



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“Evaluación de la biocompatibilidad de nanoarcillas de uso comercial en cultivos celulares (amibas y macrófagos) y en ratones”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Q. YANIS TOLEDANO MAGAÑA**

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Julio César Carrero  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dr. Emilio Rojas del Castillo  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.  
Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés  
Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

MÉXICO, D. F JUNIO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Al posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico S.A. de C.V.

A CONACyT (beca no. 362861).

A mi tutor Dr. Julio César Carrero y a mi comité tutor, Dr. Emilo Rojas del Castillo y Luis Ignacio Terrazas Valdés por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al Dr. Juan Pedro Laclette San Román, el Dr. Raúl Bobes, la Dra. Concepción Mora, la Dra. Noemí Alejandra Saavedra Ávila, la Dra. Lena Ruiz Azuara, el M. en C. Juan Carlos García Ramos, la Dra. Leticia Flores Santos, el Dr. Alfonso González Montiel, la Dra. Georgina Montes de Oca Ramírez por todos los consejos, enseñanzas y el apoyo recibido a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Karina Jiménez Duarte y al Dr. Iván Puente Lee por su apoyo en la Microscopía electrónica de Transmisión y Barrido.

Al Dr. Alfonso Olivos y el Biol. Mario Nequiz de la Unidad de Medicina Experimental, UNAM, por su apoyo en el cultivo de trofozoítos de *E. Histolytica*.

A la M.V.Z. Georgina Díaz Herrera del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por todo su apoyo en los experimentos *in vivo*.

## Dedicatoria

A mis vivos:

Adrián, José María y Allan Toledano, Martha Magaña, Josefa Castro, Juan Carlos García

A mis muertos:

Oscar Rodríguez, Oscar González Rul, Vicente Palacios, Gonzalo Ceja, Ruth Lechuga, Yolanda Espinosa

Por todo su apoyo, comprensión y enseñanzas.

*“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros.  
Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y,  
Sobre todo, tener confianza en uno mismo.  
Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa  
Y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”.*

**Marie Curie**

## Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>8</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>9</b>
- Arcillas.....	11
- Nanoarcillas.....	14
- Métodos de obtención de nanoarcillas.....	15
- Toxicidad de arcillas y nanoarcillas.....	17
- Biocompatibilidad de las nanoarcillas.....	18
- Modelos utilizados para evaluar nanotoxicidad.....	22
<b>Relevancia e impacto en el área de estudio.....</b>	<b>26</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>27</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>28</b>
- Objetivo general.....	28
- Objetivos particulares.....	28
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>29</b>
- Caracterización de nanoclinoptilolita y nanosepiolita.....	29
- Preparación de soluciones stock de nanoarcillas y talco.....	30
- Cultivo de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS y tratamiento con nanoarcillas.....	30
- Viabilidad amibiana.....	31
- Cultivo de macrófagos.....	32
- Tratamiento de macrófagos con nanoarcillas y ensayos de viabilidad.....	34
- Viabilidad, apoptosis y necrosis.....	34
- Determinación de citocinas Th1, Th2 y Treg.....	35
- Microscopía electrónica de transmisión.....	36
- Análisis estadístico.....	36
- Tratamiento de ratones con nanoarcillas.....	36
- Administración aérea.....	38
- Exposición crónica a nanoarcillas de ratones a lo largo de 3 generaciones.....	40
<b>Resultados.....</b>	<b>43</b>
- Caracterización de nanoclinoptilolita y nanosepiolita.....	43

- Efecto de la nanoclinoptilolita y nanosepiolita en cultivos de	
- <i>Entamoeba histolytica</i> .....	46
- Efecto de la nanoclinoptilolita y nanosepiolita en	
- cultivos de macrófagos.....	48
- Patrón de secreción de citocinas de macrófagos humanos	
- y murinos tratados con nanoarcillas.....	52
- Resultados de la administración simultánea por diferentes vías a ratones	
CD1.....	55
- Efecto de la exposición constante a nanoarcillas.....	62
<b>Discusión.....</b>	<b>65</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>80</b>
<b>Bibliografías.....</b>	<b>81</b>
<b>Publicaciones Obtenidas.....</b>	<b>105</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Clasificación de las arcillas. ....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 2. Esquema de administración de nanoarcillas a ratones CD1.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 3. Esquema de administración aérea de nanoarcillas a ratones CD1...38</b>	<b>38</b>
<b>Figura 4. Fotografía de la cámara de dispersión. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 5. Diagrama de evaluación del efecto a la exposición constante.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 6. Patrón de difracción de rayos X de polvos.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 7. Microanálisis de composición de nanoarcillas.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 8. Microscopías electrónicas de barrido y de transmisión de las muestras de nanoarcillas. ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 9. Viabilidad de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> después del tratamiento con nanoarcillas .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 10. Microscopías electrónicas de transmisión de amibas tratadas con nanoarcillas. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 11. TEM de macrófagos de sangre periférica humana tratados con nanoarcillas. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 12. Viabilidad, apoptosis y necrosis de macrófagos después del tratamiento con nanoarcillas. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 13. Patrón de secreción de citocinas de cultivos de macrófagos tratados con nanoarcillas y talco.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 14. Registro del peso de los ratones tratados con nanoarcillas.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 15. Fotos representativas de los efectos observados en los sitios de administración.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 16. Determinación de analitos en suero de sangre de ratones tratados con nanoclinoptilolita y nanosepiolita.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 17. Determinación de aluminio por absorción atómica en órganos de los ratones tratados con nanoarcillas.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 18. Efecto de la administración de nanosepiolita por vía aérea en ratones.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 19. Peso de ratones tratados durante 8 meses con las nanoarcillas.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 20. Determinación de aluminio en hígado, riñón y pulmón de ratones expuestos permanentemente a nanoarcillas.....</b>	<b>64</b>

## Resumen

En las últimas décadas se han desarrollado y estudiado diversas nanopartículas tanto naturales como sintéticas. En particular, las nanoarcillas se han propuesto para su aplicación como acarreadores de fármacos, para la liberación prolongada de medicamentos, como aditivos en materiales para mejorar sus propiedades y se utilizan ya en productos farmacéuticos, cosméticos, alimenticios entre otros. Sin embargo una limitante en la aplicación de nanopartículas para sus diferentes usos es la evaluación toxicológica. En este trabajo se realizó la evaluación de la toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* de nanopartículas de clinoptilolita y nanosepiolita. Es por su capacidad fagocítica que se escogieron trofozoitos de *Entamoeba histolytica* así como macrófagos que además están involucrados en la respuesta inmune. De esta manera se facilitó la internalización de las nanopartículas en las células y se determinó el perfil de expresión de citocinas. Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones CD1 debido a que han sido ampliamente utilizados en ensayos de toxicidad y a que representan una población. En los cultivos amibianos se observó un efecto tiempo y dosis dependiente con una disminución significativa de la viabilidad sólo en los cultivos tratados con nanosepiolita; mientras que en los cultivos de macrófagos el efecto es dependiente del origen de la célula, siendo las más afectadas los macrófagos de médula ósea de ratón. La expresión de citocinas en los sobrenadantes de los medios de cultivo mostró una respuesta proinflamatoria. Los ratones CD1 tratados con nanoarcillas no presentaron efectos adversos cuando se trataron con nanoclinoptilolita. En general las nanoarcillas evaluadas mostraron baja toxicidad en los modelos evaluados.

## **Abstract**

In the last decades natural and synthetic nanoparticles have been developed and studied. Particularly, the nanoclays have been proposed for use as drug carriers, for drug delivery systems, as additives in materials for improving their properties and are already used in pharmaceuticals, cosmetics, food and others. However the toxicological evaluation of nanoclays is indispensable for their application. In this work in vitro and in vivo toxicity of nanoclinoptilolite and nanosepiolite was evaluated. Is because of their phagocytic capacity that *Entamoeba histolytica* trophozoites and macrophages were chosen, also the macrophages are involved in the immune response. Thus the internalization of the nanoparticles in the cells was facilitated and the profile of cytokine expression was determined. For the in vivo tests CD1 mice were used because they have been widely used in toxicity tests as they represent a population. In amoebic cultures a time and dose dependent effect with a significant decrease in viability only in cultures treated with nanosepiolite; while in macrophage cultures the effect is dependent on the origin of the cell, being the most affected macrophages of mouse bone marrow. Cytokine expression in the supernatants of culture media showed a proinflammatory response. The CD1 mice treated with nanoclays did not present adverse effects when treated with nanoclinoptilolite. In general terms, the nanoclays showed low toxicity in the evaluated models.

## Introducción

La nanotecnología es definida por la *Royal Society and yhe Royal Academy of Engineering* como el diseño, caracterización, producción y aplicaciones de estructuras, dispositivos y sistemas controlando la forma y el tamaño a escala nanométrica. Por otra parte la *International Standard Organization* la define como la comprensión y dominio de la materia y procesos a nanoescala, normalmente, pero no de forma exclusiva, por debajo de 100nm en una o más dimensiones. A esta escala, los nanomateriales se comportan de manera diferente a sus contrapartes macro y microscópicas, lo que plantea novedosas aplicaciones de los diferentes nanomateriales por sus propiedades específicas. Ante tantas posibles aplicaciones, el estudio de los nanomateriales no sólo supone el análisis de sus propiedades físicas y químicas, sino también de su toxicidad.

Hoy en día, la nanotoxicología es una disciplina emergente que implica el estudio de la toxicidad de nanomateriales *in vitro* e *in vivo*. Esto es fundamental debido a sus propiedades, tales como el área superficial, el potencial zeta y el tamaño, que pueden modificar sus interacciones con componentes biológicos en comparación con sus contrapartes micrométricas (1). Además, se ha reportado que la toxicidad de un nanomaterial no depende sólo de su tamaño y composición, sino también de los modelos utilizados para evaluar (2). Es por esto que cada vez se hacen más evaluaciones sobre la toxicidad de nanoacompuestos. Sin embargo la mayoría de las evaluaciones se ha llevado a cabo *in vitro* sobre líneas celulares o sobre algún modelo animal inoculado por la ruta más probable de exposición.

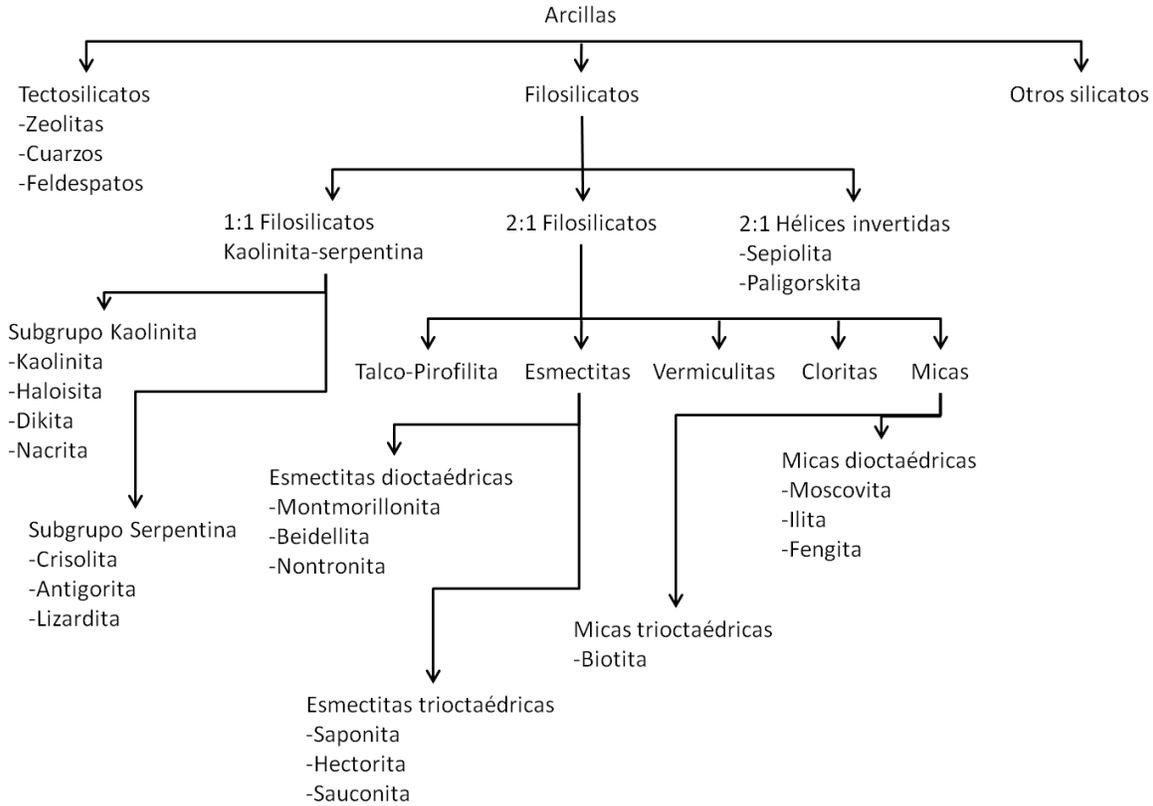
Es por esto que es necesario estandarizar métodos de evaluación de toxicidad de nanomateriales (3) y sobre todo definir los límites para poder considerar un nanomaterial como seguro. En el caso de las aplicaciones biomédicas de diversos materiales y nanomateriales es necesario tomar en cuenta la biocompatibilidad de los mismos. En este sentido, la biocompatibilidad era por definición, "la compatibilidad con el tejido vivo o un sistema vivo por no ser tóxica, perjudicial, o fisiológicamente reactiva y no causar rechazo inmunológico" (4). En los últimos años David F. Williams propuso redefinirla como: "Biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un biomaterial para realizar una función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar efectos locales o sistémicos indeseables en el receptor o beneficiario de la terapia, pero generando la respuesta celular o tisular más apropiada en esa situación específica y optimizando el rendimiento clínicamente relevante de la terapia" (5).

Entre los diversos materiales que se encuentran en la naturaleza, las arcillas son ampliamente utilizadas en diversas aplicaciones como absorbentes, adhesivos, alimentos veterinarios, cerámicas, lodos de perforación, filtros, clarificadores, decolorantes, arenas de fundición y en la impermeabilización de cubiertas y selladores, entre otros. Estos materiales también se usan en ropa, cosméticos, medicamentos y para la clarificación de zumos (6). El uso de nanoarcillas podría multiplicar sus aplicaciones y el interés de la investigación se ha centrado en su uso en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa sobre todo de huesos (7,8,9). Hasta el momento las aplicaciones de las nanoarcillas son prometedoras, pero parece existir una falta de información acerca de sus posibles efectos tóxicos. Es

importante señalar, que la producción, comercialización, consumo, almacenamiento y manipulación de nanoarcillas generarán un contacto directo entre las personas y estos materiales, siendo la razón más importante para conocer y evaluar las características de las nanoarcillas y los posibles efectos adversos en la población y el ambiente. Esto conlleva a implicaciones económicas y éticas, lo que podría implicar conflictos de interés entre productores, proveedores y consumidores. Es necesario tomar en cuenta que aún cuando las arcillas de tamaño micrométrico son inocuas, no se conoce el efecto de las nanoarcillas por lo que es necesaria la evaluación de su toxicidad.

### **Arcillas**

Desde hace décadas, las arcillas se han definido como "Los materiales naturales compuestos de minerales de grano fino, contienen agua, filosilicatos y pueden contener otros materiales que imparten plasticidad y se endurecen cuando se secan o incendian" (10) y se han clasificado debido a sus propiedades físico-químicas en tres grupos, siendo el de los filosilicatos el más abundante (11-14) (Figura 1).



**Figura 1. Clasificación de las arcillas.** El diagrama muestra los diferentes grupos en los que se clasifican las arcillas en función de su composición, estructura química, propiedades macroscópicas y microscópicas.

Debido a sus propiedades, el mercado de las arcillas a nivel mundial es muy amplio por lo que la producción, exportación e importación aumentan ligeramente cada año. Entre las arcillas más importantes se encuentran la bentonita y la tierra de batán que se utilizan principalmente como arenas de moldeo, en lodos de perforación para peletización y como absorbentes (15), siendo los mayores productores E.U.A. y China (16). El caolín es otra arcilla importante en todo el mundo que se produce principalmente en E.U.A. y Alemania. Esta arcilla se ha utilizado como material de relleno en la industria del papel, caucho, pinturas, plásticos, y se estima que el 54% de las ventas se refiere a este último (17).

También se utiliza en la industria de la cerámica y en la fabricación de zeolitas sintéticas (catalizadores), en la agricultura y para la producción de productos químicos, farmacéuticos y cosméticos (17).

Dentro de las propiedades físico-químicas más estudiadas de las arcillas se encuentra su capacidad de absorción y de unión a las aflatoxinas y micotoxinas, por lo que han sido utilizadas como aditivos en piensos y alimentos, mostrando la reducción e incluso la eliminación del efecto de dichas toxinas en pollos de engorda y lechones (18-22). De ellas, las esmectitas de baja carga preparadas con nutrientes o compuestos orgánicos no tóxicos, sufren modificaciones superficiales que producen una unión más eficaz con las aflatoxinas en los piensos o alimentos contaminados y evitan la toxicidad (23). Sin embargo, la comisión técnica de aditivos y productos o sustancias empleadas en la alimentación animal (FEEDAP) considera que no hay suficiente información para concluir sobre la eficacia de bentonita y sepiolita, otras dos arcillas, para reducir la contaminación por micotoxinas (24).

En cuanto a contaminación de agua, la combinación de montmorillonita de sodio, un soporte sólido y un adhesivo ha sido utilizada para purificar grandes volúmenes de agua contaminada (25). También la esmectita homioónica de sodio se utiliza para la adsorción de uranio en medio acuoso (26). Existe una variedad de arcillas que han mostrado su eficacia como adsorbentes de metales pesados en disoluciones de desechos mixtos acuosos (27-38), la reducción en el impacto negativo de los lixiviados de vertedero y los desechos orgánicos en el ambiente (39,40).

También se ha estudiado el uso de arcillas contra patógenos y para el control de plagas. En este aspecto, las arcillas han presentado propiedades bactericidas incluso contra cepas resistentes a los antibióticos (41) y son muy útiles para aumentar las propiedades insecticidas de algunas proteínas cuando se genera un complejo arcillo-insecticida (42,43), lo que tiene además un efecto positivo en la lucha contra la genotoxicidad de los plaguicidas (44). Algunas arcillas como el caolín, actúan naturalmente como plaguicidas siendo de gran interés ya que son de origen natural (45). En la industria farmacéutica, las arcillas han sido utilizadas como estabilizantes, espesantes, emulsionantes y excipientes. Sus diversas propiedades, así como su interacción con fármacos han llamado la atención para su uso como sistemas de administración de fármacos con el objetivo, en muchos casos, de obtener sistemas de liberación prolongada o con el fin de asegurar la llegada del fármaco al órgano diana (46-53). Todo lo anterior demuestra que las arcillas son ampliamente utilizadas debido a sus propiedades y aplicaciones.

### **Nanoarcillas**

Las nanoarcillas son arcillas que se han sometido a un proceso de trituración y tamizado para obtener partículas en la que por lo menos uno de sus lados es inferior a 100 nm. En las dos últimas décadas, el aumento en la producción de diversas nanopartículas, así como el creciente desarrollo de la nanotecnología, han atraído el interés en las nanoarcillas debido a las posibilidades de aumentar y mejorar sus propiedades físicas y químicas. Éstas han sido analizadas principalmente como nanoacarreadores por sus propiedades mecánicas y

biológicas. Sin embargo, existen otras aplicaciones para las nanoarcillas descritas en la literatura, como:

- Inmovilización de enzimas: han mostrado una mayor retención de la actividad de la enzima (54)
- Microbicidas: efectivas contra *E. coli* y *S. aureus* (55-57)
- Aditivos en textiles: inhiben el crecimiento de algunos microorganismos (58,59)
- Pesticidas: aunque tienen la propiedad de controlar algunas plagas, las nanoarcillas pueden utilizarse para la liberación controlada de pesticidas (60,61)
- Matrices poliméricas: para la elaboración de piezas automotrices, envases de alimentos y prótesis (62-67), liberación controlada de diferentes sustancias entre ellas fármacos (68-71), adhesivos dentales (72), ingeniería de tejido óseo (73) e inmunosensores (74).

### **Métodos de obtención de nanoarcillas**

La producción de nanoarcillas al igual que de otras nanopartículas como los óxidos metálicos, se realizan principalmente por dos tipos de métodos:

- Molienda: se parte de materiales sólidos macrométricos y por métodos termo-mecánicos se producen nanopartículas
- Síntesis: se parte de átomos o moléculas para la producción de nanopartículas por procesos de deposición química y física. (75)

Los métodos que parten de sólidos macrométricos son: la atricción mecánica, la litografía y los tratamientos térmicos (quenching). Estos métodos son ampliamente utilizados debido a su bajo costo. Sin embargo, las nanopartículas obtenidas pueden presentar estructuras alteradas, baja pureza y tamaños variados, lo cual afecta directamente sus propiedades físico-químicas (76). El siguiente método más utilizado es el de molienda, principalmente utilizado en industria. Para esto se utilizan “molinos” que aplican fuerzas de compresión, impacto, rozamiento y corte para reducir el tamaño del material hasta nanopartículas (77).

Por otra parte, los métodos que parten de átomos o moléculas presentan múltiples ventajas ya que se obtienen nanopartículas con una composición química más homogénea, estructura química predeterminada y mayor pureza. Los más utilizados son: el método de precipitación controlada que es una síntesis química que permite la obtención de óxidos metálicos nanométricos, ampliamente utilizada debido al bajo costo energético y porque no utiliza disolventes (78). El método sol-gel que parte de elementos metálicos o metaloides rodeados de compuestos inorgánicos para la preparación de un coloide que constituye una red tridimensional intercalada con el nanoóxido inorgánico que se desea obtener y a partir de reacciones de hidrólisis y policondensación se obtiene la nanopartícula (79). Dentro de las desventajas que presenta este método se encuentran el elevado costo de los compuestos metálicos, el tiempo de reacción y el bajo rendimiento (80).

La producción de nanoarcillas genera modificaciones en sus propiedades físico-químicas, lo que podría multiplicar sus aplicaciones. Sin embargo, la modificación

de éstas propiedades también puede modificar su interacción en sistemas biológicos, por lo que su toxicidad no puede ser extrapolada a la de sus homólogos micrométricos. De tal forma que es indispensable realizar las evaluaciones de toxicidad de cada una de las nanoarcillas que se producen.

### **Toxicidad de arcillas y nanoarcillas**

A pesar de las aplicaciones de las nanoarcillas hay poca información con respecto a su toxicidad. En nuestro conocimiento, existen alrededor de sólo 20 publicaciones que tratan este tema en particular. Uno de los principales problemas son las variables que se deben tomar en cuenta, ya que se ha reportado que la toxicidad de los nanomateriales está en función del tamaño y composición química del nanomaterial, además del tipo de celular expuesto (2). También hay puntos en la experimentación que cambian con respecto a las pruebas de otros materiales. Se ha informado que para las pruebas *in vitro*, las proteínas del suero pueden reducir la absorción intracelular de nanoarcillas formando agregados de modo que la concentración de suero puede alterar los ensayos citotóxicos, enmascarando la toxicidad de nanoarcillas, por lo que proponen el uso de una concentración límite de suero (81). Todo esto puede alterar la función normal de las células por lo que los resultados son específicos para las condiciones analizadas y, no ser aplicables a otros sistemas. En otros estudios, se ha informado que la aglomeración de partículas, la interferencia óptica y la contaminación con endotoxina afecta significativamente los ensayos inmunológicos y citotóxicos de nanopartículas (82). Así, lo más importante de recalcar es que los efectos antes descritos dependen de las propiedades del material, así como de los componentes del medio que

interfieren con los ensayos de toxicidad, por lo que los resultados obtenidos son difíciles de interpretar debido principalmente al número de variables y a la falta de homogeneidad.

En lo que respecta a las pruebas inmunológicas de nanofármacos, se ha demostrado que algunas pruebas *in vitro* como hemólisis, activación del complemento, opsonización, fagocitosis y la secreción de citocinas, se encuentran entre las más predictivas, así como la combinación de varios ensayos como la inmunosupresión y la trombogenicidad (83). Sin embargo, se plantea la necesidad de más pruebas *in vitro* e *in vivo* para establecer una correlación entre la inmunotoxicidad, la citotoxicidad y la toxicidad (83). Dentro de los principales inconvenientes en las pruebas inmunológicas, se encuentra la absorción de citocinas por las nanoarcillas. Se ha observado que las nanoarcillas de boemita pueden adsorber TNF- $\alpha$ , por lo que es necesario hacer la corrección de los resultados dependiendo de la cantidad de citocina adsorbida (84). Cabe señalar que en la literatura sólo se encuentra éste reporte, por lo que no hay información sobre la adsorción de otras citocinas por ésta u otras nanoarcillas.

### **Biocompatibilidad de las nanoarcillas**

Como se definió anteriormente, “la biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un biomaterial para realizar una función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar efectos locales o sistémicos indeseables en el receptor o beneficiario de la terapia, pero generando la respuesta celular o tisular más apropiada en esa situación específica y optimizando el rendimiento clínicamente

relevante de la terapia".(5) En este sentido, algunas propiedades físicas y químicas de las nanoarcillas, así como su composición, también han sido relacionadas con la biocompatibilidad. Así por ejemplo, en un sustrato de caucho de silicona propuesto para ingeniería de tejidos y regeneración médica, se observó que al rellenar con nanoarcillas se aumenta el módulo elástico lo que aumenta la biocompatibilidad celular (85). La solubilidad es otra propiedad asociada con la citotoxicidad, en términos de inducción de estrés oxidativo, apoptosis y daño de la membrana, las nanoarcillas aniónicas fácilmente solubles son menos tóxicas que aquellas menos solubles (86). El contenido de metales pesados también se asocia con la citotoxicidad; como las nanoarcillas son en gran medida aluminio-silicatos, la liberación de aluminio en el sistema o la acumulación en diferentes órganos, pueden presentar efectos adversos (87). Esto muestra una dificultad adicional, ya que es necesario garantizar que una nanoarcilla no se descomponga en sus materias primas por condiciones tales como son el calor, la radiación UV, microondas, disolventes o por los efectos mecánicos tales como la fricción.

Un estudio en el que se evaluó el efecto de nanoarcillas de montmorillonita, bentonita, caolinita y erionita sobre células endoteliales de la vena umbilical humana, neuroblastoma N 1 E- 115, y células oligodendrogiales ROC-1, mostró que estas arcillas podrían traspasar la barrera hematoencefálica, y por lo tanto, si el aluminio se libera en el sistema nervioso podría haber consecuencias fatales en un ser vivo (88,89). También se han observado alteraciones morfológicas en el aparato de Golgi de células intestinales humanas (Caco-2) con tratamientos de montmorillonita modificada orgánicamente, esto se ha relacionado con la

liberación de aluminio que provoca estrés oxidativo y podría inhibir la síntesis de proteínas, sin embargo no se observaron daños en ADN (90).

En algunos casos, hay discrepancias que, pueden ser como se describió anteriormente, debido a las características del nanomaterial y los modelos utilizados para evaluar. Por ejemplo, mientras en cultivos primarios de médula ósea de ratón, la nanobentonita y la nanomontmorillonita causan lisis celular, la nanoerionita no tuvo ningún efecto tóxico. De la misma manera la lisis no se produjo con ninguna de las tres nanoarcillas en la línea celular de neuroblastoma NLE-115, (88,89). Además, las diferencias no son exclusivas de modelos celulares, también se observan cuando se comparan los efectos *in vitro* con los efectos *in vivo*. Está reportado que nanopartículas de bentonita con 2% de polímero muestran una alta biocompatibilidad *in vitro* y por ello se ha propuesto su uso para la elaboración de contenedores de material quirúrgico (91), pero cuando las misma nanopartículas de arcilla (bentonita) sin las matrices poliméricas se administran por vía intragástrica en ratas durante 28 días muestran una reducción en el peso del hígado y la actividad de sus enzimas de conjugación, la actividad antagónica sobre la bifidoflora y la hiperproducción de microflora de levaduras (92).

También se han observado diferencias entre modelos animales. Tal es el caso de la adición de calcio y montmorillonita de sodio en alimentos para animales dónde no se observaron efectos adversos (93); mientras que la nanomontmorillonita organofílica aumentó el peso del útero en ratones cuando se administró por vía oral lo que podría estar relacionado con alteraciones en la reproducción (94).

Por otra parte, los nanomateriales polímero-nanoarcilla probados con diferentes propósitos han demostrado alta biocompatibilidad *in vivo*, las evaluaciones de montmorillonita y mica con poliuretano mostraron que son altamente biocompatibles y no causan daño en el medio ambiente, por lo que se proponen para su uso en equipos hospitalarios (95). También, una montmorillonita modificada de quitosano se evaluó para aplicaciones de ingeniería de tejidos y mostró una excelente biocompatibilidad, crecimiento celular y eficacia antibacteriana (41).

Si bien es cierto que las arcillas han sido ampliamente utilizadas y evaluadas, no se debe dejar de tomar en cuenta que las nanoarcillas pueden tener diferentes efectos debido a las modificaciones en sus propiedades. Además, no en todos los casos las arcillas son totalmente inocuas; en una región de la Guinea Francesa mujeres embarazadas con una dieta que incluyó arcillas, en comparación con no embarazadas y los controles que no consumieron arcillas, mostraron niveles más altos de aluminio, lo que puede tener consecuencias clínicas tanto en las mujeres como en los recién nacidos (96). En particular, existe una gran preocupación acerca de la población femenina tanto en humanos como en otros mamíferos, ya que algunas nanopartículas presentan efectos perjudiciales sobre la reproductividad femenina y en el desarrollo fetal. Estos efectos adversos están relacionados con la composición, modificación de la superficie, dosis y vía de exposición de las nanopartículas además de las especies animales expuestas (97,98).

La producción y aplicación de nanoarcillas provocarán el contacto directo tanto de las personas implicadas en la producción como de los consumidores. Es por esto que la toxicidad de las nanoarcillas es muy importante y la comunidad científica constantemente hace un esfuerzo para determinar los efectos adversos. Sin embargo, la literatura nos muestra las dificultades en la determinación de la toxicidad de nanoarcillas. Comenzando porque la toxicidad depende de la composición química y el tamaño del material, así como del modelo utilizado para evaluar el efecto tóxico. En general, el efecto sobre las líneas celulares parece ser menor en comparación con el efecto en el mismo tipo de células pero de cultivo primario, lo que plantea la necesidad de ampliar el uso de este tipo de cultivos y la necesidad de encontrar una posible relación entre los diferentes ensayos.

Las diferencias encontradas entre los mismos tipos de células, así como las discrepancias entre ensayos *in vitro* e *in vivo*, demuestran la necesidad de métodos estandar que permitan un diseño experimental adecuado para la evaluación de la toxicidad de nanoarcillas con el objetivo de evitar posibles efectos adversos.

### **Modelos utilizados para evaluar nanotoxicidad**

Existe un esfuerzo constante de la comunidad científica para aportar conocimiento con respecto a la nanotoxicología. Es por esto que se han evaluado diferentes nanopartículas utilizando diferentes métodos. Entre los métodos más destacados se encuentran: los predictivos, las evaluaciones *in vitro* y las evaluaciones *in vivo*.

Dentro de los métodos predictivos, uno de los más estudiados es el estudio teórico de la relación cuantitativa estructura actividad (QSAR), este método relaciona la estructura química de una sustancia con su actividad biológica o su reactividad química y puede ser muy útil para predecir la citotoxicidad de nanopartículas (99-102). Uno de los mayores inconvenientes que presenta el QSAR es que el cálculo se basa en datos ya reportados, de tal manera que es necesario tener conocimiento previo sobre la actividad biológica de la nanopartícula o conocer completamente sus propiedades físico-químicas. También se han utilizado modelos *in vitro*, tienen la ventaja de ser más económicos y fáciles de manejar; sin embargo, son múltiples y variados y no en todos los casos se encuentran buenas correlaciones con los ensayos *in vivo*. Entre los modelos empleados se encuentran las líneas celulares: HEK 293 de riñón de embrión humano, A549 de cáncer pulmonar, L929 de fibroblastos murinos, MCF-7 de cáncer de mama, HaCaT de queratinocitos de piel humana, MSTO-211H de células de pulmón humano, A3 de linfocitos T4, entre otras (103-106). Como cultivos primarios se han utilizado: células endoteliales humanas, células madre mesenquimales de la médula ósea humana, células de sangre humana, osteoblastos humanos, hepatocitos de rata, entre otros (107,108). En general se aplican estos modelos dependiendo del uso que se propone para la nanopartícula. Las líneas celulares suelen verse menos afectadas que los cultivos primarios, lo que plantea la dificultad en la elección del modelo para una óptima evaluación de la citotoxicidad. En cuanto a los modelos *in vivo* se suelen usar: ratones de la cepa C57BL/6 (108,109), peces *Pimephales promelas* (110), ratas Wistar (111), anemonas

*Nematostella vectensis* (112), embriones de pez cebra (113) y moscas *Drosophila* (114). De todos ellos, los ratones son por mucho el modelo animal más socorrido, debido a su fácil manipulación, alta tasa de reproducción, bajos costos de mantenimiento, y sobre todo, a la gran diversidad de reactivos disponibles para evaluar los efectos de la administración de las nanopartículas. Dentro de los diversos ratones, la colonia CD1 es uno de los modelos más idóneos para evaluar toxicidad, debido precisamente a que no corresponde a una cepa, sino a una colonia, por lo que existe variabilidad genética; esto es importante porque los ensayos de toxicidad sobre estos ratones representan mejor los posibles efectos en una población (115,116).

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas es la falta de correlación que se observa en algunas ocasiones entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*, por lo que se ha propuesto el uso de *Caenorhabditis elegans* que se ha utilizado desde hace varias décadas como modelo para estudios genéticos (117). Dentro de las células de mamífero más utilizadas en ensayos de toxicidad y que ha demostrado buena correlación con los ensayos *in vivo* se encuentran los macrófagos, células esenciales en la respuesta inmune que se especializan en la eliminación de cuerpos extraños por su amplia capacidad fagocítica y potencial lítico (118,119). En este sentido, últimamente en nuestro grupo de trabajo se ha propuesto el uso de trofozoítos de *E. histolytica*, parásito protozoario causante de la amibiasis intestinal en humanos, por ser un modelo altamente fagocítico y lítico que facilita la incorporación de la nanopartícula o sus aglomeradas y que además ha mostrado una buena correlación entre los ensayos *in vitro* e *in vivo* (120-121).

Tomando en cuenta las propiedades de éstos dos últimos modelos, el uso de ambos podría llevar a resultados más concluyentes sobre la citotoxicidad de un nanomaterial.

Con base en lo anterior, podemos decir que la producción de nanoarcillas expondrá a los trabajadores principalmente por las vías aérea, oral y cutánea. Posteriormente por sus aplicaciones en ingeniería de tejidos y medicina reconstuctiva serán los consumidores los que estén expuestos a las nanoarcillas. Es por esto que en esta tesis se planteó la evaluación de la toxicidad de nanoarcillas de uso comercial (nanoclinoptilolita y nanosepiolita) en modelos altamente fagocíticos (amibas y macrófagos) con el fin de analizar la respuesta celular. Así como la evaluación *in vivo* en ratones CD1 administrados con nanoarcillas por las posibles vías de exposición de trabajadores y consumidores, con el fin de evaluar la toxicidad de las nanoarcillas en seres vivos.

## **Relevancia e impacto en el área de estudio**

La nanotoxicología es una ciencia emergente que propone la evaluación toxicológica de todas las partículas que tengan por lo menos una dimensión menor a los 100nm. A pesar de la importancia de este tipo de estudios, no hay muchos reportes al respecto debido a la falta de regulación a nivel mundial para la evaluación de la toxicidad de nanopartículas, por lo que las implicaciones del uso de las nanopartículas a mediano y largo plazo se desconocen. Entre las nanopartículas con aplicaciones biomédicas se encuentran las nanoarcillas, de las cuales se piensa que pueden ser inocuas con base en lo que se conoce de su versión macrométrica. Sin embargo, ya que las propiedades físico-químicas de las nanopartículas son diferentes a su versión macro, es imposible predecir el efecto que puedan tener sobre los sistemas biológicos sin que se lleven a cabo estudios detallados de biocompatibilidad en diferentes sistemas. Por lo anterior, consideramos que es de vital importancia evaluar los efectos tóxicos de dos de las nanoarcillas de mayor uso comercial, tanto *in vitro* como *in vivo*, antes de pensar en las potenciales aplicaciones en diversas industrias.

## **Hipótesis**

Las nanoarcillas pueden presentar citotoxicidad en cultivos de amibas y macrófagos así como toxicidad en ratones CD1 debido al cambio en sus propiedades físico-químicas.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar la toxicidad de nanopartículas de clinoptilolita y sepiolita *in vitro* usando células altamente fagocíticas, e *in vivo* usando ratones CD1.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar el efecto de nanopartículas de clinoptilolita y sepiolita en cultivos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1:IMSS
- Evaluar el efecto sobre la viabilidad de cultivos de macrófagos de línea celular y de cultivo primario de humano y ratón tratados con nanopartículas de clinoptilolita y sepiolita
- Determinar la expresión de citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y reguladoras en sobrenadantes de cultivos primarios de macrófagos de sangre periférica humana y de médula ósea de ratón tratados con las nanoarcillas.
- Evaluar el efecto sobre la funcionalidad hepática y renal así como la acumulación en hígado, riñón y pulmón por administración cutánea, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intragástrica y aérea de nanopartículas de clinoptilolita y sepiolita en ratones CD1.
- Evaluar el efecto de la exposición durante 8 meses a nanopartículas de clinoptilolita y sepiolita en tres generaciones de ratones CD1.

## **Materiales y Métodos**

Con el fin de evaluar la biocompatibilidad de nanoarcillas de uso comercial, se realizaron evaluaciones de toxicidad *in vitro* e *in vivo* con nanoclinoptilolita y nanosepiolita. La nanoclinoptilolita (VALFOR-100) fue donada por Silicatos y Derivados S.A. de C.V. México, la nanosepiolita (polvo de sepiolita) y el talco (talco, 86257, Sigma Aldrich, México, probado según PhEur.) se compraron de Sigma-Aldrich, E.U.A.

### **Caracterización de nanoclinoptilolita y nanosepiolita**

El análisis se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM. El análisis consistió en la determinación de la estructura química de las nanoarcillas mediante difracción de rayos X de polvos, en un difractómetro Bruker modelo D8 Advance, con ánodo de cobre ( $K\alpha_1 = 0,154060$  nm). La composición química se determinó utilizando un ICP-MS, Bruker Aurora M90, y se analizó el porcentaje de Si, Al, Fe, Ca, Mg, Ti, P, Mn, Na, K, y S. Esta composición se confirmó por un micro análisis semi cuantitativo. Finalmente, para conocer la forma y tamaño de las partículas, las muestras se observaron por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) después de ser suspendidas en los medios de cultivo que se utilizaron en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

### **Preparación de soluciones stock de nanoarcillas y talco**

La nanoclinoptilolita, nano sepiolita y el talco se suspendieron por sonicación en los medios de cultivo. Para tal efecto 1.0 g de cada material se suspendió en 1 ml de medio y a continuación se sonicó utilizando 4 ciclos de 15 s con un sonicador de punta Branson Sonifier con una amplitud de 50% y una frecuencia de 130 kHz. Este procedimiento previene la formación de agregados sin afectar el tamaño de las partículas (confirmado por microscopía electrónica). Para los cultivos amibianos se utilizaron suspensiones de nano arcillas y talco en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero de bovino adulto; para los ensayos con macrófagos los materiales se suspendieron en medio DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino.

### **Cultivo de trofozoitos de *E. histolytica* HM1-IMSS y tratamiento con nanoarcillas**

Un cultivo axénico de trofozoitos se mantuvo a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino al 10%, 3% de vitaminas (Diamond vitamina Tween 80 40x de soluciones, Sigma Aldrich, E.U.A.), y 0,1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina 10000 U / ml, GIBCO, E.U.A.). Al cabo de 72 h de incubación cuando los cultivos de amibas alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, los tubos fueron colocados en hielo por 5 min para que las amibas se desprendan de las paredes y contados usando una cámara de Neubauer. A continuación, en tubos de 3 ml se sembraron  $1 \times 10^5$  amibas/ml e inmediatamente

se añadió la cantidad necesaria de la solución stock de cada nanoarcilla y del talco para alcanzar las concentraciones de 10, 100, 500, y 1000 mg/ml. Un tubo de cultivo sin el tratamiento con nanoarcillas fue usado como control de crecimiento. En todos los cultivos, el volumen fue aforado a 3ml con medio TYI-S-33 suplementado.

### **Viabilidad amibiana.**

La viabilidad y la morfología de los trofozoítos amibianos se evaluó a 24, 48 y 72 h de incubación con las nanoarcillas empleando dos métodos diferentes:

- (1) el marcador de exclusión vital azul de tripano, para evaluar la viabilidad;
- (2) el diacetato de carboxifluoresceína (CFDA kit vibrante, Invitrogen, E.U.A.), además de yoduro de propidio para evaluar la viabilidad y morfología.

Los tubos de cultivo amibiano se incubaron en hielo durante 5 min para desprender los parásitos, se tomaron alícuotas de 100µl de cultivo y se marcaron con 1µl de azul tripano 0,4% (5 min a temperatura ambiente) o 1µl de CFDA 5 mM con 1µl de yoduro de propidio 1.5 mM (15 min a temperatura ambiente). Las células se contaron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 en una cámara de Neubauer. Se realizaron seis experimentos independientes cada uno por triplicado.

### **Cultivo de macrófagos.**

Se cultivaron 3 diferentes tipos de macrófagos: i) macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana, ii) macrófagos derivados de monocitos de médula ósea de ratones CD1, y iii) macrófagos de la línea celular RAW 264.7.

i) A partir de 10 muestras de sangre de diferentes individuos sanos, se aislaron células mononucleares utilizando un gradiente de Ficoll Histopaque (GE Healthcare, E.U.A). Brevemente, se diluyen 15 ml de sangre periférica humana con anticoagulante en 15 ml de PBS, posteriormente se colocan sobre 10 ml de Ficoll. Se centrifuga el tubo a 400 g por 20 min, procedimiento que genera cuatro estratos en el tubo y con una micropipeta se retira el tercer estrato de abajo hacia arriba que es el que contiene las células mononucleares. Las células aisladas se lavan 3 veces resuspendiendo en 5 ml de PBS y centrifugando a 100 g por 10 min. Se sembraron  $1 \times 10^5$  células/ml RPMI 1640 suplementado con 10% de suero autólogo, 1% gentamicina, y 1% de 2-mercaptoetanol, en cajas de cultivo de 50 ml con recubrimiento para células adherentes. Después de 2h de incubación a 37°C/ y 5% de CO<sub>2</sub>, las células no adherentes fueron removidas lavando 2 veces con PBS. Los monocitos se dejaron madurar durante 6 días realizando cambios de medio cada 48h. Una vez diferenciados a macrófagos, se colocan las células durante 10 min sobre hielo para desprenderlas, se toman alícuotas de 10 µl que se tiñen con azul tripano para asegurar la viabilidad y conocer el número de células. Para confirmar la diferenciación de monocitos a macrófagos se utilizó el anticuerpo específico F4/80 marcado con fluorescencia y se analizaron alícuotas de  $1 \times 10^6$  células por citometría de flujo.

ii) Para la obtención de los macrófagos derivados de monocitos de médula ósea de ratón, se sacrificaron ratones CD1 machos, de 4 semanas de edad y se retiró el fémur y la tibia. Los huesos fueron tratados durante 3 min con etanol absoluto y posteriormente se lavaron con medio RPMI 1640 no suplementado. La médula ósea fue retirada cortando a la altura de la metáfisis los huesos e inyectando medio de cultivo con una aguja de insulina a través de la diáfisis hasta extraer la totalidad de la médula ósea; las células se lavaron dos veces con el mismo medio y después se lisaron los eritrocitos utilizando 1 ml de PBS 10X restituyendo de inmediato la osmolaridad agregando 9 ml de agua destilada estéril. Las células blancas se lavaron 3 veces con PBS, se suspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero autólogo, 1% gentamicina, y 1% de 2-mercaptoetanol, se sembraron  $1 \times 10^5$  células en cajas de Petri con 10ml de medio y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó el cambio de medio cada 48h durante 5 días para la diferenciación de monocitos a macrófagos. Para confirmar la diferenciación de monocitos a macrófagos se utilizó el anticuerpo específico F4/80 marcado con fluorescencia y se analizaron alícuotas de  $1 \times 10^6$  células por citometría de flujo.

iii) La línea celular RAW 264.7 se cultivó en medio RPMI 1640, suplementado como se describió anteriormente, y se mantuvo bajo las mismas condiciones.

## **Tratamiento de macrófagos con nanoarcillas y ensayos de viabilidad**

El efecto de las nanoarcillas y el talco se determinó en los tres tipos de macrófagos. Para cada experimento, se colocaron  $1 \times 10^5$  macrófagos por pozo en cajas de 96 pozos en medio RPMI 1640 suplementado, a los cuales se les añadió con suspensión de cada material para tener concentraciones de 10, 100, 500, y 1,000 mg/ml. A continuación, se añadió medio RPMI 1640 suplementado hasta alcanzar 100 $\mu$ l de volumen final en cada pocillo.

Los cultivos de macrófagos de médula ósea de ratón y los de la línea celular RAW 264.7 fueron incubados con los diferentes materiales durante 60 h, mientras que los macrófagos humanos sólo se incubaron durante 48 h. En ambos casos, cada 12 h se tomó una alícuota para su evaluación. Se realizaron tres experimentos independientes cada uno por triplicado. En cada caso se valuó la viabilidad, apoptosis y necrosis de las células.

### **Viabilidad, apoptosis y necrosis**

Alícuotas de 100 $\mu$ l fueron evaluadas cada 12 h para la determinación de viabilidad, apoptosis y necrosis celular utilizando el kit de detección Anexina V-FITC (BD Pharmingen, E.U.A.) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, cada 12 h durante un máximo de 60 h, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se almacenó a -20°C para posteriormente analizar las citocinas secretadas. Los pozos se rellenaron con PBS, se añadieron los marcadores

Anexina V y Ioduro de propidio y después de 15 min de incubación a 37°C, las células se centrifugaron, lavaron y fijaron con 50µl de una solución de p-formaldehído 3,7% para ser leídas en un citómetro de flujo FACS Canto (Becton Dickinson, E.U.A.).

### **Determinación de citocinas Th1, Th2, y Treg**

Se determinó el patrón de secreción de citocinas de los macrófagos tratados con nanoclinoptilolita, nanosepiolita y talco, utilizando el medio de cultivo retirado a las 24, 36 y 48 h. Se midió la expresión de GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17 y TNF- $\alpha$  usando los kit Th1/Th2 10 plex Flow Cytomix Multiplex (eBioscience, E.U.A.) para ratón y para humano, en macrófagos derivados de monocitos de médula ósea de ratón y en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana, respectivamente, de acuerdo con el protocolo del proveedor. Brevemente, los sobrenadantes de medio de cultivo se tratan durante 15 min con las perlas del kit. Las perlas están recubiertas con anticuerpos lo que genera una unión específica a las citocinas, y posteriormente se agrega un segundo anticuerpo biotinilado que se une a las citocinas. Finalmente, se añade estreptavidina-PE que se une a la biotina y emite la señal fluorescente. Se determinan las diferentes citocinas ya que las perlas emiten una intensidad de fluorescencia específica según el anticuerpo que tienen. Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo FACS Canto. Los datos fueron analizados utilizando el software Flow Cytomix Pro de Bender MedSystems.

## **Microscopía Electrónica de Transmisión**

Un cultivo de amibas y uno de macrófagos, tratados con las concentraciones más altas de cada nanoarcilla, se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min y se lavaron 3 veces con PBS; después las células se fijaron con formaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% toda la noche. Entonces, las células se trataron 3 veces durante 15 min con 8% de sacarosa y se fijaron con 1% de OsO<sub>4</sub>. La deshidratación se realizó con soluciones de etanol al 50, 70, 95 y 100% y óxido de propileno al 100%. La infiltración se realizó con resina LR White (Ted Pella Inc., E.U.A.). Finalmente, las muestras se pusieron en cápsulas de gelatina y se mantuvieron en el horno a 60°C durante 48h. Los cortes ultrafinos de 0.5 micras se recogieron en rejillas Formvar/Carbon de 200 mallas y en rejillas de níquel. Se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

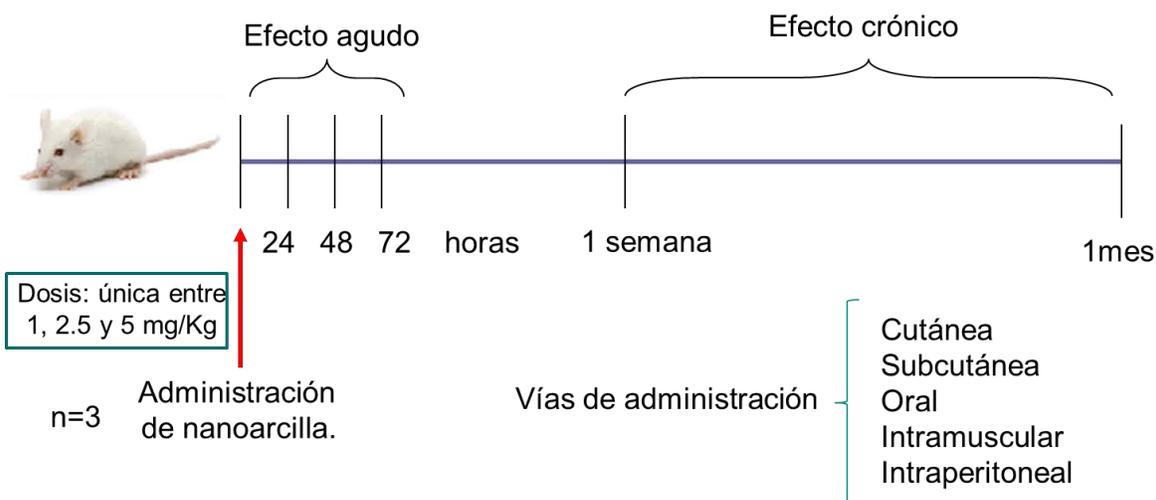
## **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías ( $P < 0,05$ ), seguido de una prueba post hoc de Tuckey ( $P < 0,05$ ) (Microsoft Excel 2010).

## **Tratamiento de ratones con nanoarcillas**

Se utilizaron ratones CD1 de 4 semanas de edad, machos, mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo condiciones estériles con agua y comida *at libitum*. Todos los procedimientos a lo que se sometieron los ratones fueron aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio (CICUAL).

En general, los animales fueron tratados al mismo tiempo por vías cutánea, subcutánea, oral, intramuscular e intraperitoneal con las nanoarcillas siguiendo el siguiente esquema:



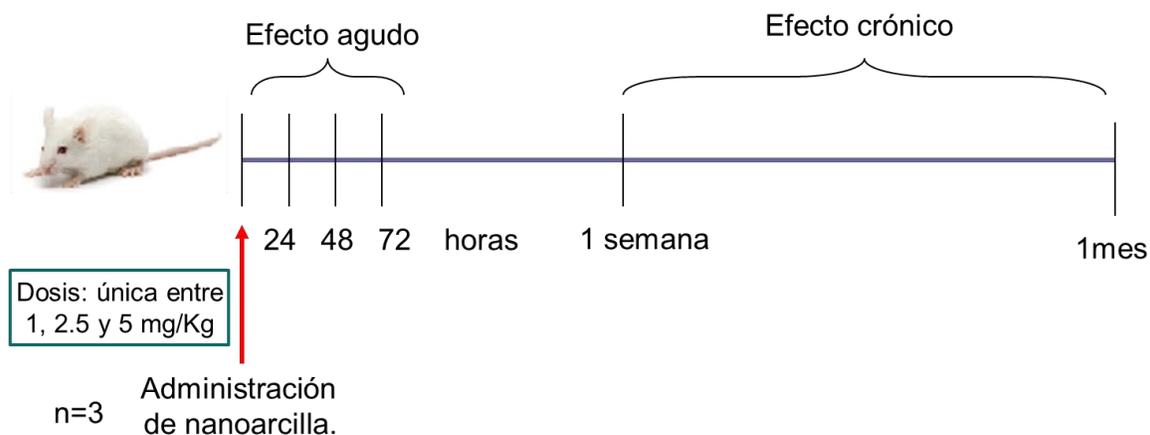
**Figura 2.** Esquema de administración simultanea por varias vías de administración a ratones CD1 con las nanoarcillas y el talco, y los diferentes tiempos a los que fue evaluado el efecto.

El Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico S.A. de C.V. productor de nanoarcillas estimó que los trabajadores de la planta estaban expuestos a 200mg/Kg en una semana de trabajo. Considerando un individuo promedio de 70Kg corresponde a 2.85mg/kg por lo que se administraron 1, 2.5, y 5 mg/Kg de peso de cada una de las nanoarcillas evaluadas de manera independiente, por cada una de las vías en el mismo ratón. A cada tiempo de evaluación (24, 48, 72 h, 1 semana y 1 mes) se obtuvo sangre total de la cola de los ratones y se sacrificaron 3 animales para cada dosis en una cámara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se recolectó el tejido asociado al sitio de administración, una porción de piel

(administración cutánea y subcutánea), músculo (administración intramuscular), peritoneo (administración intraperitoneal), además de los estómagos (administración intragástrica), hígados y riñones (para analizar una posible acumulación de nanarcillas). Las muestras fueron enviadas a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para el análisis histológico. En todos los casos un lóbulo del hígado y un riñón se utilizaron para analizar la concentración de aluminio.

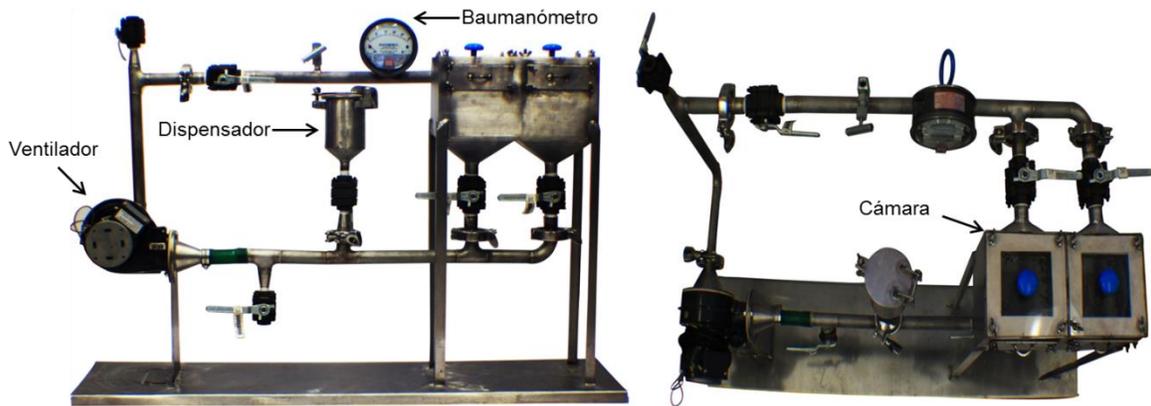
### Administración aérea

En otro ensayo independiente, se realizó la administración aérea de cada nanoarcilla siguiendo el siguiente esquema:



**Figura 3.** Esquema de administración por vía aérea a ratones CD1 de las nanoarcillas y el talco, y los diferentes tiempos a los que fue evaluado el efecto.

En este caso, se diseñó una cámara de dispersión de polvos (Figura 4) de tal manera que cada ratón recibiera una dosis conocida de nanoarcilla vía aérea. Se utilizaron dosis de 1, 2.5 y 5 mg/Kg de peso.



**Figura 4. Fotografía de la cámara de dispersión.** Cámara de dispersión diseñada para administrar por vía aérea las nanoarcillas a los ratones CD1.

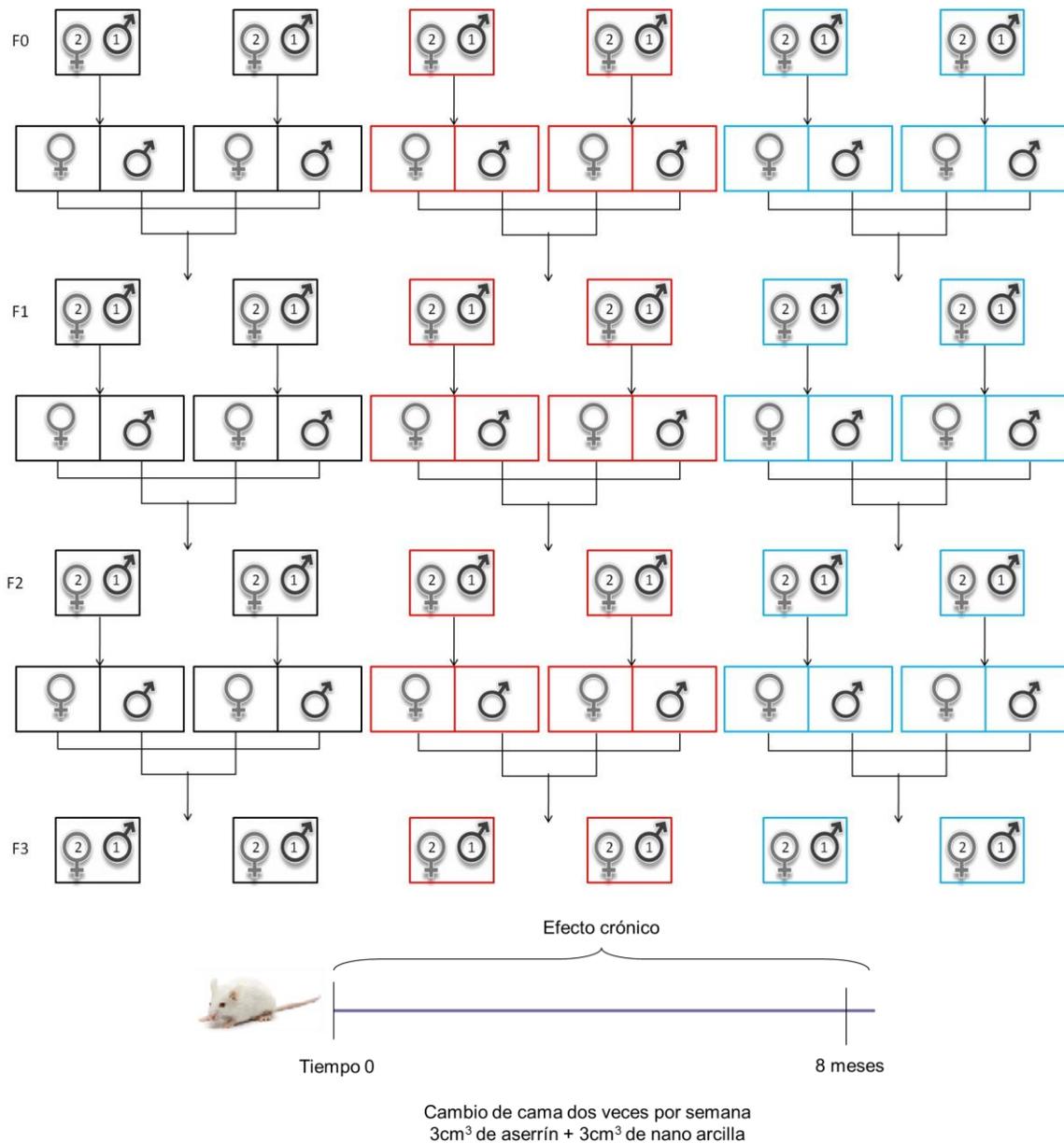
En cada una de las cámaras señaladas en la figura, se coloca un ratón CD1 de 4 semanas de edad, macho. En el dispensador se pone la cantidad a evaluar de nanoarcilla y se enciende el ventilador controlando que la presión en el sistema sea siempre la misma (10 mmHg). Después de 5 min se retiran los ratones, se lava el sistema y se repite la operación para los siguientes ratones.

Se recolectaron las mismas muestras y se sacrificaron el mismo número de animales en cámara de CO<sub>2</sub> como en el caso de los animales que recibieron el tratamiento por las múltiples vías de administración.

Para ambos estudios, las muestras de suero derivado de la sangre y las del tejido asociado al sitio de administración fueron enviados a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. En la muestra de suero se evaluó la funcionalidad hepática y renal determinando urea, AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanino aminotransferasa), creatinina, proteínas totales y bilirrubinas. Los hígados y riñones fueron enviados a la USAI, Facultad de Química, UNAM, para la determinación de la acumulación de Aluminio por absorción atómica.

### **Exposición crónica a nanoarcillas de ratones a lo largo de 3 generaciones**

Se utilizaron ratones CD1 machos y hembras de 4 semanas de edad, mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo condiciones estériles, con agua y comida *at libitum*. Se siguió el siguiente esquema de experimentación.



**Figura 5. Diagrama de evaluación del efecto a la exposición durante 8 meses.**

Diagrama que representa las diferentes generaciones de ratones y las cruces realizadas. En negro se representan las cajas de ratones sin tratamiento utilizadas como control; en rojo las de los animales tratados con nanoclinoptilolita y en azul las de los animales con nanosepiolita. El esquema en la parte inferior muestra como se realizó el tratamiento de las diferentes generaciones.

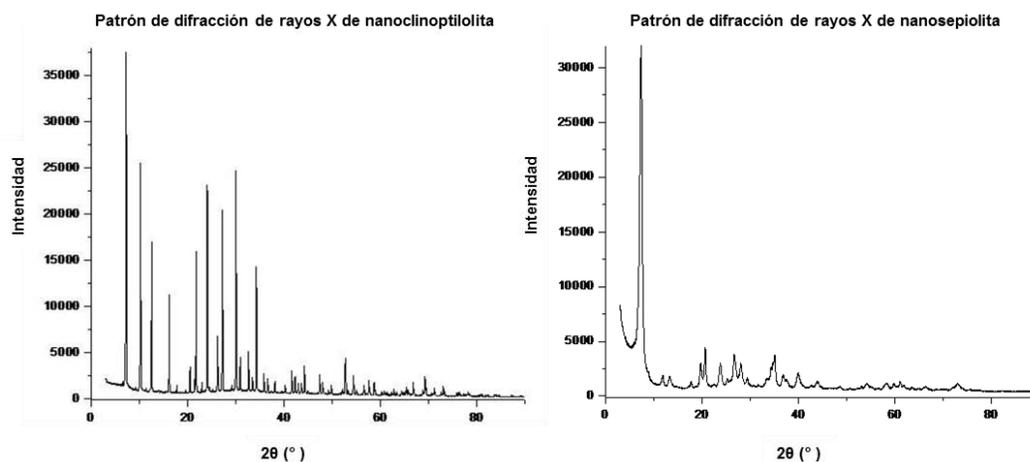
En este caso, se se colocaron 2 hembras y 2 machos por caja y se realizaron las cruzas entre los ratones nacidos en las diferentes generaciones hasta alcanzar 3 generaciones expuestas desde el nacimiento a las nanoarcillas (Figura 5). La exposición crónica al material se realizó agregando cada una de las nanoarcillas por separado como material de cama en una proporción 1:1 (3 cm<sup>3</sup> de aserrín con 3 cm<sup>3</sup> de nanoarcilla). Los ratones se mantuvieron así durante 8 meses bajo las mismas condiciones, realizando el cambio de cama 2 veces por semana.

Se determinó la temperatura y el peso corporal de todos los animales una vez por semana durante los 8 meses del experimento. Al término del mismo, los animales fueron sacrificados y enviados a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM para la realización de estudios histopatológicos. La concentración de aluminio en riñón, hígado y pulmón se determinó por absorción atómica, en la USAI, Facultad de Química, UNAM.

## Resultados

### Caracterización de nanoclinoptilolita y nanosepiolita

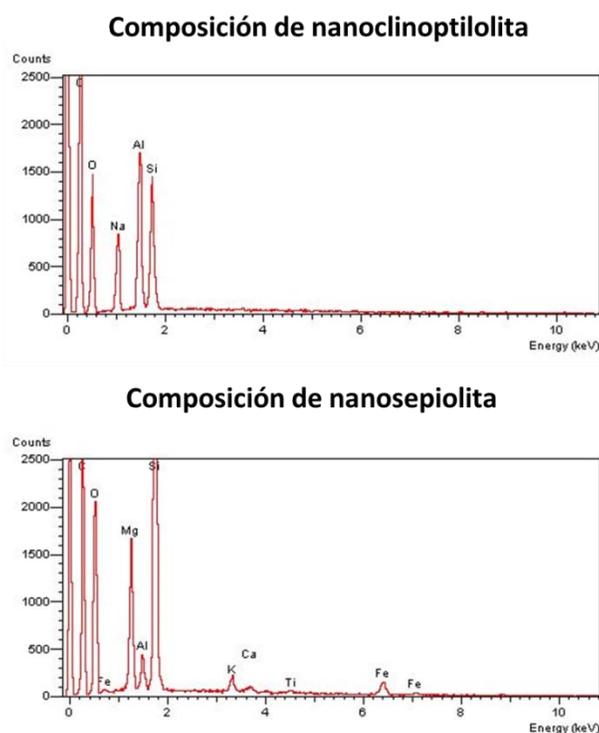
La difracción de rayos X de polvos de las nanoarcillas evaluadas, muestra una distribución típica de planos de difracción asociados con las zeolitas sepiolita y clinoptilolita. El patrón de difracción de la nanosepiolita muestra una correspondencia perfecta con el modelo obtenido en la base de datos PDF-2 del ICCD (Centro Internacional de datos de difracción) y el patrón de la nanoclinoptilolita corresponde a Nickel Ammonium Aluminium Silicon Hydroxide Oxide Hydrate (Ni-Clinoptilolita) (Figura 6).



**Figura 6. Patrón de difracción de rayos X de polvos.** Se muestran los patrones de difracción obtenidos de las muestras de nanoclinoptilolita y nanosepiolita.

El análisis de la composición química de las nanoarcillas determinado mediante la espectroscopia de absorción atómica, mostró para nanoclinoptilolita: 21.7%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 0.0078%  $\text{MgO}$ , 57.3%  $\text{SiO}_2$ , 9.2%  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 1.4%  $\text{CaO}$ , 1%  $\text{TiO}_2$  y 0.01%  $\text{MnO}$ ; para

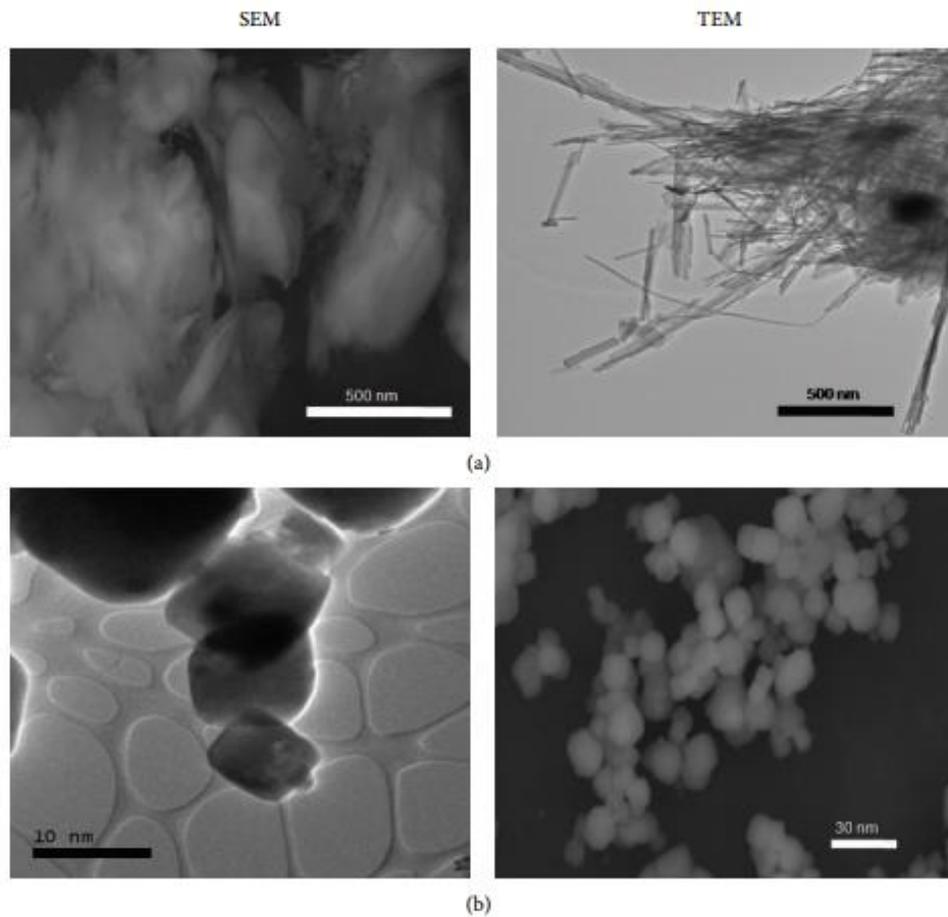
nanosepiolita: 2.16% Na<sub>2</sub>O, 27.79% MgO, 37.15% SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 12.01%, 3.72 % K<sub>2</sub>O, CaO 3.92%, 3.60% TiO<sub>2</sub> y 7.22% MnO. También, a partir de las microscopías de barrido (SEM) de ambas muestras se realizó el microanálisis de elementos metálicos y de carbono (Figura 7). Estos resultados confirman que las nanoarcillas corresponden a nanoclinoptilolita y nanosepiolita respectivamente.



**Figura 7. Microanálisis de composición de nanoarcillas.** Composición de nanoclinoptilolita y nanosepiolita obtenida por microanálisis de las microscopías electrónicas de barrido.

Por otra parte, la comprobación del tamaño nanométrico de las partículas se determinó por SEM y TEM de las muestras. Se observó que el 80% de las

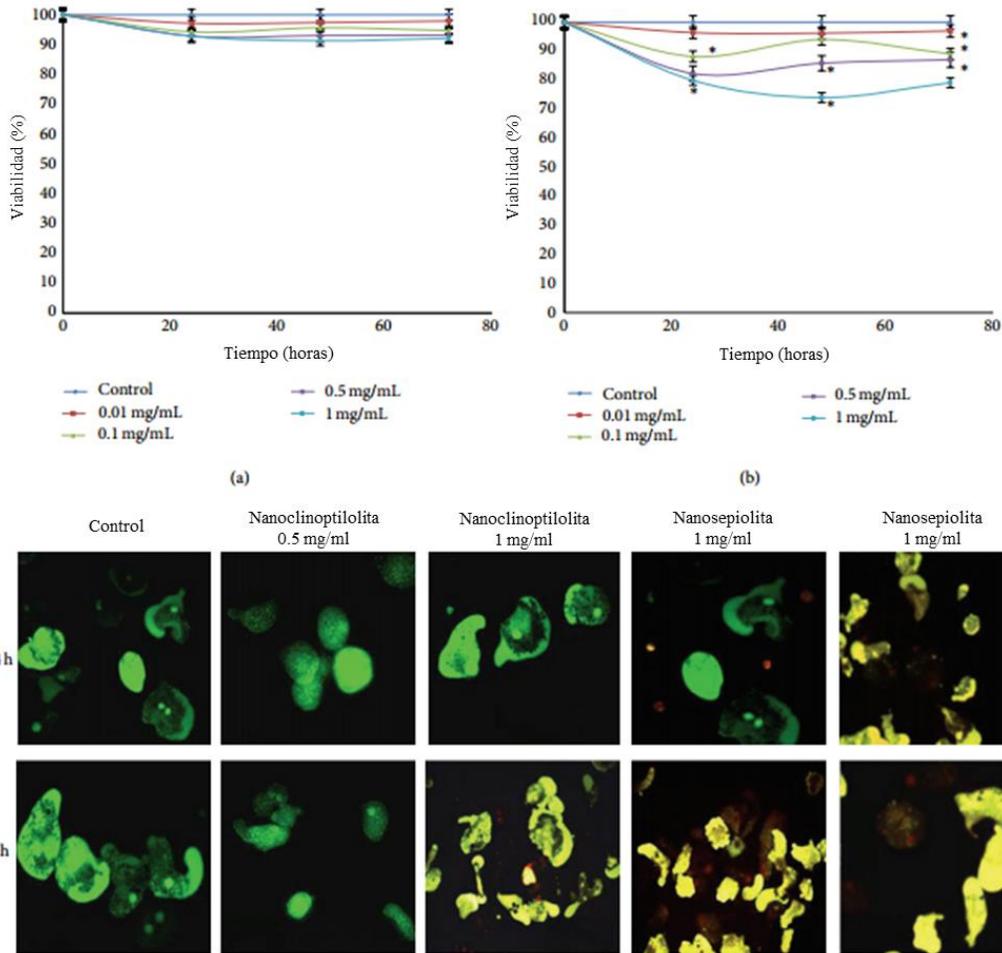
nanopartículas de clinoptilolita tenían un tamaño de menos de 30 nm, siendo el tamaño promedio de partícula de 17,5 nm. En la muestra de nanosepiolita, el 70% de las nanopartículas mostró un diámetro de hasta 20 nm, y una longitud de hasta 500nm dado que es un material fibroso (Figura 8).



**Figura 8.** Microscopías electrónicas de barrido y de transmisión de las muestras de nanoarcillas. Las fibras de nanosepiolita tienen un diámetro inferior a los 20nm (a), mientras que la nanoclinoptilolita son octaedros deformados de menos de 30nm de diámetro.

### **Efecto de la nanoclinoptilolita y nanosepiolita en cultivos de *Entamoeba histolytica***

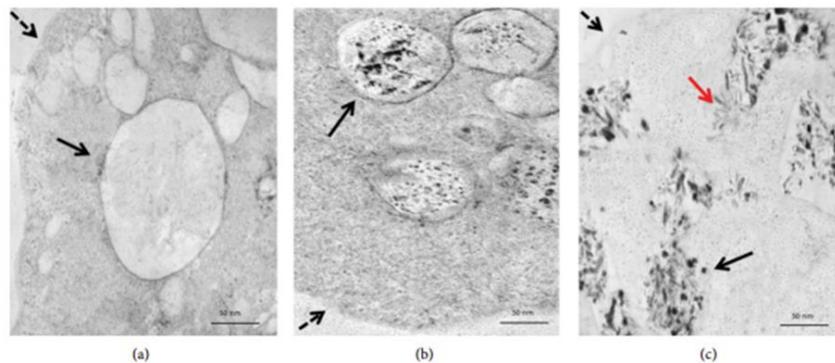
La viabilidad y el crecimiento de los trofozoítos de *E. histolytica* fueron afectados de diferente manera por las nanoarcillas. Cuando los trofozoítos se incubaron con nanoclinoptilolita, ni la viabilidad, ni el crecimiento se vieron afectados de manera significativa a ninguno de los tiempos ni concentraciones evaluados (Figura 9A). Además, bajo microscopía de fluorescencia, se confirmó la integridad de los trofozoítos con la tinción fluorescente de CFDA más ioduro de propidio. Sin embargo, el tratamiento con nanosepiolita afectó entre 13 y 21% la viabilidad de los trofozoitos a las 72 h de incubación con concentraciones superiores a 100µg/ml de manera dosis dependiente ( $p < 0,05$  respecto a los cultivos no tratados). Se observó una ligera recuperación de la viabilidad amibiana a las 48 h para los cultivos tratados con 100 y 500 µg/ml; lo que también se observó pero menos pronunciado a las 72 h para cultivos tratados con 1,000 µg/ml (Figura 9B). La tinción con CFDA más ioduro de propidio mostró que la viabilidad de las amibas disminuye a lo largo del tiempo de una manera dosis dependiente; los núcleos rojos muestran las células muertas (ioduro de propidio positivas) (Figura 9, fotos).



**Figura 9. Viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica* después del tratamiento con nanoarcillas.** En los cultivos tratados con nanoclinoptilolita(A) o nanosepiolita (B) por los periodos de tiempo indicados, se determinó la viabilidad amibiana por la tinción con azul tripano. Las fotografías de la parte baja de la figura, muestran los trofozoítos teñidos con CFDA/IP después de los tratamientos a los tiempos y concentraciones indicados. Los núcleos rojos representan las amibas muertas.

Con la finalidad de demostrar la incorporación y la localización de las nanoarcillas en los trofozoítos amibianos, se realizaron microscopías electrónicas de transmisión de las amibas de cultivos tratados durante 24 h con 100  $\mu$ g/ml de cada

nanoarcilla de manera independiente. La nanoclinoptilolita se encontró principalmente dispersa en el citosol y como agregados dentro de las vacuolas amibianas (Figura 10b), mientras que las partículas de nanosepiolita se encontraron principalmente en forma de agregados dentro de grandes vacuolas y en algunos casos, parecen causar la ruptura de la membrana vacuolar (Figura 10c, flecha roja).

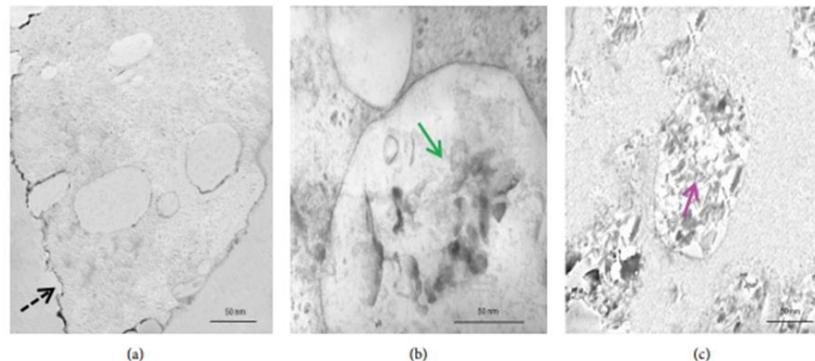


**Figura 10. Microscopías electrónicas de transmisión de amibas tratadas con nanoarcillas.** Amibas control, sin tratamiento (a); amibas tratadas con nanoclinoptilolita (b); amibas tratadas con nanosepiolita (c). Las flechas negras señalan las membranas vacuolares, las flechas punteadas las membranas citosólicas y la flecha roja muestra la posible ruptura de la membrana vacuolar por nanoarcillas de sepiolita.

### **Efecto de la nanoclinoptilolita y nanosepiolita en cultivos de macrófagos**

Se realizaron microscopías de transmisión para evaluar la localización de las nanopartículas en macrófagos de sangre periférica humana tratados durante 24 h con 100  $\mu\text{g/ml}$ . La nanoclinoptilolita se observó en una vacuola fagocítica más grande comparada con las vacuolas observadas en las amibas tratadas con la misma nanoarcilla, (Figura 11b, flecha verde), mientras que la nanosepiolita se

observó al interior de abundantes vacuolas fagocíticas de tamaño entre mediano y pequeño (Figura 11c, flecha rosa).



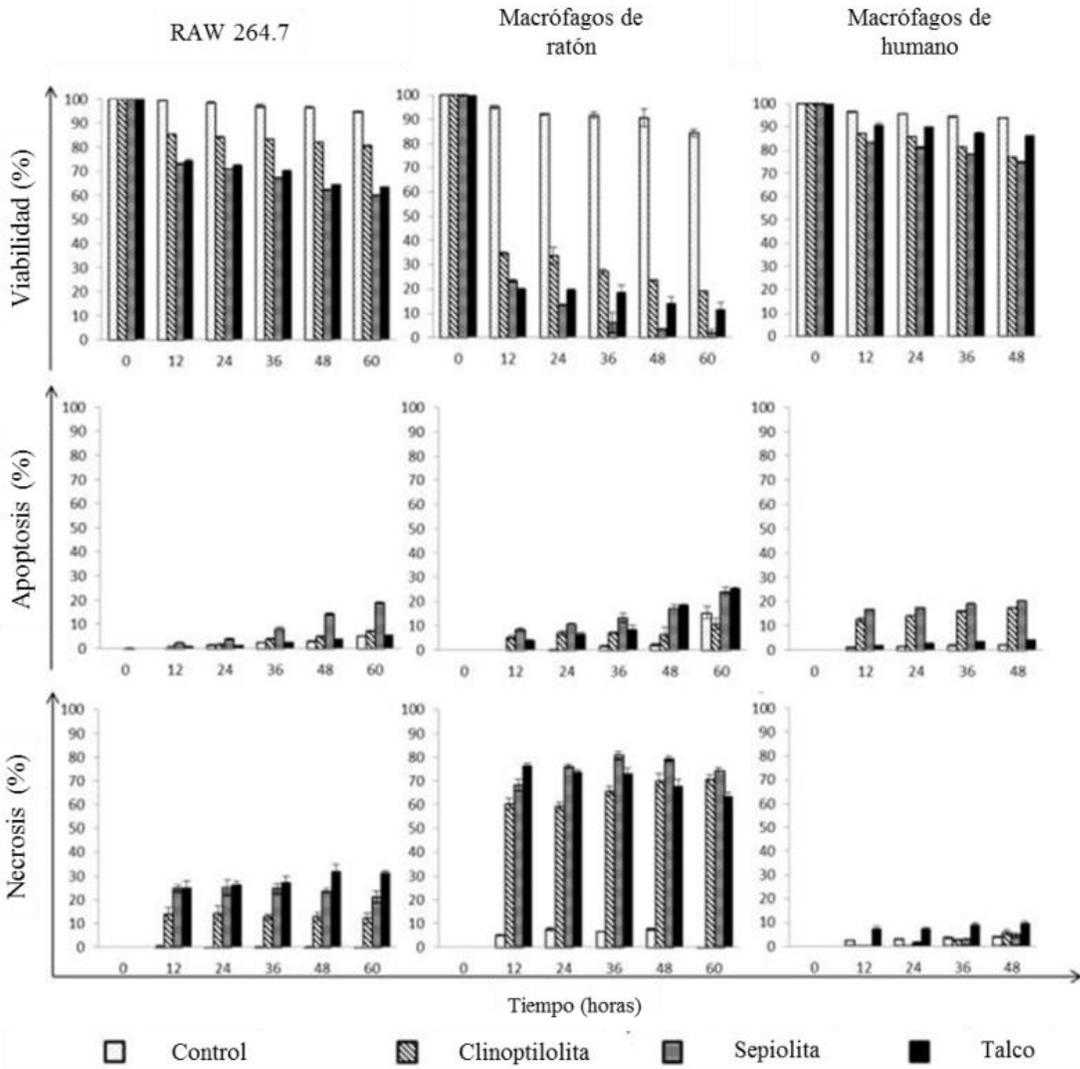
**Figura 11. TEM de macrófagos de sangre periférica humana tratados con nanoarcillas.** Macrófagos sin tratamiento (a), macrófagos tratados con nanoclinoptilolita (b); macrófagos tratados con nanosepiolita (c). La flecha punteada señala la membrana citosólica, la fleche verde la acumulación de nanoclinoptilolita y la fleche rosa la acumulación de nanosepiolita.

La viabilidad de los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 tratados con la concentración más alta de cada una de las nanoarcillas (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) disminuyó un 15% a las 24 h, alcanzando un 20% a 60 h, cuando se trataron con nanoclinoptilolita; mientras que la nanosepiolita y el talco afectaron la viabilidad en un 25% a las 24 h y alrededor del 40% a 60 h (Figura 12; paneles superiores).

Los macrófagos de sangre periférica humana mostraron un patrón similar, pero fueron menos afectados; en este caso, la concentración más alta (1000 µg/ml) de nanoclinoptilolita y nanosepiolita afectó la viabilidad en alrededor de 25% y el talco solo 14% a 60 h.

En contraposición, se observó un efecto dramático en la viabilidad de los macrófagos de cultivo primario de médula ósea de ratón, disminuyendo 65%, 73% y 82% cuando son tratados con 1000 µg/ml de nanoclinoptilolita, nanosepiolita y talco respectivamente, 24 h post tratamiento. Este efecto es aún mayor a las 60 h, cayendo la viabilidad a 80%, 98% y 88%, respectivamente para cada tratamiento (Figura 12, paneles superiores).

Por otra parte, el tipo de muerte celular se determinó en los cultivos de macrófagos tratados utilizando el kit de Anexina V/ioduro de propidio. Se observó que tanto los macrófagos de línea celular, como los de cultivo primario de médula ósea de ratón murieron principalmente por necrosis en todos los tiempos evaluados, mostrando una diferencia clara entre los diferentes tratamientos (Figura 12, paneles inferiores). En contraste, los cultivos de macrófagos de sangre periférica humana fueron los menos afectados en la viabilidad, mostrando que aproximadamente dos tercios de las células muertas, lo hicieron por apoptosis en todos los tiempos ensayados. Los diferentes efectos observados dependiendo del origen de los macrófagos así como las vías de muerte celular, sugieren que los procesos celulares que activan a los macrófagos tratados con nanoclinoptilolita son diferentes que los activados por nanosepiolita y talco. (Figura 12, paneles intermedios).



**Figura 12. Viabilidad, apoptosis y necrosis de macrófagos después del tratamiento con nanoarcillas.** Macrófagos de la línea celular RAW 264.7, derivados de monocitos de médula ósea de ratón y de monocitos de sangre periférica humana, fueron tratados con 1000 µg/ml de las nanoarcillas y talco por los tiempos indicados y luego teñidos con Anexina V y yoduro de propidio para evaluar la viabilidad, apoptosis y necrosis.

## **Patrón de secreción de citocinas de macrófagos humanos y murinos tratados con nanoarcillas**

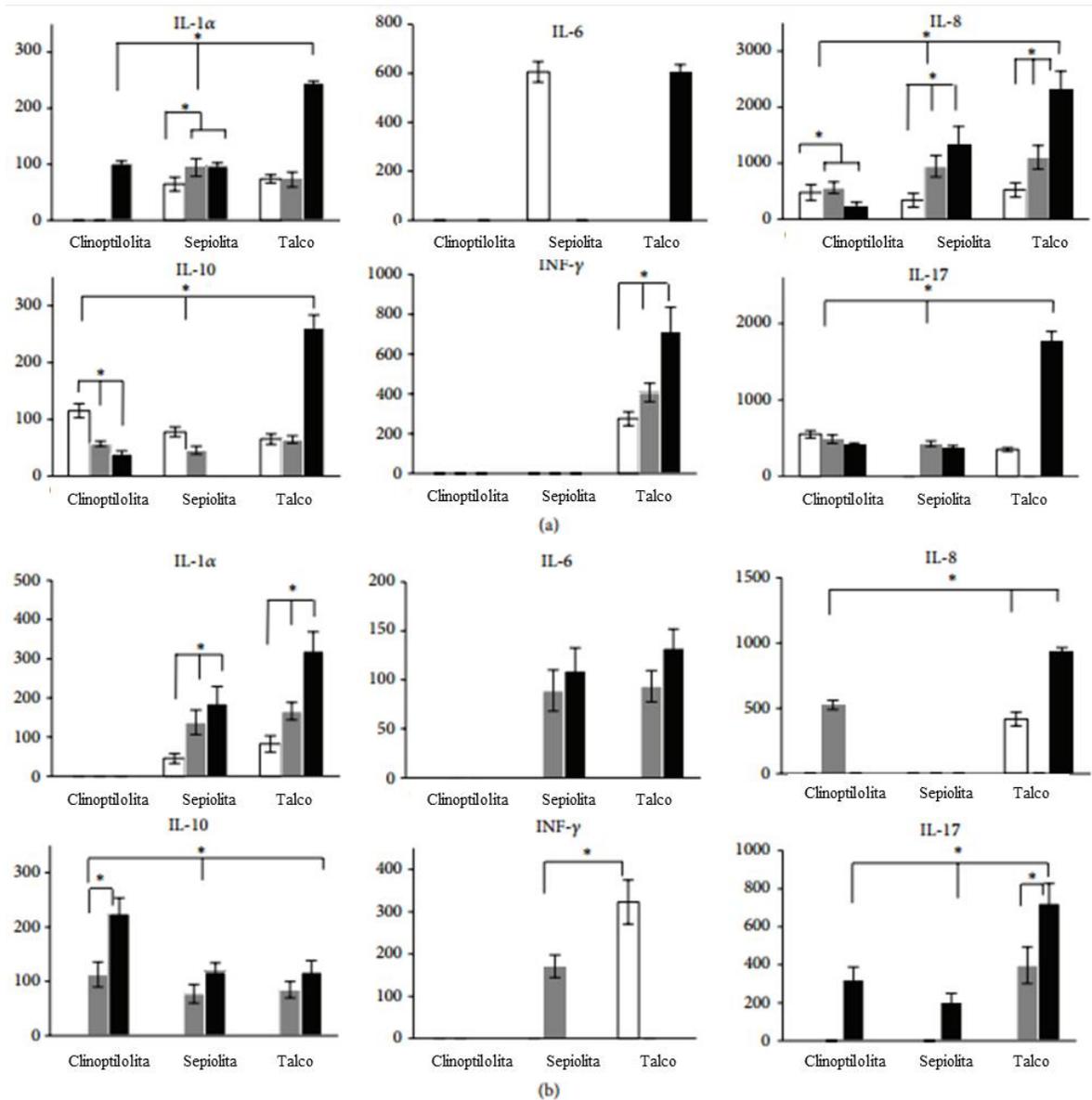
Las citocinas secretadas por los macrófagos murinos y humanos en presencia tanto de las nanoarcillas como del talco se determinaron en el medio de cultivo a las 24, 36 y 48 h post-tratamiento por citometría de flujo. Las citocinas fueron indetectables a las 12 h y no se determinaron a las 60 h.

En general, las citocinas pro-inflamatorias aumentaron a lo largo del tiempo en los dos tipos de macrófagos, pero a diferentes niveles dependiendo de los tratamientos (Figura 13). Se observó un perfil pro inflamatorio más claro en los cultivos tratados con nanosepiolita y talco en comparación con los tratados con nanoclinoptilolita. En los macrófagos humanos tratados con nanosepiolita o talco se detectaron algunas cantidades de IL-1 $\alpha$  e IL-6 que aumentaron ligeramente con respecto al tiempo. Sin embargo, la liberación de IL-6 e INF $\gamma$  no se detectó en los macrófagos murinos ni en los humanos tratados con nanoclinoptilolita en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 13a y b, respectivamente).

La citocina/quimiocina IL-8 fue liberada sin un patrón claro en ningún tratamiento, pero su producción fue considerablemente mayor en los cultivos de macrófagos murinos tratados con nanosepiolita o talco, en comparación con los tratados con nanoclinoptilolita ( $p < 0,05$ ) (Figura 13a). También se observó la secreción de esta citocina en los medios de cultivo de macrófagos humanos tratados con nanoclinoptilolita y talco. La otra citocina altamente expresada fue IL-17, que se determinó para tratamientos con nanoclinoptilolita, nanosepiolita y talco en

diferentes tiempos, siendo mayor su producción en macrófagos murinos y humanos tratados con talco. El INF $\gamma$  se observó de manera creciente en los cultivos de macrófagos murinos tratados con talco y de forma puntual en los macrófagos humanos tratados con nanosepiolita y talco, pero no se observó en ningún cultivo tratado con nanoclinoptilolita.

El factor GM-CSF y las citocinas de perfil Th2, IL-4 e IL-5, no se detectaron bajo ninguna de las condiciones evaluadas. Se detectaron niveles bajos de la citocina reguladora IL-10 en los medios de cultivo de macrófagos murinos tratados (Figura 13a); en comparación, los macrófagos humanos tratados con nanoclinoptilolita expresaron niveles más altos de esta citocina con respecto a los tratados con nanosepiolita y talco ( $p < 0,05$ ) (Figura 13b).



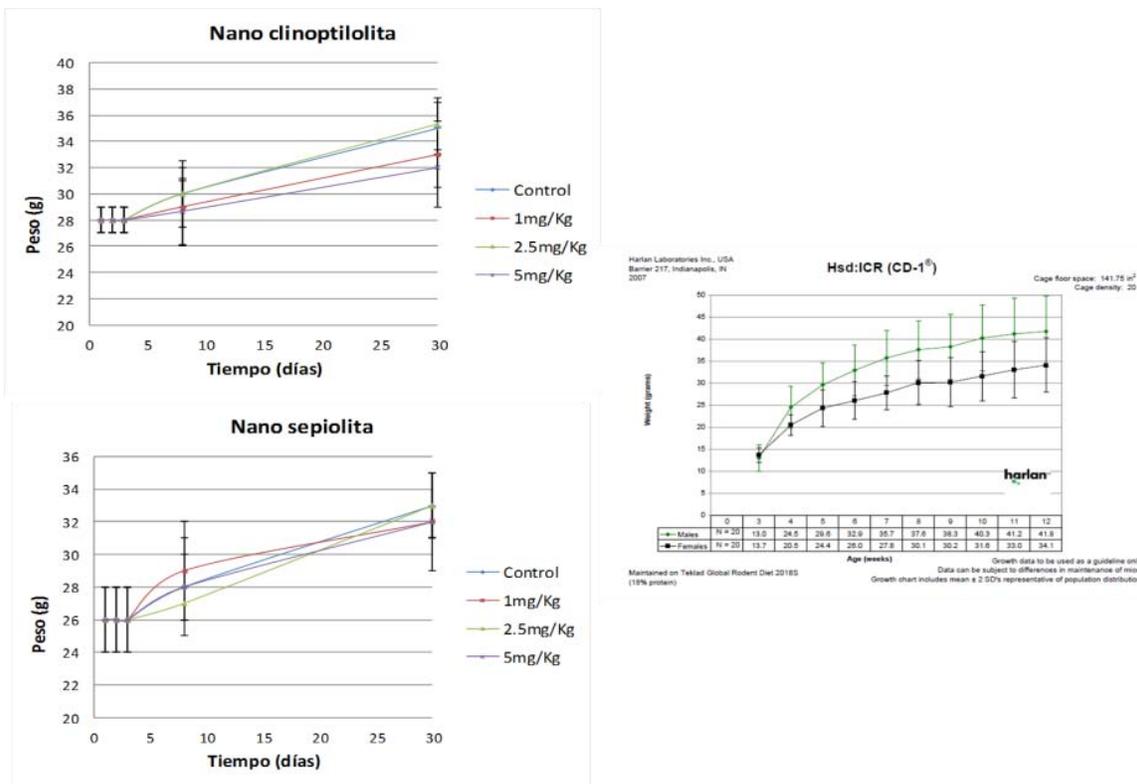
**Figura 13. Patrón de secreción de citocinas de cultivos de macrófagos tratados con nanoarcillas y talco.** Se determinó un panel de citocinas Th1 y Th2 en los medios de cultivo de los macrófagos derivados de médula ósea de ratones (a) y macrófagos de sangre periférica humana (b) a las 24 h (barras blancas), 36 h (barras grises) y 48 h (barras negras) después del tratamiento con nanoarcillas y talco. Todos los niveles de citoquinas se muestran en pg / ml.

## **Resultados de la administración simultánea por diferentes vías a ratones**

### **CD1**

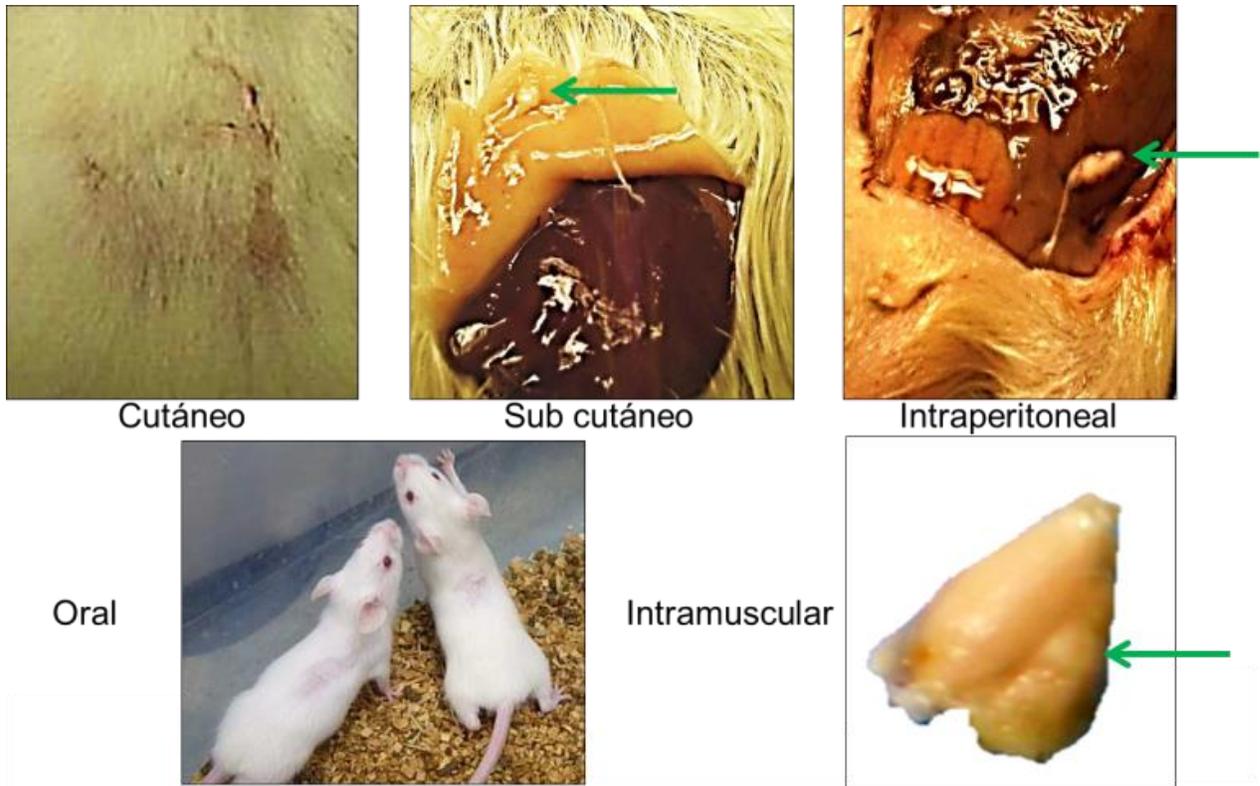
En éste caso, ratones CD1 machos de 4 semanas de edad fueron tratados con nanoclinoptilolita o nanosepiolita simultáneamente por 4 diferentes vías (cutánea, subcutánea, intraperitoneal e intramuscular) o un segundo grupo tratados sólo por vía aérea. Se utilizaron 3 ratones para cada tiempo y cada dosis evaluada.

Con el fin de determinar el estado de salud general de los ratones se les tomó la temperatura y el peso a 24, 48, 72 h, 1 semana y 1 mes post administración. En todos los tiempos evaluados los ratones presentaron una temperatura de  $36.5 \pm 0.7$  °C que consideramos normal comparando con la temperatura de referencia  $36.5 \pm 0.5$  °C reportada por los laboratorios Charles River. De la misma forma el peso estuvo dentro de los parámetros considerados como normales para esta población de ratones y no hubo diferencias significativas entre los animales tratados y los controles sin tratamiento (Figura 14).



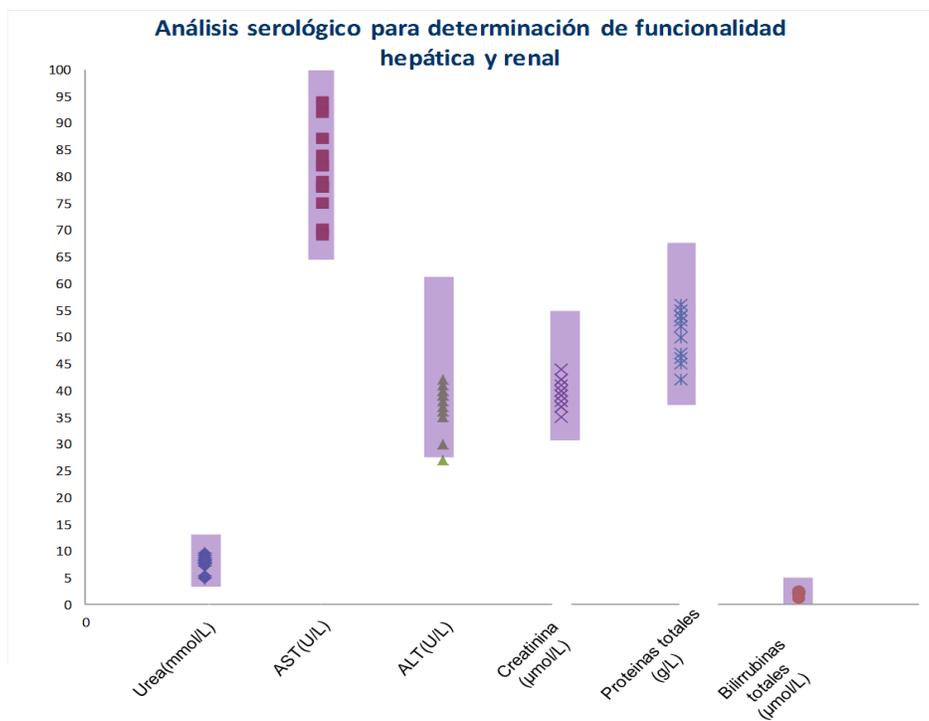
**Figura 14. Registro del peso de los ratones tratados con nanoarcillas.** En las gráficas de la izquierda se representan los datos del peso de los ratones a los diferentes tiempos de evaluación; la gráfica de la derecha es la reportada para la población de ratones CD1.

Los animales no presentaron alteraciones en la conducta (alimentación, movimiento, jugueteo, agresividad, etc) y un mes después de la administración de las nanoarcillas, se observaron a simple vista, cúmulos en los sitios de inyección además, los análisis de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, nos reportaron que no se observaba inflamación o daño alrededor de dichos cúmulos; la administración cutánea no generó ningún daño evidente y en ningún caso presentaron cuadros diarreicos o de estreñimiento derivados de la administración oral (Figura 15).



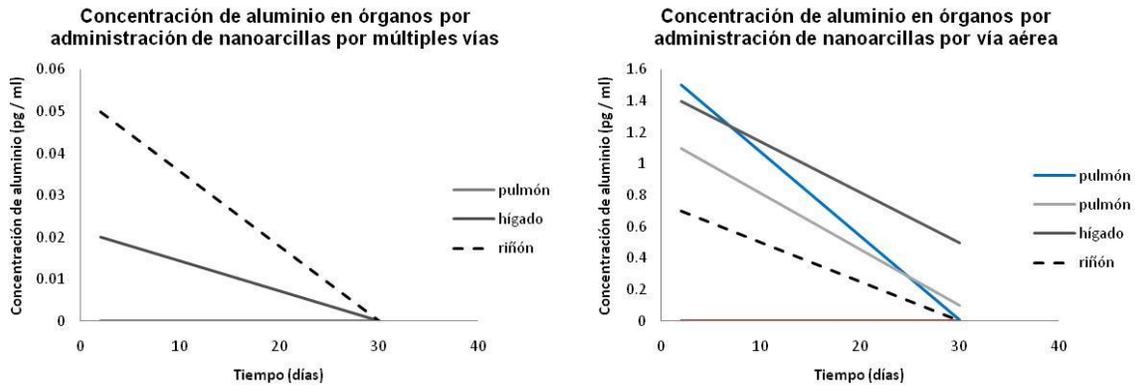
**Figura 15. Fotos representativas de los efectos observados en los sitios de administración.** En la figura se muestran los sitios asociados a la vía de administración de ratones tratados con 5 mg/kg de nanoarcillas. Las flechas verdes señalan los cúmulos observados después de 1 mes de tratamiento.

La determinación de la funcionalidad hepática y renal por determinación de analitos en sangre mostró en todas las muestras niveles dentro de los intervalos reportados como normales para ratones CD1, solamente un ratón presentó un nivel ligeramente más bajo de ALT (alanina aminotransferasa). Sin embargo, la diferencia no es significativa (Figura 16).



**Figura 16. Determinación de analitos en suero de sangre de ratones tratados con nanoclinoptilolita y nanosepiolita.** En la gráfica se muestran todos los datos de los analitos determinados en el suero de la sangre de todos los ratones tratados con nanoarcillas. AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa).

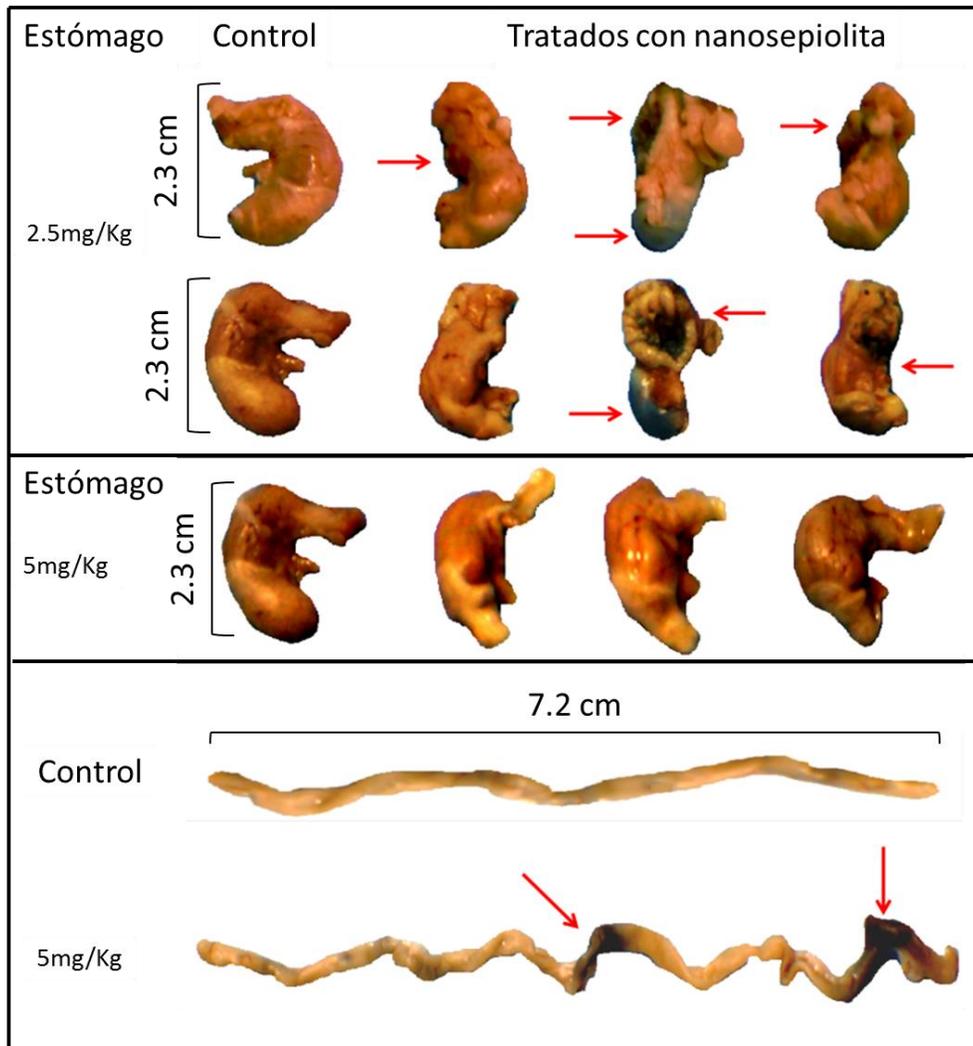
En las dos figuras anteriores se encuentran combinados los datos que corresponden tanto a los animales administrados por 4 vías como los de los animales tratados por vía aérea. Los resultados obtenidos con respecto a los parámetros fisiológicos y bioquímicos muestran que los ratones tratados se encontraron sanos a lo largo de todo el experimento y no presentan daños hepáticos ni renales. Por otra parte, se hicieron determinaciones de las concentraciones de aluminio en hígados, riñones y pulmones de los animales tratados a 48 h y 1 mes, con el fin de determinar si existe acumulación de nanoarcillas, lo cual se podría reflejar efectos adversos posteriores debido a la toxicidad del aluminio (Figura 17).



**Figura 17. Determinación de aluminio por absorción atómica en órganos de los ratones tratados con nanoarcillas.** En las gráficas se muestra la presencia de aluminio (pg/mg) en pulmones, hígados y riñones de los animales tratados con nanoarcillas por múltiples vías (cutánea, subcutánea, intragástrica, intraperitoneal e intramuscular) y por vía aérea. Las líneas en escala de grises representan el tratamiento con nanosepiolita y las líneas a color el tratamiento con nanoclinoptilolita.

Como se puede observar, el tratamiento con nanoclinoptilolita por vía cutánea, subcutánea, intraperitoneal e intramuscular en el mismo ratón, no resultó en acumulación de aluminio en ninguno de los órganos en ninguno de los tiempos evaluados. Por el contrario, la administración aérea resultó en la acumulación temprana (48 h) de aluminio en los pulmones, la cual cayó 1 mes después del tratamiento, disminuyendo la concentración 150 veces con respecto a las 48 h. En el caso del tratamiento con nanosepiolita, se observan diferentes cantidades de aluminio en los diferentes órganos con ambos esquemas de tratamiento. El órgano que presentó mayores cantidades de aluminio acumulado es el hígado, independientemente de la vía de administración. Sin embargo, sólo en animales tratados vía aérea se observó aluminio en hígado y pulmón 1 mes después del tratamiento, 2.8 y 11 veces menos que a 48 h respectivamente.

Sorprendentemente, aún cuando los parámetros evaluados hasta el momento para estimar la salud de los ratones se encuentran dentro de los intervalos reportados como normales; se observaron efectos adversos en el sistema gastrointestinal de los ratones tratados vía aérea con nanosepiolita. La menor concentración administrada (1mg/Kg) de nanosepiolita no provocó ningún efecto, sin embargo, la administración de 2.5 mg/Kg provocó la reducción del tamaño del estómago y zonas hemorrágicas en el mismo. Contrario a lo esperado, una mayor concentración (5mg/Kg) de nanosepiolita no provocó un mayor efecto en los estómagos de los ratones tratados, pero sí se observaron zonas hemorrágicas en el intestino (Figura 18). En ningún otro caso se observaron este tipo de efectos secundarios.



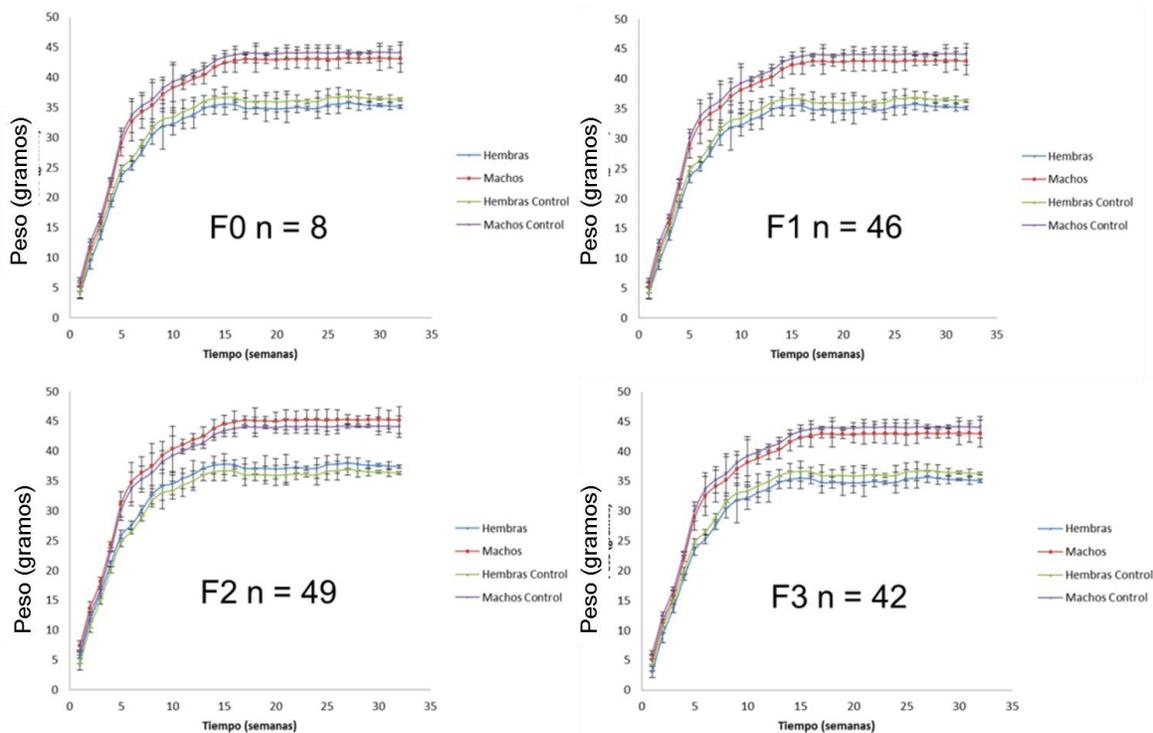
**Figura 18. Efecto de la administración de nanosepiolita por vía aérea en ratones.** Las fotografías muestran los efectos observados en los estómagos e intestinos de los ratones CD1 después de 1 mes de la administración de nanosepiolita.

En este caso particular, se observa que aún cuando todos los parámetros evaluados (peso, temperatura, acumulación de aluminio, funcionalidad hepática y renal) se encuentran dentro de los parámetros reportados como normales, la administración aérea de nanosepiolita produce un efecto negativo en el sistema gastrointestinal y no en el sistema respiratorio. Lo anterior pone en evidencia que cuando no se conocen los mecanismos de distribución de nanoarcillas *in vivo*, es

necesario realizar pruebas de toxicidad tomando en cuenta múltiples parámetros de evaluación (fisiológicos, bioquímicos e histopatológicos) de tal manera que cualquier efecto adverso pueda ser determinado.

### **Efecto de la exposición constante a nanoarcillas**

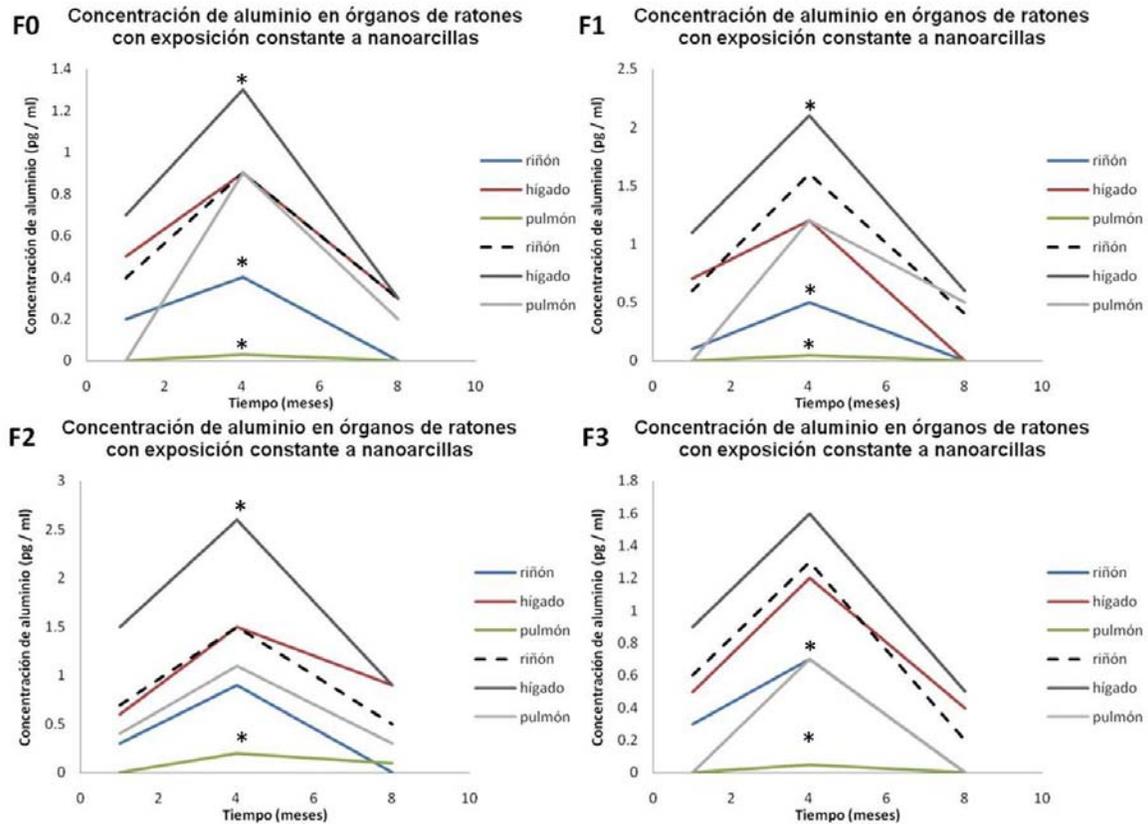
En este caso se mantuvieron ratones CD1 durante 8 meses poniendo las nanoarcillas como material de cama. Se analizaron 3 generaciones expuestas desde el nacimiento y la generación de inicio donde los ratones tenían 4 semanas de edad al iniciar la exposición a las nanoarcillas. Se tomó la temperatura y el peso de los animales 1 vez por semana, se determinó la concentración de aluminio en riñón, hígado y pulmón; finalmente los animales fueron enviados a la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM para la realización de análisis histopatológicos.



**Figura 19. Peso de ratones tratados durante 8 meses con las nanoarcillas.** En las gráficas se muestra el peso promedio de los ratones expuestos durante 8 meses a las nanoarcillas como material de cama. Están considerados tanto los ratones tratados con nanoclinoptilolita como los tratados con nanosepiolita.

Para la determinación de aluminio por absorción atómica en hígado, riñón y pulmón, se sacrificaron 6 ratones de cada generación después de 1, 4 y 8 meses de exposición a las nanoarcillas. En los animales tratados por un mes, se observó la presencia de aluminio en hígado y riñón pero no en los pulmones (Figura 20). A los 4 meses de exposición se observó aluminio en los tres órganos evaluados y fue en éste tiempo cuando se observó la concentración más alta. Finalmente, en los animales expuestos durante 8 meses la presencia de aluminio no presentó un patrón, pero disminuyó con respecto a las concentraciones encontradas a los 4 meses de exposición (Figura 20). Esto nos muestra que lo animales con el tiempo

van eliminando el aluminio presente en los órganos evaluados, lo cual puede estar relacionado con un bajo efecto tóxico.



**Figura 20. Determinación de aluminio en hígado, riñón y pulmón de ratones expuestos permanentemente a nanoarcillas.** Las gráficas muestran la concentración de aluminio en pg/mg en riñón, hígado y pulmón a 1, 4 y 8 meses de exposición en las 4 generaciones evaluadas; se observa una concentración máxima a los 4 meses. Las líneas en escala de grises representan los tratamientos con nanosepiolita y las líneas a color los tratamientos con nanoclinoptilolita.

Finalmente, se enviaron todos los ratones de la generación F0 y 10 (5 machos y 5 hembras) de cada una de las siguientes generaciones (F1, F2 y F3) para estudios histopatológicos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. En el reporte se indicó que los animales expuestos a la nanoclinoptilolita no presentaron

efectos adversos. Sin embargo, en el caso de los animales expuestos a la nanosepiolita se observaron en 3 machos y 4 hembras de la generación F3 “ligeras hemorragias” cerebrales que no se observaron en ninguno de los controles y que podrían estar relacionadas con la exposición a la nanoarcilla.

## **DISCUSIÓN**

La clinoptilolita y la sepiolita se han propuesto para aplicaciones farmacéuticas en la producción de tabletas (122), como sistemas de liberación prolongada (123), en la terapia contra el cáncer en combinación con fármacos (124), como adyuvantes (125) y para atrapar el plomo por administración intravenosa en niños con TDAH (126). Principalmente, el desarrollo de nanopartículas como sistemas de administración de fármacos aumentó el interés en las nanoarcillas debido a las modificaciones en las propiedades físicas y químicas en comparación con las arcillas naturales. Sin embargo, aunque la toxicidad de las arcillas se ha evaluado ampliamente (127,128), la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer informa que hay pocos estudios sobre la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de la nanoclinoptilolita y la nanosepiolita (129). Por ello, en este trabajo se presenta una evaluación del efecto citotóxico de nanoclinoptilolita y nanosepiolita en dos de las células reportadas como más fagocíticas (118-119), macrófagos y amibas, como una primera aproximación a la toxicidad de nanoarcillas. En éste sentido, los macrófagos son células fundamentales de la respuesta inmune innata, especializados en la contención de cuerpos extraños en mamíferos y han sido ampliamente utilizados en ensayos de toxicidad; han mostrado ser un modelo

apropiado para estudios de citotoxicidad *in vitro* (130,131) además de que las nanoarcillas podrían alcanzar el torrente sanguíneo y otros tejidos debido a sus aplicaciones como acarreadores de fármacos. Por otro lado, la amiba *Entamoeba histolytica*, el parásito protozoario que causa la amibiasis humana, se encuentra entre las células fagocíticas y proteolíticas más activas en la naturaleza, y se ha utilizado como un modelo para evaluar la toxicidad de nanotubos de carbono (120,121). A pesar de que las grandes diferencias entre los macrófagos y las amibas comparten la característica de ser células altamente fagocíticas, favoreciendo la incorporación del material y el estudio de la toxicidad de los mismos incluso en bajas concentraciones.

Es importante señalar que para las pruebas *in vitro* se debe tomar en cuenta que la nanoclinoptilolita puede modificar la composición iónica de los medios de cultivo, lo que puede alterar los ensayos citotóxicos enmascarando la toxicidad de las nanoarcillas (130). Para evitar esto, las suspensiones de nanoarcillas fueron preparadas en medio de cultivo suplementado, de tal manera que la nanoclinoptilolita puede tomar los iones del medio y proteínas del suero utilizado para suplementar, así cuando se agrega la suspensión a los ensayos se asume que el intercambio iónico y protéico es mínimo. También la formación de agregados puede alterar los resultados, por lo que se sonicaron las suspensiones de nanoarcillas para reducir el efecto de este parámetro. Con este tratamiento se asumió que la composición de iones fue casi constante y que la agregación no fue significativa, por lo que ninguna de las dos es la principal causa de muerte celular en los cultivos evaluados.

Nuestros resultados muestran que la nanoclinoptilolita no tiene efecto citotóxico contra trofozoítos de *E. histolytica*, mientras que la nanosepiolita tiene un efecto citotóxico significativo con concentraciones superiores a 0.1 mg/ml. El efecto observado fue tiempo y dosis dependiente. Sin embargo, la tinción fluorescente de los cultivos tratados no muestra cambios morfológicos en los trofozoítos, lo que podría sugerir un mecanismo de muerte celular vía apoptosis (131) (Figura 12), un análisis que necesita ser llevado a cabo en futuros estudios. Por otra parte, la viabilidad de los cultivos de macrófagos se vio afectada en diferentes grados, pero de manera tiempo y dosis dependiente de los tratamientos con nanoarcillas. El tratamiento con nanosepiolita mostró un efecto comparable con el del talco libre de asbesto, utilizado como compuesto control con una larga historia probada de uso seguro (132,133). Sorprendentemente, el efecto citotóxico depende del origen celular, siendo los cultivos de macrófagos murinos los más afectados (más de 80% de la reducción de la viabilidad a 60 h), seguido de los macrófagos de línea celular RAW 264.7 y finalmente los macrófagos humanos (Figura 12). En este sentido, Sohaebuddin et al. (2010) reportaron que diferentes tipos de células tienen una respuesta citotóxica diferente en contra de las nanopartículas. Nuestros resultados sugieren que no sólo el tipo, sino también el origen de la célula se deben considerar cuando se prueba la citotoxicidad de las nanoarcillas, lo que podría extrapolarse a cualquier nanopartícula. Sin embargo, esto no se puede generalizar y debe ser confirmado usando una amplia variedad de células de diferentes fuentes. Los macrófagos derivados de médula ósea de ratón fueron altamente susceptibles a la exposición a nanoarcillas y probablemente a cualquier

otro nanopartícula. En contraste, la línea celular RAW 264.7 ha sido ampliamente utilizada para el análisis de citotoxicidad de sílice, polímeros, óxidos metálicos, plata y nanopartículas de oro (134-136), incluyendo dos informes sobre nanopartículas de hidroxiapatita y bohemita (137,138), pero estas células son menos susceptibles al tratamiento con las nanoarcillas evaluadas en este trabajo.

En este trabajo, el tratamiento sobre macrófagos de la línea celular RAW 264.7 con 1 mg/ml de nanoclinoptilolita o nanosepiolita mostró una reducción de la viabilidad de 20% y 40% a 60 h de exposición, respectivamente (Figura 12). Los resultados son similares a los reportados para nanomontmorillonita en la línea celular hepática humana HepG2, donde la viabilidad celular se redujo en más de 20% con la misma concentración (139). Incluso cuando se utilizaron diferentes líneas celulares, la nanoclinoptilolita y la nanomontmorillonita mostraron un efecto similar sobre la viabilidad, probablemente debido a su estructura (140). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que las diferencias estén asociadas a las características particulares de cada línea. Debido a las posibles aplicaciones de las nanoarcillas en biomedicina y tomando en cuenta la recomendación de la ISO 10993-5 para la evaluación biológica de dispositivos médicos, se decidió analizar la toxicidad de nanoclinoptilolita y nanosepiolita en cultivos primarios de macrófagos derivados de sangre periférica humana. Sorprendentemente, éstos cultivos fueron los menos afectados por los tratamientos con nanoarcillas o talco, pues nunca se observó más del 25% de la reducción de la viabilidad en el tiempo y las dosis ensayadas (Figura 12). Esto es particularmente interesante si tenemos en cuenta que las posibles aplicaciones

médicas de las nanoarcillas conducirán en cualquier punto al encuentro de las nanopartículas con el macrófago altamente fagocítico. Los macrófagos derivados de sangre periférica humana se han utilizado para evaluar la toxicidad de muchas partículas presentes en el polvo, aire contaminado, polímeros y otros (141-143). Sin embargo, en nuestro conocimiento, no hay reportes del uso de éstas células para evaluar el efecto de nanoarcillas y sólo se han utilizado para evaluar la citotoxicidad de nanotubos de carbono y nanopartículas de óxido de titanio y de zinc, mostrando que éstas células son altamente susceptibles a ambos metales (144,145).

Una observación importante es que la incorporación de nanoarcillas tanto por trofozoítos amibianos como por macrófagos parece ser muy similar, debido a su localización dentro de grandes vesículas fagocíticas o lisosomas, lo que sugiere un proceso fagocítico o macropinocítico (Figura 10 y 11). Esto muestra que la agregación y distribución de las nanoarcillas dentro de las células puede estar directamente relacionada con su citotoxicidad. De tal manera que, la mayor agregación de nanosepiolita dentro de grandes vesículas puede afectar la membrana vacuolar comparando con la menor agregación de la nanoclinoptilolita, lo que se podría relacionar con el mayor efecto citotóxico de la nanosepiolita en los cultivos tanto de amibas como de macrófagos. Como la toxicidad de las nanopartículas depende del tamaño y la composición del material (2) y el estado de agregación está asociado con la estructura de la nanoarcilla, entonces la estructura fibrosa de la nanosepiolita podría contribuir al efecto de agregación y a pinchar la membrana vesicular más fácilmente que las nanopartículas de

clinoptilolita cuya estructura es la de un octaedro deformado, explicando así el mayor efecto tóxico de la nanosepiolita.

La vía de muerte celular de los macrófagos inducida por el tratamiento con nanoarcillas y talco se determinó por la tinción con anexina V y yoduro de propidio. En este caso, se observó que la muerte celular fue diferente en función del origen de los macrófagos estudiados. Así, los cultivos de la línea celular RAW 264.7 y los macrófagos derivado de médula ósea de ratón murieron principalmente por necrosis (dos y tres veces más con respecto al número de células apoptóticas, respectivamente), mientras que los macrófagos derivados de sangre periférica humana murieron preferentemente por una vía apoptótica (dos veces con respecto al número de células necróticas); esto podría ser comparable con los cultivos amibianos donde la morfología de las células muertas sugiere un proceso apoptótico. Los mecanismos de activación de la muerte de los macrófagos por las nanoarcillas y el talco, así como los eventos de señalización subyacentes que conducen a la apoptosis o necrosis son desconocidas. Pero podrían implicar que la activación de los receptores de superficie y de la caspasa 9 mitocondrial como se describe para el efecto tóxico de nanopartículas de óxido de zinc (146). En términos de citotoxicidad, la muerte vía apoptosis podría ser preferible que la muerte vía necrosis, debido a que los restos celulares de una muerte por necrosis puede promover una respuesta pro-inflamatoria que se asocia con lesión en los órganos (147). La respuesta pro-inflamatoria implica la liberación por los macrófagos y otras células innatas de citocinas y quimiocinas que promueven el reclutamiento de nuevas células en el sitio de la infección o daño. Por lo tanto, el

patrón de secreción de citoquinas en el sobrenadante de cultivo de los macrófagos de cultivo primario (humanos y murinos) tratados con nanoarcillas y talco se analizó por citometría de flujo. Como era de esperarse, se encontró una correlación entre los patrones de citocinas liberadas por los macrófagos tratados con nanoarcillas y las vías de muerte celular observadas. De este modo, los cultivos de macrófagos murinos, que fueron más afectados por los tratamientos y mueren principalmente por necrosis, secretan niveles elevados de citocinas pro inflamatorias IL-1 $\alpha$ , IL-8 y IL6, en comparación con los cultivos de macrófagos humanos. De acuerdo con los resultados, se ha informado que los macrófagos / monocitos humanos estimulados con nanotubos de carbono o nanopartículas de sílice indujeron la liberación de IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-8 asociada con un resultado pro-inflamatorio (148). Además, la presencia de clinoptilolita natural en el alimento de ratones durante 28 días produjo un aumento de la concentración sérica de LSA (amida de ácido D-lisérgico o ergina) lo que podría estar relacionado con la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-1 por los macrófagos (148). Como se mencionó anteriormente, los cultivos de macrófagos murinos secretaron una mayor cantidad de citocinas pro-inflamatorias que los macrófagos humanos, principalmente IL-8 e IL-6 (Figura 10). Además, la liberación de IL-8 en los cultivos de macrófagos murinos fue mayor con nanosepiolita que con nanoclinoptilolita. La inducción de algunas de estas citocinas pro-inflamatorias por las nanoarcillas podría estar relacionada con su estado de agregación (149) y con el tamaño de las partículas, la más grande produciendo la mayor secreción (150). Esto podría explicar la mayor producción de IL-8 en cultivos de macrófagos murinos tratados con

nanosepiolita con respecto a los tratados con nanoclinoptilolita; como ya se mencionó, la nanosepiolita es más grande que la nanoclinoptilolita lo que además podría facilitar la formación de agregados.

En contraste, el INF $\gamma$  que es también una citocina pro-inflamatoria, no se observó en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos murinos tratados con nanosepiolita y nanoclinoptilolita incluso cuando la IL-1, IL-8 e IL-6 fueron secretadas. El talco provocó un aumento en la secreción de esta citocina con respecto al tiempo (Figura 13). Por otro lado, se observó la inducción de INF $\gamma$  en cultivos de macrófagos humanos sólo en dos tiempos de tratamiento con nanosepiolita y talco (36 h y 24 h después de la exposición, respectivamente), pero no se observó secreción de INF $\gamma$  con el tratamiento con nanoclinoptilolita. En cuanto a TNF- $\alpha$ , fue indetectable en los cultivos de macrófagos con cualquier tratamiento (nanoarcillas o talco), esto sugiere una baja toxicidad ya que se ha demostrado que los materiales más biocompatibles inducen bajos niveles de TNF- $\alpha$  que tienden a cero con el paso del tiempo (150). Por otra parte, la expresión de citocinas IL-17 después de 48 h de tratamiento, sugiere que las nanoarcillas y el talco pueden inducir una respuesta alérgica, tal como se ha descrito en los macrófagos alveolares de animales tratados por vía oral nanopartículas de PLGA recubiertas con quitosano y PEG (151). Además del patrón de citocinas pro-inflamatorias, los cultivos de macrófagos humanos liberan mayor cantidad de IL-10 que los cultivos de macrófagos murinos en presencia de nanoarcillas; ésta es una citocina reguladora, probablemente producida para contrarrestar el perfil pro-

inflamatorio. Curiosamente, la expresión de IL-10 se ha asociado con una mayor biocompatibilidad, ya que contribuye a la inhibición o la resolución de la inflamación asociada a nanocompuestos (152), lo que podría estar relacionado con la menor toxicidad de las nanorillas en los macrófagos humanos.

Los resultados de las evaluaciones *in vitro*, en cultivos de *E. histolytica* y de macrófagos de diferentes orígenes expuestos a nanoarcillas, muestran que la nanoclinoptilolita y la nanosepiolita son altamente bicompatibles; en comparación, con lo que se describe en la literatura acerca de nanotubos de carbono o nanopartículas de óxido de silicio u óxidos metálicos que presentan mayor toxicidad. En este caso, no sólo el tamaño de las nanopartículas de arcilla, sino también el origen de las células utilizadas para la evaluación influye en los resultados de la citotoxicidad, mostrando importantes diferencias entre los macrófagos derivados de médula ósea de ratón con respecto a los de monocitos de sangre periférica humana. Sin embargo, no podemos descartar que la especie de origen a partir de la cual se obtienen las células, ratones o humanos, también podría influir en la respuesta citotóxica.

En cuanto a las evaluaciones *in vivo*, se utilizaron ratones CD1 de 4 semanas de edad para la administración de nanoarcillas por diferentes vías. Los resultados muestran que a lo largo del experimento (1 mes) los animales tuvieron temperatura y peso dentro del intervalo reportado como normal por los Laboratorios Charles River y en comparación con los controles (Figura 14). Existen pocos ensayos de toxicidad de nanoarcillas *in vivo*, sin embargo en

nanopartículas de óxido de cerio ( $\text{CeO}_2$ ) se han observado alteraciones en el peso de ratones CD1 que se han asociado con la respuesta inflamatoria observada en hígado y riñón (153). En este caso, el tratamiento con nanoclinoptilolita o nanosepiolita no presentó alteraciones en el peso de los ratones ni se observó proceso inflamatorio en hígados y riñones según lo reportado por los estudios histopatológicos. Por otra parte, la acumulación de las nanoarcillas en el sitio de aplicación (Figura 15) es señal de que se diseminan poco a otros órganos, además de que al no observar proceso inflamatorio alrededor de los cúmulos, puede ser indicativo de que las nanoarcillas son altamente biocompatibles. Las enzimas detectadas por química sanguínea se asocian con la funcionalidad del hígado y del riñón y se encuentran dentro de los parámetros normales cuando no existen lesiones graves en éstos órganos (154). Los analitos determinados en suero de sangre de los animales tratados (urea, AST, ALT, creatinina, proteínas totales y bilirrubinas) se encontraron dentro de los intervalos reportados como normales, lo que es indicativo de que la funcionalidad hepática y renal no se ven afectadas por la administración de nanoarcillas. Además, no se observó inflamación en éstos órganos. Por otra parte, se determinó la presencia de aluminio en pulmones, hígados y riñones a las 48 h y 1 mes después de la administración de arcillas. El aluminio está presente en las arcillas y ha sido asociado con toxicidad, se ha asociado con malformaciones en eritrocitos, estrés oxidante y neurodegeneración (155, 156). En el caso de la administración por vía intramuscular, intraperitoneal, cutánea, subcutánea y oral de nanoclinoptilolita, no se observó presencia de aluminio en ninguno de los órganos analizados. Sin

embargo, la administración vía aérea mostró  $1.5 \pm 0.3$  pg/mg a las 48 h que disminuye hasta  $0.01 \pm 0.005$  pg / mg después de 1 mes. Esta disminución se puede deber a que el aluminio se elimine en heces y orina. En el caso de la administración de nanosepiolita por las mismas vías, sí se observa la presencia de aluminio en el riñón y el hígado a las 48 h de exposición. Pero, cuando se analiza después de 1 mes de exposición no se observa en ninguno de los órganos evaluados, por lo que asumimos que la nanosepiolita se está excretando totalmente. En el caso de la administración aérea se observaron diferentes concentraciones de aluminio en los órganos (riñón, hígado y pulmón) de animales tratados con nanosepiolita a las 48 h de exposición y una disminución importante en el hígado y pulmón a 1 mes post administración , además de la total eliminación en el riñón. La administración de nanoclinoptilolita o nanosepiolita *in vitro* tanto en amibas como en macrófagos no muestra efectos citotóxicos significativos, tampoco se observan efectos adversos en ratones CD1 tratados por vía intramuscular, intraperitoneal, cutánea, subcutánea y oral. Sin embargo, el efecto de la nanosepiolita es siempre mayor que el de la nanoclinoptilolita; en el caso de la administración vía aérea una dosis intermedia (2.5 mg/Kg) provoca zonas con hemorragia en el estómago de los animales tratados, mientras que una dosis más alta (5 mg/Kg) sólo afecta la morfología de los estómagos y las zonas hemorrágicas se observan en el intestino. La agregación, así como la concentración de nanopartículas se ha asociado con su efecto tóxico, en el caso de nanopartículas de óxido de zinc, una mayor concentración conduce a una mayor agregación y por lo tanto el efecto tóxico es más evidente. En éste caso, el

efecto observado puede estar asociado a la agregación de la nanosepiolita. Una mayor agregación de nanosepiolita por administración aérea puede generar la producción de una flema dónde la nanoarcilla quedaría atrapada, después el ratón podría deglutir la flema y de esa manera llegaría al tracto digestivo lo que podría explicar los efectos observados en el estómago e intestino de los ratones. Dada la estructura fibrosa de la nanosepiolita ésta podría agregarse y a su paso por el tracto digestivo causar daño en la mucosa tanto del estómago como del intestino. Sin embargo, dado que todos los parámetros serológicos, así como el peso y la temperatura se encuentran dentro de los intervalos reportados como normales, es probable que el daño sea sólo durante el paso de la nanosepiolita a lo largo del tracto gastrointestinal.

Por otra parte, las nanopartículas fibrosas se han asociado con un alto índice de toxicidad. Por esta característica, se han clasificado como nanopartículas biopersistentes cuando no pueden ser disueltas en el pulmón dentro de un periodo de tiempo aceptable y como biosolubles cuando las fibras no son fagocitadas por los macrófagos y van desapareciendo rápidamente del pulmón. En éste sentido, la exposición crónica de ratas a nanopartículas de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) causan tumores de pulmón lo que se ha asociado con su característica fibrosa (157). La evaluación del efecto de la exposición constante a nanoarcillas es indispensable para asegurar su bioseguridad. Es por esto que se realizaron ensayos exponiendo de manera constante a ratones CD1 a las nanoarcillas. Las nanoarcillas se colocaron en una proporción 1:1 con el material de cama, esto con el fin de exponer a los animales de una forma no invasiva. Se realizaron las cruces

necesarias para obtener 3 generaciones (F1, F2 y F3) a partir de dos pies de cría para cada nanoarcilla (F0) (Figura 5). A lo largo del experimento y en todas las generaciones evaluadas, los ratones no presentaron alteraciones evidentes a simple vista. El número de crías fue de entre 6 y 9 ratones por camada tanto en los animales tratados como en los controles. En este caso se determinó el peso y la temperatura una vez por semana durante los 8 meses de duración del experimento, en todos los casos estos parámetros se encontraron dentro de los intervalos reportados como normales (Figura 19). Por otra parte, se realizaron las determinaciones de aluminio por absorción atómica en pulmones, hígados y riñones. Se encontraron trazas de éste metal, tanto en hígado como en riñón, desde el primer mes de exposición y en las 4 generaciones evaluadas de ratones tratados con nanoclinoptilolita y nanosepiolita. En el caso de la presencia de aluminio en pulmón, se observó desde el primer mes de exposición sólo en la segunda generación (F2) de ratones tratados con nanosepiolita. Se observó una concentración máxima de aluminio en los tres órganos (riñón, hígado y pulmón) a los 4 meses de exposición a nanoclinoptilolita o nanosepiolita, siendo siempre mayor la concentración de nanosepiolita comparando con la de nanoclinoptilolita. Al término del experimento, 8 meses después de la exposición constante a las nanoarcillas, los ratones presentaron una menor concentración de aluminio en los tres órganos evaluados en comparación con la encontrada a los 4 meses de exposición. En algunos casos el aluminio se elimina por completo de los pulmones, hígados y riñones; probablemente se excreta en orina y heces. Lo anterior sugiere una mayor biocompatibilidad de las nanoarcillas en comparación

con otras nanopartículas como las de óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), donde ratas expuestas durante 20 días presentan acumulación en hígado, pulmón y cerebro (155). Además, la administración intratraqueal de las mismas nanopartículas causa fibrosis renal en ratones tratados durante 4 semanas, donde la producción de especies reactivas de oxígeno parece ser la principal causa del daño (158). Es importante tomar en cuenta que hasta el momento no existe ningún reporte de toxicidad de nanoarcillas donde el tiempo de exposición sea similar al que se evaluó en este trabajo. Sin embargo, los daños reportados para exposiciones más cortas a otras nanopartículas generan daños significativos en los animales tratados. Finalmente, los animales expuestos durante 8 meses a las nanoarcillas como material de cama, fueron enviados a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM con el fin de realizar los estudios histopatológicos y evaluar el posible daño provocado por las nanoarcillas. En éste caso, no se encontraron efectos adversos en los animales tratados con nanoclinoptilolita. En el caso de los animales tratados con nanosepiolita se encontraron “ligeras hemorragias” cerebrales lo que podría relacionarse con el efecto reportado por Younes, donde la acumulación de nanopartículas de óxido de titanio en el cerebro de ratas tratadas podría afectar el rendimiento neuroconductual (155).

Los ensayos *in vitro* muestran que ambas nanoarcillas son menos citotóxicas que el talco utilizado como control, en el caso de los efectos *in vivo*, los resultados muestran una tendencia, siendo siempre la nanosepiolita menos biocompatible que la nanoclinoptilolita. Mientras en los ensayos *in vivo* no se observa ningún efecto en los animales tratados con nanoclinoptilolita, el tratamiento con

nanosepiolita causó daño a nivel de aparato gastrointestinal por administración aérea, así como ligeras hemorragias cerebrales por la exposición durante 8 meses.

En los ensayos realizados se observó un mayor efecto citotóxico en los cultivos tratados con nanosepiolita en comparación con los tratamientos con nanosepiolita. Las evaluaciones *in vivo* muestran que sólo los ratones tratados con nanosepiolita presentan efectos adversos.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran un efecto tiempo y dosis dependiente en los cultivos de *E. histolytica* tratados con nanoclinoptilolita y nanosepiolita, siendo esta última la única que presenta un efecto significativo en este cultivo. Por otra parte el tratamiento en cultivos de macrófagos muestra una dependencia entre el efecto y el origen de la célula siendo los macrófagos de médula ósea de ratón los más afectados. En comparación con el talco no se observaron diferencias significativas. El perfil de expresión de citocinas mostró una respuesta pro-inflamatoria con expresión de una citocina reguladora (IL-10). En el caso de las evaluaciones *in vivo* se observaron efectos adversos en los animales tratados durante 8 meses con nanosepiolita.

## **Bibliografias**

- 1) Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823-39.
- 2) Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L. 2010. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol* 7:22.
- 3) Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M. 2014. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 8:233-78.
- 4) [www.merriam-webster.com](http://www.merriam-webster.com)
- 5) Williams DF. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29:2941–2953.
- 6) Rytwo G. 2008. Clay Minerals as an Ancient Nanotechnology: Historical Uses of Clay Organic Interactions and Future Possible Perspectives. *Revista de la sociedad española de mineralogía* 9:15-17.
- 7) Sinha Ray S. 2012. Polylactide-Based Bionanocomposites: A Promising Class of Hybrid Materials. *Accounts of Chemical. Research* 45:1710–1720.
- 8) Ambre AH, Katti DR, Katti KS. 2013. Nanoclays mediate stem cell differentiation and mineralized ECM formation on biopolymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A,2644–2660.

- 9) Katti DR, Sharma A, Ambre AH, Katti KS. 2015. Molecular interactions in biomineralized hydroxyapatite amino acid modified nanoclay: *In silico* design of bone biomaterials 46:207–217.
- 10) Guggenheim S, Martin RT. 1995. Definition of clay and clay mineral: joint report of the AIPEA nomenclature and CMS nomenclature committees. *Clays and Clay Minerals* 43:255-256.
- 11) Rieder M, Cavazzini G, D'yakonov YS, Frank-Kamenetskii VA, Gottardi G, Guggenheim S, Koval PV, Müller G, Neiva AMR, Radoslovich EW, Robert J-L, Sassi FP, Takeda H, Weiss Z, Wones DR. 1998. Nomenclature of micas. *Clays Clay Miner* 46: 586–595.
- 12) Bailey SW. 1980. Summary of recommendations of AIPEA nomenclature committee on clay minerals. *American Mineralogist* 65:1-7.
- 13) Environmental Health Criteria 231, Bentonite, kaolin, and selected clay minerals, <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc231.htm>
- 14) Minerals UK, Centre for sustainable mineral development, <https://www.bgs.ac.uk/mineralsUK/statistics/>
- 15) <http://www.quiminet.com/articulos/usos-y-aplicaciones-de-las-bentonitas-7708.htm>
- 16) Brown TJ, Idoine NE, Raycraft ER, Shaw RA, Deady EA, Rippingale J, Bide T, Wrighton CE, Rodley J. 2014. World Mineral Production 2008-2012, British Geological Survey. Natural Environment Research Council pp 21-23; 64-66.
- 17) <http://www.quiminet.com/articulos/usos-y-aplicaciones-del-caolin-en-papel-pinturas-y-plasticos-8187.htm>

- 18) Schell TC, Lindemann MD, Kornegay ET, Blodgett DJ, Doerr JA. 1993. Effectiveness of different types of clay for reducing the detrimental effects of aflatoxin-contaminated diets on performance and serum profiles of weanling pigs. *J Anim Sci* 71:1226-1231.
- 19) Ortatatlı M, Oğuz H. 2001. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. *Research in Veterinary Science* 71, 59-66.
- 20) Marroquín-Cardona A, Dengb Y, García-Mazcorro J, Johnsona NM, Mitchella N, Tang L, Robinson A, Taylora J, Wang J-S, Phillipsa TD. 2011. Characterization and Safety of Uniform Particle Size NovaSil Clay as a Potential Aflatoxin Enterosorbent. *Appl Clay Sci* 54(3-4):248–257.
- 21) Sabater-Vilar M, Malekinejad H, Selman MHJ, van der Doelen MAM, Fink-Gremmels J. 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses, *Mycopathologia* 163:81–90.
- 22) Hassan AM , Kenawy AM , Abbas WT , Abdel-Wahhab MA. 2010. Prevention of cytogenetic, histochemical and biochemical alterations in *Oreochromis niloticus* by dietary supplement of sorbent materials, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:1890–1895.
- 23) Jaynes WF, Zartman RE. 2011. Aflatoxin Toxicity Reduction in Feed by Enhanced Binding to Surface-Modified Clay Additives, *Toxins* 3:551-565.
- 24) Scientific Opinion on the safety and efficacy of a preparation of bentonite- and sepiolite (Toxfin® Dry) as feed additive for all species, EFSA Panel on

- Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2013;11(4):3179.
- 25) Ake CL, Mayura K, Huebner H, Bratton GR, Phillips TD. 2001. Development of porous clay-based composites for the sorption of lead from water. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 63:459–475.
- 26) Korichia S, Bensmailia A. 2009. Sorption of uranium (VI) on homoionic sodium smectite experimental study and surface complexation modeling, *Journal of Hazardous Materials* 169:780–793.
- 27) Baston GMN, Berry JA, Brownsword M, Cowper MM, Heath TG, Tweed CJ. 1995. The sorption of uranium and technetium on bentonite, tuff and granodiorite, *Mat Res Soc Proc* 353:989-996.
- 28) Barnett MO, Jardine PM, Brooks SC, Selim HM. 2000. Adsorption and transport of uranium (VI) in subsurface media, *Soil Sci Soc Am J* 64:908–917.
- 29) Barnett MO, Jardine PM, Brooks SC. 2002. U (VI) adsorption to heterogeneous subsurface media: application of a surface complexation model, *Environ Sci Technol* 36:937–942.
- 30) Borovec Z. 1981. The adsorption of uranyl species by fine clay, *Chem Geol* 32:45–58.
- 31) Kohler M, Wieland E, Leckie JO. 1992. M. Kohler, E. Wieland, J.O. Leckie (1992) Metal-ligand-surface interactions during sorption of uranium

- neptunyl on oxides and silicates. Proceedings of the 7th International Conference on Water-Rock Interactions, Park City, Utah, 51-54
- 32) Pabalan RT, Turner DR. 1997. Uranium (6+) sorption on montmorillonite: experimental and surface complexation modelling study, *Aqueous Geochem* 2:203–226.
- 33) Rendell PS, Batley GE, Cameron AJ. 1980. Adsorption as a control of metal concentrations in sediment extracts, *Environ Sci Technol* 14:314–318.
- 34) Rosentreter JL, Quarder HS, Smith RW, McLing T. Uranium sorption onto natural sands as a function of sediment characteristics and solution pH, *Adsorption of Metals by Geomedia*, Academic Press pp. 99–130.
- 35) Tsunashima A, Brindley GW, Bastovanov M. 1981. Adsorption of uranium from solutions by montmorillonite: compositions and properties of uranyl montmorillonites, *Clays Clay Miner* 29:10–16.
- 36) Malakul P, Srinivasan KR, Wang HY. 1998. Metal Toxicity Reduction in Naphthalene Biodegradation by Use of Metal-Chelating Adsorbents. *Applied and environmental microbiology* 64:4610–4613.
- 37) Yu Fei Tao, Yue Qiua, Shu Yu Fang, Zhu Yun Liu, Ying Wang, Jian Hua Zhu. 2010. Trapping the lead ion in multi-components aqueous solution by natural clinoptilolite, *Journal of Hazardous Materials* 180:282–288.
- 38) Cusidó JA, Soriano C. 2011. Valorization of pellets from municipal WWTP sludge in lightweight clay ceramics, *Waste Management* 31:1372–1380.

- 39) Cotmana M, Žgajnar Gotvajnb A. 2010. Comparison of different physico-chemical methods for the removal of toxicants from landfill leachate, *Journal of Hazardous Materials* 178:298–305.
- 40) Gitipour S, Bowers MT, Bodocsi A. 1997. The Use of Modified Bentonite for Removal of Aromatic Organics from Contaminated Soil, *Journal of colloid and interface science* 196:191–198.
- 41) Williams LB, Metge DW, Eberl DD, Harvey RW, Turner AG, Prapaipong P, Poret-Peterson AT. 2011. What Makes a Natural Clay Antibacterial?, *Environ Sci Technol* 45:3768–3773.
- 42) Lee LN, Saxena D, Stotzky G. 1995. Activity of Free and Clay-Bound Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the *Mosquito Culex pipiens*, *Applied and environmental microbiology* 69:4111–4115.
- 43) Tapp H, Stotzky G. 1995. Insecticidal Activity of the Toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* Adsorbed and Bound on Pure and Soil Clays, *Applied and environmental microbiology* 61:1786–1790.
- 44) Sorensen KC, Stucki JW, Warner RE, Wagner ED, Plewa MJ. 2005. Modulation of the Genotoxicity of Pesticides Reacted with Redox-Modified Smectite, *Clay Environmental and Molecular Mutagenesis* 46:174-181.
- 45) Bengochea P, Amor F, Saelices R, Hernando S, Budia F, Adán A, Medina P. 2013. Kaolin and copper-based products applications: Ecotoxicology on four natural enemies, *Chemosphere* 91:1189–119

- 46) Sousa Rodrigues LA, Figueiras A, Veiga F, Mendes de Freitas R, Cunha Nunes LC, Cavalcanti da Silva FE, da Silva Leite CM. 2013. The systems containing clays and clay minerals from modified drug release: A review, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 103:642–651.
- 47) Perioli L, Pagano C. 2012. Inorganic matrices: an answer to low drug solubility problem, *Expert Opin Drug Deliv* 9:1559-72.
- 48) Chakraborti M, Jackson JK, Plackett D, Gilchrist SE, Burt HM. 2012. The application of layered double hydroxide clay (LDH)-poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) film composites for the controlled release of antibiotics, *J Mater Sci Mater* 23:1705-13.
- 49) Kikouama OJ, Balde L. 2010. From edible clay to a clay-containing formulation for optimization of oral delivery of some trace elements: a review, *Int J Food Sci Nutr* 61:803-822.
- 50) Li B, He J, Evans DG, Duan X. 2004. Enteric-coated layered double hydroxides as a controlled release drug delivery system, *Int J Pharm* 287:89-95.
- 51) Ambrogi V, Fardella G, Grandolini G, Perioli L, Tiralti MC. 2002. Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with anti-inflammatory agents, II: Uptake of diclofenac for a controlled release formulation, *AAPS Pharm Sci Tech* 33:E26.
- 52) Lin FH, Lee YH, Jian CH, Wong JM, Shieh MJ, Wang CY. 2002. A study of purified montmorillonite intercalated with 5-fluorouracil as drug carrier, *Biomaterials* 23:1981-1987.

- 53) Park JK, Choy YB, Oh JM, Kim JY, Hwang SJ, Choy JH. 2008. Controlled release of donepezil intercalated in smectite clays, *International Journal of Pharmaceutics* 359:198–204.
- 54) Tzialla AA, Pavlidis IV, Felicissimo MP, Rudolf P, Gournis D, Stamatis H. 2010. Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of  $\alpha$ -pinene, *Bioresource Technology* 101:1587–1594
- 55) Menezes-Blackburn D, Jorquera M, Gianfreda L, Rao M, Greiner R, Garrido E, Mora ML. 2011. Activity stabilization of *Aspergillus niger* and *Escherichia coli* phytases immobilized on allophanic synthetic compounds and montmorillonite nanoclays, *Bioresource Technology* 102:9360–9367
- 56) Martynková GS, Valásková M. 2014. Antimicrobial nanocomposites based on natural modified materials: a review of carbons and clays, *J Nanosci Nanotechnol* 14:673-693.
- 57) Rhim JW, Lee SB, Hong SI. 2011. Preparation and characterization of agar/clay nanocomposite films: the effect of clay type, *J Food Sci* 76:N40-48.
- 58) Dastjerdi R, Montazer M. 2010. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79:5–18,
- 59) Maryan AS, Montazer M, Harifi T, Rad MM. 2013. Aged-look vat dyed cotton with anti-bacterial/anti-fungal properties by treatment with nano clay and enzymes, *Carbohydrate Polymers* 95:338-347

- 60) Kookana RS, Boxall AB, Reeves PT, Ashauer R, Beulke S, Chaudhry Q, Cornelis G, Fernandes TF, Gan J, Kah M, Lynch I, Ranville J, Sinclair C, Spurgeon D, Tiede K, Van den Brink PJ. 2014. Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks, *J Agric Food Chem* 62:4227–4240
- 61) Chevillard A, Angellier-Coussy H, Guillard V, Gontard N, Gastaldi EJ. 2011. Controlling pesticide release via structuring agropolymer and nanoclays based materials, *Hazard Mater* 205-206:32-39.
- 62) Pérez E, Pérez CJ, Alvarez VA, Bernal C. 2013. Fracture behavior of a commercial starch/polycaprolactone blend reinforced with different layered silicates, *Carbohydr Polym* 97:269-276.
- 63) Dalir H, Farahani RD, Nhim V, Samson B, Lévesque M, Therriault D. 2012. Preparation of highly exfoliated polyester-clay nanocomposites: process-property correlations, *Langmuir* 28:791-803.
- 64) Harikrishnan G, Lindsay CI, Arunagirinathan MA, Macosko CW. 2009. Probing nanodispersions of clays for reactive foaming. *ACS Appl Mater Interfaces* 1:1913-1918.
- 65) Cavallaro G, Lazzara G, Milioto S, Palmisano G, Parisi F. 2014. Halloysite nanotube with fluorinated lumen: Non-foaming nanocontainer for storage and controlled release of oxygen in aqueous media, *Journal of Colloid and Interface Science* 417:66–71.
- 66) Marras SI, Kladi KP, Tsivintzelis I, Zuburtikudis I, Panayiotou C. 2008. Biodegradable polymer nanocomposites: The role of nanoclays on the

- thermo mechanical characteristics and the electrospun fibrous structure, *Acta Biomaterialia* 4:756–765.
- 67) Sinha Ray S. 2012. Polylactide-Based Bionanocomposites: A Promising Class of Hybrid Materials, *Acc Chem Res* 45:1710–1720.
- 68) Ha JU, Xanthos M. 2011. Pharmaceutical Nanotechnology, Drug release characteristics from nanoclay hybrids and their dispersions in organic polymers, *International Journal of Pharmaceutics* 414:321–331.
- 69) Yang M, Wang P, Huang CY, Ku MS, Liu H, Gogos C. 2010. Solid dispersion of acetaminophen and poly(ethylene oxide) prepared by hot-melt mixing, *Int J Pharm* 395:53-61.
- 70) Campbell K, Craig DQ, McNally T. 2008. Poly(ethylene glycol) layered silicate nanocomposites for retarded drug release prepared by hot-melt extrusion, *Int J Pharm* 363:126-31.
- 71) Choi SJ, Choy JH. 2011. Layered double hydroxide nanoparticles as target-specific delivery carriers: uptake mechanism and toxicity, *Nanomedicine* 6:803-814.
- 72) Solhi L, Atai M, Nodehi A, Imani M, Ghaemi A, Khosravi K. 2012. Poly(acrylic acid) grafted montmorillonite as novel fillers for dental adhesives: synthesis, characterization and properties of the adhesive, *Dent Mater* 28:369-377.
- 73) Ambre AH, Katti DR, Katti KS. 2013. Nanoclays mediate stem cell differentiation and mineralized ECM formation on biopolymer scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101A:2644–2660.

- 74)Feng R, Zhang Y, Li H, Wu D, Xin X, Zhang S, Yu H, Wei Q, Du B. 2013. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for zeranol detection based on signal amplification strategy of nanoporous gold films and nanomontmorillonite as labels, *Analytica Chimica Acta* 758:72–79.
- 75)Koo JH, 2006, *Polymer Nanocomposites: Processing, Characterization, and Applications*. The McGraw-Hill Companies, Inc. Nueva York.
- 76)Cao G. 2004. *Nanostructures & Nanomaterials Synthesis, Properties & Applications*. Imperial College Press, Londres.
- 77)McCabe W, Smith J, Harriott P. 1994. *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química*. McGraw-Hill, 4th ed. Madrid, España.
- 78)Tomohoro I, Naoya M, Satotu W. 2010. Size Control of Magnetite Nanoparticles by Organic Solvent-Free Chemical Coprecipitation at Room Temperature, *J Exp Nanosci* 5:251-262.
- 79)Ramírez Palma MT, Huirache Acuña R, Espinosa Acosta G, Hernández Padrón G. 2010. Estado del Arte del Proceso Sol-Gel en México, *Ciencia ergo sum* 17-2.
- 80)Ochoa Y, Ortegón Y, Rodríguez Páez JE. 2009. Síntesis de TiO<sub>2</sub>, fase anatasa, por el método sol-gel: estudio de la presencia de AcacH en el sistema, *Rev Fac Ing Univ Antioquia* 52:29-40.
- 81)Lordan S, Higginbotham CL. 2012. Effect of serum concentration on the cytotoxicity of clay particles, *Cell Biol Int* 36:57–61
- 82)Oostingh GJ, Casals E, Italiani P, Colognato R, Stritzinger R, Ponti J, Pfaller T, Kohl Y, Ooms D, Favilli F, Leppens H, Lucchesi D, Rossi

- F, Nelissen I, Thielecke H, Puntjes VF, Duschl A, Boraschi D. 2011. Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects, *Particle and Fibre Toxicology* 8:8.
- 83) Dobrovolskaia MA, McNeil SE. 2013. Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines. *Journal of Controlled Release* 172:456–466.
- 84) Pailleux M, Boudard D, Pourchez J, Forest V, Grosseau P, Cottier M. 2013. New insight into artifactual phenomena during in vitro toxicity assessment of engineered nanoparticles: Study of TNF- $\alpha$  adsorption on alumina oxide nanoparticle, *Toxicology in Vitro* 27:1049–1056.
- 85) Hosseini MS, Tazzoli-Shadpour M, Amjadi I, Haghighipour N, Shokrgozar MA, Boroujerdnia MG. 2012. Relationship Between Cell Compatibility and Elastic Modulus of Silicone Rubber/Organoclay Nanobiocomposites, *J Nat Pharm Prod* 7:65–70.
- 86) Baek M, Kim IS, Yu J, Chung HE, Choy JH, Choi SJ. 2011. Effect of different forms of anionic nanoclays on cytotoxicity, *J Nanosci Nanotechnol* 11:1803-6.
- 87) Wills MR, Savory J. 1989. Aluminum and chronic renal failure: sources, absorption, transport, and toxicity. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 27:59-107.
- 88) Murphy E J, Roberts E, Horrocks LA. 1993. Aluminum silicate toxicity in cell cultures, *Neuroscience* 55:597-605.

- 89)Murphy EJ, Roberts E, Anderson K, Horrocks L A. 1993. Cytotoxicity of aluminum silicates in primary neuronal cultures, *Neuroscience* 57:483-490.
- 90)Maisanaba S, Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Moreno FJ, Jordá M, Cameán AM, Aucejo S, Jos A. 2014. Toxic effects of a modified montmorillonite clay on the human intestinal cell line Caco-2, *Journal of Applied Toxicology* 34:714–725.
- 91)Zia KM, Zuber M, Barikani M, Hussain R, Jamil T, Anjum S. 2011. Cytotoxicity and mechanical behavior of chitin–bentonite clay based polyurethane bio-nanocomposites, *International Journal of Biological Macromolecules* 49:131–1136.
- 92)Smirnova VV, Tananova ON, Shumakova AA, Trushina EN, Avren'eva LI, Bykova IB, Minaeva LP, Soto SKh, Lashneva NV, Gmoshinskiĭ IV, Khotimchnko SA. 2012. Toxicological and sanitary characterization of bentonite nanoclay. *Gig Sanit* 3:76-8.
- 93)Reeuwijk N, Klerx WN, Kooijman M, Hoogenboom LA, Rietjens IM, Martena MJ. 2013. Levels of lead, arsenic, mercury and cadmium in clays for oral use on the Dutch market and estimation of associated risks, *Food additives & Contaminants: Part A* 30:1535-1545.
- 94)Lemke SL, Mayura K, Reeves WR, Wang N, Fickey C, Phillips TD. 2001. Investigation of organophilic montmorillonite clay inclusion in zearalenone-contaminated diets using the mouse uterine weight bioassay, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 62:243–258.

- 95) Tseng HJ, Lin JJ, Ho TT, Tseng SM, Hsu SH. 2011. The biocompatibility and antimicrobial activity of nanocomposites from polyurethane and nano silicate platelets, *Journal of Biomedical Materials Research A* 99A:192-202.
- 96) Lambert V, Boukhari R, Nacher M, Goullé JP, Roudier E, Elguindi W, Laquerrière A, Carles G. 2010. Plasma and Urinary Aluminum Concentrations in Severely Anemic Geophagous Pregnant Women in the Bas Maroni Region of French Guiana: A Case-Control Study, *Am J Trop Med Hyg* 83:1100–1105.
- 97) Sun J, Zhang Q, Wang Z, Yan B. 2013. Effects of Nanotoxicity on Female Reproductivity and Fetal Development in Animal Models, *Int J Mol Sci* 14:9319-9337
- 98) Wiles M, Huebner H, Afriyie-Gyawu E, Taylor R, Bratton G, Phillips T. 2004. Toxicological evaluation and metal bioavailability in pregnant rats following exposure to clay minerals in the diet, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 67:863–874.
- 99) Sayes C, Ivanov I. 2010. Comparative study of predictive computational models for nanoparticle-induced cytotoxicity, *Risk Anal* 30:1723-34.
- 100) Liu R, Rallo R, Bilal M, Cohen Y. 2015. Quantitative Structure-Activity-Relationships for Cellular Uptake of Surface-Modified Nanoparticles. *Comb Chem High Throughput Screen*. In press
- 101) Gajewicz A, Cronin MT, Rasulev B, Leszczynski J, Puzyn T. 2015. Novel approach for efficient predictions properties of large pool of

nanomaterials based on limited set of species: nano-read-across, Nanotechnology 26:015701.

- 102) Mostaghaci B, Susewind J, Kickelbick G, Lehr CM, Loretz B. 2015. Transfection system of amino-functionalized calcium phosphate nanoparticles: in vitro efficacy, biodegradability, and immunogenicity study, ACS Appl Mater Interfaces 7:5124-5133.
- 103) Dianat O, Azadnia S, Mozayeni MA. 2015. Toxicity of calcium hydroxide nanoparticles on murine fibroblast cell line, Iran Endod J 10:49-54.
- 104) Adesina SK, Holly A, Kramer-Marek G, Capala J, Akala EO. 2014. Polylactide-based paclitaxel-loaded nanoparticles fabricated by dispersion polymerization: characterization, evaluation in cancer cell lines, and preliminary biodistribution studies, J Pharm Sci 103:2546-55.
- 105) Hu X, Cook S, Wang P, Hwang HM, Liu X, Williams QL. 2010. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered carbon nanotubes in selected human cell lines, Sci Total Environ 408:1812-7.
- 106) Freese C, Schreiner D, Anspach L, Bantz C, Maskos M, Unger RE, Kirkpatrick C. 2014. In vitro investigation of silica nanoparticle uptake into human endothelial cells under physiological cyclic stretch Part Fibre Toxicol 11:1.

- 107) Somagoni J, Boakye CH, Godugu C, Patel AR, Mendonca Faria HA, Zucolotto V, Singh M. 2014. Nanomiengel a novel drug delivery system for topical application--in vitro and in vivo evaluation, *PLoS One* 9:e115952.
- 108) Poulsen SS, Saber AT, Williams A, Andersen O, Købler C, Atluri R, Pozzebon ME, Mucelli SP, Simion M, Rickerby D, Mortensen A, Jackson P, Kyjovska ZO, Mølhav K, Jacobsen NR, Jensen KA, Yauk CL, Wallin H, Halappanavar S, Vogel U. 2014. MWCNTs of different physicochemical properties cause similar inflammatory responses, but differences in transcriptional and histological markers of fibrosis in mouse lungs, *Toxicol Appl Pharmacol* 284:16-32.
- 109) Kasturirangan V, Nair BM, Kariapper MT, Lesniak WG, Tan W, Bizimungu R, Kanter P, Toth K, Buitrago S, Rustum YM, Hutson A, Balogh LP, Khan MK. 2013. In vivo toxicity evaluation of gold-dendrimer composite nanodevices with different surface charges, *Nanotoxicology* 7:441-51.
- 110) Jovanović B, Whitley EM, Palić D. 2014. Histopathology of fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to hydroxylated fullerenes, *Nanotoxicology* 8:755-63.
- 111) Bulcão RP, de Freitas FA, Dallegrave E, Venturini CG, Baierle M, Durgante J, Sauer E, Cassini C, Cerski CT, Zielinsky P, Salvador M, Pohlmann AR, Guterres SS, Garcia SC. 2014. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration, *Eur J Pharm Biopharm* 86:167-77.

- 112) Ambrosone A, Marchesano V, Mazzarella V, Tortiglione C. 2014. Nanotoxicology using the sea anemone *Nematostella vectensis*: from developmental toxicity to genotoxicology, *Nanotoxicology* 8:508-20.
- 113) Hu YL, Qi W, Han F, Shao JZ, Gao JQ. 2011. Toxicity evaluation of biodegradable chitosan nanoparticles using a zebrafish embryo model, *Int J Nanomedicine* 6:3351-3359.
- 114) Demir E, Vales G, Kaya B, Creus A, Marcos R. 2011. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*, *Nanotoxicology* 5:417-24.
- 115) <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/cd-1-mouse>
- 116) [http://www.harlan.com/products\\_and\\_services/research\\_models\\_and\\_services/research\\_models/icr\\_cd1\\_outbred\\_mice.html](http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models/icr_cd1_outbred_mice.html)
- 117) Silbergeld EK, Contreras EQ, Hartung T, Hirsch C, Hogberg H, Jachak AC, Jordan W, Landsiedel R, Morris J, Patri A, Pounds JG, de Vizcaya Ruiz A, Shvedova A, Tanguay R, Tatarazako N, van Vliet E, Walker NJ, Wiesner M, Wilcox N, Zurlo J. 2011. t<sup>4</sup> workshop report. Nanotoxicology: "the end of the beginning" - signs on the roadmap to a strategy for assuring the safe application and use of nanomaterials, *ALTEX* 28:236-41.
- 118) Vergaro V, Abdullayev E, Lvov Y M, Zeitoun A, Cingolani R, Rinaldi R, Leporatti S. 2010. Cytocompatibility and uptake of halloysite clay nanotubes, *Biomacromolecules* 11:820–826.

- 119) Sateriale A, Vaithilingam A, Donnelly L, Miller P, Huston CD, 2012. Feed-forward regulation of phagocytosis by *Entamoeba histolytica*, *Infection and Immunity* 80:4456–4462.
- 120) Carrero-Sánchez JC, Elías AL, Mancilla R, Arrellín G, Terrones H, Laclette JP, Terrones M. 2006. Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen, *Nano Letters* 6:1609–1616.
- 121) Elías AL, Carrero-Sánchez JC, Terrones H, Endo M, Laclette JP, Terrones M. 2007 Viability studies of pure carbon- and nitrogen-doped nanotubes with *Entamoeba histolytica*: from amoebicidal to biocompatible structures, *Small* 3:1723-9.
- 122) Viseras C, Lopez-Galindo A. 1999. Pharmaceutical applications of some Spanish clays (sepiolite, palygorskite, bentonite), *Applied Clay Science* 14:69–82.
- 123) Andronescu E, Grigore F, Tardei C, Stefan E. 2006. Natural zeolites with medical applications—preliminary preparation and characterization, *Revista Medico: Chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi's* 110:236–241.
- 124) Zarkovic N, Zarkovic K, Kralj M, Borovic S, Sabolovic S, Blazi MP, Cipak A, Pavelic K. 2003. Anticancer and antioxidative effects of micronized zeolite clinoptilolite, *Anticancer Research* 23:1589–1595.
- 125) Pavelić K, Hadzija M, Bedrica L, Pavelić J, Dikić I, Katić M, Kralj M, Bosnar MH, Kapitanović S, Poljak-Blazi M, Krizanac S, Stojković

- R, Jurin M, Subotić B, Colić M. 2001. Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy, *Journal of Molecular Medicine* 78:708–720.
- 126) Delavarian M, Hassanvand A, Gharibzadeh S, Increasing performance in children with ADHD by trapping lead with a nano-zeolite, *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 25:E22–E23.
- 127) Elmore A R. 2003. Final report on the safety assessment of aluminum silicate, calcium silicate, magnesium aluminum silicate, magnesium silicate, magnesium trisilicate, sodium magnesium silicate, zirconium silicate, attapulgite, bentonite, Fuller's earth, hectorite, kaolin, lithium magnesium silicate, lithium magnesium sodium silicate, montmorillonite, pyrophyllite, and zeolite, *International Journal of Toxicology* 22:37–102.
- 128) Adamis Z, Tátrai E, Honma K, Six É, Ungváry G. 2000. In vitro and in vivo tests for determination of the pathogenicity of quartz, diatomaceous earth, mordenite and clinoptilolite, *The Annals of Occupational Hygiene* 44:67–74.
- 129) IARC. 2013. Arsenic, metals, fibres, and dusts, in IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 100C of IARC Monograph for the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, p. 219.
- 130) Katic M, Bosnjak B, Gall-Troselj K, Dikic I, Pavelic K. 2006. A clinoptilolite effect on cell media and the consequent effects on tumor cells in vitro, *Frontiers in Bioscience* 11:1722–1732.

- 131) Ghosh AS, Dutta S, Raha S. 2010. Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*, *Parasitology International* 59:166–172.
- 132) Zazenski R, Ashton WH, Briggs D, Chudkowski M, Kelse JW, Maceachern L, Mccarthy EF, Nordhauser MA, Roddy MT, Teetsel NM, Wells AB, Gettings SD. 1995. Talc: occurrence, characterization, and consumer applications, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 21: 218–229.
- 133) Khan MI, Sahasrabuddhe AA, Patil G, Akhtar MJ, Ashquin M, Ahmad I. 2011. Nano-talc stabilizes TNF- $\alpha$  m-RNA in human macrophages, *Journal of Biomedical Nanotechnology* 7:112–113.
- 134) Chen B, Liu Y, Song WM, Hayashi Y, Ding XC, Li WH. 2011. In vitro evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by multiwalled carbon nanotubes in murine RAW 264.7 macrophages and human A549 Lung cells, *Biomedical and Environmental Sciences* 24:593–601.
- 135) Tripathy N, Hong TK, Ha KT, Jeong HS, Hahn YB. 2014. Effect of ZnO nanoparticles aggregation on the toxicity in RAW 264.7 murine macrophage, *Journal of Hazardous Materials* 270:110–117.
- 136) Zhang T, Tang M, Kong L, Li H, Zhang T, Zhang S, Xue Y, Pu Y. 2012. Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages, *Journal of Hazardous Materials* 219-220:203–212.

- 137) Elsabahy M, Zhang S, Zhang F, Deng ZJ, Lim YH, Wang H, Parsamian P, Hammond PT, Wooley KL. 2013. Surface charges and shell crosslinks each play significant roles in mediating degradation, biofouling, cytotoxicity and immunotoxicity for polyphosphoester-based nanoparticles," *Scientific Reports*, 3:article 3313.
- 138) Orłowski P, Krzyżowska M, Zdanowski R, Winnicka A, Nowakowska J, Stankiewicz W, Tomaszewska E, Celichowski G, Grobelny J. 2013. Assessment of in vitro cellular responses of monocytes and keratinocytes to tannic acid modified silver nanoparticles, *Toxicology in Vitro* 27:1798–1808.
- 139) Lordan S, Kennedy JE, Higginbotham CL, Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line, *Journal of Applied Toxicology* 31:27–35.
- 140) Martin RT, Bailey SW, Eberl DD. 1991. Report of the clay minerals society nomenclature committee: revised classification of clay materials, *Clays and Clay Minerals* 39:333–335.
- 141) Lombaert N, Lison D, van Hummelen P, Kirsch-Volders M. 2008. In vitro expression of hard metal dust (WC-Co) responsive genes in human peripheral blood mononucleated cells, *Toxicology and Applied Pharmacology* 227:299–312.
- 142) Pettit AP, Brooks A, Laumbach R, Fiedler N, Wang Q, Strickland PO, Madura K, Zhang J, Kipen HM. 2012. Alteration of peripheral blood

monocyte gene expression in humans following diesel exhaust inhalation, *Inhalation Toxicology* 24:172–181.

- 143) Bosetti M, Zanardi L, Bracco P, Costa L, Cannas M. 2003. In vitro evaluation of the inflammatory activity of ultra-high molecular weight polyethylene, *Biomaterials* 24:1419–1426.
- 144) Laverny G, Casset A, Purohit A, Schaeffer E, Spiegelhalter C, de Blay F, Pons F. 2013. Immunomodulatory properties of multi-walled carbon nanotubes in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects and allergic patients, *Toxicology Letters* 217:91–101.
- 145) Tuomela S, Autio R, Buerki-Thurnherr T, Arslan O, Kunzmann A, Andersson-Willman B, Wick P, Mathur S, Scheynius A, Krug HF, Fadeel B, Lahesmaa R. 2013. Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles, *PLoS ONE* 8:Article ID e68415.
- 146) Wilhelmi V, Fischer U, Weighardt H. 2013. Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner, *PLoS ONE* 8:Article ID e65704.
- 147) Guo X, Jagannath C, Espitia MG, Zhou X, Uptake of silica and carbon nanotubes by human macrophages/monocytes induces activation of fibroblasts in vitro potential implication for pathogenesis of inflammation and fibrotic diseases, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 25:713–719.

- 148) Pavelic K, Katic M, Sverko V, Marotti T, Bosnjak B, Balog T, Stojkovic R, Radacic M, Colic M, Poljak-Blazi M. 2002. Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic ability, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 128:37–44.
- 149) Schanen BC, Das S, Reilly CM, Warren WL, Self WT, Seal S, Drake DR 3rd. 2013. Immunomodulation and T helper TH1/TH2 response polarization by CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles, *PLoS ONE* 8:Article ID e62816.
- 150) Oh WK, Kim S, Choi M, Kim C, Jeong YS, Cho BR, Hahn JS, Jang J. 2010. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica—titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality, *ACS Nano* 4:5301–5313.
- 151) Semete B, Booyen LIJ, Kalombo L, Venter JD, Katata L, Ramalapa B, Verschoor JA, Swai H. 2010. In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles, *Toxicology and Applied Pharmacology* 249:158–165.
- 152) Poma A, Ragnelli AM, de Lapuente J, Ramos D, Borrás M, Aimola P, Di Gioacchino M, Santucci S, De Marzi L. 2014. In Vivo Inflammatory Effects of Ceria Nanoparticles on CD-1 Mouse: Evaluation by Hematological, Histological, and TEM Analysis, *Journal of Immunology Research* 2014:1-14.

- 153) Isaza-M G, Arango-M MC, Buriticá OP, Marulanda H. 2005. Determinación de la toxicidad subcrónica de la *Zebrina péndula* en ratones. *Biosalud* 14:67 – 77.
- 154) Younes NR, Amara S, Mrad I, Ben-Slama I, Jeljeli M, Omri K, El Ghoul J, El Mir L, Rhouma KB, Abdelmelek H, Sakly M. 2015. Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination, *Environ Sci Pollut Res Int*. In press.
- 155) Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B. 2010. Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production, *Neurobiol Aging* 33:199.e1-12.
- 156) Oberdörster G. 2002. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles, *Inhal Toxicol* 14:29-56
- 157) Huang KT, Wu CT, Huang KH, Lin WC, Chen CM, Guan SS, Chiang CK, Liu SH. 2014. Titanium Nanoparticle Inhalation Induces Renal Fibrosis in Mice via an Oxidative Stress Upregulated Transforming Growth Factor- $\beta$  Pathway, *Chem Res Toxicol*. In press.

## Research Article

# Effect of Clinoptilolite and Sepiolite Nanoclays on Human and Parasitic Highly Phagocytic Cells

Yanis Toledano-Magaña,<sup>1</sup> Leticia Flores-Santos,<sup>2</sup> Georgina Montes de Oca,<sup>2</sup>  
Alfonso González-Montiel,<sup>2</sup> Juan-Pedro Laclette,<sup>1</sup> and Julio-César Carrero<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, Mexico

<sup>2</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico, S.A. de C.V., Avenida de los Sauces No. 87, Mz 6, Parque Industrial Lerma, 52000 Toluca, Mexico

Correspondence should be addressed to Julio-César Carrero; carrero@biomedicas.unam.mx

Received 1 August 2014; Revised 22 October 2014; Accepted 23 October 2014

Academic Editor: Abraham Landa-Piedra

Copyright © 2015 Yanis Toledano-Magaña et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Nanoclays have potential applications in biomedicine raising the need to evaluate their toxicity in *in vitro* models as a first approach to its biocompatibility. In this study, *in vitro* toxicity of clinoptilolite and sepiolite nanoclays (NC) was analyzed in highly phagocytic cultures of amoebas and human and mice macrophages. While amebic viability was significantly affected only by sepiolite NC at concentrations higher than 0.1 mg/mL, the effect on macrophage cultures was dependent on the origin of the cells. Macrophages derived from human peripheral blood monocytes were less affected in viability (25% decrease at 48 h), followed by the RAW 264.7 cell line (40%), and finally, macrophages derived from mice bone marrow monocytes (98%). Moreover, the cell line and mice macrophages die mainly by necrosis, whereas human macrophages exhibit increased apoptosis. Cytokine expression analysis in media of sepiolite NC treated cultures showed a proinflammatory profile (INF $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-8, and IL-6), in contrast with clinoptilolite NC that induced less cytokines with concomitant production of IL-10. The results show that sepiolite NC is more toxic to amoebas and macrophages than clinoptilolite NC, mostly in a time and dose-dependent manner. However, the effect of sepiolite NC was comparable with talc powder suggesting that both NC have low cytotoxicity *in vitro*.

## 1. Introduction

Clinoptilolite and sepiolite clay are zeolites that belong to a complex group of aluminosilicates used for nanocomposites applications [1, 2]. They are used as metal oxides supports, antimicrobials [3], enzyme stabilizers [4], for absorption of heavy metals [5–7], and additives for the development of nanocomposites [8]. Because of this, in the last decade they have attracted increasing interest in biomedicine, mainly, nanoclays (NC) dispersed into polymeric matrices which have been proposed as good candidates for drug delivery systems [9–14], dental adhesives [15], bone tissue engineering [16], and immunosensors [17]. However, their use in humans has been hampered by the insufficient information regarding their safety, and toxicological assessment on *in vitro* and *in vivo* models is absolutely necessary [18–20]. These evaluations

are needed because the properties of nanomaterials, such as the surface area, zeta potential, and size, can modify their biological interactions compared to microsized materials [21]. Moreover, it has been reported that toxicity of nanomaterials also depends on the model used [22], emphasizing the need for appropriate methodologies and a unified evaluation [23].

According to the International Agency for Research on Cancer, there are few reports regarding *in vitro* and *in vivo* clinoptilolite and sepiolite NC biocompatibility [24]. In this sense, macrophages can be an appropriate model for *in vitro* cytotoxic studies [25, 26] due to the NC applications as nanovehicles which can reach the bloodstream and other tissues. Macrophages are pivotal cells of the innate immune response, specialized in the scavenging of foreign bodies in mammals and widely used in toxicity assays [27–29]; besides, macrophages are considered one of the most phagocytic cells

in mammals. On the other hand, the amoeba *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis, is among the most active phagocytic and proteolytic cells in nature, and it has been used as a model to evaluate toxicity of carbon nanotubes [30]. Even though the two systems are quite far apart (mammal and protozoan, for defense and feeding, resp.), they share the characteristic of being the most active highly phagocytic cells in nature, favoring the uptake of the material and the study of toxicity thereof even at low concentrations. In this work, we evaluated the cytotoxicity of clinoptilolite and sepiolite NC *in vitro* by determining their effect on the viability of macrophages from human, mice, and the RAW 264.7 cell line as well as in *E. histolytica* trophozoite cultures, the type of cell death induced (apoptosis or necrosis), and the cytokine profiles released by treated macrophages, all of them as a first approach to determining clinoptilolite and sepiolite NC biocompatibility.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Characterization of Clinoptilolite and Sepiolite NC.** Characterization analysis was performed in the USAI, Facultad de Química, UNAM. To determine the chemical structure of NC, X-ray powder diffraction was obtained in a Bruker diffractometer model D8 Advance, with a copper anode as X-ray source ( $K_{\alpha 1} = 0.154060$  nm); chemical composition was determined using a ICP-ms, Bruker Aurora M90 following the percentage of the enlisted elements Si, Al, Fe, Ca, Mg, Ti, P, Mn, Na, K, and S. Finally, samples after the suspension procedure in culture media (below) were observed in Low Vacuum Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Qualitative and semiquantitative microanalysis was performed to determine the size and shape of nanoclays.

**2.2. Nanoclays and Talc Suspension.** Suspensions of clinoptilolite NC (Valfor-100, Silicatos y derivados S.A. de C.V. Mexico), sepiolite NC (sepiolite powder, Sigma-Aldrich, USA) and asbestos-free talc powder (Talc, tested according to Ph. Eur; Sigma-Aldrich, USA) were obtained by sonication of each NC in culture media four times during 15 s each with amplitude of 50% and a frequency of 130 kHz using a sonicator tip Branson Sonifier, USA. TYIS-33 media supplemented with 10% of adult bovine serum and high glucose DMEM media supplemented with 10% of fetal bovine serum were used for amoeba and macrophages, respectively. This treatment was efficient preventing NC aggregates without affecting particle size (data not shown). Stock suspensions of each NC containing 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in each media were prepared as mentioned, stored at 4°C, and used for the following experiments.

**2.3. Parasite Culture and Treatment.** *E. histolytica* HMI-IMSS trophozoites were axenically grown at 37°C in TYI-S33 medium supplemented with 10% bovine serum, 3% vitamins (Diamond Vitamin Tween 80 Solution 40x, Sigma Aldrich, USA), and 0.1% antibiotic (Penicillin-Streptomycin 10,000 U/mL, GIBCO, USA). Amoebas ( $1 \times 10^5/\text{mL}$ ) were

placed in tubes with supplemented TYI-S33 and added with clinoptilolite or sepiolite NC so that the final volume was 3 mL and the concentrations of clinoptilolite and sepiolite NC were as follows: 10, 100, 500, and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**2.4. Amoebic Viability.** The viability and morphology of amoebic trophozoites were assessed at 24, 48, and 72 h of coincubation with the NC employing two different methods: (1) the vital marker trypan blue to evaluate viability and (2) the carboxyfluorescein diacetate (CFDA Vibrant kit, Invitrogen, USA) plus propidium iodide to evaluate morphology. In brief, amoebic culture tubes were incubated on ice for 5 min in order to detach the parasites, and 10  $\mu\text{L}$  of Trypan blue 0.4% or 1  $\mu\text{L}$  CFDA 5  $\mu\text{M}$  plus 1  $\mu\text{L}$  propidium iodide 1.5  $\mu\text{M}$  was added to aliquots of 100  $\mu\text{L}$  and incubated at room temperature for 15 min. Viable and dead cells were counted in a fluorescence microscope Olympus BX51 using a haemocytometer. Of six independent experiments each one by triplicate was done for each NC assayed.

**2.5. Macrophage Culture.** Macrophages from three different sources were used: macrophages derived from human peripheral blood monocytes (HMDM), macrophages derived from CD1 mice bone marrow monocytes (MMDM), and the RAW 264.7 cell line. HMDM were derived from monocytes isolated from blood samples of 10 healthy individuals at the Hospital Arnau de Vilanova (Lleida, Spain) with written consent. Monocytes were isolated in a Ficoll gradient and then placed in Petri dishes with supplemented RPMI 1640 medium at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 5 days, changing the medium every 48 h for the monocytes differentiation into macrophages.

MMDM were obtained from four-week-age CD1 mice. Once euthanized, the femur and tibia were carefully removed and kept in PBS. After treatment with absolute ethanol for 3 min, the femur and tibia were washed with RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% gentamicin, and 1% of 2-mercaptoethanol. Bone marrow cells were removed from the bones using scissors, washed twice with nonsupplemented RPMI 1640 medium, and followed by erythrocytes lysis. Adherent white blood cells were washed with PBS and suspended in supplemented RPMI 1640 medium. Cells were harvested in Petri dishes with 10 mL of medium and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, changing the medium every 48 h during 5 days for monocytes differentiation into macrophages. The RAW 264.7 cell line was cultured in RPMI 1640 medium supplemented as described above and maintained at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub>. Macrophages were sorted by flow cytometry using a specific F4/80 antibody.

**2.6. Macrophages Treatment with the NC and Viability Assays.** Effect of clinoptilolite and sepiolite NC was determined for the three types of macrophages. For each experiment,  $1 \times 10^5$  macrophages per well were placed in 96-well plate with 100  $\mu\text{L}$  of supplemented RPMI 1640 and enough NC suspension to reach concentrations of 10, 100, 500, and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in each well. RAW 264.7 and MMDM culture treated were incubated for 60 h, whereas HMDM were

incubated only during 48 h, taking an aliquot every 12 h for determining viability and death as described below. Of three independent experiments each one by triplicate was done for each NC assayed. There are no reports of the concentrations of clinoptilolite and sepiolite NC to which humans could be exposed; however, the reports where NC toxicity has been analyzed reported concentrations between 1 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**2.7. Transmission Electron Microscopy.** Amoebic and macrophage culture treated with each NC were centrifuged at 1800 rpm for 5 min and washed 3 times with phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4). Cells were then fixed in 4% formaldehyde and 1% glutaraldehyde in PBS by mixing equal volume of fixative and cell suspension. After centrifugation at 1800 rpm for 10 min, the pellet was kept in fresh fixative overnight. Then, the cells were treated 3 times for 15 min with 8% (0.2 M) sucrose in PBS after fixation with 1% OsO<sub>4</sub> in PBS for 1 h and rinsed with PBS for 30 min. For dehydration process, ethanol solutions (50, 70, and 95%) were added to the pellets for 15 min each one, absolute ethanol for 15 min twice, and 100% of propylene oxide for 30 min. Infiltration was done with LR white resin (Ted Pella Inc., USA), first adding 1:1 LR White: Propylene Oxide for 2 h to the pellets and then stored overnight in 2:1 LR White: Propylene Oxide. Samples were embedded in gelatin capsules and baked in 60°C oven for 48 h. Ultrathin sections of 0.5  $\mu\text{m}$  were collected on Formvar/Carbon 200 mesh and Nickel grids and stained with uranyl acetate for 15 min and lead citrate for 3 min.

**2.8. Viability, Apoptosis and Necrosis.** The viability, apoptosis, and necrosis of macrophages treated with NC were determined every 12 h using the Annexin V-FITC Apoptosis detection kit I (BD Pharmingen, USA), according to the protocol of BD Pharmingen. Briefly, for each time point, the culture medium of each well was placed in an Eppendorf Tube and stored at -20°C until use for cytokine analysis, and the wells were refilled with 100  $\mu\text{L}$  of PBS. Annexin V and propidium iodide markers were added and the cells further incubated for 15 min. After the incubation time, the cells were fixed with 50  $\mu\text{L}$  of a stock solution of p-formaldehyde 3.7%, and the samples were read in a FACS Canto flow cytometer (Becton Dickinson, USA).

**2.9. Th1, Th2, and Treg Cytokines Determination.** The cytokine secretion pattern of macrophages incubated with clinoptilolite or sepiolite NC was determined in the supernatant of cultures at 24, 36, and 48 h after coincubation. The expression of GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, and TNF- $\alpha$  was measured using the mouse and human Th1/Th2 10plex FlowCytomix Multiplex kit (eBioscience, USA) according to the provider protocol. Briefly, marked beads were added to the supernatant, and after incubation for 15 min the cytokines were measured in a FACS Canto flow cytometer.

**2.10. Statistical Analysis.** Data were analyzed with a Two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ) followed by a Tuckey post hoc test ( $P < 0.05$ ) (Microsoft Excel, 2010).

### 3. Results

**3.1. Characterization of Clinoptilolite and Sepiolite NC.** X-ray powder diffraction pattern of nanoclays showed a typical distribution of diffraction planes associated with the sepiolite and clinoptilolite zeolites. Sepiolite NC pattern showed a perfect match with the pattern obtained from PDF-2 database of ICDD (International Center for Diffraction Data) and the clinoptilolite NC pattern corresponded to a Nickel Ammonium Aluminium Silicon Hydroxide Oxide Hydrate (see Figure S1 in the Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2015/164980>). The chemical composition of nanoclays was determined by atomic absorption spectroscopy resulting in clinoptilolite nanoclays: 21.7% Na<sub>2</sub>O, 0.0078% MgO, 57.3% SiO<sub>2</sub>, 9.2% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 1.4% CaO, 1% TiO<sub>2</sub>, 0.01% MnO, and for sepiolite nanoclays: 2.16% Na<sub>2</sub>O, 27.79% MgO, 37.15% SiO<sub>2</sub>, 12.01% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 3.72% K<sub>2</sub>O, 3.92% CaO, 3.60% TiO<sub>2</sub>, and 7.22% MnO. In addition, the microanalysis of metallic elements and carbon was evaluated in the SEM micrographs (Figure S2). Results showed that 80% of clinoptilolite nanoparticles had a size down to 30 nm, with an average size of 17.5 nm, and 70% of sepiolite nanoparticles had a diameter size down to 20 nm. As this nanoclay is a fiber, fibers over 500 nm were also found (Figure 1).

**3.2. Effect of Clinoptilolite and Sepiolite Nanoclays on *E. histolytica* Cultures.** The viability and growth of *E. histolytica* trophozoites were affected to different extents by the nanoclays. When treated with clinoptilolite NC, viability and growth were not significantly affected by incubation with any concentration at any time evaluated (Figure 2(a)). The integrity of trophozoites treated with clinoptilolite NC was confirmed on CFDA plus PI stained cells under fluorescence microscopy. In contrast, treatment with sepiolite NC, decreases the viability of trophozoites around 13 to 21% at 72 h with concentrations higher than 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$  with respect to the untreated cultures). A slight recovery of amoebic viability was observed at 48 h for cultures treated with 100 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; this recovery was apparent for cultures treated with 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  until 72 h posttreatment (Figure 2(b)). The staining with CFDA plus PI showed that viability of amoebas seems to diminish over the time in a dose dependent manner, shifting from green to yellowish fluorescence, including red nuclei of death cells (Figure 2(c)).

In order to demonstrate the uptake and cellular location of NC on treated cells, transmission electron microscopy (TEM) of *E. histolytica* trophozoites and human peripheral blood macrophages treated for 24 h with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of each NC was performed. Clinoptilolite NC were found dispersed in the cytosol and as aggregates inside the amoebic vacuoles (Figure 3(b)); in contrast, sepiolite NC were mainly found as aggregates inside large vacuoles and, in some cases, seem to cause the rupture of the vacuolar membrane (Figure 3(c), red arrow). In HMDM, clinoptilolite NC were observed inside phagocytic vacuoles larger than those observed in the amoebic cultures (Figure 2(e), green arrow); in the case of sepiolite NC, the distribution and size of the phagocytic

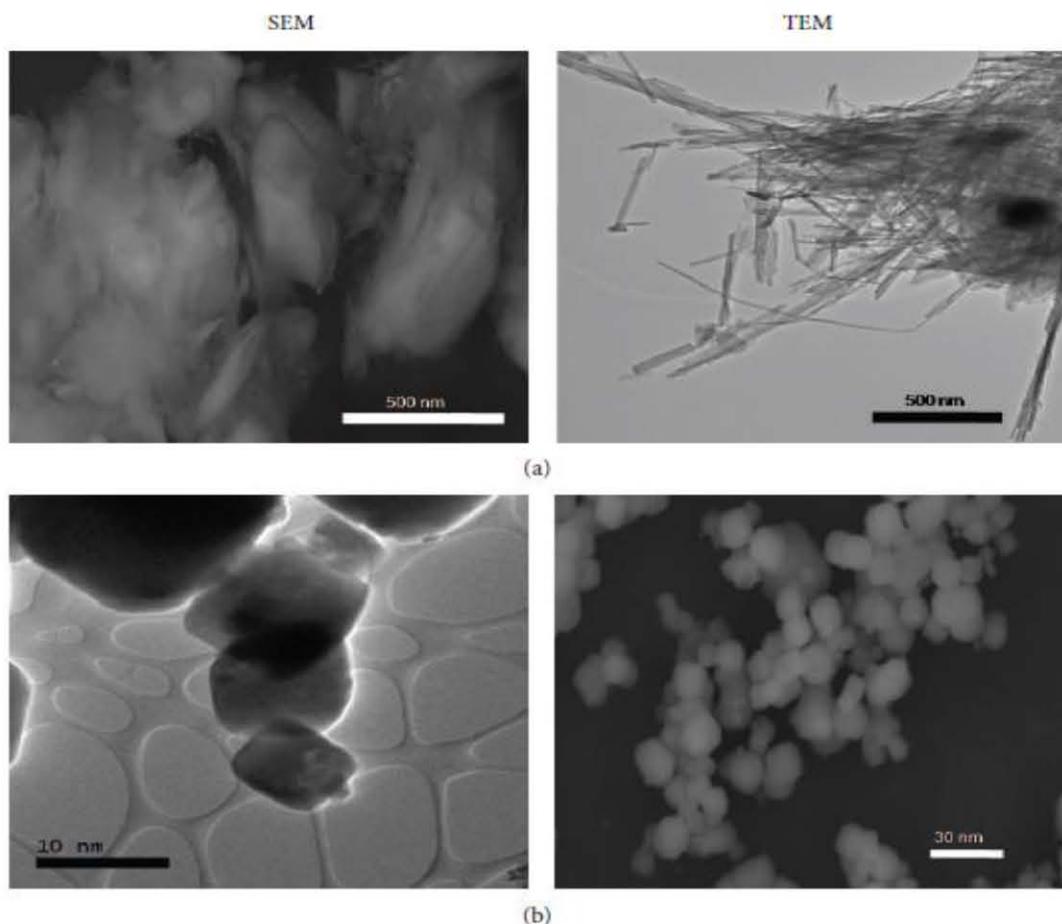


FIGURE 1: Transmission and scanning electron microscopy of sepiolite and clinoptilolite nanoclays prepared in the DMEM culture media. Sepiolite nanoclays are fibers with a diameter size down to 20 nm (a), whereas clinoptilolite nanoclays are deformed octahedrons with a size down to 30 nm (b).

vacuoles were similar to those of amoebas (Figure 3(f), pink arrow).

**3.3. Effect of Clinoptilolite and Sepiolite NC on Macrophage Cultures.** A dose and time dependent effect was observed on the viability of macrophages when treated with NC and talc, used here for comparing with the nanoparticle due to his long and proven history of safe use [31] as well as *in vitro* modest effect on peritoneal mouse macrophages [32]. Viability of RAW 264.7 macrophages decreased 15% at 24 h, reaching 20% at 60 h when treated with clinoptilolite NC, whereas sepiolite NC and talc affected the viability by 25% at 24 h to around 40% at 60 h (Figure 4; upper panels). HMDM showed a similar pattern but were less affected; in this case, clinoptilolite and sepiolite NC decreased the viability in around 25% and talc 14% at 60 h. However, a dramatic effect on the viability was rapidly observed in MMDM cultures, decreasing it to 65%, 73%, and 82% when treated with clinoptilolite NC, sepiolite NC, and talc at 24 h, respectively. The viability drops to 80%, 98%, and 88% at 60 h, respectively (Figure 4, upper panels). Cell death determined in the treated macrophage cultures using the Annexin V/propidium iodide kit showed that most RAW 264.7 and MMDM died by

necrosis at all assay time, with no clear distinction between the different treatments (Figure 4, lower panels). In contrast, HMDM cultures, which were the least affected in viability, showed that about two thirds of the cells die by apoptosis at all times tested, suggesting that the cell processes that activate in macrophages the clinoptilolite NC are different than those activated by sepiolite NC and talc, leading to different outcomes (Figure 4, middle panels).

**3.4. Cytokine Secretion Pattern from HMDM and MMDM Treated with NC.** The cytokines secreted by HMDM and MMDM (not RAW 264.7) in the presence of both NC and talc were determined in the culture media at 24, 36, and 48 h post-treatment by flow cytometry. Cytokines were undetectable at 12 h (data not shown) and were not determined at 60 h. In general terms, proinflammatory cytokines increased over the time in the two types of macrophages, but at different levels depending on treatments (Figure 5). A proinflammatory profile was clearer with sepiolite NC and the talc treatments, compared with clinoptilolite NC treatment. Thus, in HMDM treated with sepiolite NC or talc, some amounts of IL- $\alpha$  and IL-6 were detected that slightly increased over the time. In contrast, release of IL-6 and INF $\gamma$  was not detected

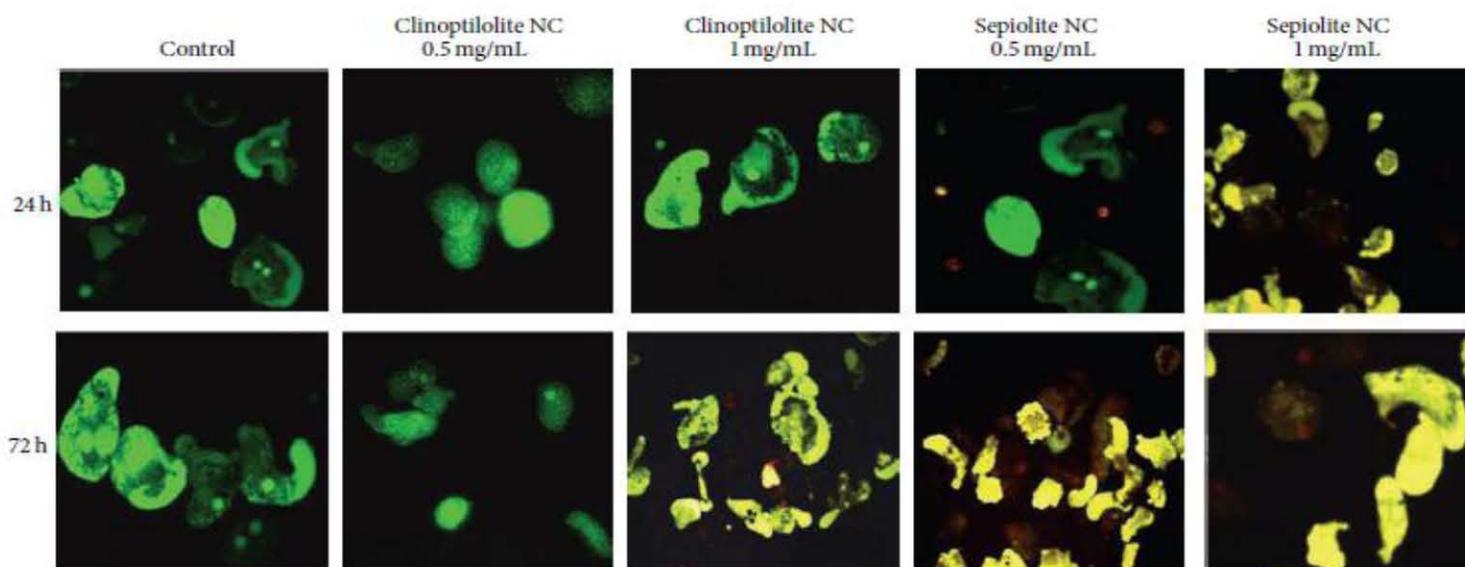
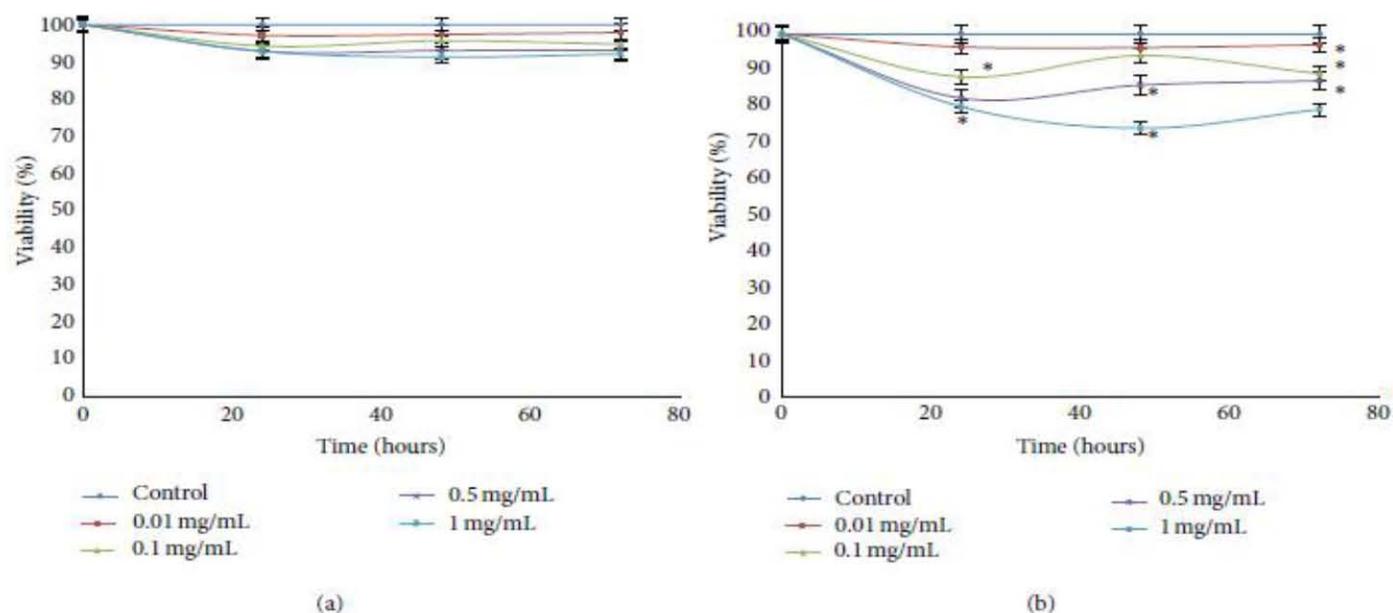


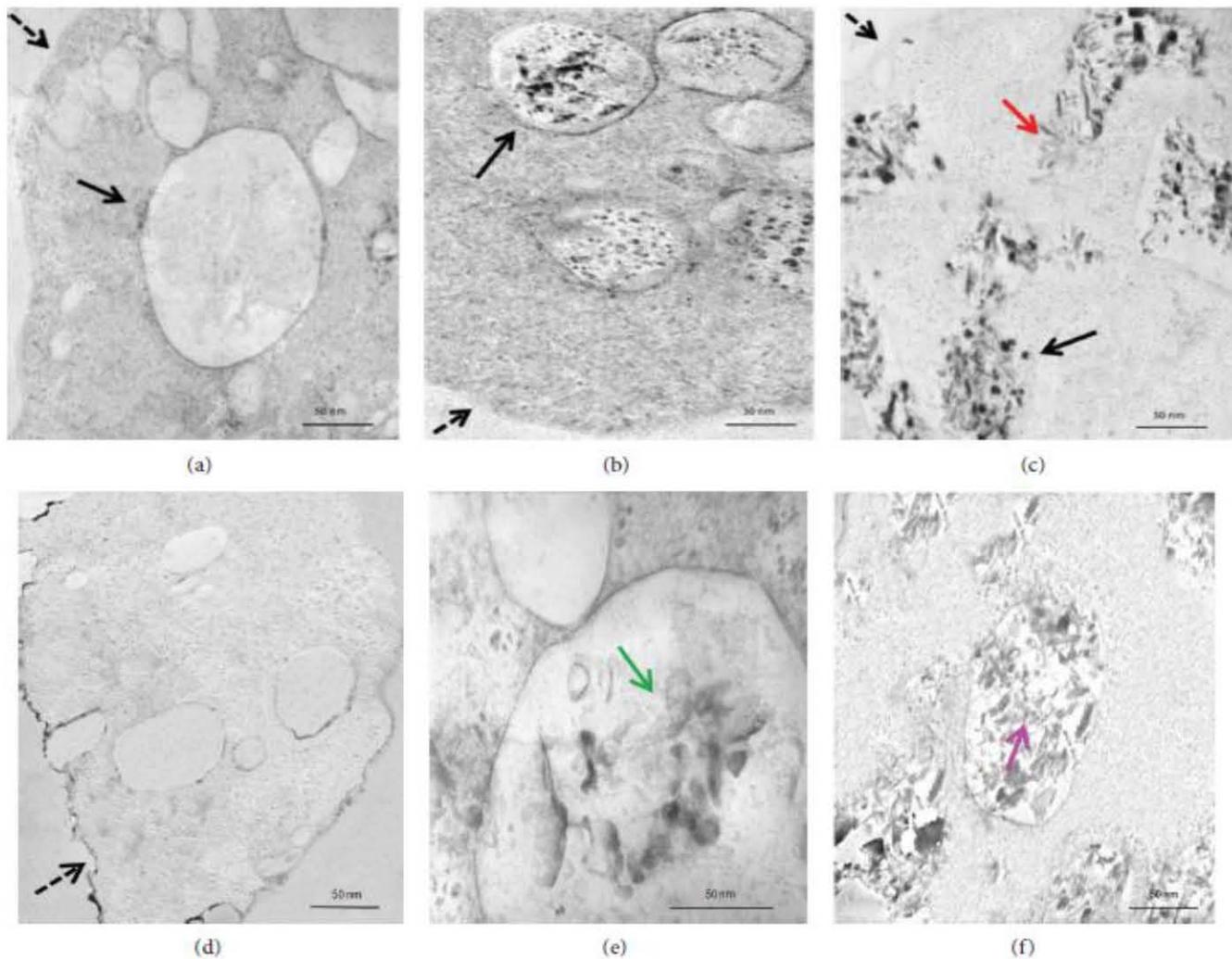
FIGURE 2: Viability of *E. histolytica* after the treatment with nanoclays. Amoebic cultures were treated with clinoptilolite (a) or sepiolite (b) NC for the period of time indicated and the viability measured by the Trypan blue method. Bottom pictures show CFDA/PI stained trophozoites from the treated cultures at the concentrations and time indicated. Controls are amoebas from a culture without treatment. The shifting of green to yellowish fluorescent indicates decrease of viability. Red nuclei come from dead cells.

in neither MMDM nor HMDM treated with clinoptilolite at any time evaluated (Figures 5(a) and 5(b), resp.). The cytokine/chemokine IL-8 was released without a clear pattern by any treatment, but its production was considerably higher in MMDM treated with sepiolite NC or talc, compared with clinoptilolite NC ( $P < 0.05$ ) (Figure 5(a)). Few levels of this cytokine were detected in medium from HMDM treated. The other cytokine highly expressed was IL-17, which appeared under any treatment at different times, with its production being higher in MMDM and HMDM treated with talc.  $\text{INF}\gamma$  was increasingly induced only by talc in MMDM and by sepiolite NC and talc in HMDM, but not by clinoptilolite NC. GM-CSF and Th2 cytokines IL-4 and IL-5 were not detected under any condition tested (not shown). Low levels

of the regulatory cytokine IL-10 were detected in media from treated MMDM (Figure 5(a)) in contrast with high levels detected in HMDM treated with clinoptilolite NC with respect to sepiolite NC and talc ( $P < 0.05$ ) (Figure 5(b)).

#### 4. Discussion

Clinoptilolite and sepiolite have been proposed for pharmaceutical applications including tablet manufacture [33], slow release systems [34], in combination with drugs for cancer therapy [35], being as adjuvants [36], being as adsorbent trapping lead in children with ADHD by intravenous administration [5], and, in general terms, for diverse therapy in humans [37]. In this sense, the development of nanoparticles as drug



**FIGURE 3:** Uptake of nanoclays by amoebas and macrophages. TEM of 5  $\mu\text{m}$  thickness cross section of amoebas (a–c) and human macrophages (d–f) nontreated (a) and (d) or treated with clinoptilolite NC (b) and (e) or sepiolite NC (c) and (f). Dashed arrows are showing the cytosolic membrane of amoebas and macrophages. Black arrows are showing the vacuolar membrane, many of them containing high accumulation of clinoptilolite and sepiolite NC. Red arrow shows a possible vacuolar membrane rupture for sepiolite NC accumulation. The green and pink arrows show the accumulation of clinoptilolite and sepiolite NC in macrophages, respectively.

delivery systems increased the interest in nanoclays [3–8] due to their physical and chemical properties in comparison to the natural clays. However, even if the toxicity of microsized clays has been evaluated [38, 39], the International Agency for Research on Cancer reports that there are few reports regarding *in vitro* and *in vivo* clinoptilolite and sepiolite NC biocompatibility [24]. Thereby, in this work we evaluated the cytotoxic effect of clinoptilolite and sepiolite NC in two of the most highly phagocytic cells reported [27–29], as a first approach to determining nanoclays biocompatibility. One of the precautions that need to be taken into account for *in vitro* tests with clinoptilolite is that this nanoclay could modify the ion composition of the culture media and thereof mask the toxicity of this nanoclay [40]. In order to prevent this, nanoclay suspensions stocks were prepared in supplemented TYI-S-33 and DMEM culture medium, exposing the nanoclays to serum and glucose prior to its addition to the experimental cultures decreasing the probability of affecting

the cellular cultures by the ion-exchange features of NC. In addition, the nanoclays suspensions were sonicated in order to reduce any possible unspecific effect of the NC aggregation. With this treatments we assumed that ion composition of the medium and dispersion ratio of NC was nearly constant during the experiments, so neither of the two is the principal cause of cellular death in our cultures.

Our results showed that even when both NC were highly phagocytosed by amoebas, clinoptilolite NC was not toxic to *E. histolytica* trophozoites, in contrast to sepiolite NC that showed significant cytotoxic effect, suggesting that clinoptilolite is less toxic than sepiolite NC, at least against the parasite. As the sepiolite NC-treated trophozoites did not show evidence of lysis or significant morphological changes, we think that amoebas probably die by an apoptotic process, a type of cellular death known that occurs in amoeba [41] (Figure 2). However, apoptosis of amoeba was not analyzed in this work and should be conducted in further studies.

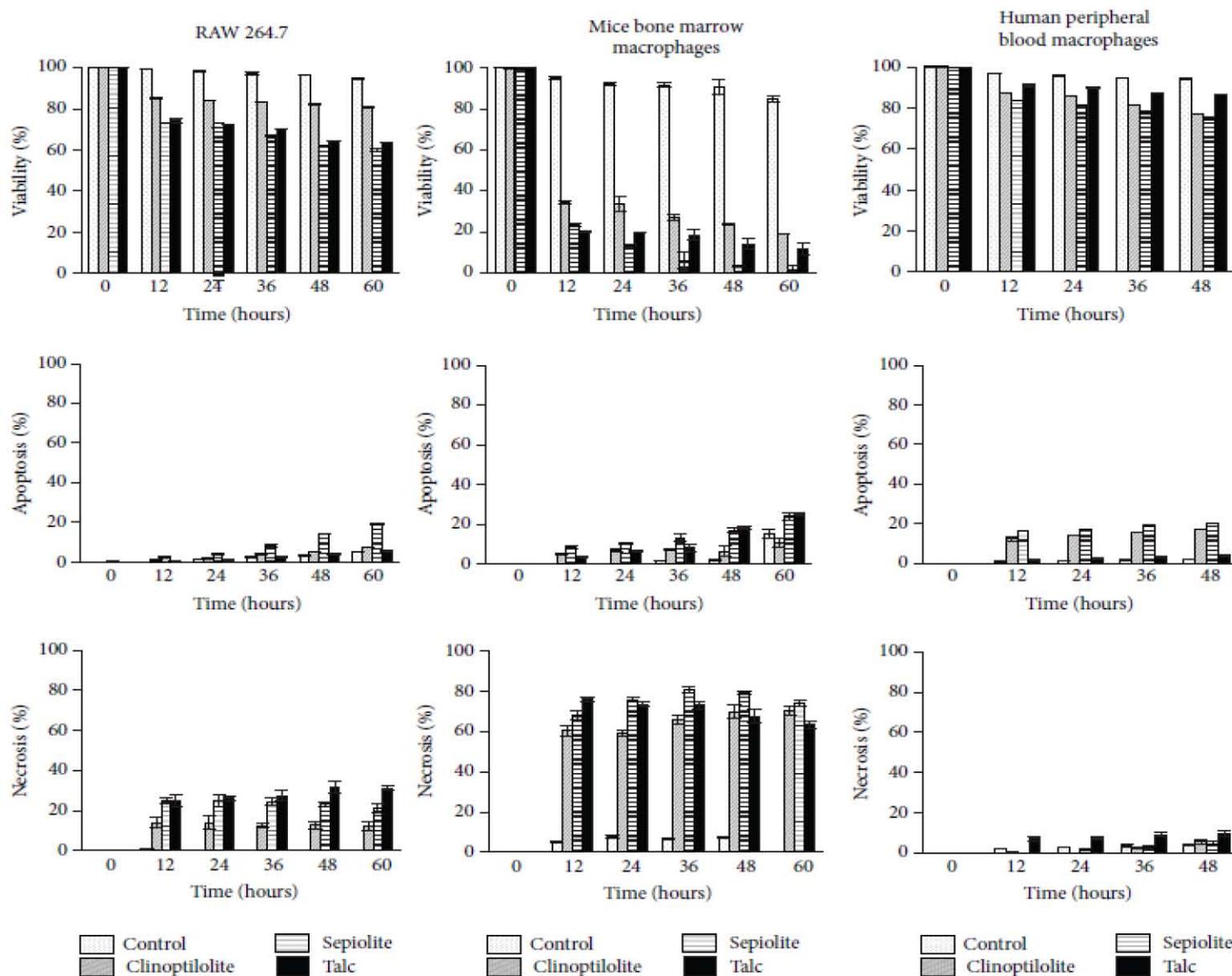


FIGURE 4: Viability, apoptosis, and necrosis of macrophages culture after treatment with nanoclays. Macrophages of RAW 264.7 cell line, from mice bone marrow monocytes and from human peripheral blood monocytes stained with Annexin V and propidium iodide to evaluate viability, apoptosis, and necrosis. Treatments with nanoclays and talc at 0, 12, 24, 36, 48 and 60 h are shown.

On the other hand, viability of macrophages cultures was affected at different extents, but in a dose and time dependent manner by the NC. Even when the viability of the macrophages was affected in a larger extent than the *E. histolytica* trophozoites, in agreement with the results obtained with amoebas, clinoptilolite NC were less toxic than sepiolite NC in all the macrophage cultures tested, supporting clinoptilolite NC as more biocompatible. However, sepiolite NC treatment showed a comparable effect with asbestos-free talc powder used as nanoparticle compound with a proven long history of safe use [31], suggesting that even when sepiolite NC is more cytotoxic than clinoptilolite NC, both are relatively harmless. Sohaebuddin et al. [22] have reported that a different type of cells has a different cytotoxic response against nanoparticles. Remarkably, we observed in this study

that the cytotoxic effect also depends on the cell origin, with the MMDM cultures being the most affected (more than 80% of viability reduction at 60 h) followed by RAW 264.7 and finally HMDM (Figure 4). The RAW 264.7 cell line has widely been used for analyzing cytotoxicity of silica, polymers, metal oxides, silver, and gold nanoparticles [42–45], including two reports on hydroxyapatite and boehmite NC [46, 47], showing higher susceptibility than the results obtained here with the NC. Thus, our results suggest that not only the type but also the origin of the cell should be taken into account when testing cytotoxicity of NC, which could be extensive to any nanoparticle. However, we cannot rule out that other factors can influence the results and therefore, such proposal needs to be confirmed using a wide variety of cells from different sources.

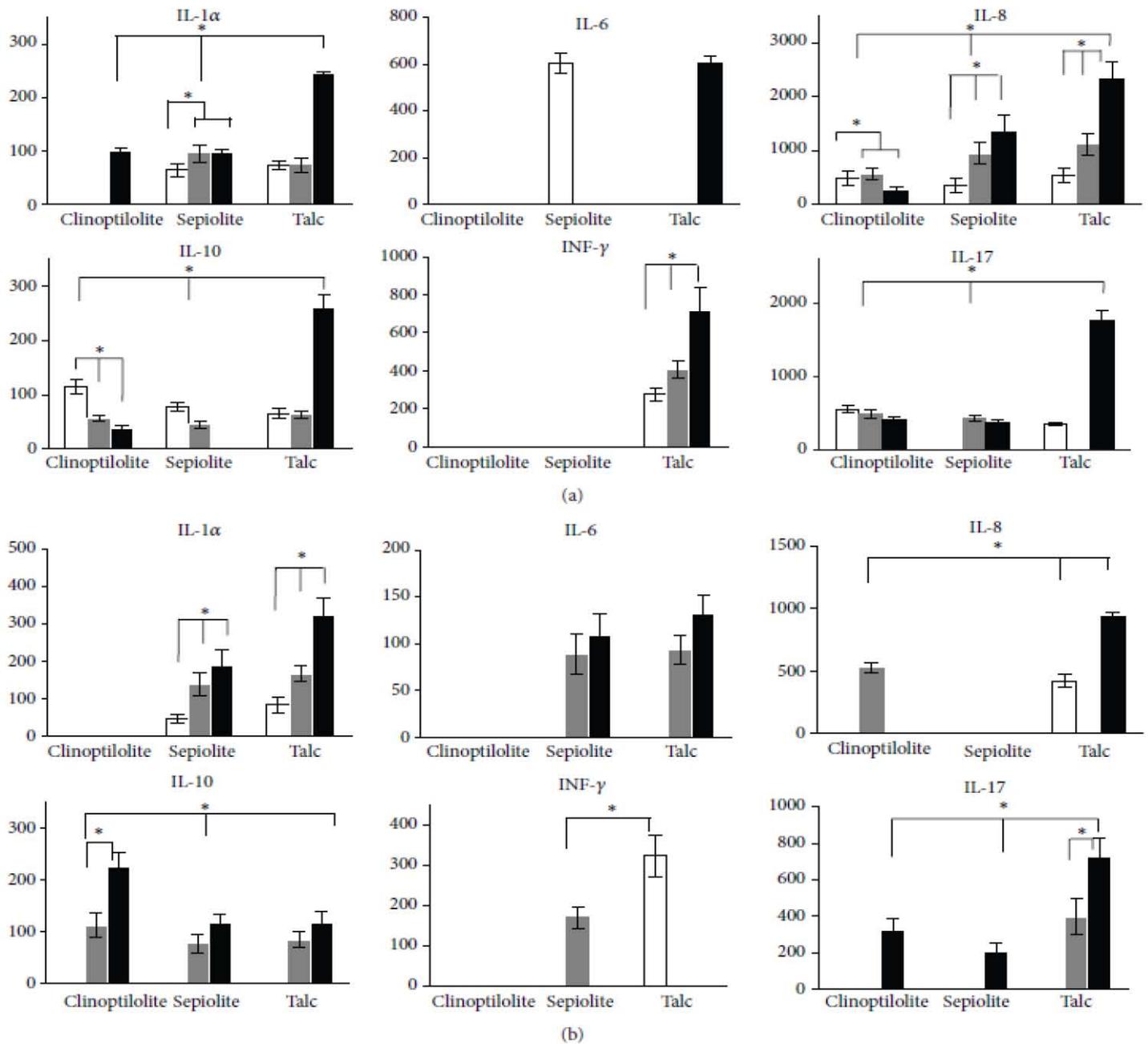


FIGURE 5: Cytokine secretion pattern from NC treated macrophages cultures. A panel of Th1 and Th2 cytokines was determined in the culture media of mice bone marrow macrophages (a) and human peripheral blood macrophages (b) at 24 h (open bars), 36 h (gray bars), and 48 h (black bars) posttreatment with NC and talc. All cytokine levels are shown in pg/mL \*  $P < 0.05$ .

In this work, the results obtained in the RAW 264.7 cell line macrophages were similar to the effect reported for montmorillonite NC on the human hepatic cell line HepG2, where cell viability was reduced in more than 20% with the same dose of 1mg/mL [48]. Even when different cell lines were used, clinoptilolite NC and montmorillonite NC showed a similar effect on viability probably due to their structure [49]. However, we cannot rule out the possibility of differences associated with the particular characteristics of each cell line. Remarkably, HMDM cultures were the less affected by the treatments with NC or talc, never showing

more than 25% of viability reduction at the time and doses tested (Figure 4). This is particularly interesting if we consider that potential biomedical applications in humans of NC will lead in any point to the encounter of the nanoparticles with the highly phagocytic scavenger macrophage, and its use is highly recommended by the international standard ISO 10993-5 for the biological evaluation of medical devices. In this sense, HMDM has been used to evaluate the toxicity of many particles present in dust, polluted air, polymers, and others [50–52]. However, in our knowledge, HMDM cultures have only been used to assess the cytotoxicity of MWCNTs

and nanoparticles of titanium and zinc metal oxide, but not nanoclays [53, 54].

Interestingly, uptakes of both NC by amoebas and HMDM appear to be similar, due to their location inside large phagocytic vesicles or lysosomes, suggesting a phagocytic or macropinocytic process (Figure 3). In this sense, the greater aggregation of sepiolite NC inside larger vesicles could affect the vacuolar membrane compared to the less aggregation of clinoptilolite NC, which could be also related with the higher cytotoxic effect of sepiolite NC on the cultures. As the toxicity of nanoparticles depends on the size and composition of the material [22] and the aggregation state is associated with the NC structure, the nanofiber structure of sepiolite NC could aggregate and puncture the vesicle membrane more easily than the deformed octahedron clinoptilolite NC, explaining the higher toxic effect of sepiolite NC.

Regarding the type of cell death induced by the NC, noteworthy, the predominant cell death was different depending on the macrophage culture studied. Thus, RAW 264.7 and MMDM cultures mainly died by necrosis (two- and threefold over the number of apoptotic cells, resp.), whereas HMDM preferably died by an apoptotic pathway (twofold over the number of necrotic cells). HMDM death could be comparable with amoebic cultures, where the morphology of the death trophozoites suggests an apoptotic process. The mechanisms triggering the macrophage death by the NC and talc as well as the underlying signaling events leading to apoptosis or necrosis are unknown, but they could involve surface scavenger receptors and activation of mitochondrial caspase 9 as described for the toxic effect of zinc oxide nanoparticles [55].

In terms of cytotoxicity, apoptosis death could be more preferable than necrosis, due to the potential of necrotic cellular debris to promote a proinflammatory response that is associated with tissue damage [56]. The proinflammatory response involves the release by the macrophages and other innate cells of cytokines and chemokines that promote recruitment of new cells to the site of infection or damage. Therefore, the cytokine secretion pattern in the supernatant of primary culture macrophages (MMDM and HMDM) treated with the NC and talc was analyzed by flow cytometry. As expected, a correlation between the cytokine patterns released by the NC exposed macrophages and the observed cellular death pathways was found. Thus, the MMDM cultures, which were the most affected by the treatments and mainly dying by necrosis, secreted higher levels of proinflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-8, and IL6, in comparison with HMDM cultures. In agreement with our results, it has been reported that human macrophages/monocytes stimulated with single-walled carbon nanotubes (CNT) or silica induced the release of IL-1 $\alpha$ , IL-6, and IL-8 associated with a proinflammatory outcome [53]; also, the application of natural clinoptilolite in mice food for 28 days produced an increased serum LSA concentration which could be related with the release of TNF- $\alpha$  and IL-1 by macrophages [57]. As mentioned before, MMDM cultured with NC released higher amount of proinflammatory cytokines than HMDM, mainly IL-8 and IL-6 (Figure 5). In addition, the release of IL-8 in MMDM was higher with sepiolite NC than with

clinoptilolite NC. The induction of some of these proinflammatory cytokines by the NC could be related to their agglomeration state [58] and to the particle size, the bigger the particle the higher release [59]. Therefore, the higher IL-8 release from MMDM in the presence of sepiolite NC could be related to the bigger size of sepiolite NC in comparison with clinoptilolite NC.

This was also observed for INF $\gamma$ , another important proinflammatory cytokine, which was only detected in two time points of HMDM treatment with sepiolite NC and talc (36 h and 24 h postexposure, resp.), but not with clinoptilolite NC (Figure 5). On the other hand, TNF $\alpha$  was undetectable in the macrophage cultures with any NC or talc (not shown), suggesting low toxicity as the most biocompatible materials have been shown to induce low TNF- $\alpha$  levels that tend to drop to zero over the time [60]. Moreover, the expression of cytokine IL-17 at late time (48 h) suggests that NC and talc have the potential to induce an allergic response, as it has been described in alveolar macrophages of animals orally treated with PLGA NPs coated with chitosan and PEG [61]. In addition to the proinflammatory pattern of cytokines, HMDM cultures release higher amount of IL-10 than MMDM cultures in the presence of NC, a regulatory cytokine probably produced to counterbalance the proinflammatory profile. Interestingly, the expression of IL-10 has been associated with a greater biocompatibility contributing to the inhibition or resolution of the inflammation associated with nanocomposites [59], which could be related with the lower toxicity of NC on HMDM.

The results of this work showed that clinoptilolite and sepiolite NC are well tolerated when tested in highly phagocytic cell cultures, showing results comparable with asbestos-free talc powder suggesting that both could be highly biocompatible. However, when compared, clinoptilolite NC appears to be less toxic than sepiolite NC, which is very important taking into account the potential biomedical application of clinoptilolite in humans. These cytotoxic assays could contribute to the necessary knowledge for future application of nanoclays; however, additional studies regarding the cellular physiology alterations of cells from different lineages as well as *in vivo* studies at short and long term exposure to confirm the safety of clinoptilolite and sepiolite nanoclays are necessary before thinking in their use for biomedical applications.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding to the publication of this paper.

## Acknowledgments

This work was supported by Centro de Investigación y Desarrollo S.A. de C.V., MACRO-M. The authors also acknowledge the financial support by CONACYT 167788 and DGAPA-UNAM-PAPIIT IN213611 granted to Julio-César Carrero. This work was part of the doctoral thesis of the Ph.D. student Yanis Toledano Magaña, who thanks CONACYT

for the Fellowship no. 362861 and thanks the Programa de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

- [1] A. Charkhi, H. Kazemian, and M. Kazemeini, "Optimized experimental design for natural clinoptilolite zeolite ball milling to produce nano powders," *Powder Technology*, vol. 203, no. 2, pp. 389–396, 2010.
- [2] M. F. Can, M. Çinar, B. Benli, O. Özdemir, and M. S. Çelik, "Determining the fiber size of nano structured sepiolite using Atomic Force Microscopy (AFM)," *Applied Clay Science*, vol. 47, no. 3–4, pp. 217–222, 2010.
- [3] J. Hrenovic, J. Milenkovic, N. Daneu, R. M. Kepcija, and N. Rajic, "Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles supported onto natural clinoptilolite," *Chemosphere*, vol. 88, no. 9, pp. 1103–1107, 2012.
- [4] M. A. Zayed, S. E. M. El-Begawy, and H. E. S. Hassan, "Enhancement of stabilizing properties of double-base propellants using nano-scale inorganic compounds," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 227–228, pp. 274–279, 2012.
- [5] M. Delavarian, A. Hassanvand, and S. Gharibzadeh, "Increasing performance in children with ADHD by trapping lead with a nano-zeolite," *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, vol. 25, no. 1, pp. E22–E23, 2013.
- [6] A. Nezamzadeh-Ejhieh and M. Kabiri-Samani, "Effective removal of Ni(II) from aqueous solutions by modification of nano particles of clinoptilolite with dimethylglyoxime," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 260, pp. 339–349, 2013.
- [7] C. Barrera-Díaz, C. Almaraz-Calderón, M. T. Olguín-Gutiérrez, M. Romero-Romo, and M. Palomar-Pardavé, "CD(II) and PB(II) separation from aqueous solution using clinoptilolite and *Opuntia* ectoderms," *Environmental Technology*, vol. 26, no. 7, pp. 821–829, 2005.
- [8] S. Xie, S. Zhang, F. Wang, M. Yang, R. Séguéla, and J.-M. Lefebvre, "Preparation, structure and thermomechanical properties of nylon-6 nanocomposites with lamella-type and fiber-type sepiolite," *Composites Science and Technology*, vol. 67, no. 11–12, pp. 2334–2341, 2007.
- [9] J. U. Ha and M. Xanthos, "Drug release characteristics from nanoclay hybrids and their dispersions in organic polymers," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 414, no. 1–2, pp. 321–331, 2011.
- [10] S. S. Ray, "Polylactide-based bionanocomposites: a promising class of hybrid materials," *Accounts of Chemical Research*, vol. 45, no. 10, pp. 1710–1720, 2012.
- [11] M. Yang, P. Wang, C. Y. Huang, M. S. Ku, H. Liu, and C. Gogos, "Solid dispersion of acetaminophen and poly(ethylene oxide) prepared by hot-melt mixing," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 395, no. 1–2, pp. 53–61, 2010.
- [12] K. Campbell, D. Q. M. Craig, and T. McNally, "Poly(ethylene glycol) layered silicate nanocomposites for retarded drug release prepared by hot-melt extrusion," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 363, no. 1–2, pp. 126–131, 2008.
- [13] S.-J. Choi and J.-H. Choy, "Layered double hydroxide nanoparticles as target-specific delivery carriers: uptake mechanism and toxicity," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 5, pp. 803–814, 2011.
- [14] K. T. Campbell, D. Q. M. Craig, and T. McNally, "Ibuprofen-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) layered silicate nanocomposites prepared by hot melt extrusion," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 21, no. 8, pp. 2307–2316, 2010.
- [15] L. Solhi, M. Atai, A. Nodehi, M. Imani, A. Ghaemi, and K. Khosravi, "Poly(acrylic acid) grafted montmorillonite as novel fillers for dental adhesives: synthesis, characterization and properties of the adhesive," *Dental Materials*, vol. 28, no. 4, pp. 369–377, 2012.
- [16] A. H. Ambre, D. R. Katti, and K. S. Katti, "Nanoclays mediate stem cell differentiation and mineralized ECM formation on biopolymer scaffolds," *Journal of Biomedical Materials Research A*, vol. 101, no. 9, pp. 2644–2660, 2013.
- [17] R. Feng, Y. Zhang, H. Li et al., "Ultrasensitive electrochemical immunosensor for zeranol detection based on signal amplification strategy of nanoporous gold films and nanomontmorillonite as labels," *Analytica Chimica Acta*, vol. 758, pp. 72–79, 2013.
- [18] H. M. Kipen and D. L. Laskin, "Smaller is not always better: nanotechnology yields nanotoxicology," *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 289, no. 5, pp. L696–L697, 2005.
- [19] M. C. Powell and M. S. Kanarek, "Nanomaterial health effects—part 2: uncertainties and recommendations for the future," *Wisconsin Medical Journal*, vol. 105, no. 3, pp. 16–20, 2006.
- [20] K. Thomas and P. Sayre, "Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part I. Evaluating the human health implications of exposure to nanoscale materials," *Toxicological Sciences*, vol. 87, no. 2, pp. 316–321, 2005.
- [21] G. Oberdörster, E. Oberdörster, and J. Oberdörster, "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles," *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, no. 7, pp. 823–839, 2005.
- [22] S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker, J. W. Eaton, and L. Tang, "Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 7, article 22, 2010.
- [23] Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone, and M. Dusinska, "Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles," *Nanotoxicology*, vol. 8, no. 3, pp. 233–278, 2014.
- [24] IARC, "Arsenic, metals, fibres, and dusts," in *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*, vol. 100C of *IARC Monograph for the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, p. 219, 2013.
- [25] X. Banquy, F. Suarez, A. Argaw et al., "Effect of mechanical properties of hydrogel nanoparticles on macrophage cell uptake," *Soft Matter*, vol. 5, no. 20, pp. 3984–3991, 2009.
- [26] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, "Nanomedicine: current status and future prospects," *The FASEB Journal*, vol. 19, no. 3, pp. 311–330, 2005.
- [27] R. F. Service, "Nanotechnology grows up," *Science*, vol. 304, no. 5678, pp. 1732–1734, 2004.
- [28] V. Vergaro, E. Abdullayev, Y. M. Lvov et al., "Cytocompatibility and uptake of halloysite clay nanotubes," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 3, pp. 820–826, 2010.
- [29] A. Sateriale, A. Vaithilingam, L. Donnelly, P. Miller, and C. D. Huston, "Feed-forward regulation of phagocytosis by *Entamoeba histolytica*," *Infection and Immunity*, vol. 80, no. 12, pp. 4456–4462, 2012.
- [30] J. C. Carrero-Sánchez, A. L. Elías, R. Mancilla et al., "Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen," *Nano Letters*, vol. 6, no. 8, pp. 1609–1616, 2006.

- [31] R. Zazenski, W. H. Ashton, D. Briggs et al., "Talc: occurrence, characterization, and consumer applications," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 21, no. 2, pp. 218–229, 1995.
- [32] M. I. Khan, A. A. Sahasrabudhe, G. Patil, M. J. Akhtar, M. Ashquin, and I. Ahmad, "Nano-talc stabilizes TNF- $\alpha$  mRNA in human macrophages," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 7, no. 1, pp. 112–113, 2011.
- [33] C. Viseras and A. Lopez-Galindo, "Pharmaceutical applications of some Spanish clays (sepiolite, palygorskite, bentonite)," *Applied Clay Science*, vol. 14, no. 1–3, pp. 69–82, 1999.
- [34] E. Andronescu, F. Grigore, C. Tardei, and E. Stefan, "Natural zeolites with medical applications—preliminary preparation and characterization," *Revista Medico: Chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi's*, vol. 110, no. 1, pp. 236–241, 2006.
- [35] N. Zarkovic, K. Zarkovic, M. Kralj et al., "Anticancer and antioxidative effects of micronized zeolite clinoptilolite," *Anticancer Research*, vol. 23, no. 2B, pp. 1589–1595, 2003.
- [36] K. Pavelić, M. Hadžija, L. Bedrica et al., "Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 78, no. 12, pp. 708–720, 2001.
- [37] L. M. Jurkić, I. Cepanec, S. K. Pavelić, and K. Pavelić, "Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: new perspectives for therapy," *Nutrition and Metabolism*, vol. 10, no. 1, article 2, 2013.
- [38] Z. Adamis, E. Tátraí, K. Honma, S. É, and G. Ungváry, "In vitro and in vivo tests for determination of the pathogenicity of quartz, diatomaceous earth, mordenite and clinoptilolite," *The Annals of Occupational Hygiene*, vol. 44, no. 1, pp. 67–74, 2000.
- [39] A. R. Elmore, "Final report on the safety assessment of aluminum silicate, calcium silicate, magnesium aluminum silicate, magnesium silicate, magnesium trisilicate, sodium magnesium silicate, zirconium silicate, attapulgite, bentonite, Fuller's earth, hectorite, kaolin, lithium magnesium silicate, lithium magnesium sodium silicate, montmorillonite, pyrophyllite, and zeolite," *International Journal of Toxicology*, vol. 22, no. 1, pp. 37–102, 2003.
- [40] M. Katic, B. Bosnjak, K. Gall-Troselj, I. Dikic, and K. Pavelic, "A clinoptilolite effect on cell media and the consequent effects on tumor cells in vitro," *Frontiers in Bioscience*, vol. 11, no. 2, pp. 1722–1732, 2006.
- [41] A. S. Ghosh, S. Dutta, and S. Raha, "Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*," *Parasitology International*, vol. 59, no. 2, pp. 166–172, 2010.
- [42] T. Hamada, M. Morita, M. Miyakawa et al., "Size-dependent partitioning of nano/microparticles mediated by membrane lateral heterogeneity," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, no. 34, pp. 13990–13996, 2012.
- [43] B. Chen, Y. Liu, W. M. Song, Y. Hayashi, X. C. Ding, and W. H. Li, "In vitro evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by multiwalled carbon nanotubes in murine RAW 264.7 macrophages and human A549 Lung cells," *Biomedical and Environmental Sciences*, vol. 24, no. 6, pp. 593–601, 2011.
- [44] N. Tripathy, T.-K. Hong, K.-T. Ha, H.-S. Jeong, and Y.-B. Hahn, "Effect of ZnO nanoparticles aggregation on the toxicity in RAW 264.7 murine macrophage," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 270, pp. 110–117, 2014.
- [45] M. Elsabahy, S. Zhang, F. Zhang et al., "Surface charges and shell crosslinks each play significant roles in mediating degradation, biofouling, cytotoxicity and immunotoxicity for polyphosphoester-based nanoparticles," *Scientific Reports*, vol. 3, article 3313, 2013.
- [46] P. Orłowski, M. Krzyżowska, R. Zdanowski et al., "Assessment of in vitro cellular responses of monocytes and keratinocytes to tannic acid modified silver nanoparticles," *Toxicology in Vitro*, vol. 27, no. 6, pp. 1798–1808, 2013.
- [47] T. Zhang, M. Tang, L. Kong et al., "Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 219–220, pp. 203–212, 2012.
- [48] S. Lordan, J. E. Kennedy, and C. L. Higginbotham, "Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 31, no. 1, pp. 27–35, 2011.
- [49] R. T. Martin, S. W. Bailey, D. D. Eberl et al., "Report of the clay minerals society nomenclature committee: revised classification of clay materials," *Clays and Clay Minerals*, vol. 39, no. 3, pp. 333–335, 1991.
- [50] N. Lombaert, D. Lison, P. van Hummelen, and M. Kirsch-Volders, "In vitro expression of hard metal dust (WC-Co) responsive genes in human peripheral blood mononucleated cells," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 227, no. 2, pp. 299–312, 2008.
- [51] A. P. Pettit, A. Brooks, R. Laumbach et al., "Alteration of peripheral blood monocyte gene expression in humans following diesel exhaust inhalation," *Inhalation Toxicology*, vol. 24, no. 3, pp. 172–181, 2012.
- [52] M. Bosetti, L. Zanardi, P. Bracco, L. Costa, and M. Cannas, "In vitro evaluation of the inflammatory activity of ultra-high molecular weight polyethylene," *Biomaterials*, vol. 24, no. 8, pp. 1419–1426, 2003.
- [53] G. Laverny, A. Casset, A. Purohit et al., "Immunomodulatory properties of multi-walled carbon nanotubes in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects and allergic patients," *Toxicology Letters*, vol. 217, no. 2, pp. 91–101, 2013.
- [54] S. Tuomela, R. Autio, T. Buerki-Thurnherr et al., "Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 7, Article ID e68415, 2013.
- [55] V. Wilhelmi, U. Fischer, H. Weighardt et al., "Zinc oxide nanoparticles induce necrosis and apoptosis in macrophages in a p47phox- and Nrf2-independent manner," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, Article ID e65704, 2013.
- [56] X. Guo, C. Jagannath, M. G. Espitia, and X. Zhou, "Uptake of silica and carbon nanotubes by human macrophages/monocytes induces activation of fibroblasts in vitro—potential implication for pathogenesis of inflammation and fibrotic diseases," *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol. 25, no. 3, pp. 713–719, 2012.
- [57] K. Pavelic, M. Katic, V. Sverko et al., "Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic ability," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 128, no. 1, pp. 37–44, 2002.
- [58] B. C. Schanen, S. Das, C. M. Reilly et al., "Immunomodulation and T helper TH1/TH2 response polarization by CeO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, Article ID e62816, 2013.
- [59] W.-K. Oh, S. Kim, M. Choi et al., "Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica—titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality," *ACS Nano*, vol. 4, no. 9, pp. 5301–5313, 2010.

- [60] S. Heuking, B. Rothen-Rutishauser, D. O. Raemy, P. Gehr, and G. Borchard, "Fate of TLR-1/TLR-2 agonist functionalised pDNA nanoparticles upon deposition at the human bronchial epithelium *in vitro*," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 11, no. 29, pp. 1-10, 2013.
- [61] B. Semete, L. I. J. Booyesen, L. Kalombo et al., "*In vivo* uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 249, no. 2, pp. 158-165, 2010.