

C/11623  
2º



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIFERENCIACION NEURONAL IN VITRO DE CELULAS CROMAFINES,  
INDUCIDAS POR CAMPOS MAGNETICOS DE EXTREMA BAJA  
FRECUENCIA O POR FACTOR DE CRECIMIENTO  
NEURONAL.

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS  
P R E S E N T A:

Sebastián Guadalupe Castillo Medina

TUTOR: DR. RENE DRUCKER COLIN



IMSS

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1

273026



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

PAGINATION

DISCONTINUA.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi esposa Lic. Rosalía Rodríguez Vega por su comprensión y apoyo. A mis hijos Sebastián Arturo, Juan Carlos y Rafael. A mi padre Juan Castillo Pacheco y a mi madre Josefina Medina Medrano.

Al Dr. René Drucker Colín, Dra. Leticia Verdugo Díaz, Dr. Alfredo Feria Velasco. M.C. Sandra Orozco Suárez, M.C. Concepción Sánchez Gómez, Dra. Dulce María Hernández Hernández, Dr. Emilio Castellanos Juárez, Dra. Erika Díaz Cortés, Dra. María Seberina Ortega López y al Dr. José Luis Flores por su apoyo académico, por su amistad.

También a Patricia Piña Sánchez, Jorge Antonio Sosa Melgarejo, María del Carmen Baltazar Cortés, Víctor Manuel Pérez González, Elizabeth Mravko Maldonado, Jorge Ramón Toledo García, Eduardo Ramón López Rodríguez, Rita Socorro Mota Domínguez, amigos y colaboradores del laboratorio de Histología y del laboratorio de Microscopía Electrónica de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Asimismo agradezco a los doctores Ramón Paniagua Sierra y Dante Amato Martínez por su apoyo académico y orientación.

A CONACYT, por haberme otorgado la beca registrada con el número 87752.

## CONTENIDO

	Pág.
Agradecimientos	2
Contenido	3
Resumen	5
Summary	6
Definición Operativa de las Variables	7
Introducción	10
Células Cromafines de la Médula Suprarrenal	11
Gránulos Cromafines	11
Cultivos Primarios de Células de Médula Suprarrenal	12
Factor de Crecimiento Neuronal (FCN)	13
Campos Magnéticos de Frecuencia Extremadamente Baja (CMFEB)	14
Neuritas	15
Cono de Crecimiento Axonal (CCA)	16
Citoesqueleto	17
Filamentos de Actina	17
Filamentos Intermedios	18
Microtúbulos	18
Planteamiento del Problema	21
Hipótesis	22
Objetivos	23
Materiales y Métodos	24
Manejo de Animales	24

	Pág.
Cultivo Primario de Células Cromafines	24
Exposición a CMFEB	25
Cultivo en presencia de FCN	26
Microscopía de Luz	26
Microscopía Electrónica de Barrido	26
Microscopía Electrónica de Transmisión	27
Resultados (tabla comparativa)	28
Análisis Estadístico	29
Gráfica No.1	32
Discusión	33
Bibliografía	38
Fotografía No.1	43
Figura 1	46
Figura 2	48
Figura 3	50
Figura 4	52
Figura 5	54
Figura 6	56
Figura 7	58
Figura 8	60
Anexo No. 1	62
Anexo No. 2	63
Publicaciones	64

## RESUMEN

La aplicación del factor del crecimiento neuronal (FCN) en los cultivos de células cromafines de médula suprarrenal induce cambios fenotípicos caracterizados principalmente por la presencia de neuritas. Un efecto similar ha sido observado cuando estas células son estimuladas por campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja (CMFEB). En este estudio, células cromafines de ratas recién nacidas fueron cultivadas y expuestas a FCN o CMFEB con el objeto de comparar sus características histológicas y ultraestructurales. Las células cultivadas en presencia de FCN desarrollaron proyecciones citoplásmicas y en sus extremos terminales mostraron conos de crecimiento, así como filopodias. Con el microscopio electrónico de transmisión barrido y el de transmisión, se observó en el núcleo de las células un incremento de la electrodensidad submembranal, así como proyecciones neuríticas irregulares, onduladas, con un moderado número de varicosidades y citoesqueleto compuesto predominantemente por filamentos intermedios. Las células estimuladas con CMFEB presentaron extensiones neuríticas rectas, con un gran número de varicosidades. Con el microscopio electrónico de transmisión se observaron numerosos microtúbulos en el citoesqueleto, tanto en las neuritas como en el soma. En ambos grupos, por sus características ultraestructurales, se identificaron claramente conos de crecimiento y filopodias. Las diferencias observadas en el citoesqueleto de las células, estimuladas por FCN o CMFEB, sugieren mecanismos de estimulación diferente, posiblemente determinados por las características bioquímicas, electrofisiológicas y morfológicas, en ambos tipos de cultivos celulares.

## SUMMARY

### NEURONAL DIFFERENTIATION OF CHROMAFFIN CELLS *IN VITRO*, INDUCED BY EXTREMELY LOW FREQUENCY MAGNETIC FIELDS OF NERVE GROWTH FACTOR.

The application of nerve growth factor (NGF) to primary adrenal medulla chromaffin cell cultures induced phenotypic changes characterized mainly by the presence of neurites. A similar effect has been seen when these cells are stimulated by extremely low frequency magnetic fields (ELFMF). In this study, newborn rat chromaffin cells were cultured and subjected to NGF or ELFMF in order to compare their histological and ultrastructural characteristics. Cells cultured in the presence of NGF developed cytoplasmic projections and their distal ends showed growth cones as well as filopodia. With scanning and transmission electron microscopy, an increased submembranous electron density was observed in the nuclei of cells as well as irregular, wavy neuritic projections with a moderate number of varicosities, as well as the prevalence of intermediate filaments among the cytoskeleton components. Cells stimulated with ELFMF presented straighter neuritic extensions with a greater number of varicosities. With the transmission electron microscope, numerous neurotubules were observed, both in the cell soma and in their neuritic extensions. The differences seen in the cytoskeleton of cells stimulated with NGF or ELFMF suggest differential stimulation mechanisms possibly determining the biochemical, electrophysiological, and morphological characteristics in both types of cell cultures.



## DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

**Células Cromafines:** Embriológicamente tienen su origen en la cresta neuronal y dan origen a diversos tipos de células adultas, entre ellos las de la médula suprarrenal.

**Campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja (CMFEB):** Los campos electromagnéticos que nos interesan producen radiación de tipo no ionizante y, dentro del espectro electromagnético, se clasifican como radiación de frecuencia extremadamente baja (50 a 60 Hertz).

**Factor de crecimiento Neuronal (FCN):** Factor de acción neurotrófica tanto *in vivo* como *in vitro*. Su habilidad para modular el programa de diferenciación de las células neuronales precursoras consiste en que cuando las células PC12 son cultivadas en presencia de FCN dan lugar a neuronas de tipo simpático, dado que desarrollan neuritas, dejan de dividirse y se vuelven eléctricamente excitables.

**Diferenciación:** Proceso por el cual las células presentan una manifestación de cambio hacia un tipo celular especializado.

**Neuritas:** Este término se utiliza para identificar el crecimiento de los procesos citoplásmicos de las células cultivadas, por su semejanza con las neuronas.

**Varicosidades:** Son ensanchamientos que se presentan a lo largo de las neuritas de las neuronas simpáticas. También se han observado en las neuritas de células cromafines, diferenciadas por exposición a diversos estímulos como FCN o CMFEB.

**Conos de crecimiento:** Son ensanchamientos membranosos terminales del axón en formación; miden varias micras de diámetro y contienen numerosos filopodios, lamelopodios y organillos citoplásmicos.

**Citoesqueleto:** Sistema de proteínas filamentosas en el citoplasma de una célula eucarionta, que le da la forma celular y la capacidad de movimiento dirigido. Las diversas actividades del citoesqueleto dependen de tres tipos de proteínas filamentosas, éstas son microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermedios y filamentos gruesos.

**Micrómetro o micra:** Unidad de longitud que se utiliza en histología y microscopía electrónica; es igual a  $1 \times 10^{-6}$  metros.

**Nanómetro:** Unidad de longitud que se utiliza en microscopía electrónica; es igual a  $1 \times 10^{-9}$  metros.

**Angstrom (A):** Unidad de longitud utilizada para medir átomos y moléculas; es igual a  $1 \times 10^{-10}$  metros ó 0.1 nanómetros (nm).

**Microtúbulos:** Son organelos no membranosos, intracitoplásmicos que se caracterizan por ser estructuras tubulares finas de longitud indeterminada, con un diámetro exterior constante de 25 nanómetros.

**Filamentos intermedios:** Son estructuras filamentosas, intracitoplásmicas, no membranosas que en el microscopio electrónico de transmisión tienen un diámetro de 8 a 10 nanómetros.

## INTRODUCCIÓN

Las células de médula suprarrenal se han utilizado en cultivos primarios como modelo para estudiar la diferenciación celular. Estas células responden a diferentes estímulos modificando su fenotipo, produciendo extensas ramificaciones neuríticas al ser tratadas con FCN, similares a las neuronas simpáticas (Unsicker y cols., 1985). Se ha obtenido diferenciación neurítica de las células cromafines *in vitro*, con otros tipos de estímulos como la aplicación de campos eléctricos (Robinson, 1985), co-cultivos con células del glioma C<sub>6</sub> (Notter et al., 1989), exposición a CMFEB (Drucker-Colín y cols., 1994), y resiembras de estas células (Verdugo-Díaz y cols., 1995).

La estimulación con campos CMFEB representa un interesante abordaje del fenómeno de la diferenciación celular, principalmente porque es un procedimiento "no invasivo". A pesar de la simplicidad del método, no se ha informado que haya estudios morfológicos relacionados con sus efectos sobre las células cromafines. Ciertamente no hay estudios sobre los aspectos ultraestructurales del proceso de diferenciación que presentan dichas células.

## CÉLULAS CROMAFINES DE LA MÉDULA SUPRARRENAL

Las células cromafines son células endócrinas que se originan a partir de la cresta neuronal y están ontogénicamente relacionadas con las neuronas simpáticas. Al migrar a la región central dan origen a las células secretoras de la médula suprarrenal. Excepto por la presencia de éstos gránulos cromafines, las células secretoras de catecolaminas en la médula suprarrenal no poseen características propias cuando se estudian al microscopio electrónico. Además de tener una cantidad moderada de ribosomas libres y una cantidad pequeña de retículo endoplásmico rugoso, tienen un complejo de Golgi bastante notable. Los gránulos cromafines contienen, además de la adrenalina y noradrenalina, diversas proteínas enzimáticas y no enzimáticas, adenosina trifosfato (ATP), otros nucleótidos y algunos fosfolípidos. También almacenan algunos péptidos opioides (encefalinas) y sus precursores, lo cual sugiere que tales péptidos pudieran participar en la modulación y coordinación de respuestas simpáticas amplias (Cormack, D. H., 1988).

## GRÁNULOS CROMAFINES

Estudios realizados con microscopía electrónica muestran que la médula suprarrenal tiene dos tipos de células que secretan hormonas y que cada una libera una catecolamina distinta. Los gránulos que contienen adrenalina pueden tener una imagen menos electrodensa que los que almacenan noradrenalina. La respuesta cromafín de los gránulos esta condicionada por la reacción de oxidación

en frío, con dicromato de potasio al 2.5 % y sulfato de sodio al 1%, en un amortiguador de acetato al 0.2 M (pH de 4.1), según el método de Wood y Barnett. La noradrenalina genera un producto de oxidación más obscuro que la adrenalina. Este hecho plantea la hipótesis de que algunas células producen adrenalina y otras noradrenalina. En las micrografías electrónicas de cortes finos de 60 a 80 nanómetros de espesor, los gránulos hormonóforos de las células secretoras de la médula suprarrenal fijados con glutaraldehído, postfijados con  $\text{OsO}_4$ , contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo, tienen un aspecto electrodenso. Los gránulos que contienen adrenalina son de opacidad electrónica variable de moderada a extrema; tienen un núcleo finamente granular y un halo periférico inconstante debajo de su membrana limitante; su forma es redonda u oval, y sus diámetros están en los límites de 65.8 a 414.0 nm (192.3 nm en promedio), en tanto que los gránulos que almacenan noradrenalina tienen un rango de 105.5 a 518.4 nm (257.7 nm en promedio); su núcleo es tan electrodenso que no llena el espacio delimitado por la membrana, es excéntrico e irregular (Benchimol y Cantin, 1977), (Cormack, 1988).

## CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MÉDULA SUPRARRENAL

El cultivo de células se inició a principios de siglo como un método para el estudio de la conducta de las células animales libres de variaciones sistémicas. Su expansión se sitúa en la década de 1950. De embriones de pollo y roedores se han producido diversas líneas celulares. Es posible estudiar la actividad intracelular de estas células: síntesis de proteínas, relaciones de las células con el

medio ambiente, estudios de hormonas, metabolitos, infecciones, acción de drogas, movimientos transmembranales, interacción de célula a célula, cooperación metabólica, limitación del crecimiento, así como inducción embrionaria. Una de las ventajas de este método es el control de las condiciones físico-químicas ambientales (pH, temperatura, presión osmótica, oxígeno, bióxido de carbono, tensión), las que se pueden controlar con toda precisión. La mayoría de los cultivos están complementados con suero y otros componentes como hormonas, y sustancias reguladoras. Otras conveniencias son las cuestiones económicas, éticas, morales y legales. Las desventajas son que se requieren condiciones estrictamente asépticas, así como las limitaciones en la cantidad de células. Cuando los fragmentos de tejido recientemente obtenido se colocan en la caja de cultivo o en una fase líquida, o como suspensión en un medio, se denominan cultivos primarios (Freshney, 1991).

### FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL (FCN)

El FCN regula la sobrevivencia, el crecimiento neuronal y la producción de neurotransmisores de numerosas neuronas y de algunas células de la línea PC12 y cromafines. Es un dímero formado por dos cadenas de polipéptidos de 118 aminoácidos cada uno, unidos por tres puentes disulfúricos y por una fuerte interacción hidrofóbica. Se extrae a partir de la glándula submaxilar del ratón, donde se encuentra en forma de complejo de 135,000 Da. La molécula de 7S FCN contiene dos copias de tres cadenas de polipéptidos: alfa, beta y gamma. La cadena beta es la que contiene actividad biológica y es la fracción reconocida

por los receptores de FCN. Una vez unido al receptor correspondiente, el complejo receptor-factor de crecimiento es rápidamente introducido hacia el interior de la célula por un proceso de endocitosis. Ya en el interior, el complejo sufre de proteólisis sucesivas. En el interior de la célula se han descrito dos mecanismos principales de acción: fosforilación de proteínas y cambios en la expresión génica (Verdugo-Díaz, 1994).

El FCN, que es un factor neurotrófico por excelencia, puede tener efectos sobre la función y diferenciación morfológica de otros tipos celulares no neuronales. Un ejemplo de esto es el efecto del FCN sobre la extensión de procesos parecidos a neuritas (Tamara Rosenbaum, 1997).

Las células cromafines y la línea celular PC12 de feocromocitoma de rata, se han convertido en los modelos elegidos para estudiar la capacidad del FCN en la modulación de expresión fenotípica y los mecanismos moleculares adyacentes a este proceso. Cuando las células PC12 son cultivadas en presencia de FCN se diferencian dando lugar a neuronas de tipo simpático, dado que desarrollan neuritas, dejan de dividirse y se vuelven eléctricamente excitables (Tamara Rosenbaum, 1997).

## CAMPOS MAGNÉTICOS DE FRECUENCIA EXTREMADAMENTE BAJA

Experimentos realizados en nuestro laboratorio sugieren que la estimulación con campos magnéticos induce transformación morfológica en las células cromafines,



con el establecimiento de una vía de señalización por exposición de CMFEB. El mecanismo puede ser el aumento de las corrientes masivas, las cuales, pueden tener relación con el fenotipo diferenciado y la secreción potenciada. (Drucker-Colín y cols., 1994).

El influjo de  $Ca^{2+}$  puede disparar eventos, tales como activación de enzimas, que llevan a una respuesta genómica. Se sugiere que la expresión del fenotipo diferenciado, el aumento en las corrientes de  $Ca^{2+}$  y la secreción, pudieran causar que las células estuvieran preparadas para la función madura que también involucra cambios en la liberación de transmisores (Morgardo-Valle y cols., 1998).

Los campos magnéticos que producidos por las líneas eléctricas producen radiación no ionizante y se clasifican como de frecuencia extremadamente baja (Anexo No. 1). Pueden medirse utilizando la fuerza del campo magnético en amperes por metro (A/m), o más comúnmente midiendo la densidad del flujo magnético en unidades de Gauss (G) o Tesla (T). Para las exposiciones que nos interesan son más prácticas las mediciones en Gauss, y se conoce que 1 miliGauss es igual a 0.1 microtesla (mT). Una Tesla es igual a 10,000 gauss y 1 Gauss es igual a 0.0001 Tesla. Una militesla es igual a 10 Gauss. (Bracken, 1993, Fajardo-Gutiérrez, A., 1993).

## NEURITAS

Este término se utiliza para identificar el crecimiento de los procesos citoplásmicos de las células cultivadas por su semejanza con las neuronas. Con respecto al tejido nervioso el término neuritas se utiliza indistintamente para hacer referencia

tanto a axones como a dendritas. El axón es la fibra nerviosa más larga de una neurona, su diámetro varía de 0.2 a 20 micrómetros; sus ramas colaterales se extienden en forma perpendicular a él; está desprovisto de retículo endoplásmico rugoso, presenta numerosos microtúbulos y neurofilamentos. El axoplasma contiene mitocondrias filiformes, retículo endoplásmico de superficie lisa, microtúbulos y neurofilamentos abundantes; está desprovisto de ribosomas. Las dendritas son prolongaciones ramificadas ahusadas que pocas veces exceden de un milímetro de longitud; se extienden en todas direcciones del cuerpo celular, y a diferencia de los axones se ramifican en forma dicotómica y en ángulo agudo. Las ramas dendríticas son de diámetro cada vez menor. Las dendritas principales difieren del axón porque contienen cuerpos de Nissl (retículo endoplásmico rugoso y ribosomas) así como abundantes microtúbulos, neurofilamentos y mitocondrias (Pannese, 1994).

### CONO DE CRECIMIENTO AXONAL (CCA)

Es una estructura especializada del neuroblasto fetal, capaz de encontrar la trayectoria hacia áreas específicas y de reconocer la célula blanco apropiada para la formación de sinapsis, por lo que su función está ligada estrechamente al desarrollo del sistema nervioso. Morfológicamente es un ensanchamiento membranoso en el axón terminal, de varias micras de diámetro, compuesto de numerosos filopodios y lamelopodios. Contiene estructuras características del plasmalema, que ocupan la porción central, tales como un retículo endoplásmico agranular, cúmulos de vesículas, mitocondrias, lisosomas secundarios,

microfilamentos y microtúbulos; las partículas intramembranales son escasas. Se ha informado un alto porcentaje de glicoproteínas en los CCA, que tienen una importante participación en los fenómenos de adhesividad, y reconocimiento celular. En el extremo terminal de la neurita que forman las células cromafines al ser estimuladas con factor de crecimiento neuronal, se observan estos ensanchamientos con todas las características que distinguen al CCA (Mercado-Camargo, R., 1996).

## CITOESQUELETO

Se llama citoesqueleto a un organillo intracitoplásmico de las células eucariotas que les es útil para adoptar una variedad de formas y para conducir directa y coordinadamente sus movimientos. Depende de un complejo de redes de proteínas filamentosas que se extienden en todo el citoplasma. Las diversas actividades del citoesqueleto dependen de los siguientes tipos de proteínas filamentosas: microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermedios y filamentos gruesos (Alberts y cols., 1994).

## FILAMENTOS DE ACTINA

También conocidos como microfilamentos, son dos hebras de filamentos helicoidales de polímeros de actina; aparecen como estructuras flexibles con un diámetro de 5 a 9 nanómetros que están organizados en forma lineal de envoltorio

de dos hebras; la mayor concentración de estos filamentos está relacionada con la membrana citoplásmica (Alberts y cols., 1994).

## FILAMENTOS INTERMEDIOS

Se llaman filamentos intermedios porque en el microscopio electrónico de transmisión tienen un diámetro de 8 a 10 nanómetros; son de mayor diámetro que la actina y menor que el de las fibras de miosina de las células musculares. Se conocen cuatro variedades de estos filamentos intermedios: las queratinas, la vimentina, los neurofilamentos y la lámina nuclear. Todas son semejantes en su estructura central dominante y varían en sus extremos amino terminal y carboxiterminal (Alberts y cols., 1994).

## MICROTÚBULOS

Son estructuras tubulares finas de longitud indeterminada, con un diámetro exterior constante de 25 nm. Transversalmente tienen un aspecto de pequeños círculos con una luz que es menos electrodensa que sus paredes. Cada microtúbulo está integrado por trece protofilamentos longitudinales a manera de finísimos cilindros, construcción singular que refleja el patrón de organización de sus subunidades. Con tinción adecuada, es posible advertir componentes de los centriolos y también de los cilios. Con inmuno-histoquímica, incubándolos con anticuerpos contra tubulina, y marcados con fluoresceína, se pueden observar a través de un microscopio de fluorescencia. En los microtúbulos la tubulina está en

equilibrio con la de tipo soluble. No toda la tubulina de la célula está en forma de microtúbulos, ya que parte de ella también está en forma soluble, como proteína citoplásmica. En realidad, la proteína soluble está integrada por dos péptidos estructuralmente semejantes que son la alfa y beta tubulina (ambas guardan relación mutua para formar dímeros).

Estudios *in vitro* indican que los dímeros de tubulina son incorporados preferencialmente a un extremo del microtúbulo, o se pierden de manera preferente desde su otro extremo, y se disocian con mayor rapidez que con la que son agregados. Los microtúbulos representan estructuras lábiles, con tendencia a degradarse hasta producir sus subunidades constituyentes de tubulina. Dichas subunidades siempre están reincorporándose a los microtúbulos existentes, y también intervienen en el ensamblado de otros nuevos. El proceso de ensamblado de microtúbulos es regulado. La polimerización de la tubulina para formar microtúbulos comienza en sitios llamados "centros organizadores de microtúbulos", los que están casi en todo el citoplasma, y abundan en la vecindad de los centríolos. Se sabe lo anterior porque al aplicar colchicina y después, al eliminarla, comienzan a ensamblarse en la región pericentriolar nuevos microtubulillos citoplásmicos.

Cuando se divide una célula, y sus subunidades de tubulina son utilizadas para producir microtúbulos husales en vez de citoplásmicos, se observa también reensamble ulterior de éstos últimos en íntima relación con los centros pericentriolares de organización de los microtúbulos, en células hijas. La

polimerización y despolimerización de dímeros de tubulina guardan relación precisa, de tal forma que los microtúbulos sólo se integran en sitios necesarios y en las ocasiones apropiadas.

Existen datos de que algunas proteínas relacionadas con microtúbulos -nombre que reciben por su relación íntima con ellas-, participan como reguladoras en el ensamblado de tales estructuras. Las células utilizan sus microtúbulos en varias formas. Los microtúbulos citoplásmicos son relativamente rígidos, pero pueden mostrar flexión hacia un lado, por lo que brindan soporte interno a la célula y representan su principal elemento estructural o esquelético. Su distribución ejerce un notable efecto en la morfología celular, y explica las muy diversas formas de células. También facilitan el transporte intercelular de orgánulos, partículas y macromoléculas, por vías específicas a través del citoplasma. La capacidad de dirigir el transporte intracelular tiene importancia particular en los cilindroejes, que son prolongaciones citoplásmicas extraordinariamente largas del cuerpo neuronal. Los microtúbulos, dentro de dicha prolongación, tienen capacidad de dirigir el transporte intracelular de materiales sintetizados en el cuerpo, para hacerlos llegar al extremo de dicha prolongación (Cormack, 1988).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los trabajos realizados por el Dr. Drucker y colaboradores, se demostró que en cultivos primarios se puede modificar el fenotipo de las células de médula suprarrenal; llegaron a obtener la formación de neuritas emergiendo de estas células, aplicando pulsos de CMFEB dos horas por la mañana y dos horas por la tarde, durante siete días. La imagen histológica en estas condiciones muestra neuritas cuantitativas y cualitativamente semejantes a las que se obtienen agregando FCN al medio de cultivo por un mismo período de tiempo. Sin embargo, no se conoce la morfología de estas neuritas por MET, por lo que es necesario plantearse la siguiente pregunta:

¿Se encuentran diferencias en las características ultraestructurales en las neuritas, producidas a partir de la diferenciación de las células cromafines estimuladas *in vitro* por FCN, comparadas con la exposición *in vitro* por CMFEB?

## HIPÓTESIS GENERAL

Los cultivos primarios de células cromafines en presencia de FCN o en la exposición de CMFEB inducen a que estas células desarrollen neuritas. Dada la naturaleza diferente de estos estímulos, se espera que existan diferencias histológicas y ultraestructurales.

## HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

Podrían identificarse algunos componentes ultraestructurales diferentes en células cromafines, diferenciadas por el estímulo de FCN, contra las expuestas a CMFEB.



## OBJETIVOS GENERALES

Determinar diferencias en la naturaleza histológica y ultraestructural de las extensiones neuríticas de las células cromafines de la medula suprarrenal, producidas *in vitro* en presencia de FCN contra la exposición con CMFEB.

## OBJETIVO ESPECIFICO

Determinar diferencias en la cantidad de microtúbulos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Manejo de Animales

En el presente trabajo se utilizaron ratas recién nacidas, de ambos sexos, de la cepa Wistar. Las ratas se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las madres de las ratas se sometieron tanto a un régimen *ad-libitum* en agua como a uno de alimento Purina Chow, en un cubículo mantenido en condiciones ambientales estándar, con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, temperatura de 23 +/- 2°C, y humedad relativa de 60 %. Las condiciones de gestación y nacimiento fueron dentro de límites estándar. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación.

### Cultivo Primario de Células Cromafines

Se obtuvieron células de médula suprarrenal de ratas Wistar de 1 a 3 días de nacidas. Las células fueron preparadas como lo describen Unsicker y sus colaboradores (Unsicker y cols., 1978). Los fragmentos de tejido de médula suprarrenal se colectaron en una solución salina de Spinner, libre de calcio (SSS, Sigma), enriquecida con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma). Las células se disociaron con medios enzimáticos, solución salina de Spinner, más 2 mg/ml de colagenasa (Worthington, tipo I) y 15 mg/ml de desoxiribonucleasa I (Sigma Tipo II), durante 45 minutos, a 37 °C, con agitación continua moderada. El tejido fue dispersado mecánicamente con una pipeta Pasteur, y la suspensión celular fue

centrifugada a 100 x g, a 20 °C, por 10 minutos. Las células disociadas de médula suprarrenal fueron suspendidas en el medio de Eagle's (DMEM, Gibco), modificado de Dulbecco's, enriquecido con suero bovino fetal al 10 % (Gibco), 4.5 mg de insulina (Sigma), 100 U/ml de penicilina (Sigma), 100 mg/ml de estreptomina (Sigma) y 2.5 mg/ml de fungizona (Gibco). (Anexo No. 2). La viabilidad de las células fue de 90 %, determinada por el método de exclusión de azul de tripano. Las células se cultivaron durante 7 días con una humedad de 5%, CO<sub>2</sub>-95%, y aire atmosférico a una temperatura de 37 °C; el medio de cultivo fue cambiado cada 4 días.

#### Exposición a Campos Magnéticos de Frecuencia Extremadamente Baja

Los cultivos primarios de células cromafines fueron expuestos a campos magnéticos de baja frecuencia, tal y como lo describen Bassen y cols. (1992). Una parte de las células fue sembrada en cápsulas Beem invertidas, y otra parte sobre fragmentos de cubreobjetos de 16 mm<sup>2</sup>. En ambos casos los cultivos fueron colocados entre dos bobinas, a una distancia de 30 cm, de manera que los campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja quedaran orientados perpendicularmente a la base de la monocapa de células. Bajo estas condiciones las células fueron expuestas en forma uniforme a un campo magnético de 7 G (60 mA), 4 horas diarias a partir del segundo día de un total de 7 días de cultivo (24 horas de exposición). (Fotografía No. 1)

## Cultivo en Presencia de Factor de Crecimiento Neuronal

Al medio de los cultivos primarios de células cromafines se le añadió FCN, 100 ng/ml (Sigma), después de cuatro horas de haber sido sembradas. Las células permanecieron en cultivo durante 7 días. El medio con FCN se renovó cada 4 días (Drucker-Colín).

## Microscopía de Luz

Se agregó un fragmento de cubreobjetos de vidrio de 0.5 x 0.5 cm. dentro de las cajas de cultivo de células cromafines, con lo que se logró una monocapa de células. Después de siete días de cultivo, a los cubreobjetos con la monocapa de células se les retiró el medio de cultivo fueron lavados con amortiguador de cacodilato al 0.1 M, pH 7.4. Se fijaron durante dos horas en una solución de glutaraldehído (2.5%), paraformaldehído (1%) y ácido tánico (0.1%) en amortiguador de cacodilato. Las células se tiñeron con la técnica de Gross Bielschowski (Sheehan y Hrapchak).

## Microscopía Electrónica de Barrido

Después de siete días de cultivo, a los cubreobjetos de 0.5 x 0.5 cm. con la monocapa de células, se les retiró el medio de cultivo; se lavaron con amortiguador de cacodilato al 0.1 M, pH 7.4, se fijaron durante dos horas en una solución de glutaraldehído (2.5%), con paraformaldehído (1%) y ácido tánico (0.1%)

en amortiguador de cacodilato. Se postfijaron durante dos horas en tetraóxido de osmio y se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcoholes; las preparaciones se desecaron a punto crítico con CO<sub>2</sub>, se cubrieron con oro ionizado y fueron observadas utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5300.

### Microscopía Electrónica de Transmisión

Las células fueron cultivadas en cápsulas Beem colocadas en forma invertida (Hayat, 1986). A los 7 días de cultivo la monocapa de células, obtenida en la tapa de la cápsula, fue lavada con amortiguador de cacodilato al 0.1 M, pH 7.4; se fijaron durante dos horas en solución de glutaraldehído al 2.5% con paraformaldehído al 1% y ácido tánico al 0.1% en amortiguador de cacodilato al 0.1 M, pH 7.4. Fueron postfijadas en tetraóxido de Osmio al 2%, deshidratadas en concentraciones ascendentes de alcoholes, y se incluyeron en resina araldita (Ciba-Geygi); se realizaron cortes semifinos de una micra de espesor en un ultramicrotomo Porter Blum MT-1, los que fueron teñidos con azul de toluidina y fucsina básica. Se obtuvieron secciones de 60 nanómetros de espesor, que se contrastaron con acetato de Uranilo (Merck) y citrato de Plomo (Merck) (Técnica de Reynolds). Los cortes finos fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-906.

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE CELULAS DE MÉDULA SUPRARRENAL

Estructura	Células recién obtenidas y disociadas por medios enzimáticos.	Células cultivadas en condiciones basales.	Células estimuladas por NGF.	Células estimuladas por LFM.
• Núcleo	• Redondo	• Ovalado	• Ovalado	• Ovalado
• Envoltura nuclear	• Delgada	• Delgada	• Engrosada	• Delgada
• Cromatina	• Heterocromatina condensada y Eucromatina	• Distribuida homogéneamente.	• Distribuida homogéneamente.	• Distribuida homogéneamente.
• Nucleolo	• Prominente	• Poco aparente	• Poco aparente	• Poco aparente
<b>CITOPLASMA</b>				
1. Aparato de Golgi	1. Poco aparente	1. Prominente	1. Prominente	1. Prominente
2. Vesículas	2. Abundantes	2. Abundantes	2. Abundantes	2. Escasas
3. Mitocondrias	3. Regulares	3. Abundantes	3. Abundantes	3. Regulares
4. Lípidos	4. Abundantes	4. Escasos	4. Abundantes	4. Escasos
5. Ribosomas	5. Escasos	5. Escasos	5. Abundantes	5. Abundantes
6. Gránulos electrodensos	6. +	6. ++	6. ++	6. +++
7. Retículo endoplásmico	7. Escaso	7. Escaso	7. Regular	7. Regular
<b>NEURITA</b>	Ausente	Presente	Presente	Presente
1. Forma		1. Curvilínea	1. Curvilínea	1. Rectilínea
2. Cantidad		2. Escasa	2. Abundante	2. Abundante
3. Longitud		3. Corta	3. Larga	3. Larga
4. Varicosidades		4. Escasa	4. Abundantes irregulares	4. Abundantes regulares
5. Conos de crecimiento		5. No se detectaron	5. Abundantes	5. Abundantes
6. Filopodias		6. No se detectaron	6. ++++	6. +
7. Filamentos intermedios		7. ++	7. +	7. ++++
8. Microtúbulos		8. No se detectaron	8. +	8. ++++
9. Gránulos		9. Presentes	9. Presentes	9. Presentes

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se contó el número de microtúbulos en cada neurita observada en el microscopio electrónico de transmisión, a 6000 aumentos, en las preparaciones de las células de médula suprarrenal. En un grupo están las que se cultivaron en presencia de FCN y en el otro grupo las que se expusieron a CMFEB. (Gráfica I)

Se desea efectuar la comparación de dos grupos en los que se ha medido una variable de tipo cuantitativo discreto cuya distribución no es semejante a la de la curva normal.

Diseño: Comparación de dos grupos independientes.

Prueba: Comparación de dos distribuciones independientes a través de la prueba U de Mann-Whitney.

Se utiliza la base de datos en Excel para Windows 95, Versión 7.0, y el paquete Statistical Package for Social Science (SPSS), Versión 7.5.

No. de Neurita	Microtúbulos FCN	Microtúbulos CMFEB
1.	1	5
2.	2	5
3.	0	4
4.	1	4
5.	1	4
6.	2	5
7.	0	4
8.	0	4
9.	2	4
10.	2	5
11.	2	3
12.	3	5
13.	2	5
14.	2	4
15.	0	5
16.	2	3
17.	1	4
18.	2	5
19.	2	5
20.	2	4
21.	2	4
22.	3	5
23.	2	4
24.	2	5
25.	1	5
26.	1	5
27.	1	5

No. de Neurita	Microtúbulos FCN	Microtúbulos CMFEB
28.	1	4
29.	3	4
30.	1	5
31.	1	5
32.	1	5
33.	0	4
34.	1	5
35.	0	5
36.	0	4
37.	2	5
38.	2	5
39.	1	4
40.	0	4
41.	1	6
42.	0	4
43.	0	4
44.	0	4
45.	2	4
46.	2	5
47.	1	5
48.	2	5
49.	0	4
50.	0	6

Sumatoria	62	226
Promedio	1.24	4.52
Desviación estándar	0.91606969	0.64649763

N FCN      50                      Rango promedio 25.56      Suma de rangos 1278.00

N-CMFEB    50                      Rango promedio 75.44      Suma de rangos 3772.00

U de Mann-Whitney 3.00

Significancia  $p < 0.001$

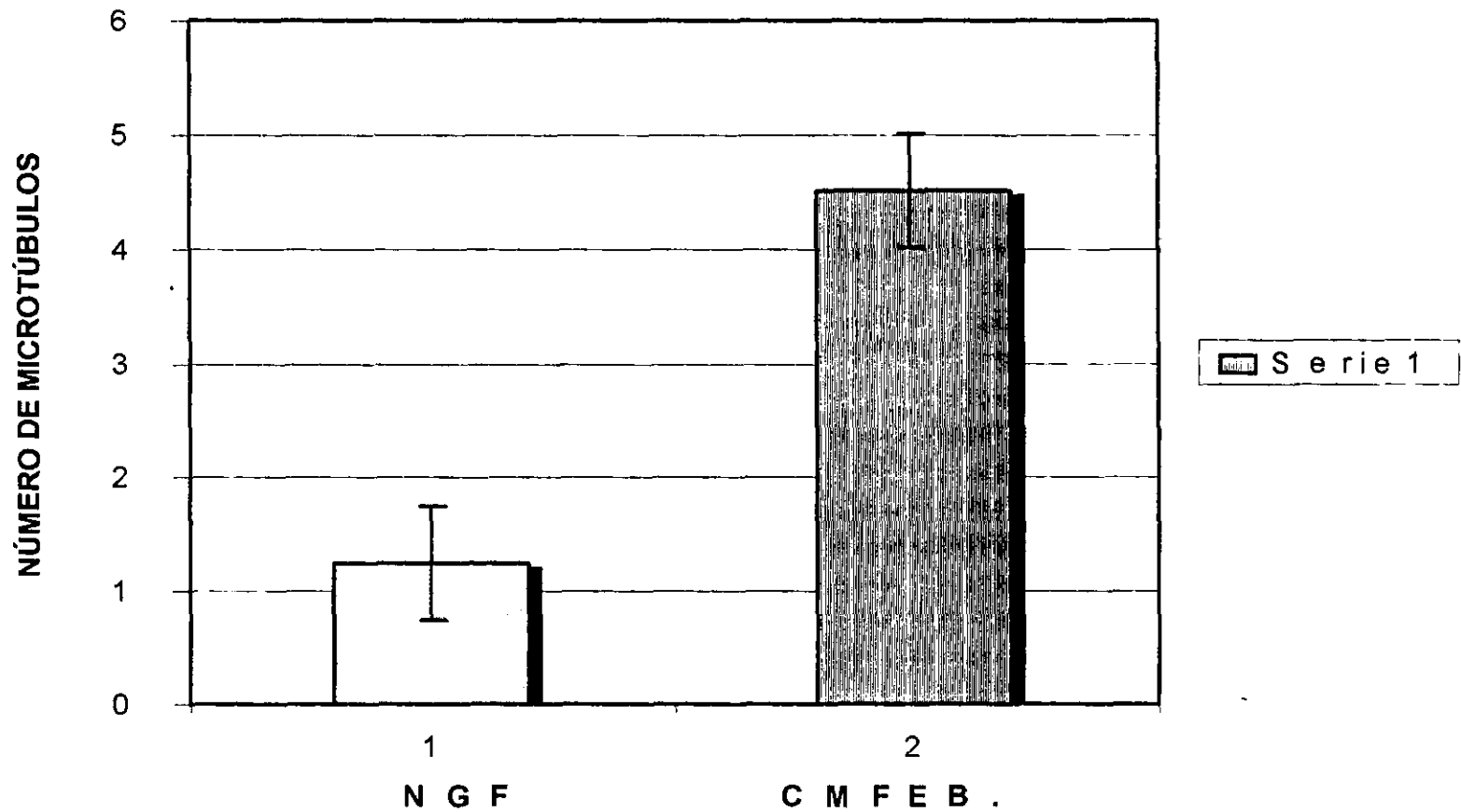
Valores críticos a dos colas para la U de Mann-Whitney para ambos grupos de igual tamaño. Hipótesis estadística nula de que ambas distribuciones de valores son semejantes. En el caso de esta prueba, la hipótesis estadística nula se



rechaza cuando el valor calculado es menor o, a lo sumo, igual al valor crítico tabular para un nivel de significancia dado.

La anterior conclusión representa la existencia de una diferencia significativa en el número de microtúbulos producidos por efecto de FCN y en los producidos por CMFEB.

# PROMEDIO DE MICROTÚBULOS POR NEURITA .



## DISCUSIÓN

En este documento se describen las características morfológicas, en el ámbito histológico y ultraestructural, del crecimiento de células cromafines de la médula suprarrenal de ratas recién nacidas, en condiciones basales, durante 7 días, en presencia de FCN o estimulados con CMFEB. Los hallazgos descritos son comparados con las características morfológicas de las células cromafines de la médula suprarrenal, obtenidas de animales recién nacidos. Cuando de las ratas neonatales se extrae la médula suprarrenal, ésta es disociada y cultivada; por lo tanto, pueden observarse diferentes tipos celulares. En el extendido éstas tienen una forma ovoide o redonda y llegan a ser poligonales a pocos días de haber sido cultivadas (Ogawa y cols., 1986). Del 10 al 14 % de ellas producen extensiones del citoplasma (neuritas) dentro del lapso de 7 días de cultivo (Drucker-Colín y cols., 1994; Herman y cols., 1992; Livett, 1984). Por otra parte, en presencia de FCN se observa un incremento de la cantidad de retículo endoplásmico, y mitocondrias con aumento del aparato de Golgi y de los microtúbulos (Ogawa y cols., 1986).

Estas observaciones morfológicas son semejantes a las nuestras en cultivos de células cromafines diferenciadas con FCN. En los cultivos expuestos a CMFEB se apreciaron algunas diferencias; en este último se observa que el citoesqueleto está compuesto por microtúbulos. Esta característica morfológica se ha encontrado en las extensiones neuríticas de las neuronas (Pannese y cols., 1994).

Matus (1990) propone que el ensamble de los microtúbulos es esencial para el mantenimiento de la estructura radial del axón y la dendrita. Las proteínas asociadas a microtúbulo (MAPs) están directamente relacionadas a estas funciones, promoviendo la polimerización de la tubulina y participando en el encadenamiento de los microtúbulos en las extensiones neuríticas. Un tipo temprano de MAPs está relacionado con la formación y crecimiento de extensiones neuríticas para la formación de lo que serán las dendritas o los axones, mientras que un tipo tardío está involucrado en la estabilización y preservación de las dendritas y los axones ya creados.

Es conocida la susceptibilidad de las células cromafines de la médula suprarrenal para sufrir cambios fenotípicos bajo el efecto de diversos estímulos. El crecimiento de neuritas a partir del citoplasma de las células cromafines nos parece el cambio más interesante de estas células, además de la presencia de conos de crecimiento en estas extensiones. Esto podría ser sugestivo de su genotipo neuronal. Se conoce muy poco acerca de la ultraestructura de estas extensiones neuríticas en células cromafines en cultivo, y es aún menos conocida la asociación de estos cambios con la naturaleza del estímulo que induce diferenciación en las células cromafines. La mayoría de los informes sobre diferenciación de células suprarrenales, indican que se han utilizado células de feocromocitoma o células PC-12. Durante el crecimiento de las células PC-12 se han identificado dos poblaciones: la primera tiene un fenotipo esférico muy similar al observado en células normales de médula suprarrenal

recientemente obtenidas y disociadas. La segunda población tiene un fenotipo neuronal que, aunque no tiene una morfología consistente, muestra extensiones neuríticas con una moderada cantidad de filamentos intermedios y microtúbulos, varicosidades en sus extensiones y algunos conos de crecimiento sobre la porción distal de sus proyecciones. Edgar y cols. informaron de ciertos hallazgos morfológicos en células PC-12, tales como la formación de fibras asociadas con actividad acetilcolina transferasa. Notter y cols. observaron en células cromafines desarrolladas junto con células C<sub>6</sub> de glioma que los microtúbulos predominaron sobre los neurofilamentos en neuritas procedentes directamente del soma.

Algunos estudios han mostrado que las células cromafines, al crecer en la presencia de FCN, incrementan su intercambio de calcio y aumentan la sobrevivencia y el desarrollo de la célula (Nikodijevic y Guroff, 1991).

Un estudio previo (Drucker-Colín y cols., 1994) con el uso de técnicas de microscopía de luz mostró que las células cromafines en cultivo, sometidas a ambos tipos de estímulos (FCN o CMFEB) se diferencian por la emisión de numerosas extensiones neuríticas. En este estudio esos hallazgos se confirman y se complementan al demostrar que las células desarrolladas en la presencia de FCN muestran neuritas de trayectos irregulares, mientras que las células desarrolladas y estimuladas por CMFEB presentan extensiones neuríticas más rectas, más rígidas, y cuando se observan en el microscopio electrónico de transmisión (MET) muestran predominio de filamentos intermedios o

microtúbulos respectivamente. En el caso de estimulación de CMFEB, parte de los cambios estructurales están relacionados con procesos de entrada de calcio, mientras que cuando se bloquean los canales de L-Ca<sup>2+</sup> con nifedipina no se observa diferenciación inducida por los CMFEB. Esto no sucede con FCN, dado que los bloqueadores de los canales de N-Calcio no evitaron la diferenciación. En vista de las observaciones anteriores, sería necesario determinar si los canales de L-Ca<sup>2+</sup> están de cualquier manera relacionados al ensamblaje preferencial de microtúbulos sobre los filamentos intermedios, durante la diferenciación neuronal de células cromafines.

Los cambios presentados en este estudio pueden ser significativos. Las células estimuladas con CMFEB pueden estar sujetas a cambios en los sitios de entrada de Calcio a la célula, como lo sugirieron Conti y cols. (1985) y fue demostrado por Morgado-Valle y cols. (1998), sin pasar por alto el considerar la etapa del ciclo celular en que se encontraban las células cromafines al momento de la estimulación, y la intensidad de los campos magnéticos aplicados (Walleczek y Budinger, 1992).

En suma, este estudio muestra que la estimulación tanto con FCN como con CMFEB, indujo diferenciación neuronal en las células cromafines de médula suprarrenal, caracterizada principalmente por la formación de extensiones neuríticas, la presencia de conos de crecimiento y la aparición de varicosidades en las neuritas. Muestra asimismo una estructura similar a las vistas en las células monoaminérgicas (Hököfelt, 1974). Un apoyo a esta última observación

se encontró adicionalmente en estudios previos en los cuales se ha demostrado que estas células son TH positivas (Drucker-Colín y cols., 1994; Morgado-Valle y cols., 1998). Al estudiar ambos grupos de células cultivadas en el MET, las células desarrolladas en la presencia de FCN mostraron un claro crecimiento preferencial de filamentos intermedios y neuritas de formas irregulares con patrón ondular. En contraste, en las células cultivadas bajo CMFEB predominaron los microtúbulos en las neuritas, las cuales mostraron imágenes más rectas y más rígidas. En ambos tipos de cultivos se observaron conos de crecimiento, varicosidades de sus trayectos y filopodia en los extremos neuríticos, así como gránulos irregulares típicos de células cromafines, caracterizados por masas altamente electrodensas colocadas dentro de membranas distendidas, rodeándolos. La presencia de estos gránulos de tipo neurosecretor en extensiones neuronales y conos de crecimiento, podría ser adicionalmente un indicativo de neuronas de tipo simpático neuronal (Grillo, 1966).

Los experimentos en esta línea están intentando ahora definir si estos hallazgos ultraestructurales tienen funciones biológicas específicas que puedan caracterizar a las células cromafines desarrolladas y estimuladas bajo diferentes condiciones.

## BIBLIOGRAFÍA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, Chapter 16 The Cytoskeleton in Molecular Biology of the cell. 3rd. ed. Garland Publishing, Inc. New York. (1994), pp 788-858.

Bassen H, Litovitz T, Penafiel M, Meister R (1992): ELF in vitro exposure systems for inducing uniform electrical and magnetic fields in cell culture media. Bioelectromagnetics 13:183-198.

Benchimol S, Cantin M. Ultrastructural cytochemistry of the human adrenal medulla. Histochemistry. 1977. 54, 9-26.

Bracken TD. Exposure assessment for power frequency electric and magnetic fields. Am. Ind. Hyg. Assoc. J (1993): 54 (4): 164.

Conti P, Gigante GE, Alesse E, Cifone MG, Fieschi C, Reale M, Angeletti PU (1985): A role for  $Ca^{2+}$  in the effect of very low frequency electromagnetic field on blastogenesis of human lymphocytes. FEBS Lett 181:28-32.

Cormack DH (1988): Histología de Ham. 9a. OMS. Ed. Harla.



Drucker-Colín R, Verdugo-Díaz L, Méndez M, Carrillo-Ruiz José, Morgado-Valle C, Hernández-Cruz A, Corkidi G (1994): Comparison between low frequency magnetic field stimulation and nerve growth factor treatment of cultured chromaffin cells, on neurite growth, noradrenaline release, excitable properties, and grafting in nigrostriatal lesioned rats. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 5:485-498.

Fajardo-Gutiérrez A, Garduño-Espinoza J, Yamamoto-Kimura L, Hernández-Hernández DM, Gómez-Delgado A, Mejía Aranguré M, Cartagena-Sandoval A, Martínez-García MC (1993): Residencia cercana a fuentes eléctricas de alta tensión y su asociación con leucemia en niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 50 (1): 32-38.

Freshney RI. (1991): Culture of animal cells. A manual of basic technique. 2a. Ed. Wiley-Liss. Chapter 20. 257-288.

Grillo MA (1966): Electron microscopy of sympathetic tissues. *Pharmacological Rev* 18:387-399.

Hayat, M.A. (1986). Cell in culture, specific preparation methods in Basic techniques for Transmission electron microscopy, Academic Press Inc. (London) LTD. 296-297

Herman MAR, Shulz CA, Claude P (1992): Early and late effects of NGF may be mediated by different pathways in transdifferentiating chromaffin cells. *Brain Res* 575:257-264.

Hökfelt T (1974): Morphological contributions to monoamine pharmacology. Fed Proc 33:2177-2186.

Livett BG (1984): Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. Physiol Rev 64:1103-1161.

Matus A (1990): Microtubule-associated proteins and determination of neuronal form. J Physiol 84:134-137.

Mercado-Camargo R (1996): Tesis Efecto de la serotonina sobre la  $Na^+/K^+$ -atpasa en el cerebro adulto de la rata y sistema de reconocimiento para la 5-HT en el cono de crecimiento axonal. Cinvestav. IPN.

Morgado-Valle C, Verdugo-Diaz L, García DE, Morales-Orozco C, Drucker-Colín R. (1998): The role of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. Cell Tissue Res 291: 217-230.

Nikodijevic B, Guroff G (1991): Nerve growth factor-induced increase in calcium uptake by PC12 cells. J Neurosci Res 28:192-199.

Notter MFD, Hansen JT, Okawara S, Gash DM (1989): Rodent and primate adrenal medullary cells in vitro: Phenotypic plasticity in response to co-culture with C6 glioma cells or FCN. Exp Brain Res 76:38-46.

Ogawa M, Ishikawa T, Ohta H (1986): Transdifferentiation of endocrine chromaffin cells into neuronal cells. *Curr Topics Dev Biol* 20:90-110.

Pannese Ennio (1994): George Thieme Verlag Stuttgart, New York. Thieme Medical Publishers, Inc New York. *Neurocytology. Fine structure of neurons, nerve processes, and neuroglial cells. III.- Shape and Size of Neurons*, pp 9-11.

Robinson KR (1985): The responses of cells to electrical fields: A review. *J Cell Biol* 101: 2023-2027.

Rosenbaum T (1997): Los factores de crecimiento: ¿qué son, qué hacen y cómo lo hacen? Curso Internacional Precongreso. Actualización en Fisiología. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Morelia Michoacán. 281-293.

Unsicker K, Skaper SD, Varon S (1985): Neurotrophic and neurite-promoting factors: Effects on early postnatal chromaffin cell from rat adrenal medulla. *Dev. Brain Res* 17: 117-129.

Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H (1978): Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cell: Impairment by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2242-2246.

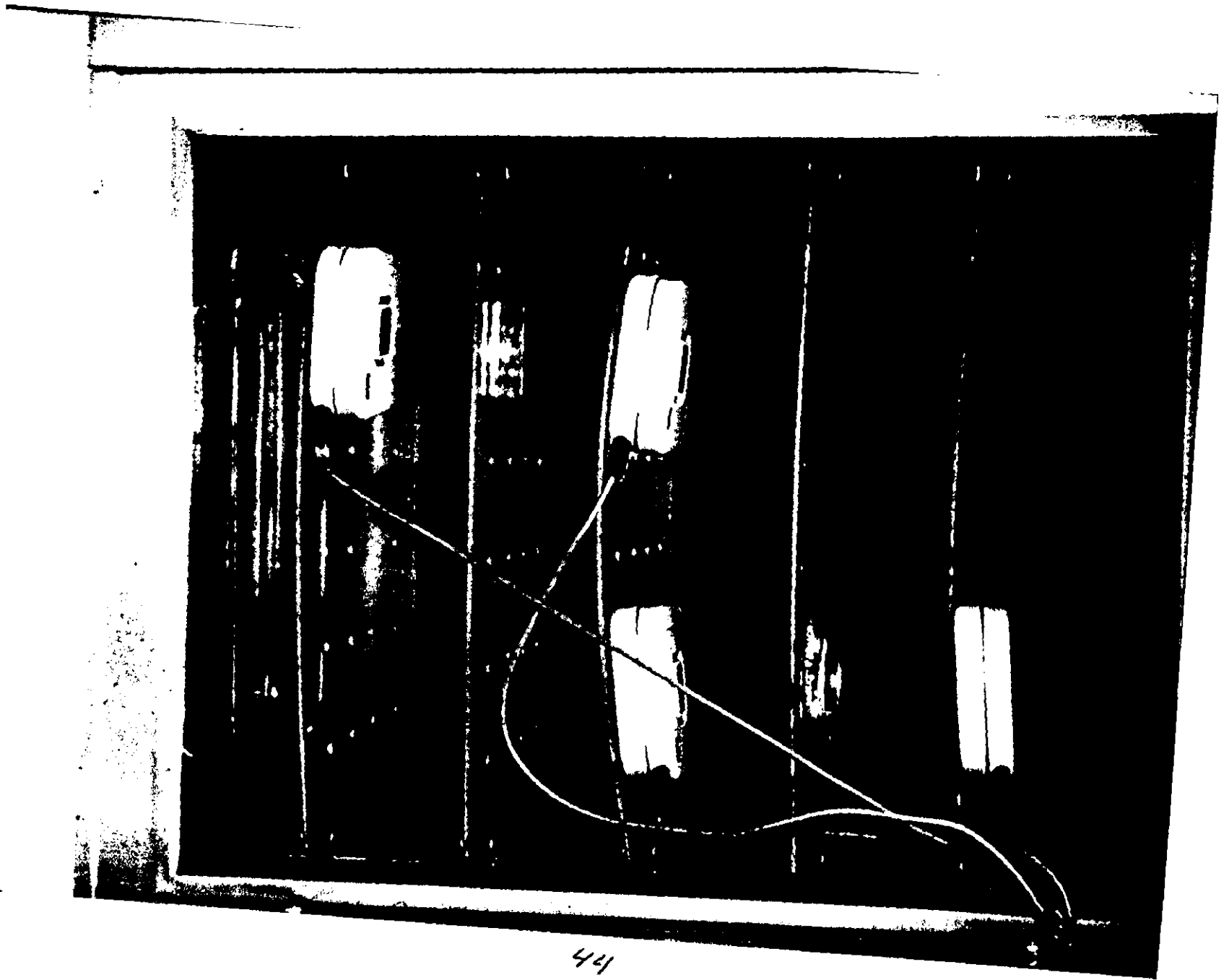
Verdugo-Díaz L, Méndez M, Corkidi G, Drucker-Colín R (1995): Phenotypic changes induced by replating of early post-natal rat chromaffin cells. *Neuroscience Letters*. 183:167-170.

Verdugo-Díaz L (1994): Factores de crecimiento. *Rev. Fac. Med. UNAM*. 37:184-189.

Walleczek J, Budinger TF (1992): Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes: Dependence on cell status and field intensity. *FEBS Lett* 314:351-355.

### Fotografía No. 1

Los cultivos fueron colocados entre dos bobinas, a una distancia de 30 cm., de manera que los campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja quedaran orientados perpendicularmente a la base de la monocapa de células. Bajo estas condiciones, las células fueron expuestas en forma uniforme a un campo magnético de 7 G (60 mA).



44

# FIGURAS

## Figura 1

Microfotografía de células cromafines obtenidas de médula suprarrenal de rata.

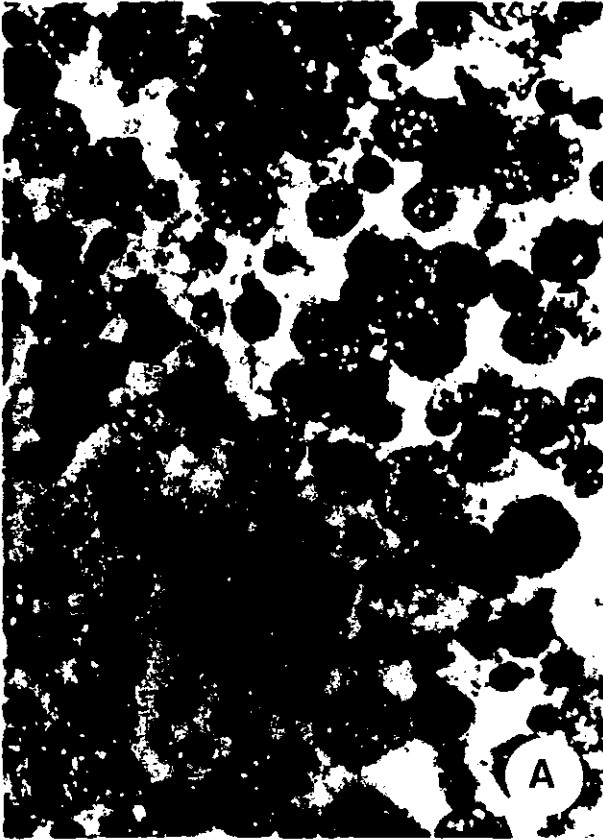
A. Células cromafines recientemente obtenidas, de aspecto poliédrico, núcleo localizado en el centro, rodeado por citoplasma granular y denso. Cortes de una micra de espesor teñidos con azul de toluidina (120x).

B- Células cromafines cultivadas en condiciones basales durante 7 días. Algunas células mostraron formación de extensiones neuríticas con varicosidades. Tinción de Gros Bielschowski. (300 aumentos).

C. Células cromafines cultivadas en presencia de FCN durante 7 días, donde las células presentan extensiones neuríticas distribuidas en varias direcciones y con apariencia curvilínea. Tinción de Gros Bielschowski. (120x).

D. Células cromafines cultivadas y expuestas a CMFEB durante 7 días, las cuales muestran extensiones neuríticas rectas en varias direcciones. Tinción de Gros Bielschowski. (47x).





## Figura 2

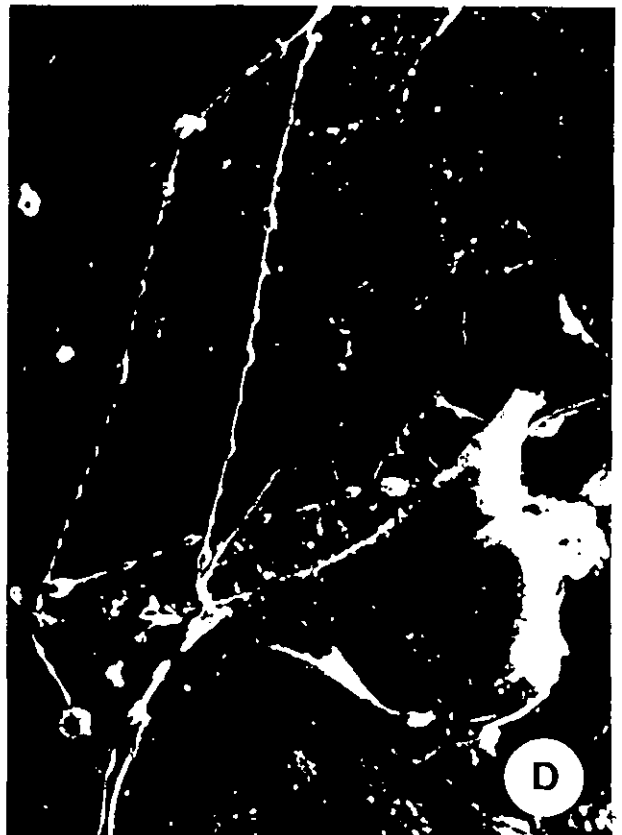
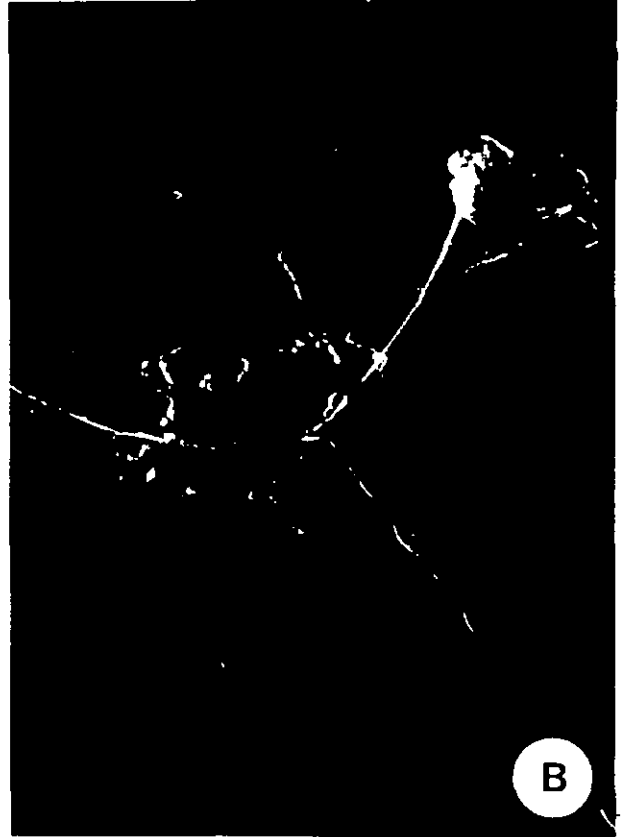
Células cromafines examinadas bajo el microscopio electrónico de barrido.

A. Células cromafines con una larga extensión neurítica después de ser estimulada con FCN durante 7 días de cultivo. (350x).

B- Preparación de células cromafines cultivadas durante 7 días sujetas a CMFEB, muestra extensiones neuríticas con varicosidades. (1,500x).

C. Células cromafines cultivadas durante 7 días en presencia de FCN, donde las células presentan extensiones neuríticas de apariencia curvilínea con algunas varicosidades. (1,500x).

D. Células cromafines cultivadas y expuestas a CMFEB durante 7 días, donde las extensiones neuríticas aparecen rectas con varias varicosidades en ellas. (750x).



### Figura 3

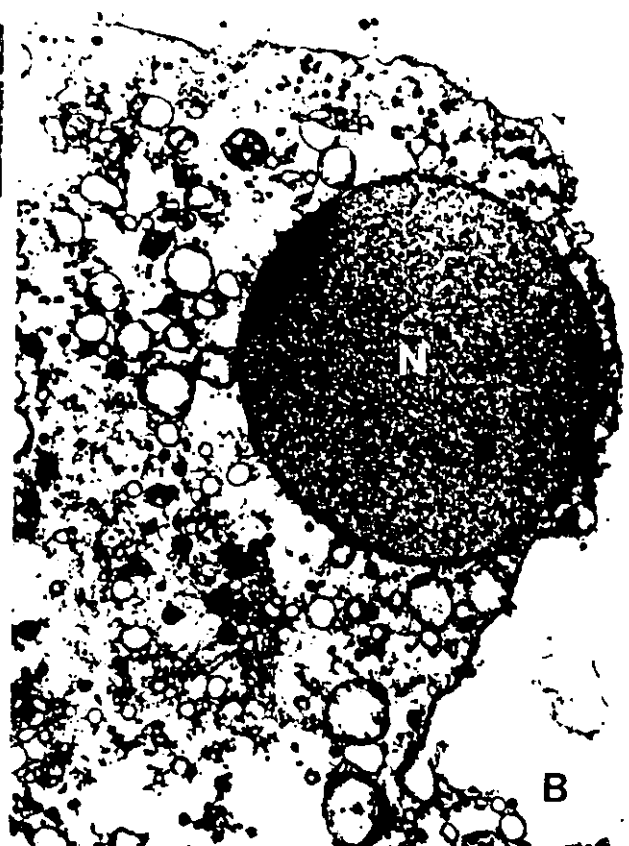
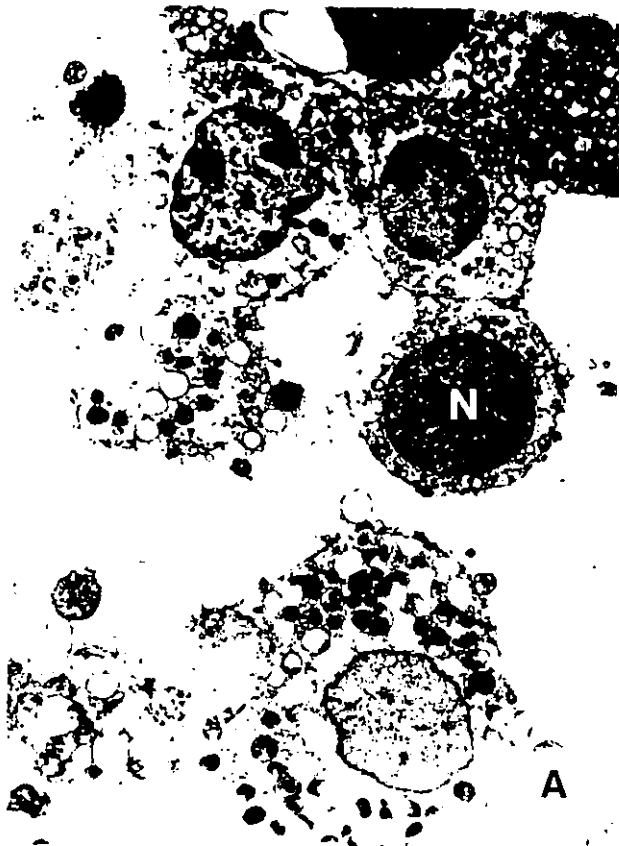
Micrografías electrónicas de transmisión de baja resolución de células cromafines cultivadas.

A. Células cromafines recientemente obtenidas de médula suprarrenal de rata, donde aparecen con un núcleo grande, redondo u ovalado (N), nucleolo prominente, citoplasma claro con varios tipos de organillos incluyendo mitocondrias y gránulos electrodensos. (2156x).

B- Parte de una célula cromafin cultivada en condiciones basales durante 7 días; muestra algunos gránulos electrodensos, mitocondrias y algunos lisosomas. (3,597x).

C. Células cromafines cultivadas durante 7 días en presencia de FCN, donde la más prominente característica es representada por la zona de electrodensidad, por debajo de la envoltura nuclear (N), algunos lisosomas, mitocondrias, vacuolas citoplásmicas y extensiones neuríticas. (1,293x).

D. Células cromafines cultivadas y expuestas a CMFEB durante 7 días, donde se observa en el soma un núcleo de apariencia normal (N) junto con mitocondrias, gránulos electrodensos, contornos de retículo endoplasma y membrana citoplásmica bien definida. En el resto de la imagen aparecen procesos citoplásmicos orientados en diferentes direcciones. (3597x).



#### Figura 4

Micrografías electrónicas de transmisión de células cromafines cultivadas durante 7 días en presencia de FCN, donde la envoltura nuclear tiene un aspecto electrodenso, aparentemente debido a la condensación de material por debajo de la membrana nuclear interna. Dentro del citoplasma se observan vacuolas, mitocondrias y pocos gránulos neurosecretorios. Extensiones neuríticas se observan claramente, donde varios filamentos intermedios están presentes en estos procesos (\*).

A. (6,000x).

B- (1,670x).

C. (1,670x).



## Figura 5

Micrografías electrónicas de transmisión, extensiones neuríticas y matriz citoplásmica de células cromafines de médula suprarrenal, cultivadas en presencia de FCN.

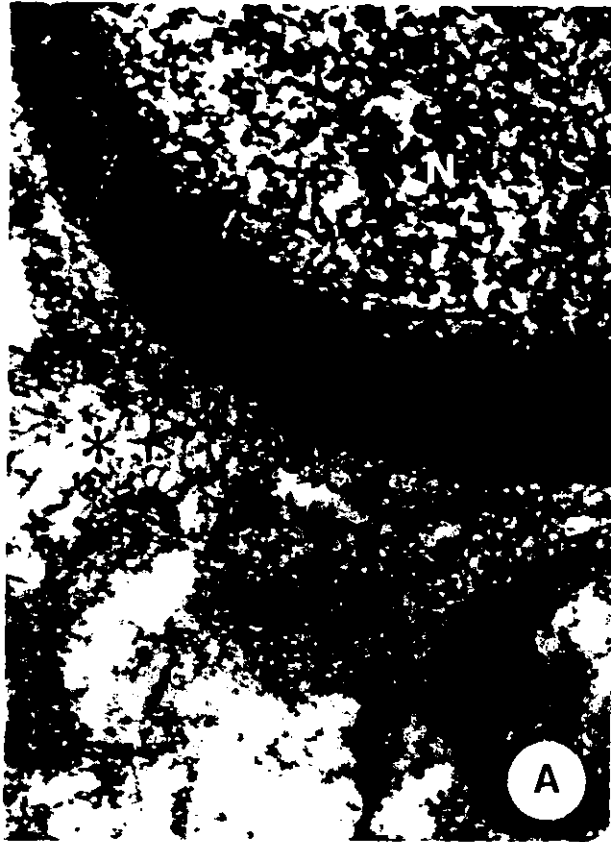
A. Porción del núcleo de una de estas células (N), donde la envoltura nuclear tiene un aspecto electrodenso, aparentemente debido a una condensación de material intranuclear, y en la que están incluidos los poros nucleares; en el citoplasma se encuentran ribosomas, filamentos intermedios (\*) y una mitocondria. (16,000x).

B- Mitocondrias, vesículas y filamentos intermedios (\*) dentro de las extensiones neuríticas y sus varicosidades. (4,646x).

C. Mitocondrias, vesículas y filamentos intermedios (\*) dentro de las extensiones neuríticas y sus varicosidades. (10,000x).

D. Gránulos electrodensos, filamentos intermedios (\*), ribosomas libres y vesículas en las extensiones neuríticas. (10,000x)





## Figura 6

Micrografías electrónicas de transmisión de células cromafines de médula suprarrenal, cultivadas durante 7 días y expuestas a CMFEB.

A. Núcleo de apariencia normal (N), el citoplasma presenta organillos típicos de estas células, incluyendo mitocondrias, ribosomas libres, retículo endoplásmico, microtúbulos y gránulos electrodensos. Son notorios los microtúbulos dentro de las extensiones neuríticas (flechas). (16,700x).

B. Núcleo (N) y citoplasma de célula cromafín con citoplasma, con característicos gránulos electrodensos, mitocondrias, vesículas y microtúbulos dentro de las extensiones neuríticas (flechas). (16,700x).



## Figura 7

Micrografías electrónicas de transmisión de extensiones neuríticas y matriz citoplásmica de células cromafines cultivadas durante 7 días, expuestas a CMFEB.

A. Extensiones neuríticas con algunas varicosidades. Nótese varios microtúbulos dentro del citoplasma (flechas) con algunas vacuolas y mitocondrias dentro de las varicosidades. (16,700x).

B. Baja amplificación mostrando varias extensiones neuríticas entremezcladas con numerosos microtúbulos dentro de su citoplasma (flechas). (4,646x).

C. Porción de un núcleo en una de estas células cromafines donde los poros nucleares *in corte* tangencial son claramente discernidos (flechas); en el citoplasma se encuentran gránulos electrodensos, vesículas, pliegues de retículo endoplásmico y numerosos microtúbulos. (16,000x).



## Figura 8

Micrografías electrónicas de transmisión de estructuras típicas de conos de crecimiento en células cromafines de médula suprarrenal, después de 7 días de cultivo en presencia de FCN (A y B) y expuestas a CMFEB (C y D).

A. En presencia de FCN las extensiones neuríticas desarrollaron estructuras típicas de cono de crecimiento con formación de filopodias. En su interior se identifican vacuolas, polirribosomas y gránulos electrodensos. (4,646x).

B. Nótese en este acercamiento, que predominan los filamentos intermedios (\*) dentro del cono de crecimiento, así como filopodias de las extensiones de células cromafines cultivadas en presencia de FCN. (10,000x).

C. En la exposición de CMFEB las extensiones neuríticas desarrollaron estructuras típicas de cono de crecimiento con formación de filopodias; en su interior se identifican vacuolas, polirribosomas y gránulos electrodensos. (4,646x).

D. En este acercamiento se observa que predomina la presencia de microtúbulos dentro de las filopodias y del cono de crecimiento de las células cromafines, cultivadas en la exposición de CMFEB (flechas). (10,000x).







## ANEXO No. 2

### Medio de Eagle Modificado de Dulbecco

AMINOACIDOS	mg/L
L-Arginina HCl	84.00
L-Cistina 2HCl	62.57
L-Glutamina	584.00
Glicina	30.80
L-Histidina HCl*H <sub>2</sub> O	42.80
L-Isoleucina	104.80
L-Leucina	104.80
L-Lisina HCl	146.20
L-Metionina	30.00
L-Fenilalanina	66.00
L-Serina	42.00
L-Treonina	95.20
L-Triptofano	16.00
L-Tirosina 2 Na*2H <sub>2</sub> O	103.79
L-Valina	93.60
SALES INORGANICAS	mg/L
CaCl <sub>2</sub> (anhidro)	200.00
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> * 9H <sub>2</sub> O	0.10
KCl	400.00
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	97.67
NaCl	6400.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	125.00

VITAMINAS	mg/L
D-Ca Pantotenato	4.00
Colina Clorada	4.00
Acido Fólico	4.00
mio-Inositol	7.00
Niacinamida	4.00
Piridoxal HCl	4.00
Riboflavina	0.40
Tiamina HCl	4.00

OTROS COMPONENTES	mg/L
D-Glucosa	1000.00
Rojo de fenol (Sódico)	15.90
Piruvato de sodio	110.00

AGREGADO	mg/L
NaHCO <sub>3</sub>	3700.00

#### REFERENCIAS:

- Dulbecco, R. And Freeman, G. (1959)= Virology 8, 396.  
 Smith, J.D., Freeman, G., Vogt, M. And Dulbecco, R. (1960) Virology 12, 185.  
 Tissue Culture Standars Committee (1970) In Vitro 6:2, 93.

**ARTÍCULOS PUBLICADOS  
EN EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS**

## Correlative light, scanning and transmission electron microscopy in the study of differentiation of chromaffin adrenal medulla cells

Alfredo Feria-Velasco<sup>1</sup>, Sandra Orozco-Suárez<sup>2</sup>, Sebastián Castillo<sup>3</sup>, Leticia Verdugo-Díaz<sup>4</sup>, Concepción Sánchez<sup>5</sup> and René Drucker-Colín<sup>4</sup>

<sup>1</sup>División de Patología y Biotecnología Ambiental, CIATEJ (SEP - CONACyT), Guadalajara, Jal. MEXICO

<sup>2</sup>Unidad de Invest. en Enfermedades Neurológicas, Hosp. Especialidades, CMN S-XXI, IMSS, México, D.F. MEXICO

<sup>3</sup>Unidad de Invest. en Enfermedades Oncológicas, Hosp. Oncología, CMN S-XXI, IMSS, México, D.F. MEXICO

<sup>4</sup>Depto. Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F. MEXICO

<sup>5</sup>Depto. Biol. del Desarrollo y Teratogénesis Experimental., Hosp. Infantil de México "Federico Gómez", SSA, México, D.F. MEXICO

Chromaffin cells derive embryologically from the neural crest, and are closely related to sympathetic neurons. These cells have been used in tissue cultures, as a model to study cell differentiation, as they respond to various stimuli showing changes in cell morphology including the formation of neuritic extensions, similar to those seen in sympathetic neurons (1-3). Some of the stimuli applied to cultures of chromaffin cells, with good results is the treatment with extremely low frequency magnetic fields (ELFMF)(4), which have shown to have several biological effects both, *in vivo* and *in vitro*. Among this effects are changes in hormone levels, modifications in cell membrane ion management, and changes in biochemical intracellular processes, such as protein synthesis and RNA transcription (5).

### Objective:

The aim of this study was to compare the effects of nerve growth factor (NGF) and ELFMF stimulations on the differentiation of chromaffin cells maintained in culture, with particular reference to the ultrastructural characteristics of their cell components.

### Materials and methods:

Adrenal medulla cells were obtained from 1-3 day-old Wistar rats according to the procedure described by Unsicker et al. (1). The dissociated adrenal medulla cells were suspended in a Dulbecco modified Eagle culture

medium and the cells were grown for 7 days with a 5% CO<sub>2</sub>-95% air mixture, in presence of NGF (100 ng/ml), or stimulated with ELFMF (uniformly exposed to a magnetic field of 60 mA for 4 h every day). Results obtained in both conditions were compared to the findings observed with the cells maintained in plain culture medium for 7 days.

For the light microscopic study, the cells from all groups were washed and stained with the Gross-Bielschowski technique. For the scanning electron microscopic study, the cells grown on cover-slips were washed and fixed in buffered-2.5% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde, and 0.1% tannic acid solution; critical point-dried, and covered with ionized gold to be examined under a JEOL JSM-5300 scanning electron microscope. For the transmission electron microscopic study, the samples were fixed in the buffered-glutaraldehyde-paraformaldehyde-tannic acid solution, postfixed with buffered-1% osmium tetroxide solution, dehydrated in graded changes of ethanol and embedded in araldite. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Zeiss EM-906 transmission electron microscope.

### Results and Discussion:

1. When the chromaffin cells were grown under baseline conditions for 7 days, the light and the scanning electron microscopic studies revealed two types of cells: One of them showed a structure similar to the *in situ* adrenal medulla cells, and the other type showed ovoid nucleus with finely granular cytoplasm, well defined plasma membrane and very few neuritic extensions. With the transmission electron microscope, few organelles and neurosecretory-like granules were identified in the cytoplasm, with moderate amount of intermediate filaments and microtubules (Fig. 2); Some varicosities were seen in various neurites which disclosed growth cones at their ends.

2. When the cells were grown in presence of NGF, the most striking features were an increased density of the intranuclear material adjacent to the internal nuclear membrane, as well as a predominant amount of intermediate filaments into the cell soma and the neuritic extensions (Figs. 3 - 5). Most cells appeared ovoid with irregularly oriented neurites with a curve line path (Fig. 1A), varicosities similar to those seen in monoamine containing nerve fibers (Figs. 1A and 5), and growth cones at their ends (Fig. 4). Moderate amount of organelles and neurosecretory granules were depicted within the cytoplasm of these cells.

3. When the cells were cultured and stimulated with ELFMF most of them showed an ovoid cell body with organelles, neurosecretory-like granules

and large amount of microtubules. Their neuritic extensions were linear, straight and branched (Fig. 1B), with numerous microtubules (Figs. 6 and 7), varicosities in their path and terminal endings ultrastructurally similar to growth cones (Fig. 7) and filopodia.

Microtubule assembly is essential to maintain the axon and dendrite form and structure in neurons, and the *early* and *late* types of the Microtubule Associated Proteins (MAPs) are directly related to these functions (6). Drucker-Colín et al. showed that chromaffin cells cultured in presence of NGF or stimulated with ELFMF differentiated extending cell projections interpreted as neurites when examined under a light microscope (4). In the present work, these findings are confirmed at ultrastructural level, demonstrating that when the cells in culture are stimulated with NGF or with ELFMF, a predominance of intermediate filaments or microtubules, respectively, is observed in the soma cytoplasm and in the neurites. Correlative studies are needed to better understand the biological bases underlying the differential aspects seen in chromaffin cells grown and stimulated under both conditions.

#### References:

1. Unsicker, K. et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2242-2246.
2. Ogawa, M. et al. (1984) Nature 307: 66-68.
3. Doupe, A.J. et al. (1985) J. Neurosci. 5: 2119-2142.
4. Drucker-Colín, R. et al. (1994) Mol. Cell. Neurosci. 5: 485-498.
5. Pool, R. (1990) Science 249: 1378-1381.
6. Matus, A. (1990) J. Physiol. 84: 134-137.

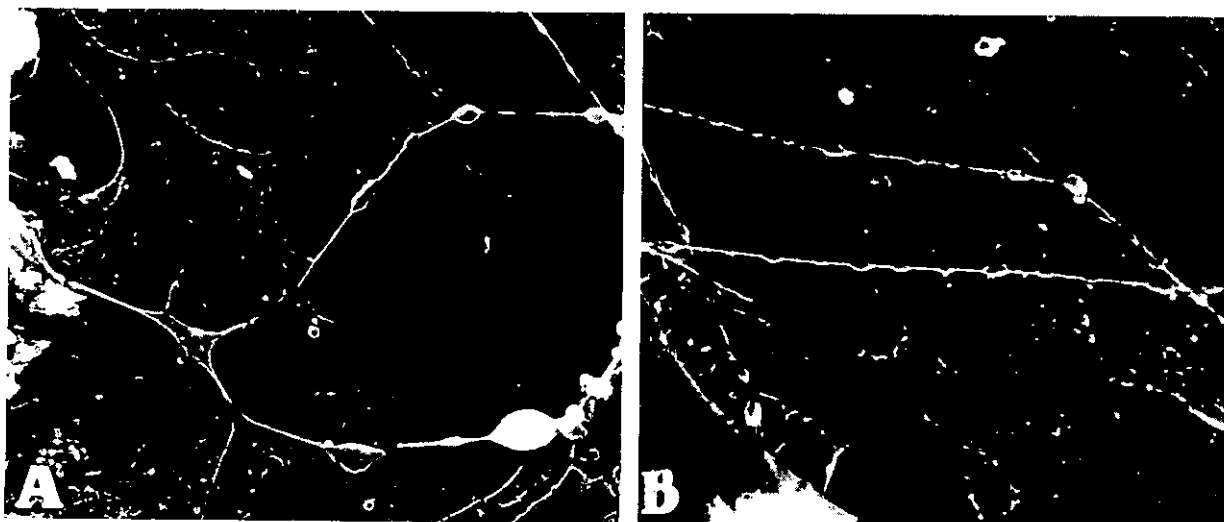
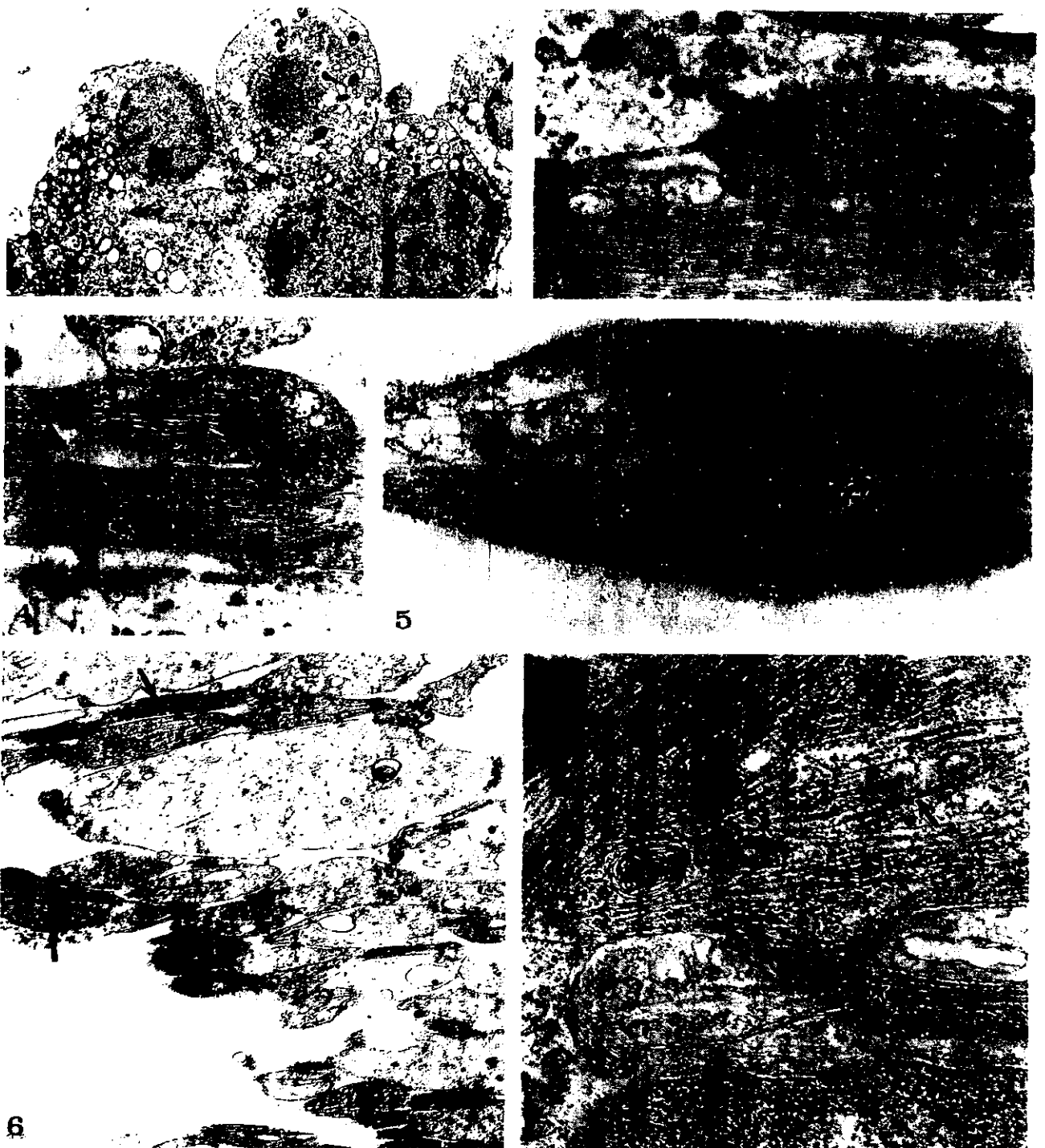


Figure 1. Scanning electronmicrographs of chromaffin cells cultured for 7 days in presence of nerve growth factor (A) (x 1,500) or stimulated with extremely low frequency magnetic fields (B) (x 750).



**Figure 2.** Ovoid chromaffin cells on day 1 of culture (x 1,670).

**Figures 3 - 5.** In presence of NGF, where numerous bundles of intermediate filaments are seen in cell soma (asterisk), in neurites (open arrow), in varicosities (curved arrow), and near growth cones (arrow head) 3: x 7,750; 4: x 6,000; 5: x 27,800.

**Figures 6 and 7.** Stimulation with ELFMF. Microtubules predominate into neurites (arrows) and growth cones (asterisk) 6: x 4,650; 7: x 21,560.

# Neuronal Differentiation of Chromaffin Cells In Vitro, Induced by Extremely Low Frequency Magnetic Fields or Nerve Growth Factor: A Histological and Ultrastructural Comparative Study

Alfredo Feria-Velasco,<sup>1</sup> Sebastián Castillo-Medina,<sup>2</sup> Leticia Verdugo-Díaz,<sup>4</sup> Emilio Castellanos,<sup>2</sup> Sandra Orozco-Suárez,<sup>3</sup> Concepción Sánchez-Gómez,<sup>6</sup> and René Drucker-Colín<sup>4,5\*</sup>

<sup>1</sup>División de Biotecnología y Patología del Medio Ambiente, CIATEJ (SEP-CONACYT), Guadalajara, Jalisco, México

<sup>2</sup>Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, D.F., México

<sup>3</sup>Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, D.F., México

<sup>4</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, D.F., México

<sup>5</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, D.F., México

<sup>6</sup>Departamento de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental del Hospital Infantil de México "Dr. Federico Gómez", SSA, México, D.F. México

The application of nerve growth factor (NGF) to primary adrenal medulla chromaffin cell cultures induces phenotypic changes characterized mainly by the presence of neurites. A similar effect has been seen when these cells are stimulated by extremely low frequency magnetic fields (ELFMF). In this study, newborn rat chromaffin cells were cultured and subjected to NGF or ELFMF in order to compare their histological and ultrastructural characteristics. Cells cultured in the presence of NGF developed cytoplasmic projections and their distal ends showed growth cones as well as filopodia. With scanning and transmission electron microscopy, an increased submembranous electron density was observed in the nuclei of cells as well as irregular, wavy neuritic projections with a moderate number of varicosities, as well as the prevalence of intermediate filaments among the cytoskeleton components. Cells stimulated with ELFMF presented straighter neuritic extensions with a greater number of varicosities. With the transmission electron microscope, numerous neurotubules were observed, both in the cell soma and in their neuritic extensions. In both groups, growth cones were clearly identified by their ultrastructural characteristics. The differences seen in the cytoskeleton of cells stimulated with NGF or ELFMF suggest differential stimulation mechanisms possibly determining the biochemical,

electrophysiological, and morphological characteristics in both types of cell cultures. *J. Neurosci. Res.* 53:569–582, 1998. © 1998 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** magnetic fields; chromaffins; NGF; neurites

## INTRODUCTION

Chromaffin cells are endocrine cells stemming from the neural crest and are ontogenically related to sympathetic neurons. In primary cultures, these cells have been used as a model to study biochemical aspects of cell differentiation (Müller and Unsicker, 1986). For example, chromaffin cells treated in vitro with nerve growth factor (NGF) show the development of neurites similar to those seen in sympathetic neurons (Unsicker et al., 1978; Ogawa et al., 1984; Doupe et al., 1985). In addition, NGF induces tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine  $\beta$ -hydroxylase (D $\beta$ H) activity both in vivo and in vitro (Müller and Unsicker, 1986). There have been attempts to get neuritic differentiation in chromaffin cells in vitro by

Contract grant sponsor: Fideicomiso, UNAM.

\*Correspondence to: Dr. René Drucker-Colín, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, Apdo. Postal 70–250, 04510 México, D.F. E-mail: drucker@servidor.unam.mx

Received 9 February 1998; Revised 6 April 1998; Accepted 14 April 1998

using other kinds of stimuli such as applying electric fields (Hinkle et al., 1981; Robinson, 1985; Borgens, 1989), cocultures with glioma C<sub>6</sub> cells (Notter et al., 1989), and treatment with extremely low frequency magnetic fields (ELFMF; Drucker-Colin et al., 1994). ELFMF have several biological effects *in vivo* and *in vitro* including changes in hormone levels, modifications in cell membrane ion management, and modifications to several intracellular processes such as RNA transcription and protein synthesis (Pool, 1990). The mechanisms whereby ELFMF induces differentiation in chromaffin cells are not clearly understood. However, recent experiments conducted in our laboratory have shown that dehydropyridine-sensitive voltage-gated-L-Calcium channels appear to be involved (Morgado-Valle et al., 1998).

ELFMF stimulation represents an interesting approach to experimentally inducing cell differentiation, especially since it is a "noninvasive" procedure. In spite of the model's simplicity, there are currently no studies on the morphological aspects of the differentiation process in these cells. The purpose of this study was to compare the NGF and ELFMF stimulation effects on chromaffin cells in terms of cell and ultrastructural morphology in order to get a future basis for understanding how these morphological changes might reflect certain physiological differences.

## MATERIALS AND METHODS

### Primary Cultures of Chromaffin Cells

Adrenal medulla cells were taken from Wistar rats (1–3 days old). These cells were prepared following the procedure described by Unsicker et al. (1978). The adrenal medulla fragments were collected in a calcium-free, Spinner's saline solution (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with bovine serum albumin (Sigma). Cells were enzymatically dissociated with Spinner's saline solution having 2 mg/ml of collagenase (Worthington, Type I, Freehold, NJ) and 15 mg/ml of deoxyribonuclease I (Sigma, Type II) for 45 minutes at 37°C with moderate continuous stirring. The tissue was mechanically spread with a Pasteur pipette and the cell suspension was centrifuged at 100 g, at 20°C for 10 minutes. Dissociated adrenal medulla cells were suspended in a Dulbecco modified Eagle culture medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 4.5 mg/ml of insulin (Sigma), 100 U/ml of penicillin (Sigma), 100 mg/ml of streptomycin (Sigma), and 2.5 mg/ml of fungizone (Gibco). Cell viability was 90% as determined by the trypan blue exclusion method. Cells were grown for 7 days with a 5% CO<sub>2</sub> - 95% air mix, at 37°C, and the culture medium was replaced every 4 days. One portion of the cells were grown in inverted

Beem capsules for transmission electron microscopy. The rest of cells were grown on glass coverslip fragments coated with polylysine (20 mg/ml) for histology and scanning electron microscopy studies. Cells were grown on 35-mm Petri dishes.

### Experimental Groups

Four groups of cells were prepared as: rat chromaffin cells recently dissociated (Group I); culture of rat chromaffin cells without any stimulation (Group II or baseline); chromaffin cells cultured in the presence of 50 ng/ml of NGF (Group III or NGF); and finally rat chromaffin cells exposed to ELFMF stimulation (Group IV or ELFMF).

Primary chromaffin cell cultures were exposed to extremely low frequency magnetic fields as described by Bassen et al. (1992) following the results derived by Drucker-Colin et al. (1994). Cultures were placed between two coils, which were separated from each other at a distance of 21 cm. The coils were placed dorsally and ventrally to the culture dishes, so that the low frequency magnetic fields were perpendicular to the cell monolayer base. Under these conditions, cells were exposed to a 7 Gauss or 0.7m Teslas (60 mA) for 4 hours every day (2 hours in the morning and 2 hours in the afternoon) beginning on the second day of culture for 7 days. The coils consisted of a pair of 6 cm x 10 cm Helmholtz coils. The coils emitted sine waves which were monitored through a Hewlett Packard 1201 oscilloscope.

### Light Microscopy

One set of cells grown on glass coverslip fragments were fixed with a 4% formaldehyde solution buffered with 0.1 M phosphate to a 7.4 pH for 4 hours, at room temperature. Cells were washed with the same buffer for 2 hours to be stained with the Gross-Bieloschowski technique (Sheehan and Hrapchak, 1980) and examined under a Leitz transmission light microscope.

Fig. 1. Photomicrograph of chromaffin cells obtained from rat adrenal medulla. **A:** Chromaffin cells recently obtained, where all cells appear round with centrally located nucleus and a coarsely granular cytoplasm. One-micron-thick section stained with toluidine blue (120x). **B:** Chromaffin cell cultured for 7 days in basal culture medium where cells show a neurite extension (arrow). Bielchowsky's stain (300x). **C:** Chromaffin cell cultured for 7 days in presence of nerve growth factor (NGF), where the cells show neuritic extensions in a somewhat randomly distributed pattern and in curvilinear appearance (arrow). Bielchowsky's stain (120x). **D:** Chromaffin cell cultured for 7 days subjected to extremely low frequency magnetic fields (ELFMF) which show straight neuritic extensions in several directions (arrows) Bielchowsky's stain (47x).



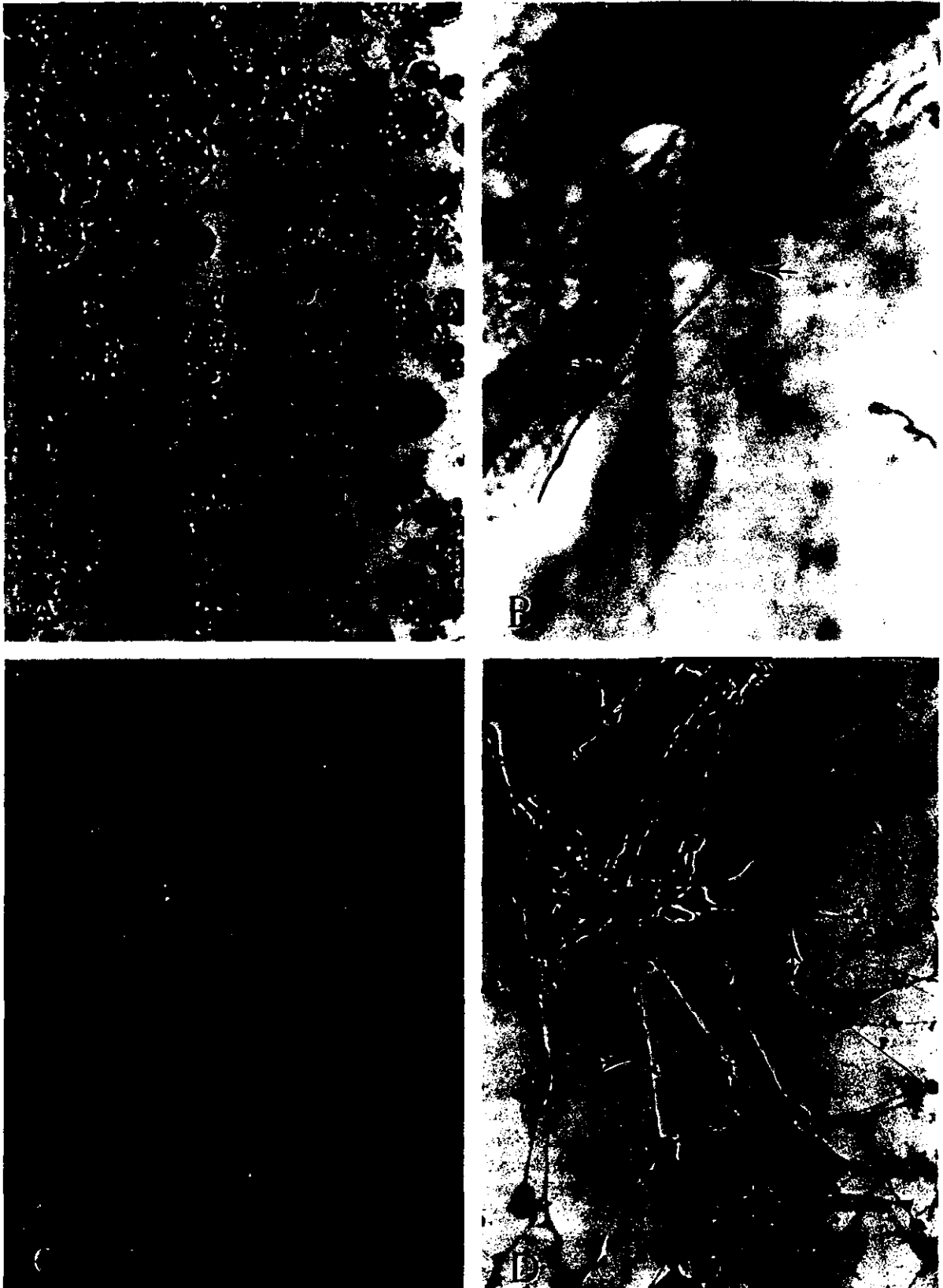


Figure 1.

### Scanning Electron Microscopy

One set of cells grown on glass coverslip fragments were rapidly washed with a 0.1 M sodium cacodylate buffer to a 7.4 pH and fixed for 2 hours in a glutaraldehyde (2.5%), paraformaldehyde (1%), and tannic acid (0.1%) solution diluted with 0.1 M sodium cacodylate buffer to a 7.4 pH. They were postfixed in a sodium cacodylate-1% osmium tetroxide solution for 1 hour and dehydrated in graded changes of ethanol. Preparations were dried to a critical point with CO<sub>2</sub>, covered with ionized gold and examined with a JEOL JSM-5300 scanning electron microscope.

### Transmission Electron Microscopy

Cells grown in Beem capsules were washed on the seventh day with a 0.1 M sodium cacodylate buffer solution and fixed in a glutaraldehyde (2.5%), paraformaldehyde (1%), and tannic acid (0.1%) solution diluted with 0.1 M sodium cacodylate buffer to a 7.4 pH. Samples were postfixed with a cacodylate buffered-1% osmium tetroxide solution for 1 hour and dehydrated in graded changes of ethanol and embedded in araldite (Polysciences Inc., Warrington, PA). With a Porter Blum MT-1 (Sorvall, Wilmington, DE) ultramicrotome, 1-mm-thick sections were obtained and collected on glass slides which were stained with toluidine blue and basic fucine to select those areas where thin sections would be taken from. From these areas, 60-nm-thick sections were obtained with the same ultramicrotome. These sections were collected on copper grids, contrasted with lead citrate (Merck, Darmstadt, Germany) and uranyl acetate (Merck), and examined under a Zeiss EM-906 transmission electron microscope.

## RESULTS

### Group I

With the light microscope, cells recently obtained and enzymatically dissociated were seen as polyhedral cells, with a spherical, eccentric nucleus, well-defined nuclear membrane, finely granular chromatin, and an apparent nucleolus (Figs. 1A and 3A). Cytoplasm was seen as finely granular with some vacuole formation (Fig. 1A). No neuritic extensions were identified in the vast majority of cells. The scanning electron microscope corroborated the existence of cells, mostly ovoid or spherical in shape. Some of these showed one or two short extensions. The transmission electron microscope showed a single ovoid nucleus, with moderately condensed heterochromatin and a single nucleolus in the nucleoplasm (Fig. 3A). Some nuclear pores were identified in the perinuclear cisternae and continuity was seen with some endoplasmic reticulum cisternae. A well-developed Golgi apparatus was identified in the cyto-

plasm along with numerous profiles of granular and smooth endoplasmic reticulum, some neurosecretory-like granules, free ribosomes, mitochondria, clear vesicles, and lysosomes. The cell membrane was clearly defined in close relationship to other neighboring chromaffin cells (Fig. 3A).

### Group II

Histology images of primary adrenal medulla cells grown under baseline conditions and stained with the Gros-Bieloschowski technique showed two types of chromaffin cells. Some with a structure totally similar to the *in situ* adrenal medulla cells (Millar and Unsicker, 1981) and others with an ovoid nucleus having homogeneous chromatin and finely granular cytoplasm with well-defined plasma membrane and very few neuritic extensions (Fig. 1B). Under the scanning electron microscope, spherical and ovoid cells were seen. Some of them had neurites with characteristic varicose formations (Fig. 2A). Under the transmission electron microscope, cells grown under baseline conditions showed an ovoid nucleus limited by the perinuclear cisternae with a moderate amount of nuclear pores, heterochromatin spread in coarse clusters over the nucleoplasm, and a very prominent nucleolus. Few organelles and neurosecretory-like electron-dense granules were identified in the cytoplasm, with a moderate amount of intermediate filaments and a few neurotubules (Fig. 3B). Some varicosities were seen in various neurites which disclosed growth cones at their ends. These varicosities contained scarce organelles and free ribosomes.

### Group III

In this group, the Gross-Bieloschowski technique revealed several spherical or ovoid chromaffin cells similar to those seen in Group I, and numerous ovoid cells with long neuritic, irregular extensions which gave them the configuration as monopolar, bipolar, or multipolar cells (Fig. 1C). Some growth cones with filopodial formation and spaced varicosities were identified in the neurites. With the scanning electron microscope, neurites were seen to have irregular paths, varicose formations and terminal extensions similar to growth cones. Some neurites were seen as shunting, with a curve line path and spaced out varicosities (Fig. 2B and C). The transmission electron microscope revealed that cells grown in the presence of NGF had one or several cytoplasm extension containing various intermediate filaments and few microtubules. Mitochondria, lysosomes, few neurosecretory like granules and endoplasmic reticulum elements, together with clear lipid vesicles were identified in these neurites (Fig. 3C). The cell body showed various mitochondria, multivesicular bodies, intermediate filament:

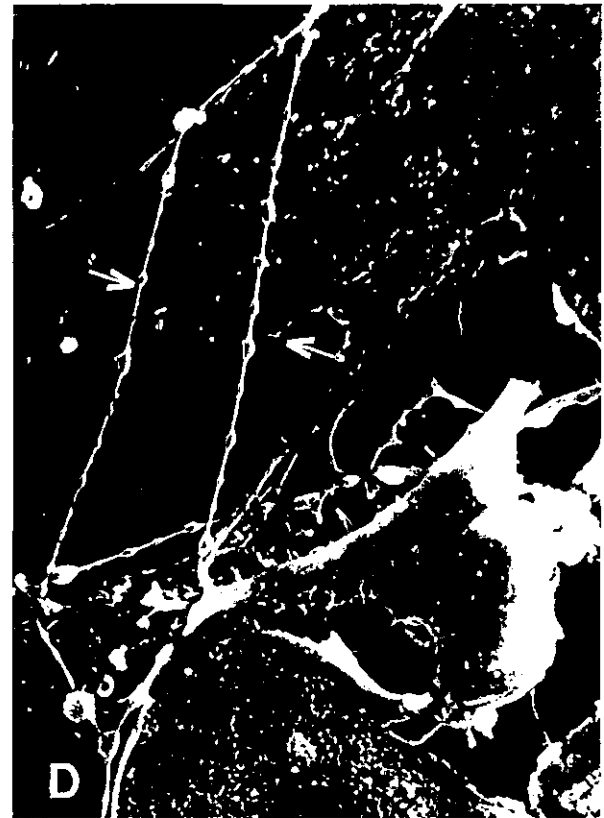
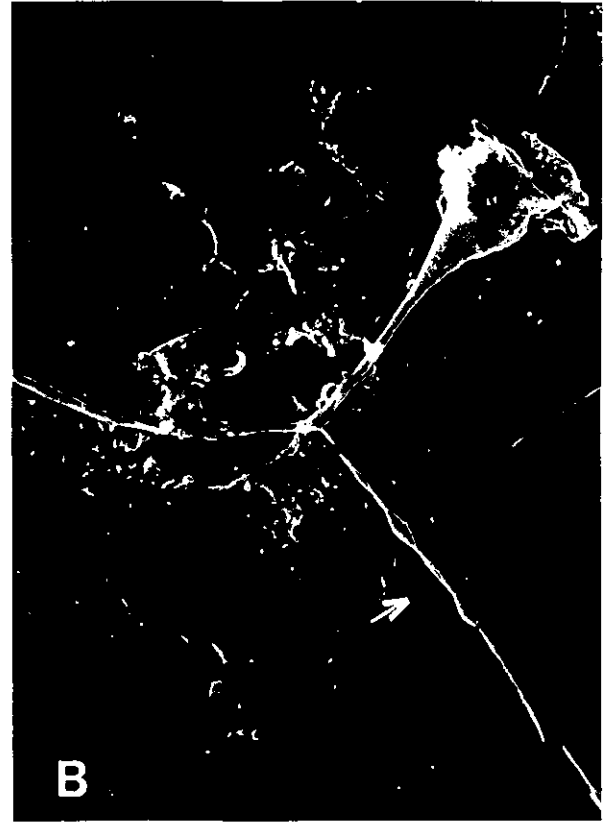
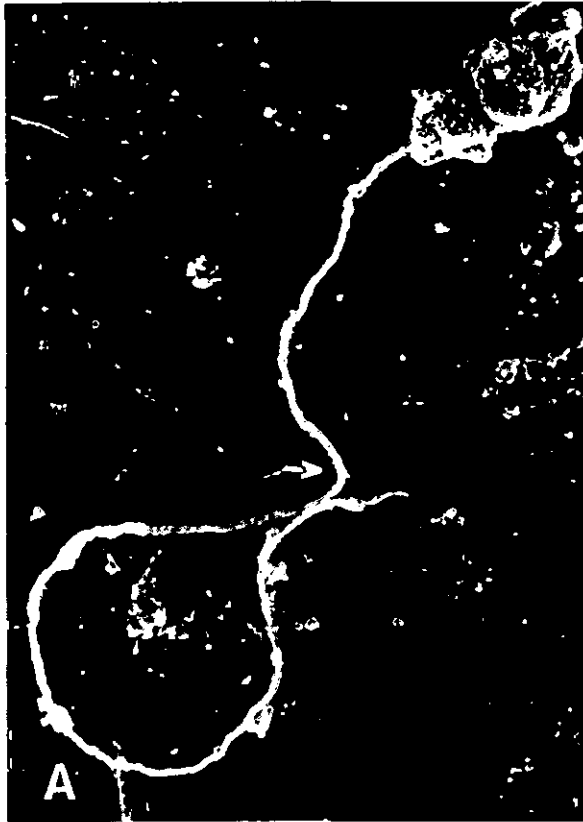


Fig. 2. Chromaffin cells examined under the scanning electron microscope. **A:** Chromaffin cells with long neuritic extensions (arrow) maintained for 7 days stimulated by NGF (350x). **B:** Preparation of chromaffin cells cultured for 7 days and subjected to ELFM showing neuritic extensions with varicosities (arrow; 1,500x). **C:** Chromaffin cells cultured for 7 days in

presence of NGF showing curvilinear appearance of the neuritic extensions with some varicosities (arrows; 1,500x). **D:** Chromaffin cells cultured for 7 days and subjected to ELFM where the neuritic extensions appear straight with several varicosities in them (arrows; 750x).

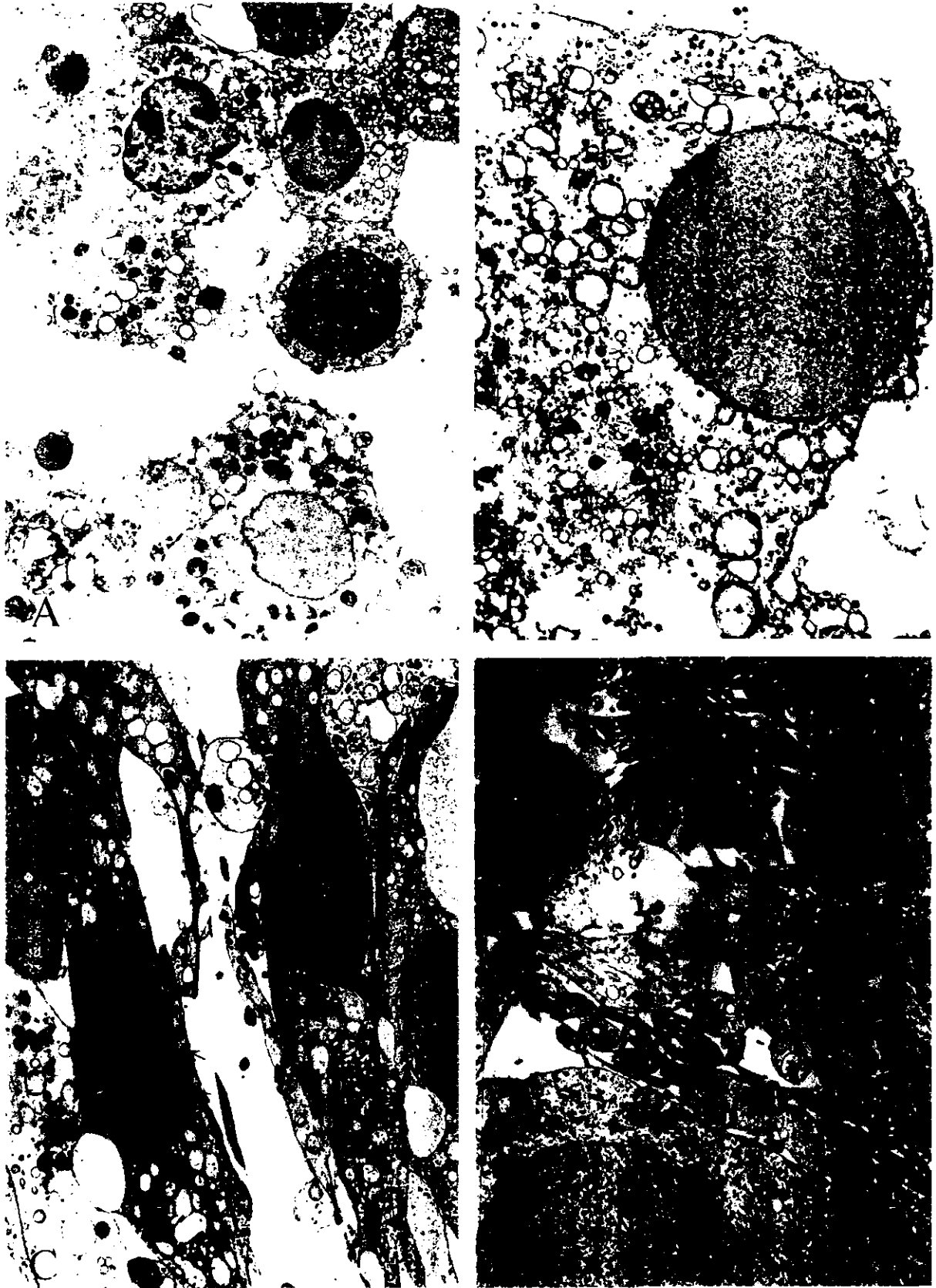


Figure 3.

few microtubules, a moderate amount of cisterns with smooth endoplasmic reticulum profiles, and free ribosomes and polyribosomes (Fig. 4–C). Few Golgi structures and a small amount of neurosecretory-like membrane-limited granules, 80 to 100 nm in diameter, with an electron-dense core were observed. The nucleus showed membrane thickening because of increased density of the intranuclear material adjacent to the internal nuclear membrane (Figs. 3C; 4A,–C), moderate amount of nuclear pores and moderate amount of heterochromatin immersed in the nuclear sap where a prominent nucleolus was usually identified (Fig. 3C). In the ends of several neurites, cytoplasmic extensions were seen with an image morphologically similar to growth cones, conic in shape with some filopodia (Fig. 5A–D). Their cytoplasm contained endoplasmic reticulum cisternae, numerous clear vesicles of variable diameters, mitochondria, lysosomes, few electron-dense granules, large amount of intermediate filaments, and few microtubules.

#### Group IV

ELFMF-stimulated cells grown and stained with the Gross-Bieloschowski technique were mostly of an ovoid or fusiform soma, 8 to 12  $\mu$ m of largest diameter, with cytoplasm extensions showing varicosities in their path (Fig. 1D). Some of these neurites ended in structures similar to growth cones. Spherical or ovoid cells were also seen with no cytoplasmic extensions, a central nucleus, and finely granular cytoplasm. Under the scanning electron microscope, both cell populations were identified. It was seen that cytoplasm extensions in differentiated cells were linear, straight, and branched with varicosities in their path and terminal endings

similar to growth cones (Fig. 2D). With the transmission electron microscope, cells with neurites showed an ovoid nucleus, well-defined perinuclear cisternae, no condensations, a moderate amount of nuclear pores (Figs. 6B and 8A), heterochromatin spread in coarse clumps across the nucleoplasm, and a prominent nucleolus. Cytoplasm in these cells showed numerous mitochondria, lysosomes, several endoplasmic reticulum elements, both smooth and granulated, few intermediate filaments, and numerous neurotubules (Fig. 7C). Furthermore, some neurosecretory-like granules, clear vesicles, 50 to 60 nm in diameter, free ribosomes and polyribosomes were also identified (Figs. 3D and 6A). Neuritic extensions particularly showed numerous microtubules and few microfilaments or intermediate filaments (Fig. 7A and B) or intermediate strings. In the varicose region, some mitochondria, ribosomes, and clear vesicles were also identified (Fig. 7A). Cytoplasm extensions were seen on the ends of certain neurites with thin, short extensions corresponding to filopodia. These extensions had numerous clear vesicles of variable diameters (50 to 100 nm), some mitochondria, few intermediate filaments, and a moderate amount of microtubules, a structure corresponding to growth cones (Fig. 8B–D). Spherical or ovoid cells, with no neuritic extensions, had numerous organelles such as mitochondria, lysosomes, neurosecretory-like granules, Golgi structures, and components of the smooth and granulated endoplasmic reticulum, as well as a few cytoskeletal elements. The nucleus of these cells was ovoid in shape, with well-defined perinuclear cisternae, prominent nucleolus, and heterochromatin clumps within the nucleoplasm.

#### DISCUSSION

In this paper, the morphological characteristics, at an histological and ultrastructural level of adrenal medulla chromaffin cells of newborn rats, grown under basal conditions for 7 days, in the presence of NGF or stimulated by ELFMF, are described. These findings are compared to morphological characteristics of chromaffin cells obtained and dissociated from newborn animals. When the adrenal medulla isolated from neonatal rats is dissociated and cultured, one can observe chromaffin cells of different types. It has been reported that chromaffin cells are round and ovoid at plating and become partially polygonal after a few days in culture (Ogawa et al., 1986) and about 10–15% of them elicit processes within one week of culture (Drucker-Colín et al., 1994; Herman et al., 1992; Livett, 1984). On the other hand, in the presence of NGF, there is a great increase in the amount of endoplasmic reticulum and mitochondria concomitant with increases in Golgi apparatus and microtubules (Ogawa et al., 1986). These observations are similar

Fig. 3. Low magnification of transmission electron micrographs of cultured chromaffin cells. **A:** Recently obtained chromaffin cells from rat adrenal medulla where they appear ovoid or round with a large nucleus, prominent nucleolus, clear cytoplasm with various types of organelles including mitochondria and some neurosecretory-like granules (2,156x). **B:** Part of a chromaffin cell cultured for 7 days in basal culture medium showing some electron-dense neurosecretory-like granules (arrow), mitochondria, and some lysosomes (3,597x). **C:** Chromaffin cells cultured for 7 days in presence of NGF where the most prominent feature is represented by the electron-dense zone just beneath the nuclear envelope (arrows), and some lysosomes, mitochondria, cytoplasmic vacuoles, and neuritic extensions (1,293x). **D:** Chromaffin cells cultured for 7 days subjected to ELFMF where in the soma a round nucleus is observed with its normal appearance (N), along with mitochondria, neurosecretory-like granules (arrow), endoplasmic reticulum profiles, and a well-defined cytoplasmic membrane. In the rest of the photograph there appears some straight cytoplasmic processes oriented in different directions (3,597x).

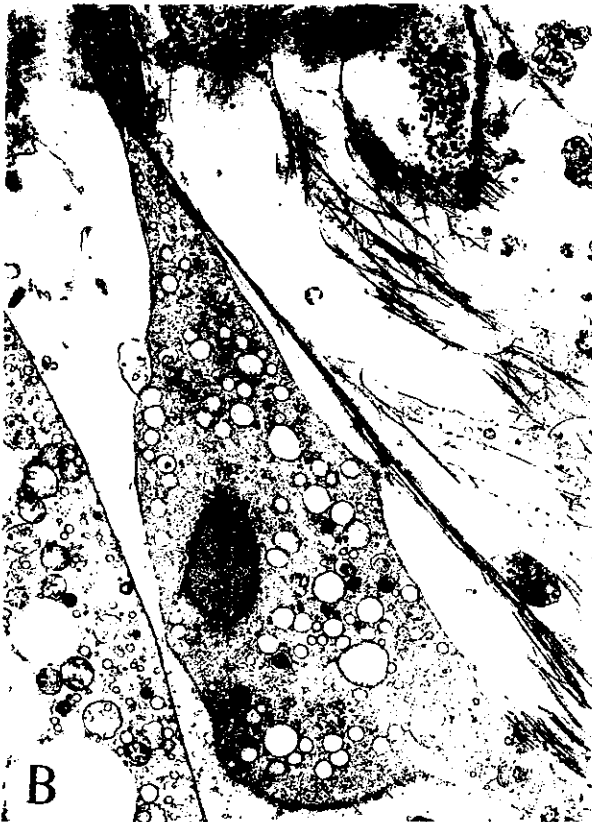
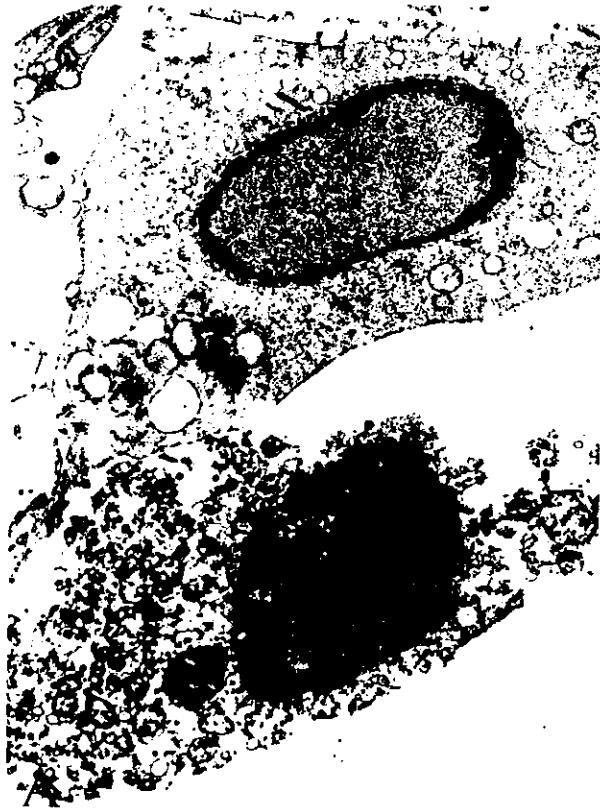


Fig. 4. Electron micrographs of chromaffin cells cultured for 7 days in presence of NGF where the most striking feature is the electron-dense appearance of the nuclear envelope, apparently due to a condensation of material just beneath the internal nuclear membrane. Vacuoles, mitochondria, and few neurosecretory-like granules are seen into the cytoplasm. Neuritic extensions are clearly seen where several neurofilaments are present in these processes (asterisk in C). A: (6,000x), B: (1,670x), and C: (6,000x).

tory-like granules are seen into the cytoplasm. Neuritic extensions are clearly seen where several neurofilaments are present in these processes (asterisk in C). A: (6,000x), B: (1,670x), and C: (6,000x).



Fig. 5. In the course of the neuritic extensions of the chromaffin cells cultured in presence of NGF appear the typical structure of growth cones represented by cytoplasmic distensions containing vacuoles (V in B and D), some mitochondria, smooth-surfaced cisternae, and some neurosecretory-like granules (ar-

rows in B and C). Few filopodia are seen in one of the growth cones (F in B and D). Note the presence of large amount of intermediate filaments into these neuritic extensions, the growth cones and the filopodia (asterisks in A and C). A: (4,646x), B: (4,646x), C: (10,000x), and D: (10,000x).

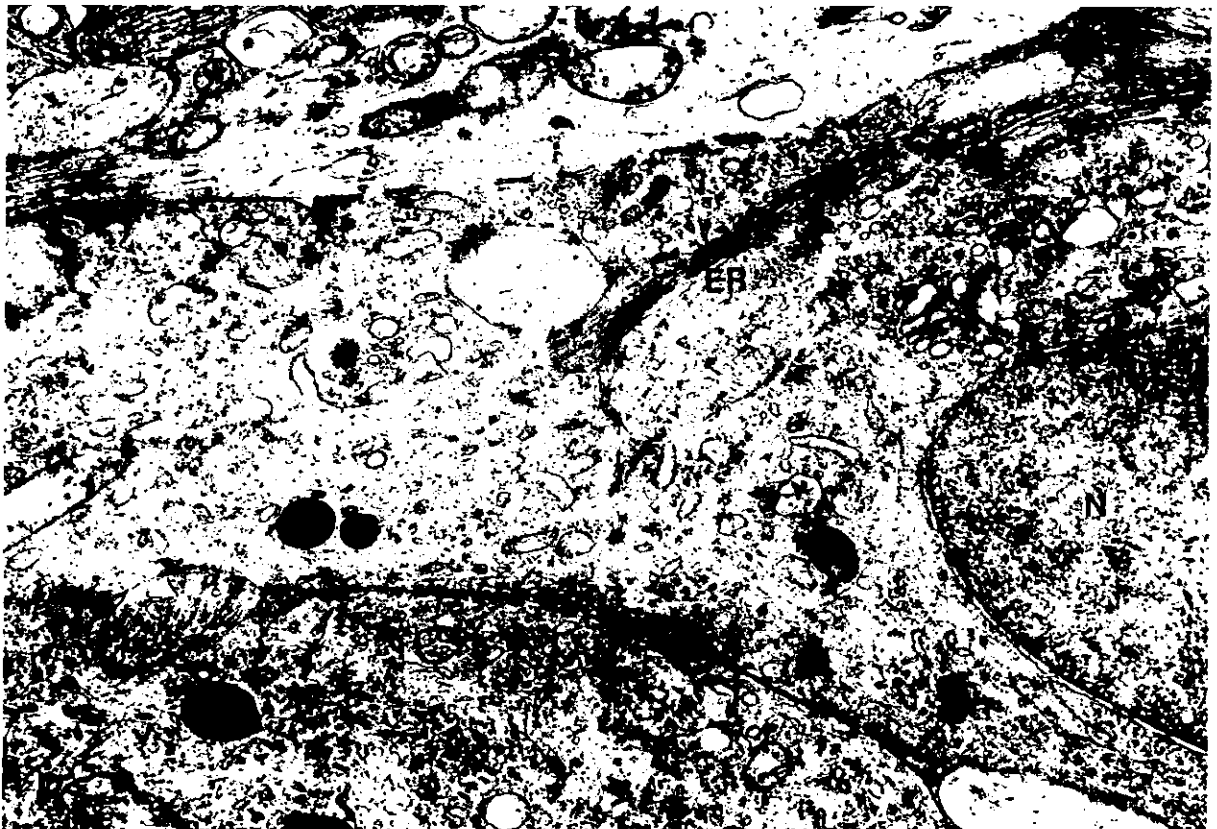


Fig. 6. Electron micrographs of medulla chromaffin cells and subjected to ELFMF. The normal appearance of the nucleus (N) is evident, and the cytoplasm displays the typical organelles of these cells including mitochondria, free ribosomes, polyribo-

somes, endoplasmic reticulum profiles (ER), microtubules, and some neurosecretory-like granules (arrow in A). A: (16,700x) and B: (21,560x).





Fig. 7. Electron micrographs of neuritic extensions and cytoplasmic matrix of chromaffin cells cultured for 7 days subjected to ELFMF. A: Neuritic extension with some varicosities showing numerous microtubules into the cytoplasm along (arrows) with some vacuoles (V) and mitochondria (16,700x) into the varicosities. B: Low magnification showing various intermingled

neuritic extensions with numerous microtubules into their cytoplasm (arrows; 4,646x). C: Portion of a nucleus in one of these chromaffin cells where nuclear pores in tangential sections are clearly discerned (arrows); in the cytoplasm neurosecretory-like granules, vesicles, endoplasmic reticulum profiles, and numerous microtubules are clearly observed (16,000x).

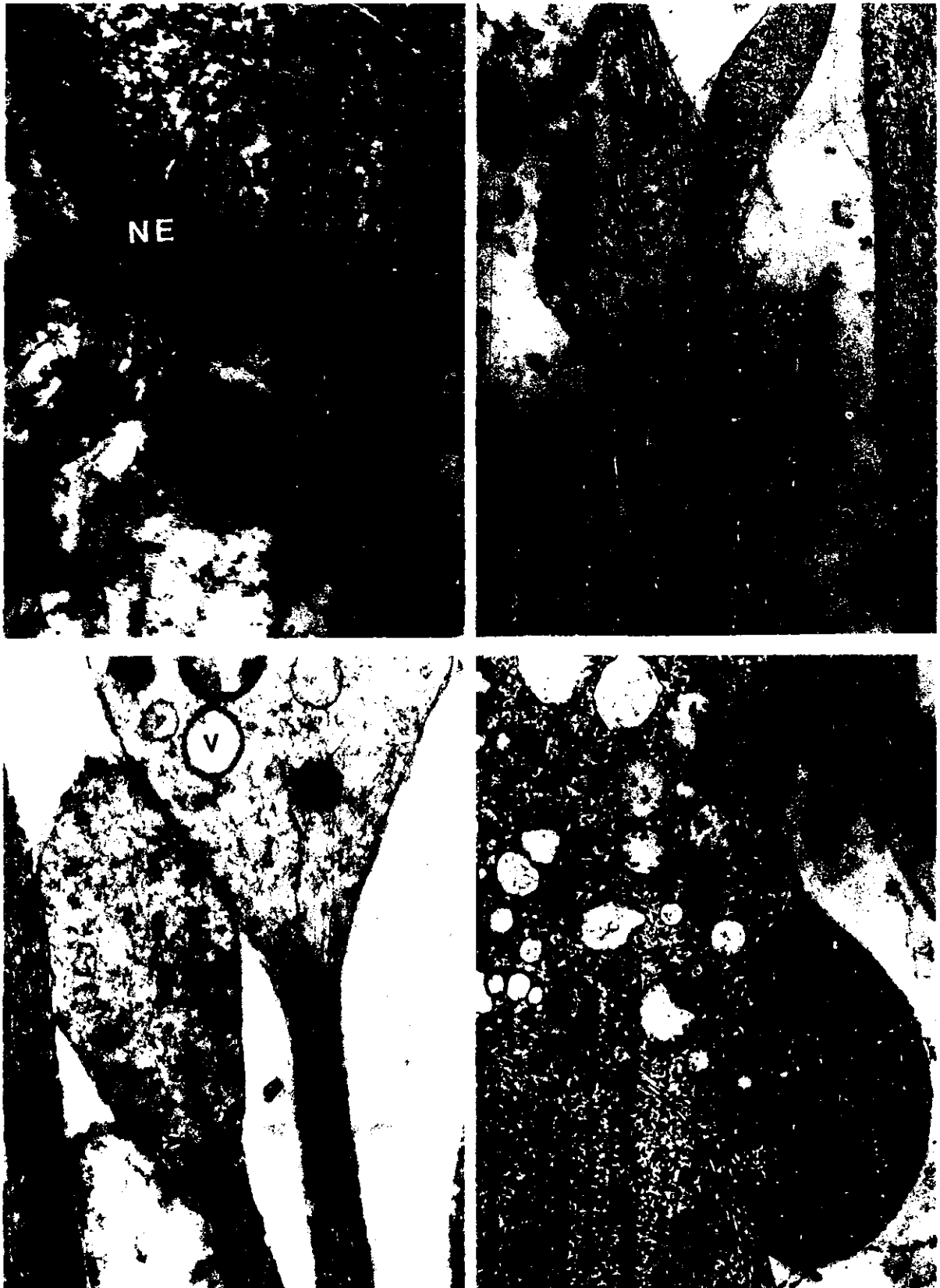


Figure 8.

to our cultures of chromaffin cells differentiated with NGF, but some differences are observed in cultures exposed to ELFMF. In the latter case, the cytoskeleton is more numerous in neurotubules than in microtubules. This characteristic has been observed in the neuritic extensions of neurons. Matus (1990) proposes that a microtubule assembly is essential for the maintenance of the radial axon and dendrite structure. Microtubule associated proteins (MAPs) are directly related to these functions, promoting polymerization of tubulin and participating in chaining microtubules in neuritic extensions. Early type MAPs are related to the formation and growth of neuritic extensions to create future dendrites or axons, while late type MAPs are involved in stabilizing and preserving already created dendrites and axons (Matus, 1990).

Adrenal medulla chromaffin cells have been known to be susceptible to phenotypic changes under the effect of several stimuli. The most interesting change is the appearance of neurites growing from cytoplasmic projections in these cells or growth cones present in those extensions. This would be indicative of their neuronal phenotype. Very little is known about the ultrastructure of these neuritic extensions in chromaffin cells in culture and even less is known about the association of these changes to the nature of stimuli inducing differentiation in these chromaffin cells. Most reports on transformed adrenal cells have used the pheochromocytoma or PC-12 cells. When growing PC-12 line cells, two populations have been identified, the first population having a spherical phenotype and a morphology very similar to what is observed in normal recently obtained dissociated adrenal medulla cells, the second population having a neuronal phenotype, which in spite of not having a consistent morphology, shows neuritic extensions with a moderate amount of intermediate filaments and microtubules, vari-

cosities in their extensions, and some growth cones on the distal portion of their cell processes (Lal et al., 1995). Edgar et al. (1979) reported certain morphological findings in PC-12 cells, such as the formation of fibers associated with choline acetyl transferase activity. Notter et al. (1989) observed in chromaffin cells grown together with glioma C<sub>6</sub> cells that microtubules predominated over neurofilaments in neurites stemming directly from the soma.

Some studies have shown that chromaffin cells, when grown in the presence of NGF, increase their calcium exchange and enhance cell survival and development (Nikodijevic and Guroff, 1991).

An earlier study (Drucker-Colín et al., 1994), with the use of light microscopy techniques, showed that cultured chromaffin cells, subjected to both kinds of stimuli (NGF or ELFMF), are differentiated by issuing numerous neuritic extensions. In this study, those findings are confirmed and supplemented by showing that cells grown in the presence of NGF show neurites of irregular paths, while cells grown and stimulated by ELFMF show straighter, more rigid neuritic extensions and when seen under the transmission electron microscope, a prevalence of intermediate filaments or microtubules, respectively, is observed. It could be that in the case of ELFMF stimulation, part of the structural changes are associated with calcium cell entrance processes, since when blocking the L-Ca<sup>2+</sup> channels with nifedipine, no ELFMF-induced differentiation was observed, which is not the case for NGF, while N-calcium channel blockers did not prevent differentiation (Morgado-Valle et al., 1998). In view of the above observations, it may be worth determining whether L-Ca<sup>2+</sup> channels are in any way related to the preferential assembly of microtubules over the intermediate filaments during chromaffin cell neural differentiation.

The changes presented in this study may be significant. Cells stimulated with ELFMF may be subjected to changes in the sites of cell calcium entrance as suggested by Conti et al. (1985) and shown by Morgado-Valle et al. (1998), without overlooking the fact that one should consider the cell cycle stage where chromaffin cells are found at the time of stimulation and the intensity of the magnetic fields applied (Walleczek and Budinger, 1992).

In sum, this study shows that both NGF and ELFMF stimulation induced neural differentiation in adrenal medulla chromaffin cells of newborn rats, mainly characterized by the formation of neuritic extensions, the presence of growth cones, and the appearance of varicosities in the neurites showing a structure similar to that seen in monoaminergic fibers (Hökfelt, 1974). Support for this latter observation is additionally found in previous studies where these cells have been shown to be TH-positive (Drucker-Colín et al., 1994; Morgado-Valle et al., 1998). When studying both groups of cultured cells under the

---

Fig. 8. Electron micrographs of chromaffin cells cultured for 7 days and subjected to ELFMF. **A:** Portion of a chromaffin cell where numerous nuclear pores (arrows) are discerned in the nuclear envelope; in the cytoplasm some mitochondria (m) along with free ribosomes, granular endoplasmic (NE) reticulum, and intermediate filaments (asterisk), are observed (4,646x). **B:** Neuritic extensions where the most striking feature is the presence of microtubules in their cytoplasmic matrix (arrow; 4,646x). **C:** A growth cone is seen in one neuritic extension, showing its typical structure, with neurotubules (arrow), vacuoles (V), and finely granular material (10,000x). **D:** Portion of a chromaffin cell showing part of its nucleus and cytoplasm containing some mitochondria, vacuoles, and free ribosomes. A cytoplasmic extension of a neurite is seen in close contact with a chromaffin cell (NU). This extension shows electron-dense neurosecretory-like granules, microtubules, and some microfilaments (10,000x).

transmission electron microscope, cells grown in the presence of NGF showed a clear preferential growth of intermediate filaments and irregularly shaped neurites with grossly wavy patterns. In contrast, in cells cultured under ELFMF, microtubules predominate in neurites which show straighter and more rigid images. In both types of cultures, growth cones, filopodia at neurite ends, and varicosities on their paths were observed. Distorted granules typical of NA cells, with highly electron-dense masses eccentrically placed within distended limiting membranes, are seen in all types of cultures presented in this paper. The presence of these neurosecretory-like granules in neural extensions and growth cones would additionally be indicative of neuronal-like sympathetic neurons (Grillo, 1966).

Experiments are now underway attempting to define whether these ultrastructural findings have any specific biologic functions which could characterize chromaffin cells grown and stimulated under different conditions.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Miss Patricia Piña Sánchez, Miss Rita Mota Domínguez, and Mr. Fernando Carbajal-Esquivel for their technical assistance, Mr. Eduardo López and Mr. Jorge Toledo for their assistance in photography, and Ma. Teresa Torres-Peralta for typing the manuscript. This work was partially supported by Fideicomiso UNAM to R.D.C.

## REFERENCES

- Bassen H, Litovitz T, Penafiel M, Meister R (1992): ELF in vitro exposure systems for inducing uniform electrical and magnetic fields in cell culture media. *Bioelectromagnetics* 13:183-198.
- Borgens RB (1989): Artificially controlling axonal regeneration and development by applied electric fields. In Borgens RB, Robinson JW, Vanable Jr, Mc.Ginnis ME (eds): "Electrical Fields in Vertebrate Repair." New York: Wiley-Liss, Inc., pp 117-170.
- Conti P, Gigante GE, Alesse E, Cifone MG, Fieschi C, Reale M, Angeletti PU (1985): A role for  $Ca^{2+}$  in the effect of very low frequency electromagnetic field on blastogenesis of human lymphocytes. *FEBS Lett* 181: 28-32.
- Doupe AJ, Landis StC, Patterson PH (1985): Environmental influences in the development of neural crest derivatives: Glucocorticoides, growth factors and chromaffin cells plasticity. *J Neurosci* 5:2119-2142.
- Drucker-Colín R, Verdugo-Díaz L, Méndez M, Carrillo-Ruíz J, Morgado-Valle C, Hernández-Cruz A, Corkidi G (1994): Comparison between low frequency magnetic field stimulation and nerve growth factor treatment of cultured chromaffin cells, on neurite growth, noradrenaline release, excitable properties, and grafting in nigrostriatal lesioned rats. *Mol Cell Neurosci* 5:485-498.
- Edgar D, Barde YA, Thoenen H (1979): Induction of fibre outgrowth and choline acetyltransferase in PC12 pheochromocytome cells by conditioned media from glial cells and organ extracts. *Exp Cell Res* 121:353-361.
- Grillo MA (1966): Electron microscopy of sympathetic tissues. *Pharmacological Rev* 18:387-399.
- Herman MAR, Shulz CA, Claude P (1992): Early and late effects of NGF may be mediated by different pathways in transdifferentiating chromaffin cells. *Brain Res* 575:257-264.
- Hinkle L, McCaig CD, Robinson KR (1981): The direction of growth of differentiating neurons and myoblasts from frog embryos in applied electrical fields. *J Physiol* 314:121-131.
- Hökfelt T (1974): Morphological contributions to monoamine pharmacology. *Fed Proc* 33:2177-2186.
- Lal R, Drake B, Blonberg D, Saner DR, Hansnea PK, Feinsten SC (1995): Imaging real-time neurite outgrowth and cytoskeletal reorganization with an atomic force microscope. *A J Physiol* 269:275-285.
- Livett BG (1984): Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* 64:1103-1161.
- Matus A (1990): Microtubule-associated proteins and determination of neuronal form. *J Physiol* 84:134-137.
- Millar TJ, Unsicker K (1981): Catecholamine-storing cells in the adrenal medulla of the pre- and postnatal rat. *Cell Tissue Res* 217:155-170.
- Morgado-Valle C, Verdugo-Díaz L, García DE, Morales-Orozco C, Drucker-Colín R (1998): The role of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. *Cell Tissue Res* 291:217-230.
- Muller TH, Unsicker K (1986): Nerve growth factor and dexamethasone modulate synthesis and storage of catecholamines in cultured rat adrenal medullary cells: Dependence of postnatal age. *J Neurochem* 46:516-524.
- Nikodijevic B, Guroff G (1991): Nerve growth factor-induced increase in calcium uptake by PC12 cells. *J Neurosci Res* 28:192-199.
- Notter MFD, Hansen JT, Okawara S, Gash DM (1989): Rodent and primate adrenal medullary cells in vitro: Phenotypic plasticity in response to coculture with C6 glioma cells or NGF. *Exp Brain Res* 76:38-46.
- Ogawa M, Ishikawa T, Irimajiri A (1984): Adrenal chromaffin cells form functional cholinergic synapses in culture. *Nature* 307:66-68.
- Ogawa M, Ishikawa T, Ohta H (1986): Transdifferentiation of endocrine chromaffin cells into neuronal cells. *Curr Topics Dev Biol* 20:90-110.
- Pool R (1990): Electromagnetic field: The biological evidence. *Science* 249:1378-1381.
- Robinson KR (1985): The responses of cells to electrical fields: A review. *J Cell Biol* 101:2023-2027.
- Sheehann D, Hrapchak B (1980): "In Theory and Practice of Histotechnology." St. Louis Missouri: The C.V. Mosby Company.
- Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H (1978): Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cell: Impairment by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2242-2246.
- Wallaczek J, Budinger TF (1992): Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and field intensity. *FEBS Lett* 314:351-355.