82:997-1003.
- Lee YS, Nam DH, Kim J-A. 2000. Induction of apoptosis by capsaicin in A172 human glioblastoma cells. *Cancer Letters* 161:121-130.
- Liu Y-P, Dong F-X, Chai X, Zhu S, Zhang B-L, Gao D-S. 2016. Role of Autophagy in Capsaicin-Induced Apoptosis in U251 Glioma Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36:737-743.