

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**IDENTIFICACIÓN DE GENES INDUCIDOS POR CAMPOS  
MAGNÉTICOS DE EXTREMA BAJA FRECUENCIA EN CÉLULAS  
CROMAFINES DIFERENCIADAS**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
PRESENTA

M. en C. TATIANA NENETZEN OLIVARES BAÑUELOS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. RENÉ RAÚL DRUCKER COLÍN

MAYO DEL 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE DESARROLLÓ EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA TUTORÍA DEL DR. RENÉ DRUCKER COLÍN Y LA ASESORÍA DE LA DRA. LUZ NAVARRO ÁNGULO Y LA DRA. LETICIA VERDUGO DÍAZ, CON EL APOYO ECONÓMICO DE:

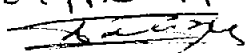
CONACYT

- BECA CRÉDITO No. 119311 OTORGADA A T.N.O.B.
- PROYECTO DE INVESTIGACIÓN No. 25122-M OTORGADO A R.D.C.

DEGAPA

- SUPLEMENTO DE BECA OTORGADA A T.N.O.B.
- PROYECTO DE INVESTIGACIÓN IN-208799 OTORGADO A R.D.C.

FIDEICOMISO OTORGADO A R.D.C.

Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica  
del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
Programa de Becas de Investigación Científica y Tecnológica  
Tatiana N. Olvera Barvelat  
27/Abril/04.  


# ÍNDICE

	PÁGINA
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>ANTECEDENTES</b>	3
DIFERENCIACIÓN CELULAR	3
CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR	5
CONTROL DEL CRECIMIENTO CELULAR	6
CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE GENES	8
FACTORES DE DIFERENCIACIÓN	13
FACTORES CELULARES INTERNOS	13
FACTORES AMBIENTALES INTERNOS	17
FACTORES AMBIENTALES EXTERNOS	20
CAMPOS MAGNÉTICOS	20
LAS CÉLULAS CROMAFINES, UN MODELO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	26
<b>JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	38
<b>HIPÓTESIS</b>	40
<b>OBJETIVOS</b>	40
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	41
CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS CROMAFINES	42
TINCIÓN CON ROJO OLEOSO	42
DIFFERENTIAL DISPLAY	43

	PÁGINA
NORTHERN BLOT	44
ANÁLISIS DE SECUENCIAS	45
INMUNOFLUORESCENCIA PARA MAP-2	45
HIBRIDACIÓN DE MICROARREGLOS DE DNAC DE RATA	46
ANÁLISIS DE MICROARREGLOS	47
<b>RESULTADOS</b>	49
DIFFERENTIAL DISPLAY	51
La expresión de las MAP-2 es específica de las células cromafines diferenciadas	54
Análisis de la región regulatoria 5' de los genes modificados por CM-EBF	55
MICROARREGLOS	57
<b>DISCUSIÓN</b>	76
<b>CONCLUSIONES</b>	99
<b>PERSPECTIVAS</b>	100
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	101
<b>APÉNDICE</b>	114

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	PÁGINA
<b>Figura 1</b> Seis pasos en los cuales la expresión genética en eucariontes puede ser regulada	9
<b>Figura 2</b> Espectro electromagnético	23
<b>Figura 3</b> Formación embrionaria del linaje simpatoadrenal	28
<b>Figura 4</b> Diferencias entre células cromafines tratadas con NGF o con CM-EBF	34
<b>Figura 5</b> Microfotografías de cultivos primarios de células cromafines no diferenciadas y diferenciadas	50
<b>Figura 6</b> Bandas diferenciales observadas con el método de Differential Display	52
<b>Figura 7</b> Gráficas de intensidad de los transcritos observados en el análisis de Differential Display	53
<b>Figura 8</b> Inmunofluorescencia de células cromafines con MAP-2	54
<b>Figura 9</b> Análisis de los elementos de respuesta electromagnéticos	56


- Figura 10** Gráficas de porcentajes del análisis consecutivo de datos para determinar cambios verdaderos entre tratamientos de células cromafines 57
- Figura 11** Gráficas de porcentajes de genes conocidos y sobreexpresados al comparar el grupo tratado con NGF y el grupo control 59
- Figura 12** Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes conocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con NGF y las células cromafines no tratadas 60
- Figura 13** Gráficas de porcentajes de genes conocidos y sobreexpresados al comparar el grupo tratado con CM-EBF y el grupo control 63
- Figura 14** Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes conocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con CM-EBF y las células cromafines no tratadas 64
- Figura 15** Gráficas de porcentajes de genes conocidos y sobreexpresados al comparar el grupo tratado con CM-EBF y el grupo de NGF 66
- Figura 16** Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes conocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con CM-EBF y las células cromafines tratadas con NGF 67

<b>Figura 17</b>	Mecanismo de acción propuesto para explicar el efecto de los campos magnéticos de extrema baja frecuencia sobre las células cromafines	98
<b>Tabla 1</b>	Comparación de características de las células cromafines diferenciadas con NGF o con CM-EBF	35
<b>Tabla 2</b>	Correspondencia de los transcritos diferenciales secuenciados	51
<b>Tabla 3</b>	Genes conocidos que se modifican en los tratamientos aplicados a las células cromafines	69
<b>Tabla 4</b>	Funciones celulares de los genes conocidos que se modifican en los tratamientos aplicados a las células cromafines	72
<b>Tabla 5</b>	Genes conocidos y su participación en distintas rutas metabólicas celulares	75



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>A</b>	Adrenalina
<b>ATP</b>	Adenosin-trifosfato
<b>ADP</b>	Adenosin-difosfato
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CM</b>	Campo Magnético
<b>CM-EBF</b>	Campos Magnéticos de Extrema Baja Frecuencia
<b>DAA</b>	Descarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos
<b>DBA</b>	Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa
<b>DMSO</b>	Dimetil-sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DNAc</b>	Ácido Desoxirribonucléico copia
<b>DOPA</b>	Dihidroxifenilalanina
<b>ERK</b>	Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FH</b>	Fenilalanina Hidroxilasa
<b>GTP</b>	Guanosin-trifosfato
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MAP</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos
<b>MAP-2</b>	Proteínas asociadas a microtúbulos tipo 2
<b>mT</b>	Mili Teslas
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NGF</b>	Factor de Crecimiento Neuronal
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Solución buffer de fosfatos



<b>PCR</b>	Reacción de Polimerasa en Cadena
<b>PNMT</b>	Feniletanolamina-N-metil-transferasa
<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNAm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>RNAs</b>	Ácidos Ribonucleicos
<b>SA</b>	Simpatoadrenal
<b>SGC</b>	Células cromafines de gránulos pequeños
<b>SIF</b>	Células pequeñas de intensa fluorescencia
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor- $\beta$ -transformante de crecimiento
<b>TH</b>	Tirosina Hidroxilasa

## RESUMEN

Los campos electromagnéticos de extrema baja frecuencia (CM-EBF) inducen cambios en la morfología, en los procesos bioquímicos y en la expresión de genes de las células cromafines de rata neonata (1-3 días de edad). A la fecha no se conocen los mecanismos por los cuales este tipo de campos causan las modificaciones antes mencionadas y solamente existen teorías, relacionadas con diferentes tipos celulares, que intentan establecer posibles mecanismos de acción para que se lleven a cabo estos procesos. El objetivo del presente trabajo de investigación radica en determinar cuales genes se modifican durante la exposición de las células cromafines de rata neonata a campos magnéticos de baja intensidad (0.7 mT) y compararlos con los que se modifican al tratar a dichas células con factor de crecimiento neuronal (NGF). Para alcanzar dicho objetivo se utilizaron dos métodos de análisis: el Differential Display y la hibridación de Microarreglos de DNAC de rata. De los resultados obtenidos se concluye que: 1) el mecanismo de diferenciación de las células cromafines tratadas con NGF es distinto al mecanismo inducido por CM-EBF, 2) el proceso de diferenciación por CM-EBF comprende un menor número de cambios en la expresión génica de las células cromafines, comparado con los cambios que se inducen cuando las células se exponen a NGF, y 3) durante el proceso de diferenciación de las células cromafines la mayoría de los genes se reprimen para dar lugar al fenotipo neuronal.

## INTRODUCCIÓN

La *diferenciación celular* es el proceso por el cual una célula relativamente poco especializada, adquiere rasgos estructurales y funcionales que la caracterizan en el organismo [Smith, 2000].

Las células cromafines son un modelo de estudio en el que es posible observar el comportamiento celular y todos aquellos cambios que se generan cuando estas células se diferencian a células neuronales. Las células cromafines tienen el mismo origen embrionario que las neuronas simpáticas. Durante la migración embrionaria las células cromafines quedaron arrestadas antes de alcanzar su estado diferenciado final, lo que les permite continuar el proceso de diferenciación celular cuando se les estimula con distintos factores. Entre estos factores se encuentra el factor de crecimiento neuronal (NGF, por sus siglas en inglés), los campos eléctricos o los campos magnéticos de extrema baja frecuencia (CM-EBF) y el cocultivan con células gliales. Las células cromafines diferenciadas presentan numerosos cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos, que requieren ser estudiados en detalle.

En la actualidad, existen diversos reportes sobre estas células cuando son diferenciadas con factores como el NGF. En contraste, son escasos los reportes que expliquen los cambios genéticos que se presentan en las células cromafines cuando se diferencian con CM-EBF. El presente trabajo de investigación tiene la finalidad de conocer los cambios genéticos que se presentan en las células

cromafines estimuladas con CM-EBF, y su comparación con los efectos del NGF, para contribuir en el entendimiento del mecanismo celular desencadenado por dichos campos magnéticos.

## **ANTECEDENTES**

### **DIFERENCIACIÓN CELULAR**

El número de células de un organismo varía de una célula a cientos de trillones. Los humanos y otros vertebrados superiores están formados por millones de células, pero únicamente por aproximadamente 200 tipos celulares diferentes. En todos los organismos cada tipo celular está definido por su morfología, función y características moleculares propias. Dos células pueden tener el mismo tipo celular pero presentan distinto origen embrionario, o bien pueden alcanzar el mismo estado diferenciado a través de diversos mecanismos de determinación celular [Kalthoff, 2001].

La especialización celular se alcanza en el estado maduro de las células y se conoce como *estado diferenciado*. Una célula diferenciada es generalmente estable y la mayoría no sufre transformaciones a otro tipo celular durante el desarrollo normal. El proceso por el cual una célula relativamente no especializada adquiere propiedades estructurales y/o funcionales, particulares de las células, los tejidos o los órganos de un ser maduro (o bien de alguna otra fase relativamente estable durante la vida del organismo), se conoce como *diferenciación celular* [Kalthoff, 2001].

La diferenciación ocurre inicialmente durante la histogénesis a través de un proceso secuencial, cuando los tejidos asumen su especialidad, y continúa a lo largo de la vida del organismo en donde algunas células son remplazadas continuamente por otras nuevas, dependiendo de los requerimientos particulares de cada tejido [Kalthoff, 2001].

Muchas células diferenciadas son altamente especializadas y dependen unas de otras para su mantenimiento, de tal manera que el estado diferenciado de un tipo celular depende del estado diferenciado de otras células. Durante la vida adulta, las nuevas células diferenciadas se producen de las células madre [Kalthoff, 2001].

Las principales características del proceso de diferenciación celular se resumen en éste principio: *los organismos multicelulares desarrollan un número limitado de diferentes tipos celulares que son generalmente estables una vez que han madurado.* Este principio se aplica a los organismos multicelulares y es básico para el entendimiento del desarrollo [Kalthoff, 2001].

Las distintas clases de células en un organismo multicelular difieren considerablemente tanto en estructura como en función. Por ejemplo, si comparamos una neurona con un linfocito, las diferencias son tan extremas que es difícil imaginar que contienen el mismo genoma. Por esta razón, y debido a que la diferenciación celular es a menudo irreversible, originalmente se suponía que los genes debían perderse selectivamente cuándo se diferenciaba una célula. Sin

embargo, ahora sabemos que la diferenciación celular depende generalmente de los cambios en la expresión de genes más que de algún cambio en la secuencia de nucleótidos del genoma de la célula [Alberts y cols., 2002].

## **CONTROL DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR**

El incremento en el tamaño celular, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, son comportamientos viables que todas las células, que no están terminalmente diferenciadas, presentan. Generalmente se asume que en cualquier célula hay una conexión importante entre la regulación, el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular, a pesar de que cada proceso parece ser independiente uno del otro. Muchas células que comienzan a diferenciarse y adquieren funciones especializadas dejan de dividirse, y se mueven a la fase G0 del ciclo celular, perdiendo la capacidad de dividirse posteriormente. Esto nos hace suponer que sí existe una conexión entre diferenciación, cesación de la proliferación y entrada a G0, pero esta conexión no obliga a la célula a decidir entre proliferar o diferenciarse, es decir puede realizar uno de los dos procesos de manera relativamente independiente del otro [Brown y cols., 2003].

La relación directa entre proliferación celular y diferenciación aún no se establece. Sin embargo, se ha sugerido que la remodelación de la cromatina durante los ciclos celulares facilita que las células adquieran características de estados diferenciados, lo que podría indicar que las divisiones celulares durante la

maduración pueden ser esenciales para la diferenciación exitosa [Brown y cols., 2003].

Con esto podemos decir que para que una célula pueda diferenciarse, se requiere tanto de mecanismos de control en la proliferación y/o en el crecimiento, como del control en la expresión de genes.

### **CONTROL DEL CRECIMIENTO CELULAR**

Las células responden a los factores que promueven el crecimiento de dos formas: replicando sus cromosomas o incrementando la expresión de genes para formar nuevas proteínas. La replicación de cromosomas requiere de la producción de nuevo DNA, mientras que la expresión de genes requiere de la síntesis de nuevo RNA. En ambos casos se requiere un incremento en la producción de nucleótidos [Whitmarsh y Davis, 2000].

Los factores de crecimiento se unen a receptores específicos en la superficie celular, desencadenando cascadas de señales celulares. Una de estas cascadas incrementa la actividad enzimática de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAP), y requiere de la activación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) para el crecimiento celular. En respuesta a las señales de crecimiento, las cinasas MAP y ERK controlan la síntesis de nucleótidos para la producción de DNA y RNA. Esto lo hacen regulando directamente la actividad de la enzima carbamil-fosfato-sintetasa II (CPSII), la cual cataliza el paso inicial y limitante en la síntesis de nucleótidos [Whitmarsh y Davis, 2000].



Graves y colaboradores en el 2000 reportaron que la actividad de CPSII se incrementa después de que las células se exponen al factor de crecimiento epidermal, o si se incuban con las cinasas MAP y ERK *in vitro*. ERK y MAP catalizan la unión de grupos fosfato en la treonina 456 de CPSII, alterando su conformación e incrementando su actividad en la presencia del fosforibosil-pirofosfato.

Otro mecanismo por el cual las cinasas ERK y MAP regulan el crecimiento celular, es modificando los factores de transcripción. Dichas cinasas fosforilan un grupo de factores de transcripción, los cuales encienden a los genes de respuesta primaria requeridos para el crecimiento celular. Los factores de transcripción fosforilados incrementan el índice de transcripción de los genes, los cuales a su vez incrementan la síntesis de proteínas necesarias para que la célula crezca. ERK y MAP también favorecen la transcripción regulando la estructura de la cromatina. Las células que pierden a la enzima Rsk-2, la cual es activada por MAP, no pueden fosforilar a la histona H-3 y la cromatina no se puede descondensar impidiendo que los factores de transcripción actúen sobre el DNA [Whitmarsh y Davis, 2000].

Las cinasas ERK y MAP participan también durante la traducción del RNAm. La activación de ERK y MAP aumenta la traducción al incrementar la habilidad del factor-4E de iniciación de la traducción en eucariontes (eIF-4E) para reclutar

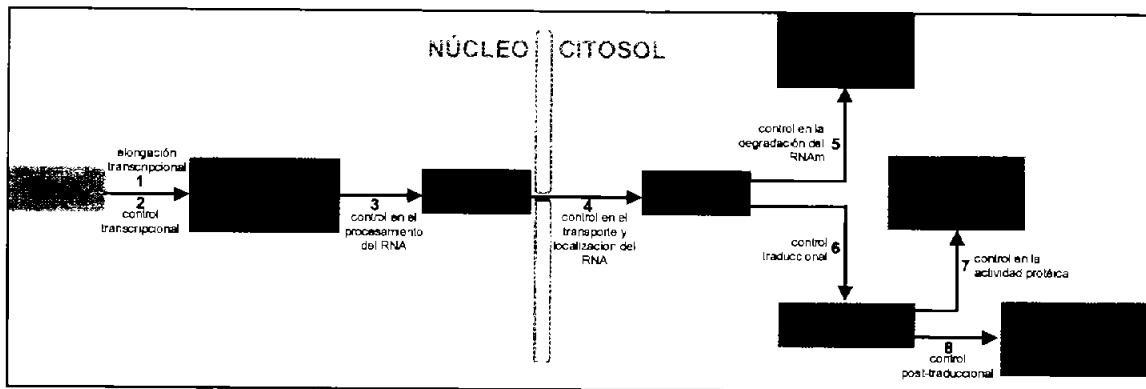
ribosomas que sintetizan proteínas, así como otros factores necesarios para iniciar la síntesis de proteínas [Whitmarsh y Davis, 2000].

Finalmente, el crecimiento celular en sí mismo, es influenciado por ERK y MAP. El crecimiento está altamente controlado por la actividad de la familia de cinasas dependientes de ciclinas (CDK). La síntesis de la ciclina D1 y su ensamble con Cdk4, es un paso limitante del crecimiento. La activación de las cascadas reguladas por MAP y ERK incrementa la transcripción del gen de la ciclina D1, facilitando la formación del complejo D1-Cdk4. Este complejo fosforila e inactiva la proteína de retinoblastoma represora de crecimiento, y la inactivación detiene la inhibición del factor de transcripción E2F, el cual puede incrementar la transcripción de genes que promueven el crecimiento y la replicación del DNA [Whitmarsh y Davis, 2000].

### **CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE GENES**

En eucariontes, la transcripción de un gen es controlada generalmente por combinaciones de proteínas reguladoras de genes. Se piensa que cada tipo de célula de un organismo eucariótico superior contiene una combinación específica de proteínas reguladoras de genes que aseguran la expresión de solo aquellos genes apropiados para ese tipo de célula. Una proteína reguladora de un gen determinado puede estar activa en una variedad de circunstancias y típicamente participa en la regulación de muchos genes [Alberts y cols., 2002].

Los genes están regulados en múltiples niveles (Figura 1), entre los cuales predomina el control de la iniciación de la transcripción (control transcripcional). Empero, algunos genes son transcritos en niveles constantes y se encienden o se apagan solamente por procesos regulatorios post transcripcionales. Estos procesos incluyen: 1) elongación transcripcional; 2) atenuación del transcrito de RNA por su terminación prematura; 3) selección del RNA por corte-empalme alternativo; 4) control del extremo 3' por corte o poliadenilación; 5) edición del RNA; 6) control del transporte del núcleo al citosol; 7) localización de los RNAs mensajeros en determinadas partes de las células; 8) control de la iniciación de la traducción; 9) regulación traduccional; y 10) degradación regulada del RNAm [Alberts y cols., 2002; Carey y Smale, 2000].



**Figura 1.** Seis pasos en los cuales la expresión genética en eucariotes puede ser regulada [Alberts y cols., 2002; Carey y Smale, 2000].

Estos mecanismos se utilizan de diversas formas para regular ciertas clases de genes. Algunos genes son regulados solamente por uno de estos mecanismos alternativos, y muchos otros genes son regulados por una combinación de mecanismos. Dentro de los mecanismos de regulación se encuentra la estabilidad del RNAm, la cual varía ampliamente en células de mamíferos con vidas medias

entre los 15 minutos (RNAm de *c-fos*) a 10 horas (RNAm de  $\beta$ -actina). Debido a la variación en la estabilidad de los RNAm no es sorprendente que el proceso de degradación está altamente regulado y contribuye a la regulación genética. Así, la estabilidad diferencial del RNAm es el mecanismo primario para regular un gran número de genes. En algunos casos, la estabilidad del RNAm se regula de manera conjunta con la iniciación de la transcripción. La estabilidad del RNAm está directamente relacionada con la degradación del mismo [Carey y Smale, 2000].

Las rutas de degradación de RNAm típicos en eucariontes no están definidas en detalle. Se sabe que uno de los mecanismos básicos de degradación es la deadenilación, posiblemente responsable de la degradación pasiva y regulada de la mayoría de los RNAm. Otros RNAm son degradados por rutas de deadenilación independientes. En la deadenilación-dependiente se acorta la cola de poli-Adeninas del RNAm en dirección 3'-5' por ribonucleasas (deadenilatonucleasa en mamíferos). El acortamiento de la cola de poli-A parece tener lugar en el citoplasma. Después del corte de adeninas, la pirofosfatasa específica remueve la estructura 7-metil-guanosina que se encuentra en el extremo 5' del RNAm. Al eliminarse esta estructura, el RNAm en el citoplasma es susceptible a exonucleasas, las cuales completan el proceso de degradación [Carey y Smale, 2000].

Por otro lado, el corte endonucleolítico del RNAm, o la terminación prematura de la transcripción, puede promover la degradación del RNAm vía deadenilación-independiente. Los elementos de respuesta ricos en Adeninas-Uracilos (AU), contribuyen en la reducción del tiempo de vida media de varios RNAm de respuesta temprana. Estos elementos de respuesta contienen la secuencia AUUUA, secuencia multicopia presente en las regiones 3' no traducibles del RNAm. Los elementos de respuesta AU contribuyen a la inestabilidad del RNAm y son capaces de desestabilizar RNAm heterólogos que contienen dichas secuencias AU [Carey y Smale, 2000].

A pesar de que la transcripción está regulada generalmente durante la iniciación, hay genes que se regulan durante la elongación. A la fecha, los determinantes específicos del índice de elongación no se han establecido, pero numerosos estudios en procariontes y eucariontes revelan que la elongación es un proceso complicado y dinámico que puede ser influenciado por componentes del complejo ternario, por la conformación del complejo unido a proteínas y nucleosomas cercanos al transcrito naciente, o por las estructuras primarias y secundarias del templado y el transcrito [Carey y Smale, 2000].

Todos estos determinantes tienen el potencial de incrementar o reducir el índice de elongación al detener, arrestar o terminar la actividad de la polimerasa. La detención de la polimerasa se define como un cesamiento reversible de la elongación por un periodo de tiempo definido. El arresto es similar a la detención, pero las moléculas de polimerasa arrestadas no pueden continuar a menos que

los factores suplementarios se agreguen. La gran cantidad de determinantes en el índice de elongación sugieren diferentes mecanismos de regulación genética durante éste proceso [Carey y Smale, 2000].

Finalmente, el corte-empalme diferencial del pre RNAm y la poliadenilación, son mecanismos reguladores en su mayoría implicados en generar proteínas relacionadas pero funcionalmente distintas. El corte-empalme del RNAm se realiza con un alto grado de precisión debido a que si se comete un error y un nucleótido extra se remueve o se agrega, se genera un cambio completo en el marco de lectura. Una vez que cambia el marco de lectura, se producen nuevos codones generando una secuencia de amino ácidos totalmente diferente, la cual puede ser no funcional [Pandit y Li, 2004].

Bajo diferentes condiciones o bien distintos tipos celulares, el corte-empalme del pre RNAm para muchas proteínas da origen a transcritos alternos que codifican para proteínas relacionadas pero no idénticas en el tejido. El corte-empalme alternativo proporciona un mecanismo para producir una amplia variedad de proteínas a partir de un número reducido de genes. Es así que éstos mecanismos, además del transporte nucleocitoplasmático del RNAm, contribuyen a la regulación de una gran cantidad de genes, en donde el corte-empalme parece ser el más común de ellos [Carey y Smale, 2000; Pandit y Li, 2004].

## **FACTORES DE DIFERENCIACIÓN**

En un organismo multicelular la mayoría de las células especializadas son capaces de alterar el patrón de expresión de sus genes en respuesta a claves ambientales internas, entre las que se encuentran las hormonas y los morfógenos, y a claves ambientales externas, como la luz, las radiaciones, la gravedad y los campos magnéticos. A la fecha, los mecanismos por los cuales las claves ambientales internas modifican a las células, son los más conocidos. Por el contrario, hoy en día sabemos poco de los mecanismos generados por las claves ambientales externas.

A continuación se habla de las principales características de dichas claves, con la finalidad de hacer notar las diferencias que existen entre ambos tipos.

## **FACTORES CELULARES INTERNOS**

Dentro de los factores internos de mayor interés para el presente trabajo se encuentran los factores neurotróficos, de los cuales se habla a continuación.

La familia de neurotrofinas o de factores neurotróficos incluye el NGF, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5). Estos factores neurotróficos son cruciales no solo para la regulación y la diferenciación celular durante el desarrollo, sino también para la sobrevivencia de diversas poblaciones neuronales en animales adultos. Las neurotrofinas normalmente funcionan interactuando con los

receptores de alta afinidad a la proteína tirocina cinasa (Trk, por sus siglas en inglés) TrkA, TrkB y TrkC. Cada una de las neurotrofinas se une específicamente a su receptor Trk. El NGF se une a TrkA, mientras que el BDNF y la NT-4/5 interactúan con TrkB, mientras que la NT-3 generalmente lo hace con el receptor TrkC, pero también puede interactuar con TrkA y TrkB [Dechant y Neumann, 2002].

Todas las neurotrofinas pueden unirse al receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75, el cual parece ser importante para potenciar la especificidad de los receptores Trk. Los efectos biológicos de las neurotrofinas están regulados por las señales en sí de los receptores Trk, o por la coactivación de los receptores Trk y p75. La activación de los receptores conlleva a la activación de distintos tipos de proteínas cinasas y una cascada de eventos intracelulares [Chan y cols., 2003; Dechant y Neumann, 2002].

Los hallazgos sobre los factores de crecimiento y sus receptores, han servido para que se utilicen dichos receptores como marcadores de diferenciación de tumores del sistema nervioso simpático en niños. Como ejemplo se encuentra el gen del factor del crecimiento parecido a la insulina 2 (IGF2), el cual tienen una alta expresión en el tejido simpático normal, específicamente en las células SIF y en las células cromafines extraadrenales en el paraganglio, y no se expresa en las neuronas simpáticas. Este gen se ha encontrado en una subpoblación de células del neuroblastoma con características histológicas de células SIF, sugiriendo que



dicho tumor infantil se origina del linaje de las células paraganglionicas/SIF [Hedborg y cols., 1995].

En animales adultos, las neurotrofinas son sintetizadas en una forma actividad-dependiente por las neuronas centrales y se liberan durante la despolarización. Las neurotrofinas también pueden modular la eficacia de las transmisiones sinápticas regulando positivamente la síntesis y liberación de más neurotrofinas. Tanto en animales en desarrollo como en animales adultos, los efectos de las neurotrofinas a largo plazo están implicados en distintas funciones: estructuración axonal y dendrítica, control de la muerte celular inducida, diferenciación fenotípica y regulación del precursor de la proliferación y neurogénesis [Chan y cols., 2003].

Debido a la abundancia relativa del NGF, éste fue el primer factor neurotrófico en ser aislado y caracterizado a partir de la glándula salival del ratón [Levi-Montalcini y Hamburger, 1953]. El NGF es un factor neurotrófico de 26 KDa capaz de regular una variedad de respuestas biológicas. En condiciones normales, los niveles séricos del NGF son bajos, lo que sugiere que es un factor sintetizado en su sitio de acción. Actúa como un factor de sobre vivencia para las neuronas simpáticas y sensoriales, tanto *in vivo* como en cultivo, y puede actuar también como quimioattractante [Ross y cols., 1991].

Además, el NGF es un factor de diferenciación de células PC12, neuroblastomas, neuronas periféricas fetales, neuronas colinérgicas fetales, y células cromafines. Los órganos inervados proporcionan una fuente de NGF para las neuronas

dependientes de NGF y durante el desarrollo, y la competencia por el NGF regula la muerte celular neuronal. A pesar de que el NGF fue nombrado factor de crecimiento, su papel como mitógeno es limitado y hay pocas evidencias de su papel mitógeno *in vivo*. Algunas cepas de células PC12 cesan de dividirse cuando se les expone a NGF, a pesar de que otras cepas crecen continuamente en respuesta al NGF antes de que alcancen un estado diferenciado [Ross y cols., 1991].

La respuesta morfológica al NGF de algunos tipos celulares, entre ellas las células cromafines, está bien documentada y esto ha fomentado la búsqueda de receptores específicos para NGF en células simpatoadrenales. Receptores como el TrkA se han identificado en las subpoblaciones de células cromafines adrenérgicas y en las neuronas negativas a óxido nítrico sintetasa. Se conoce que las neuronas intraadrenales y todas las células cromafines expresan también p57. Los receptores neurotróficos se expresan de manera característica en cada uno de los tipos de las células de la glándula adrenal [Langley y Grant, 1999].

Por otro lado, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés) es otro factor trófico que promueve la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas [Hamanoue y cols., 1996] y coopera con el NGF potenciando la supervivencia de las neuronas del ganglio dorsal al mismo tiempo que promueve el crecimiento de los axones de éstas neuronas *in vitro* [Maina y cols., 1998]. Otro factor que contribuye en el desarrollo de las neuronas noradrenérgicas periféricas

es el factor neurotrófico de la línea de células gliales (GDNF) [Granholtm y cols., 1997].

### **FACTORES AMBIENTALES INTERNOS**

El entorno celular juega un papel muy importante en la regulación del comportamiento celular. Un claro ejemplo de ellos son las células cromafines, las cuales durante las fases iniciales de su migración de la cresta neural por señales derivadas de la notocorda y el tubo neural ventral, son arrestadas por el ambiente que las circunda (principalmente por los glucocorticoides) y detienen su proceso de diferenciación, lo que les permite desempeñar un papel endocrino en el organismo.

Los resultados experimentales indican que la ausencia de glucocorticoides lleva a las células simpatoadrenales a diferenciarse en neuronas simpáticas dependientes de NGF. Reportes previos han concluido que los niveles relativos de NGF y de glucocorticoides determinan el estado de las células simpatoadrenales y la expresión de ciertas proteínas que producen [Doupe y cols., 1985; Unsicker y cols., 1989]. Esta hipótesis parece ser lógica debido a los altos niveles de glucocorticoides secretados por la corteza adrenal que rodea a las células cromafines de la médula. No obstante, este punto ha sido cuestionado recientemente.

En 1999 Finotto y colaboradores generaron un ratón que no expresa el gen que codifica para la producción de glucocorticoides y presentaron por vez primera

evidencia de que éstos no son indispensables para mantener el estado diferenciado de las células cromafines. Los ratones recién nacidos deficientes en glucocorticoides presentaron un número normal de células cromafines que son indistinguibles ultra estructuralmente de las células cromafines de la cepa silvestre, y se distinguen claramente de las neuronas simpáticas. Las células expresan TH y otros marcadores como Phox2 y pierden los marcadores neuronales como los neurofilamentos. Dichos ratones también dejan de expresar PNMT y adrenalina. Estos datos sugieren que las señales de glucocorticoides mediadas por los receptores a los mismos, no son un prerrequisito absoluto para el desarrollo de las células cromafines [Schober y cols., 2000].

Sin embargo, se ha demostrado que los glucocorticoides regulan el nivel de expresión de varias proteínas en los distintos tipos de células simpatoadrenales. Esto incluye el contenido de los gránulos de las neuronas simpáticas y de las células cromafines [Henion y Landis, 1992] y componentes de membrana de los gránulos como los transportadores de aminas [Wakade y cols., 1996].

En suma, se ha comprobado que los glucocorticoides regulan negativamente la expresión de proteínas implicadas en la exocitosis o en la plasticidad morfológica de las células cromafines y de las neuronas simpáticas. Si los glucocorticoides pueden regular ciertas proteínas que son expresadas diferencialmente en las subpoblaciones de las células cromafines, entonces es posible que grupos separados de cromoblastos, con diferentes sensibilidades a los glucocorticoides o con distinta expresión de receptores a factores tróficos, estén presentes en el

blastoma antes de la migración hacia el primordium adrenal y que esto origine los dos principales tipos de células cromafines adrenales [Cole y cols., 1995].

La razón de la expresión de los receptores de glucocorticoides en las células cromafines, se desconoce hasta el momento. Se sabe que los reguladores positivos y negativos de los diferentes constituyentes moleculares de las subpoblaciones de células cromafines deben estar expresados diferencialmente y ser regulados a su vez por ellos mismos. Pese a esto, las observaciones de que los cromoblastos de la periferia de los agregados celulares de la médula adrenal embrionaria se diferencian en células adrenérgicas típicas que mantienen los niveles de TH y PNMT, mientras que las células en el centro de dichos agregados permanecen como células noradrenérgicas, sugieren que las concentraciones locales de factores ambientales pueden ser importantes para la diferenciación de las células simpatoadrenales [Leon y cols., 1992].

En conjunto, todos los datos anteriores sugieren que existe un control fino de la expresión genética de las células simpatoadrenales directamente relacionado con el ambiente que las rodea. Este control genético conlleva al fenotipo característico de cada una de las células que derivan de este linaje y puede ser regulado por factores tanto internos como externos a las células.

Particularmente, las células cromafines se diferencian a células tipo neuronas tanto con factores internos como con factores externos. Entre los factores internos que inducen diferenciación en las células cromafines está el NGF (cuyo efecto ha

sido bien estudiado en estas células así como en la línea celular PC12), y el FGF. Se sabe también que el cocultivo celular con células glioma C6, los campos eléctricos, el ácido retinóico, la estimulación con el oncogen *v-src* y los campos magnéticos de extrema baja frecuencia (EM-EBF), inducen diferenciación celular cromafín [Alemà y cols., 1985; Cosgaya y cols., 1996; Damon y cols., 1990; Drucker-Colín y cols., 1994; Eveleth y cols., 1989; Rausch y cols., 1989].

## **FACTORES AMBIENTALES EXTERNOS**

En esta sección se hablará particularmente de los campos magnéticos, dado que constituyen el factor ambiental externo de interés para el presente trabajo de investigación.

## **CAMPOS MAGNÉTICOS**

La región del espacio que rodea una carga móvil incluye un campo magnético además de un campo eléctrico. La relación entre magnetismo y electricidad fue descubierta en 1819 por Christian Oersted. Poco después André Ampère formuló leyes cuantitativas para calcular la fuerza magnética entre conductores por los que circula corriente y sugirió que lazos de corriente eléctrica de tamaño molecular son responsables de todos los fenómenos magnéticos. Posteriormente en la década de 1820, Faraday y Henry, por separado, demostraron que un campo magnético produce un campo eléctrico, y años después Maxwell mostró que un campo eléctrico variable origina un campo magnético. Un campo magnético también rodea a cualquier sustancia magnética [Serway, 1999].

Con el fin de describir cualquier tipo de campo, debemos definir su magnitud, o intensidad, y su dirección. La dirección del campo magnético en cualquier posición está en la dirección hacia la cual apunta el polo norte de la aguja de una brújula en esa posición. Podemos definir un campo magnético en algún punto en el espacio en términos de fuerza magnética ejercida sobre un objeto de prueba apropiado. Nuestro objeto de prueba es una partícula cargada que se mueve con una velocidad. Los experimentos acerca del movimiento de diversas partículas cargadas en un campo magnético brindan los siguientes resultados, de acuerdo a Serway (1999):

- La magnitud de la fuerza magnética es proporcional a la carga y a la velocidad de la partícula.
- La magnitud y la dirección de la fuerza magnética depende de la velocidad de la partícula y de la magnitud y dirección del campo magnético.
- Cuando la partícula cargada se mueve paralela al vector de campo magnético, la fuerza magnética sobre la carga es cero.
- La fuerza magnética sobre una carga positiva está en la dirección opuesta a la dirección de la fuerza sobre una carga negativa que se mueve en la misma dirección.
- El campo magnético se define en términos de una fuerza lateral que actúa sobre una partícula cargada móvil.
- Un campo magnético estático cambia la dirección de la velocidad pero no afecta la velocidad o la energía cinética de una partícula cargada.

Los campos magnéticos presentan dos componentes, uno magnético y uno eléctrico. La unidad del componente magnético es el weber por metro cuadrado ( $\text{Wb}/\text{m}^2$ ) llamada también tesla (T), o pueden ser los gauss (G), que se relacionan con la tesla por medio de la conversión  $1\text{T} = 10^4\text{G}$ . El componente eléctrico se mide en volts por metro ( $\text{V}/\text{m}$ ). El componente eléctrico puede ser detenido por materiales conductores, mientras que el campo magnético penetra fácilmente la mayoría de los materiales ~~sin~~ perder su intensidad. Los campos magnéticos son directamente proporcionales al flujo de corriente en el conductor y decrecen rápidamente en magnitud con la distancia de su fuente [Lacy-Hulbert y cols., 1998]. La intensidad horizontal de un campo magnético depende entonces de su fuente y de la distancia de ésta [Cameron y cols., 1993].

La fuerza magnética terrestre presenta un campo magnético *estático*, mientras que los campos magnéticos generados por el flujo de corriente, utilizada por aparatos electrodomésticos o de oficinas, son de tipo *fluctuante*. Los campos magnéticos generados por equipos eléctricos son mucho mayores que aquellos que ocurren naturalmente y su permanencia ambiental es consecuencia del desarrollo tecnológico de la segunda mitad del siglo XX [Lacy-Hulbert y cols., 1998].

Por su frecuencia, los campos magnéticos se clasifican en alta, baja y extrema baja frecuencia (Figura 2). Se denominan campos magnéticos de **alta frecuencia** cuando fluctúan con frecuencias mayores de 200 Hertz (Hz, unidad de frecuencia); se habla de campos magnéticos de **baja frecuencia** cuando se originan de



frecuencias mayores a los 100 Hz; y finalmente, los campos magnéticos se clasifican en campos de **extrema baja frecuencia** cuando tienen frecuencias menores a los 100 Hz [Lacy-Hulbert y cols., 1998].

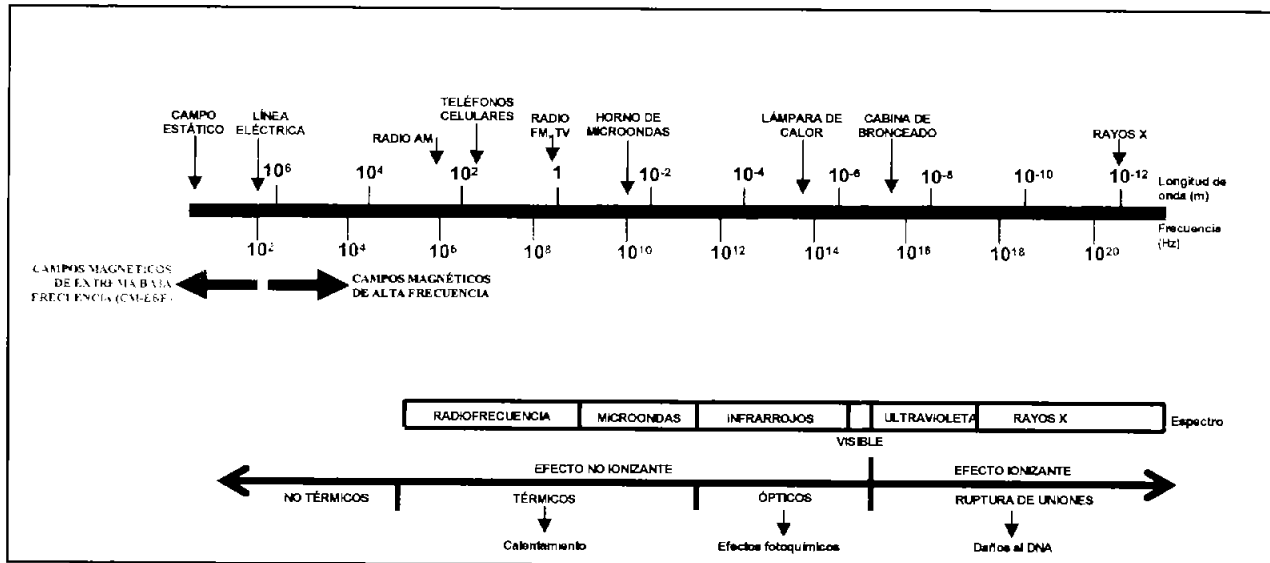


Figura 2. Espectro electromagnético [Moudler, 1998; Lacy-Hulbert y cols., 1998].

Diversas fuentes ambientales producen campos magnéticos de baja frecuencia, pero la mayoría de la gente está expuesta, por periodos sostenidos, a campos magnéticos de extrema baja frecuencia (CM-EBF) generados por los aparatos eléctricos [Cameron y cols., 1993]. Así, los campos magnéticos fluctuantes son de gran interés científico por su interacción directa con los seres vivos y su posible participación en algunos padecimientos [Miki y cols., 1999; Tagüeña y Martina, 1988].

Los campos magnéticos ejercen fuerzas sobre las partículas magnéticas y los iones en movimiento, mientras que los campos eléctricos lo hacen únicamente sobre los iones; éste tipo de fuerzas pueden estar implicadas en el mecanismo de acción de los campos magnéticos. En general, los campos electromagnéticos pueden afectar las reacciones bioquímicas y el comportamiento de las moléculas cargadas cercanas a la membrana [Levin, 2003].

Varios modelos hipotéticos se han propuesto para explicar el mecanismo de interacción de los campos electromagnéticos con los sistemas biológicos, como son la inducción de corrientes eléctricas por la aceleración de iones generando campos eléctricos en moléculas conductoras, ejerciendo fuerza sobre los acarreadores durante el movimiento de cargas, presionando los dipolos magnéticos permanentes y las partículas diamagnéticas no esféricas (los campos magnéticos homogéneos), distorsionan los ángulos de enlace (afectando la unión de proteínas y la síntesis de macromoléculas), generan interacciones resonantes que comprenden vibraciones dirigidas o transiciones orbitales en biomoléculas, propiciando reacciones bioquímicas en las que participan radicales libres, y finalmente, cambiando el nivel de protones circundantes a las bases del DNA o interaccionando directamente en el movimiento de electrones del DNA [Levin, 2003; Czyz y cols., 2004].

Se sugiere también que los campos oscilantes externos generan fuerzas vibratorias en los iones libres de la superficie celular y distorsionan su entrada a través de canales electro sensibles de la membrana plasmática [Czyz y cols.,

2004]. Se ha sugerido también que un tipo de fotones pueden afectar la estructura de moléculas estables como el DNA [Levin, 2003]. Otros reportes sugieren que los campos electromagnéticos no tienen efecto genotóxico, pero pueden participar en procesos cancerígenos alterando el balance entre proliferación y muerte celular (probablemente interviniendo en la transducción de señales celulares alterando la concentración y el transporte de calcio intracelular); un incremento en la proliferación y/o en la inhibición de la apoptosis, puede explicar el efecto tumoral de los campos electromagnéticos [Pirozzoly y cols., 2003].

El sitio de interacción de los campos electromagnéticos se desconoce, pero se ha propuesto que la membrana celular y el DNA son sitios blancos [Bauréus y cols., 2003]. Hoy en día se sabe que los CM-EBF producen cambios en los niveles hormonales de los organismos, modifican las cargas iónicas de la membrana celular, tienen efecto sobre la traducción del RNA, originan alteraciones en el desarrollo celular y, participan en la regeneración nerviosa y en la diferenciación celular [Drucker-Colín y cols., 1994; Goodman y cols., 1993; Phillips, 1993; Phillips y cols., 1991; Valverg y cols., 1997]. Sin embargo, a la fecha se desconoce cuál de estos efectos es más relevante en los sistemas biológicos, o aún más, cuál de todos ellos es el responsable de los cambios celulares observados.

Estudios epidemiológicos han concluido que la exposición residencial a campos magnéticos de alta frecuencia aumenta la incidencia de leucemias (particularmente en niños), de linfomas, de melanomas y de cáncer de pulmón. Además se relacionan con alteraciones en el desarrollo embrionario, aumento en

el número de abortos espontáneos, con alteraciones en la formación de huesos y con la supresión de la producción de melatonina. A la fecha no se ha podido demostrar la relación biológica entre los campos magnéticos y los padecimientos antes mencionados por el reducido número de muestras y por la falta de parámetros específicos de exposición como referencia [Czerske y cols., 1991; Delgado y cols., 1982; Huuskonen y cols., 1998; Lacy-Hulbert y cols., 1998; Tao y Henderson, 1999].

De la misma manera se han observado efectos no dañinos de los campos magnéticos sobre la salud humana, motivo por el cual se han empleado en clínica para el tratamiento de varios padecimientos. La terapia con CM-EBF se ha utilizado para tratar fracturas, para la regeneración neural, la tendinitis, las fusiones espinales y para la necrosis avascular. Cabe mencionar que la respuesta clínica no es inmediata, en algunos casos se requiere de un tratamiento diario durante algunos meses [Félix y cols., 1974; Jacobson, 1994; Lacy-Hulbert y cols., 1998; Pilla, 1999; Sisken y cols., 1990].

## **LAS CÉLULAS CROMAFINES, UN MODELO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR**

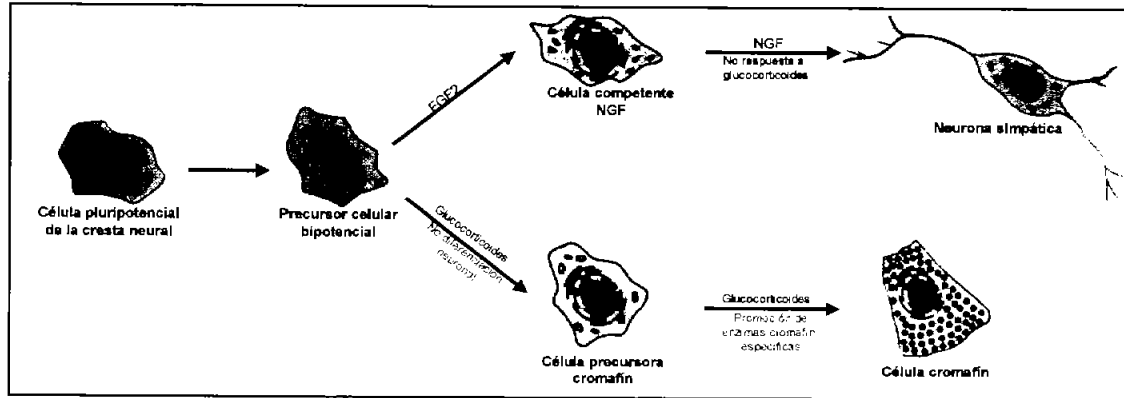
En los mamíferos las células derivan de un precursor totipotencial temprano del blastocisto, el cual es llamado célula madre embrionaria. Posteriormente, durante la gastrulación estas células madre segregan las hojas germinales denominadas: ectodermo, mesodermo y endodermo. Gradualmente, estos precursores

madurarán en células madre somáticas específicas de órganos y tejidos y tendrán destinos distintos [Vescovi y cols., 2002].

Así, el endodermo formará un tubo, el primordio del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano y será también el precursor de muchas de las glándulas asociadas al aparato digestivo. El mesodermo por su parte, dará origen a los elementos fibrosos y musculares que actúan como soporte del organismo. Y finalmente, la capa del ectodermo cubrirá el embrión, dando lugar a la epidermis y a la totalidad del sistema nervioso [Alberts y cols., 2002; Vescovi y cols., 2002].

Se sabe que el ambiente que rodea a la cresta neural, durante o después de la migración celular, es crítico para la determinación del fenotipo final de dichas células. Si la cresta consiste de poblaciones celulares heterogéneas, cada una dirigida a un estado único, ambientes distintos podrán seleccionar diferencialmente la supervivencia de éstos precursores. De manera alternativa, si algunas o todas las células de la cresta son inicialmente capaces de expresar varios fenotipos alternativos, entonces los distintos ambientes podrán influenciar la elección de un estado diferenciado particular [Anderson y Axel, 1985].

Una decisión del desarrollo de la cresta neural que muestra la importancia del ambiente, es la elección entre un fenotipo endocrino y uno neuronal (Figura 3).



**Figura 3.** Diferenciación de las células de la cresta neural hacia neuronas simpáticas y células cromafines [Gilbert, 2000].

Las células adrenérgicas endocrinas, o células cromafines, de la médula adrenal y las neuronas noradrenérgicas, del ganglio simpático paravertebral, derivan de la región simpatoadrenal de la cresta neural. Las células cromafines de la médula adrenal durante su ruta migratoria y en la aorta dorsal, se ven expuestas a factores, en particular a miembros de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs, por sus siglas en inglés), que inducen la capacidad de sintetizar catecolaminas. Estas células constituyen el linaje celular simpatoadrenal (SA) [Langley y Grant, 1999].

Los progenitores del SA migran de diversos puntos en el adulto con poblaciones mayores en el ganglio simpático y en la glándula adrenal, y con poblaciones menores en el cuerpo carotídeo y en el paraganglio. El linaje comprende neuronas, principalmente concentradas en el ganglio simpático (aunque algunas están localizadas en la glándula adrenal), y varios tipos de células cromafines,

incluyendo las células pequeñas de intensa fluorescencia (SIF) [Kobayoshi y Coupland, 1993].

Las células cromafines SIF extraadrenales, con un fenotipo intermedio entre el de las neuronas y el de las células cromafines, parece desarrollarse más temprano que las células cromafines y realizan un papel distinto en ciertas especies, particularmente durante la vida fetal tardía y el nacimiento. En éste periodo, las células SIF son la mayor fuente de catecolaminas [Hervonen y cols., 1985].

La diferenciación de precursores simpatoadrenales en neuronas del sistema simpático y en células cromafines, refleja los requerimientos fisiológicos en los diferentes niveles del desarrollo y de la madurez celular [Hervonen y cols., 1985]. La diferenciación y la maduración de neuronas precede a la de las células cromafines, las cuales presentan cambios dramáticos durante la última semana prenatal de la vida embrionaria en respuesta a los factores tejido específicos secretados y dichos cambios continúan hasta los primeros días del nacimiento. La actividad funcional completa de las células cromafines probablemente coincide con la adquisición de su fenotipo definitivo en términos de neurotransmisores, proteínas secretadas y proteínas asociadas a exocitosis [Hervonen y cols., 1985].

El marcador más ampliamente usado para el monitoreo de diferenciación adrenérgica es la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima catalizadora del paso limitante en la síntesis de catecolaminas [Schober y cols., 2000]. El término adrenérgico literalmente delinea la capacidad de las células SA para sintetizar

adrenalina, pero en el presente trabajo se utiliza para definir células que sintetizan adrenalina y noradrenalina [Kobayashi y cols., 1993].

En las células simpatoadrenales, el ambiente embrionario de la cresta adrenomedular parece inducir el fenotipo cromafin de las células que migran dentro de él. El efecto del ambiente sobre la decisión simpatoadrenal aparentemente no influye solamente en el desarrollo, sino también en la plasticidad de los derivados completamente diferenciados. Es así como las células cromafines, a pesar de que expresan un fenotipo endocrino diferencial terminal, mantienen la capacidad de diferenciarse a neuronas en ausencia de síntesis de DNA, cuando se cultivan en la presencia del NGF [Anderson y Axel, 1985; Unsicker y cols., 1978] o de CM-EBF [Drucker-Colín y cols., 1994].

Las células que contienen noradrenalina fluorescen más intensamente que las células adrenérgicas después de dicho tratamiento. Las proporciones relativas de adrenalina y noradrenalina de las células cromafines pueden variar considerablemente entre especies, pero generalmente las células adrenérgicas predominan. Las células adrenérgicas expresan feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT, por sus siglas en inglés), la enzima que metila la noradrenalina para transformarla en adrenalina. Dicha enzima no está presente en las neuronas de la médula adrenal [Omori y cols., 1993].

A pesar de que la noradrenalina y la adrenalina son los principales neurotransmisores en las células cromafines, se ha encontrado serotonina en



células adrenérgicas de rata, pero no en células noradrenérgicas. Mientras que en la médula adrenal del ratón solamente se ha encontrado ácido gama aminobutírico (GABA) en células cromafines noradrenérgicas [Omori y cols., 1993].

En cultivos primarios, las células cromafines se han utilizado como modelo para estudiar aspectos bioquímicos de la diferenciación celular. La adrenalina y noradrenalina almacenada por estas células pueden ser consideradas como marcadores celulares del estado de diferenciación de las células cromafines, la adrenalina caracteriza preferentemente el fenotipo cromafín endocrino, mientras que la noradrenalina caracteriza el fenotipo cromafín neuronal. Sin embargo, el 20% de las células cromafines también producen noradrenalina [Livett, 1984].

Además de la síntesis y el almacenamiento de catecolaminas, las células cromafines pueden sintetizar y almacenar una compleja mezcla de factores de crecimiento y moléculas tróficas, a esta mezcla se le conoce como "cóctel trófico". Entre los péptidos de interés que se producen por las células cromafines se encuentran algunos factores neurotróficos, neuropéptidos y citocinas conocidas para estimular los niveles de los factores neurotróficos en varias lesiones neuronales; estos factores son: factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (FGF-2, por sus siglas en inglés), factores de crecimiento  $\beta$  transformantes, interleucinas, encefalinas, somatostatina, neurotensina y un polipéptido intestinal vasoactivo [Unsicker y cols., 1997].

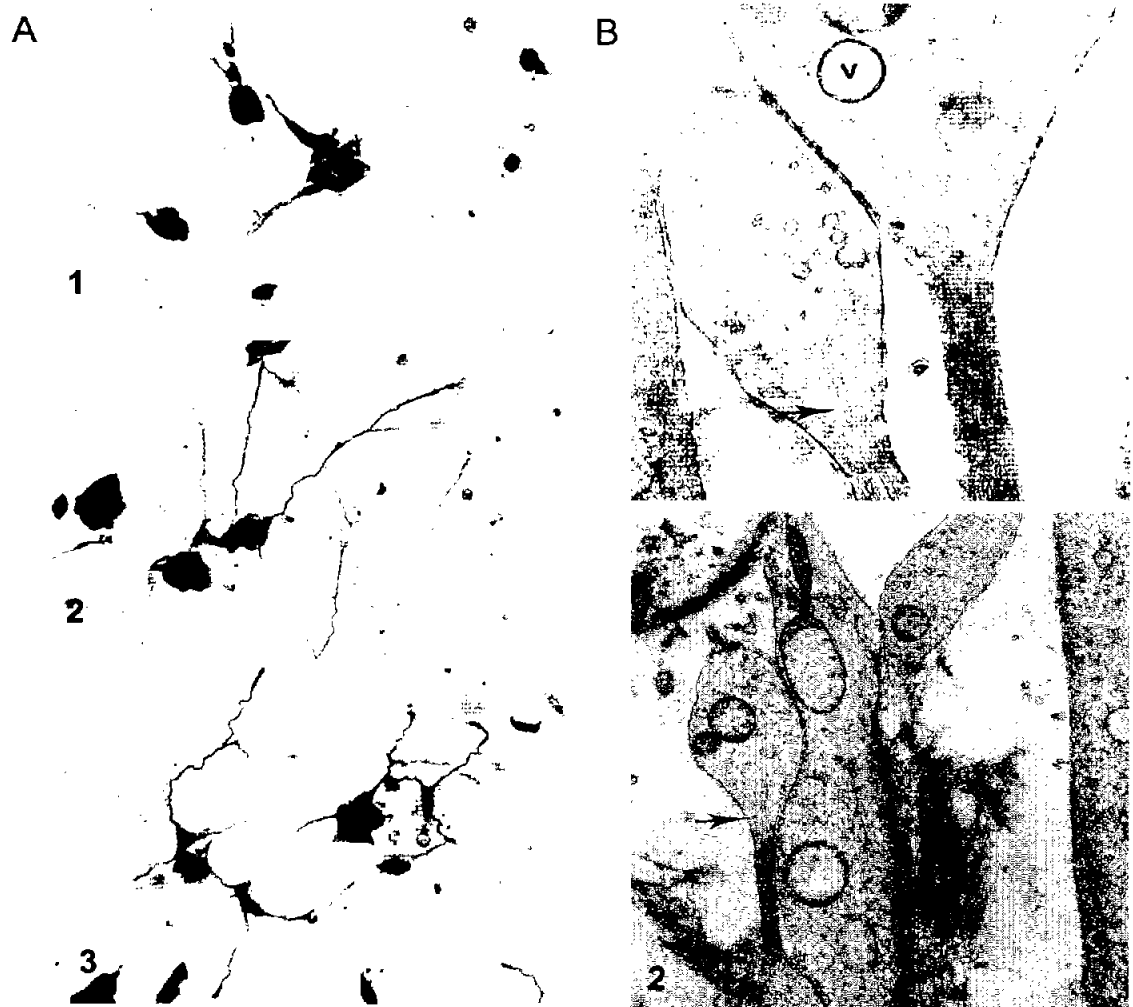
La diferenciación de las células cromafines de células endocrinas a células tipo neuronas se presenta tanto *in vivo* como *in vitro* y está directamente relacionado con las condiciones del medio en donde se encuentran estas células. La conversión fenotípica de las células cromafines ocurre en células embrionarias, en neonatas y en células adultas, e implica crecimiento de neuritas, formación de sinapsis, incremento en el tamaño celular y cambios marcados en la organización citoplásmica. Una vez que las células cromafines son transformadas a células neuronales no pueden regresar a su estado endocrino, posiblemente porque los genes que codifican el fenotipo neuronal quedan activados persistentemente [Ogawa y cols., 1986].

Las características morfológicas y bioquímicas de las células cromafines al diferenciarse dependen en gran medida del tipo de factor que se está implicado en dicho proceso. En general, las células cromafines diferenciadas muestran una tendencia a adherirse unas con otras [Ogawa y cols., 1986].

Durante la diferenciación de las células cromafines el retículo endoplásmico rugoso (RER), el complejo de Golgi y las mitocondrias ocupan una gran área en el citoplasma de estas células. Hay un gran número de gránulos, de 50-350 nm de diámetro, adyacentes a la membrana. Los gránulos cromafines son menos abundantes en el área central y se localizan en las áreas periféricas del citoplasma o en las extensiones celulares [Ogawa y cols., 1986].

El cultivo de células cromafines de rata en presencia o ausencia de NGF (50 ng/mL) a los ocho días de cultivo muestra un patrón característico de células catecolaminérgicas. Las células que crecen en presencia de NGF muestran crecimiento externo de neuritas. Estas mismas células expuestas a la estimulación de CM-EBF muestran crecimiento de neuritas en células individuales o en agregados de ellas, casi en la misma proporción a lo observado con el NGF (Figura 4-A).

En la Tabla 1 se muestran las principales diferencias observadas con ambos tipos de tratamientos. Cuando los tratamientos de NGF y CM-EBF se aplican simultáneamente sobre el cultivo de células cromafines, no hay un incremento adicional en el número de células que muestran crecimiento de neuritas. Con estos tratamientos combinados no existen diferencias significativas en el área, perímetro, forma y número de neuritas por célula (Figura 4-A-2,3). Por otro lado, se determinó que hay una mayor presencia de microtúbulos en aquellas células diferenciadas con NGF (Figura 4-B-1), mientras que en las cromafines diferenciadas con CM-EBF se observan neurofilamentos (Figura 4-B-2) [Drucker-Colín y cols., 1994].



**Figura 4.** Diferencias entre células cromafines tratadas con NGF o con CM-EBF. A, microfotografías de células cromafines TH positivas en cultivo primario sin tratamiento (1), diferenciadas con NGF (2) o con CM-EBF (3) en donde se observan las extensiones neuríticas. B, microfotografías de microscopía de transmisión de células cromafines diferenciadas con NGF (1) o con CM-EBF (2), las flechas muestran los microtúbulos (1) y los neurofilamentos (2) presentes en las extensiones neuríticas características de cada estado diferenciado [Drucker-Colín y cols., 1994; Feria-Velasco y cols., 1998].

Tabla 1. Comparación de características de las células cromafines diferenciadas con factor de crecimiento neuronal (NGF) o con campos magnéticos de extrema baja frecuencia (CM-EBF). RE= retículo endoplásmico [Drucker-Colín y cols., 1994; Feria-Velasco y cols., 1998; Morgado-Valle y cols., 1997; Verdugo-Díaz y cols., 1998]

CARACTERÍSTICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO NGF (50 ng/mL)	GRUPO CM-EBF (60 Hz, 0.7 mT)	
<b>MORFOLÓGICAS</b>	Aparición de extensiones neuríticas, conos de crecimiento, varicosidades	No se presentan	En forma individual y agregados; patrones toscamente ondulados	En forma individual y agregados; extensiones lineales rígidas
	Características en el citoplasma	Sin cambios	Incrementa cantidad de RE, mitocondrias y Golgi; libre de ribosomas y poli ribosomas; pocos gránulos neurosecretores; vesículas numerosas de diversos diámetros	Numerosas mitocondrias, lisosomas, elementos del RE rugoso y liso; pocos gránulos neurosecretores y vesículas; libre de ribosomas y poli ribosomas
	Núcleo	Sin cambios	Incrementa densidad intranuclear, poros nucleares y heterocromatina moderada, tamaño prominente	Forma ovoide, cisterna perinuclear bien definida, heterocromatina no condensada, cromatina dispersa, poros nucleares moderados
	Citoesqueleto	Sin cambios	Gran cantidad de filamentos delgados	Numerosos neurotúbulos, pocos filamentos delgados
<b>BIOQUÍMICAS</b>	Tirosina Hidroxilasa y Dopamina-β-hidroxilasa	Actividad normal	Mayor actividad enzimática	Mayor actividad enzimática
	Principal catecolamina secretada	Adrenalina	Noradrenalina (++++)	Dopamina (+++)
	Expresión de canales de Ca <sup>++</sup>	Sin cambios	Tipo L	Tipo N
	Intercambio de Na <sup>+</sup>	Sin cambios	Incremento	Incremento

Por otro lado, se ha demostrado que las células cromafines diferenciadas con NGF presentan una mayor cantidad de noradrenalina acumulada en comparación con las células estimuladas con CM-EBF. En las células cromafines no diferenciadas la principal catecolamina liberada es la adrenalina (Tabla 1). Asimismo, el flujo de sodio en las células cromafines estimuladas con NGF y/o

CM-EBF se incrementa con respecto a los cultivos en donde las células no se diferencian [Islas-Suárez y cols., 1994; Morgado-Valle y cols., 1997; Verdugo-Díaz y cols., 1998].

En las células cromafines tratadas con NGF se incrementa el flujo de calcio y se aumenta la supervivencia y el desarrollo celular. En el caso de la estimulación con CM-EBF parte de los cambios estructurales se asocian con el proceso celular de entrada de calcio [Jiménez y Hernández-Cruz, 2001; Morgado-Valle y cols., 1997].

Los mecanismos de diferenciación de las células cromafines no están totalmente definidos. Se sabe que en la línea celular PC12 (clonada de feocromocitoma de rata) estimulada con factores tróficos, se presentan cambios en los potenciales de membrana y cambios en la expresión de genes de las familias *ras*, *scr*, *raf*, *fos* y de algunos otros genes más específicos como el PC4, TGF-beta-1, TAFII<sub>31</sub>, pp60v-src y el gp140trk [Aoki y cols., 1997; D'Arcangelo y Halegoua 1993; Guardavaccaro y cols., 1994; Kremer y cols., 1991; Takekoshi y cols., 1998; Vician y cols., 1997].

En lo que se refiere a los posibles mecanismos de acción que se presentan cuando las células cromafines se diferencian por CM-EBF, no hay un consenso. Trabajos previos sugieren que el sitio primario de acción de los CM-EBF son las proteínas de la membrana plasmática, y se piensa que los cambios en la conductancia de iones de calcio participan de manera directa en los cambios generados por los campos magnéticos [Lacy-Hulbert y cols., 1998].

En particular es crucial identificar los blancos que censan los campos magnéticos y aquellos que transmiten las señales que generan la expresión de genes y otros eventos celulares. La información obtenida será crucial para elucidar la naturaleza y el origen del alto control morfogénico en el crecimiento y desarrollo de los biosistemas, y tendrá numerosas implicaciones en la medicina humana y en el entendimiento de la biología.

## JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células cromafines representan un excelente modelo para estudiar procesos de diferenciación. Fenotípicamente son células endocrinas que pueden ser inducidas a diferenciarse en células neuronales cuando se les estimula con factores como el NGF o con CM-EBF, entre otros. Los cambios morfológicos y bioquímicos que presentan estas células diferenciadas varían dependiendo del estímulo que se les aplique para diferenciarse. Así, las células cromafines diferenciadas con NGF tienen características particulares que las distingue de aquellas células cromafines diferenciadas con CM-EBF, como se explica en la Tabla 1.

Entre las diferencias más interesantes observadas con ambos tipos de estímulo, se encuentra que las células cromafines diferenciadas con CM-EBF secretan mayor cantidad de dopamina, comparadas con aquellas células diferenciadas con NGF que secretan más noradrenalina. Además, las células cromafines diferenciadas con CM-EBF no presentan una dependencia hacia el factor de diferenciación como lo hacen las estimuladas con NGF. En este sentido se sabe, que las células neuronales son independientes de los factores de crecimiento por un largo tiempo, y después de que alcanzan cierto tamaño, o bien, después de cierto periodo de tiempo, se vuelven dependientes a dicho factor. Estas características particulares nos hablan de que los mecanismos por los cuales las células cromafines se diferencian son distintos, o bien, podríamos suponer que a



los siete días de cultivo, el nivel de diferenciación de las células cromafines, inducido por el NGF o por los CM-EBF, es distinto.

Una forma de saber si dichos mecanismos de diferenciación son iguales o distintos, es analizar el patrón de expresión genético de las células. El análisis y la comparación de los genes que se modifican con cada tratamiento nos permitirán establecer una aproximación del mecanismo celular inducido por CM-EBF.

En este sentido, el presente trabajo de investigación adquiere gran relevancia debido a que hasta hoy, la forma en que las células censan un campo magnético y generan rutas de señalización intracelulares, que llevan a cambios evidentes, se desconoce.

## **HIPÓTESIS**

Dado que las células cromafines diferenciadas con CM-EBF presentan cambios morfológicos y bioquímicos, la expresión de genes de transducción de señales, de ciclo celular y de citoesqueleto debe estar modificada.

## **OBJETIVO GENERAL**

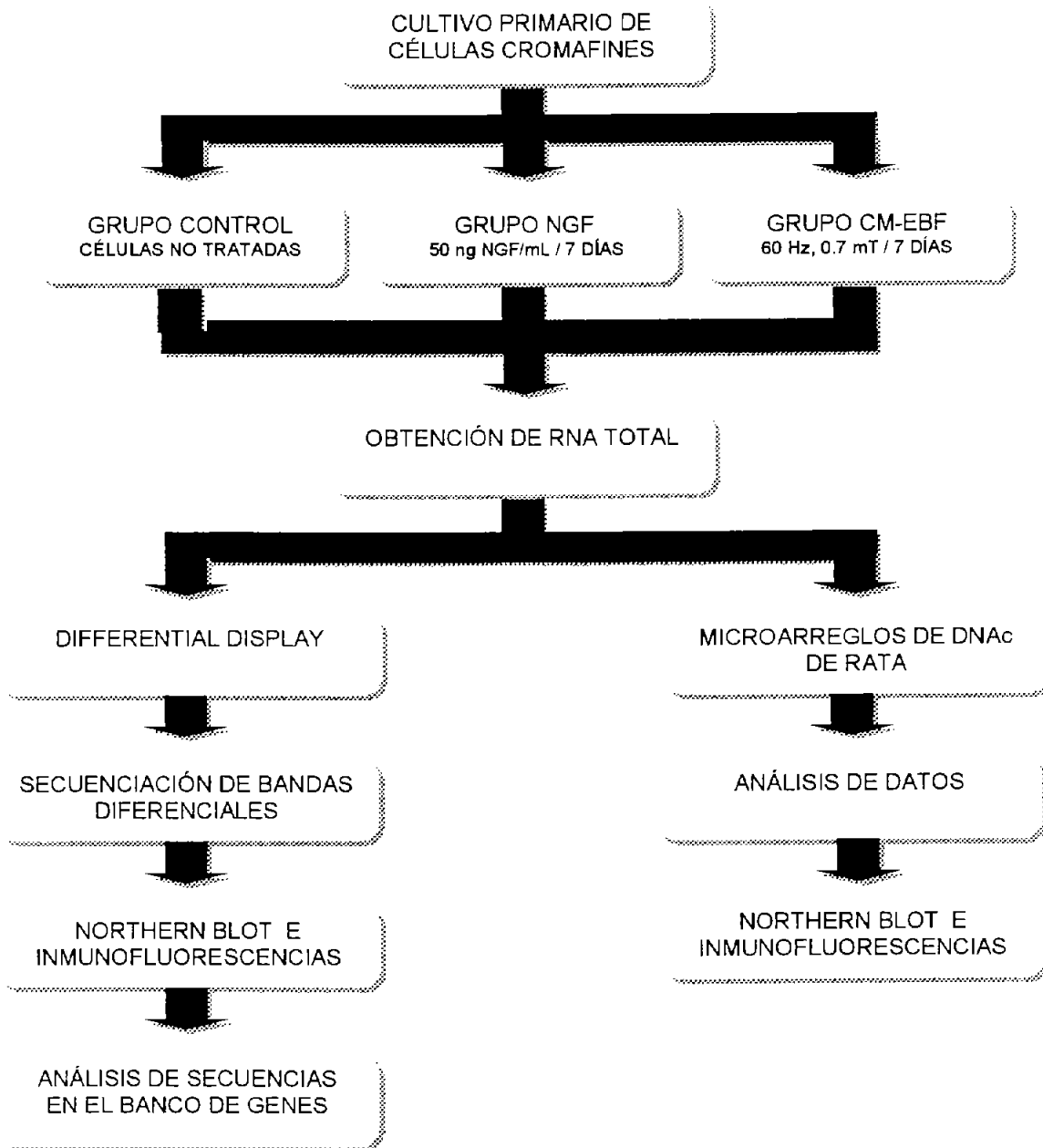
Identificar genes inducidos por campos magnéticos de extrema baja frecuencia durante el proceso de diferenciación de células cromafines de rata neonata.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar y secuenciar genes de expresión diferencial en células cromafines diferenciadas con CM-EBF a través del método de "Differential Display".
2. Comprobar la expresión de las bandas diferenciales a través de ensayos de Northern Blot.
3. analizar y comparar las secuencias en el Banco de Genes.
4. Identificar elementos de respuesta a CM-EBF dentro de las secuencias diferenciales obtenidas.
5. Analizar el patrón de expresión de células cromafines diferenciadas con NGF ó con CM-EBF utilizando microarreglos de DNAC de rata.
6. Comprobar la expresión diferencial de genes expresados en los microarreglos a través de ensayos de Northern Blot.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología a través de la cuál se desarrolló el presente trabajo de investigación se resume en el siguiente diagrama de flujo.



## **CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS CROMAFINES**

Extraer las glándulas suprarrenales de ratas neonatas (1-3 días de edad) y disgregarlas enzimáticamente 45 minutos a 37°C con agitación en solución Hanks libre de calcio (Gibco) con 0.1% de albúmina bovina, colagenasa (2 mg/mL) y DNAasa (15 mg/mL) (Unsicker y cols., 1978). Disgregar mecánicamente las células y centrifugar a 900 rpm 10 minutos a 20°C. Desechar el sobrenadante y recolectar la pastilla en medio DMEM suplementado (10% suero fetal de bovino, 4.5 mg/mL insulina, 100 U penicilina, 100 mg/mL estreptomina, 2.5 mg/mL fungizona). Determinar el número de células cromafines viables con el método de azul de Tripano (97% en el presente trabajo). En cajas de cultivo de 3.5 cm colocar un millón de células cromafines, dividir el número de cajas en tres para formar los grupos experimentales: células cromafines sin ningún estímulo o grupo control, células estimuladas con NGF (50 ng/mL) o grupo NGF y células estimuladas con CM-EBF (0.7 mT, 60 Hz, 4 horas diarias: 2 en la mañana y dos en la noche) o grupo CM-EBF. Incubar las células a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire por 7 días y cada 3 días cambiar el medio de cultivo. En todos los cultivos primarios de células cromafines que se realizaron durante este trabajo se hizo una presiembra de 10 minutos antes de colocar las células en su caja de cultivo definitiva, con la finalidad de disminuir el número de fibroblastos y otras células contaminantes presentes en la suspensión celular.

## **TINCIÓN CON ROJO OLEOSO**

Se realizaron cultivos primarios de células cromafines en cajas de 12 pozos con cubreobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina. Después de los siete días de

cultivo se retira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS 1X en agitación durante 10 minutos. Se hace un segundo lavado con PBS 1X bajo las mismas condiciones. Se fijan las células con *p*-formaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1M durante 30 minutos a 4°C. Lavar dos veces con PBS 1X durante 10 minutos cada lavado. Una vez fijadas y secas las células, colocarlas en propilenglicol durante 5 minutos hasta deshidratar completamente. Colocar la preparación en solución Rojo O al 0.7% (en propilenglicol) en horno seco a 60°C durante 7 minutos, agitar ocasionalmente. Pasar la preparación a una solución de propilenglicol al 85% durante 3 minutos, homogenizando la solución suavemente. Contrateñir en hematoxilina de Harris (1:2 en agua desionizada). Sumergir en agua amoniacal y posteriormente en agua desionizada. Montar las preparaciones. NOTA: Los núcleos de las células se tiñen de azul y las hormonas esteroideas de rojo.

### **DIFFERENTIAL DISPLAY**

A partir de los cultivos primarios de células cromafines de ratas Wistar neonatas se obtuvo el RNA total de los tres diferentes grupos experimentales (control, NGF y CM-EBF) utilizando el método de TRIzol. Con el RNA obtenido se hicieron los ensayos de RT-PCR con cada uno de los 9 decámeros arbitrarios seleccionados [Liang y Parde, 1992] (Ap1.TACAACGAGG, Ap2.TGGATTGGTC, Ap3.CTTTCTACCC, Ap4.TTTTGGCTCC, Ap5.GGAACCAATC, Ap6.AAACTCCGTC, Ap7.TCGATACAGG, Ap8.TGGTAAAGGG, Ap9.TCGGTCATAG) y con un oligonucleótido de anclaje (T<sub>11</sub>G). Los productos de dichas reacciones de PCR se corrieron en geles de

poliacrilamida, los cuales se tiñeron con plata, y se observó el patrón de expresión de las bandas diferenciales. La intensidad de cada una de las bandas diferenciales observadas se cuantificó a partir de los geles de poliacrilamida utilizando el programa Imagen Quant del IFC-UNAM. Se seleccionaron y reamplificaron por PCR ocho de estas bandas diferenciales. Posteriormente se clonaron los DNAs utilizando el sistema TOPO TA Cloning de Invitrogen y los plásmidos con el inserto se purificaron utilizando el Plasmid Mini kit de QUIAGEN. Los plásmidos se mandaron secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del IFC-UNAM la cual cuenta con un secuenciador automático ABI PRISM™ 310 versión 3.2.

#### **NORTHERN BLOT**

Se transfirieron 20 µg de RNA total obtenido de los cultivos primarios de células cromafines a membranas de nitrocelulosa (Gene Screen Plus, Lab Science). Como sonda se utilizó DNAs obtenido a través de reacciones específicas de PCR y purificado con el sistema de extracción CONCERT de Life Technologies. La sonda se marcó con <sup>32</sup>P utilizando el Rad Prime DNA Labelling System de Gibco. Como sonda control se utilizó actina de rata. Se hibridaron las membranas y se expusieron en placas fotográficas Kodak. Posteriormente se revelaron las placas y se analizaron los resultados obtenidos.

#### **ANÁLISIS DE SECUENCIAS**

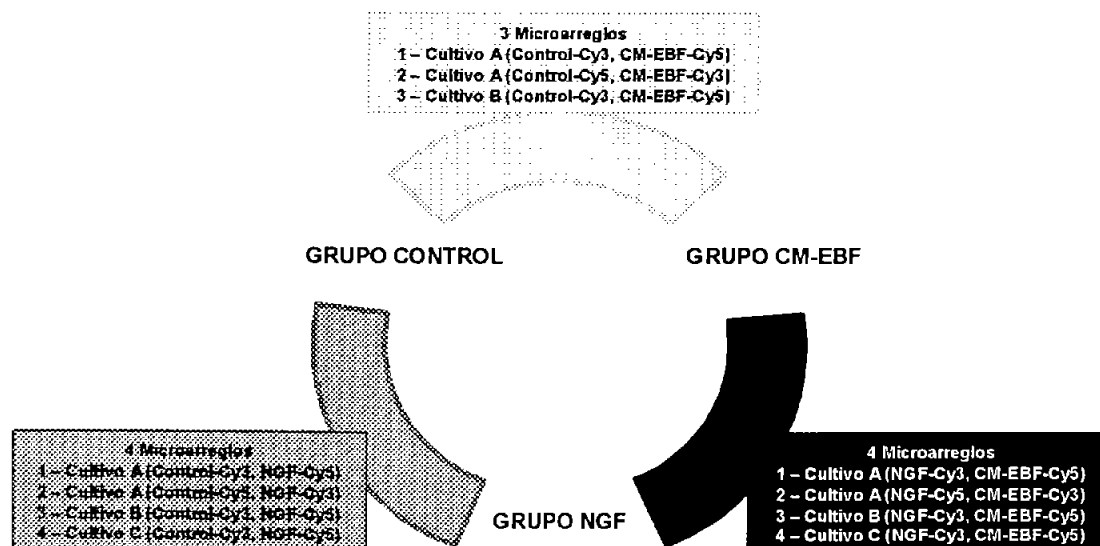
Las secuencias diferenciales obtenidas se compararon con el genoma de rata reportado en la base de datos Europea Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), al 4 de Diciembre del 2003) para identificar el gen a que corresponden cada una de las secuencias. En cada una de las secuencias diferenciales se analizaron 1000 pb río arriba a partir del codón de iniciación de la transcripción (ATG) con la finalidad de identificar el número de secuencias CTCT denominadas elementos de respuesta a CM-EBF.

### **INMUNOFLUORESCENCIA PARA MAP-2**

El cultivo celular se realizó sobre cubreobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina. Después de los siete días de cultivo se retira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS 1X en agitación durante 10 minutos. Se hace un segundo lavado con PBS 1X bajo las mismas condiciones. Fijar con *p*-formaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1M durante 30 minutos a 4°C. Lavar dos veces con PBS 1X durante 10 minutos cada lavado. Incubar en la siguiente solución durante 1 hora a 4°C: PBS 1X, BSA 1%, tritón X-100 0.01%. Incubar con anticuerpo primario MAP-2 monoclonal de ratón (Chemicon) 1:1000, toda la noche a 4°C. Lavar dos veces con PBS 1X durante 10 minutos cada lavado. Incubar con el anticuerpo secundario Tritc conjugado anti ratón 1:500, durante 2 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz. Lavar dos veces con PBS 1X durante 10 minutos cada lavado. Montar los cubreobjetos con medio de montaje para fluorescencia marca DAKO sobre portaobjetos y dejar secar durante 24 horas a 4°C protegidos de la luz. Realizar las observaciones correspondientes en el microscopio confocal.

## HIBRIDACIÓN DE MICROARREGLOS DE DNAC DE RATA

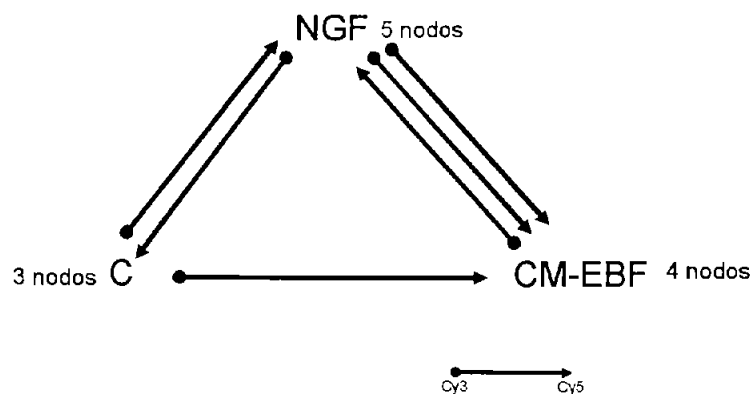
Se obtuvo el RNA total de los cultivos primarios de células cromafines utilizando el Mammalian Total RNA Kit de Sigma y se cuantificó con la prueba de RiboGreen de Molecular Probes. Se utilizaron 30  $\mu$ g de RNA total para cada uno de los marcajes requeridos en la hibridación de los microarreglos. Los microarreglos se compraron a la Universidad de Noruega y se hibridaron en la Unidad de Microarreglos del IFC-UNAM. Los microarreglos utilizados fueron de DNAC de rata y se utilizaron dos tipos de ellos: 5 de 14 K y 6 de 15 K (ver especificaciones en el Apéndice B). Una vez hibridados los microarreglos se analizaron los datos utilizando los programas de libre acceso: BRB Array-Tools versión 3.01, TIGER-MIDAS versión 2.17 y BAGEL 3.2. El diseño experimental que se utilizó con los microarreglos se muestra a continuación:





## ANÁLISIS DE MICROARREGLOS

Para obtener los datos de los microarreglos lo primero que se hizo fue filtrar los valores de cada uno de los puntos del microarreglo utilizando el valor promedio de la señal de fondo de cada arreglo (se promedió el valor de los puntos blanco del arreglo y el valor obtenido se restó a cada uno de los puntos restantes, programador Perl). Posteriormente se normalizaron los datos con los valores de los blancos y los controles propios de cada laminilla (programa MIDAS). Después se descartaron aquellos valores que no fueran reproducibles en el microarreglo, al compararlos entre sí, y con estos datos se realizó el análisis con el programa BAGEL. Éste último programa se basa en un método cuantitativo Bayesiano utilizado para analizar datos de microarreglos normalizados del diseño de experimentos repetidos, en el cual cualquier tipo de tratamientos, genotipos o estados de desarrollo, se estudian usando una cadena continua de comparaciones [Townsend y Hartl, 2002]. Con el programa BAGEL es posible comparar todas las laminillas independientemente de los tratamientos que se hibridaron en cada una, bajo la condición de que existan al menos tres nodos (o tres repeticiones a comparar) entre tratamientos, como se muestra en la siguiente figura:



Así, el programa BAGEL permite analizar el comportamiento de cada uno de los tratamientos con respecto a los otros dos que se aplicaron, compara todas las laminillas hibridadas y establece la desviación estándar para cada uno de los valores obtenidos, lo mismo que la probabilidad de que estos valores sean verdaderos. A partir de estos valores se realizaron tablas de datos que contenían todos aquellos valores con una probabilidad igual a uno de ser verdaderos al comparar dos tratamientos. De estos valores se seleccionaron aquellos que presentaban una variación de expresión mayor o igual a 1.2 veces entre dos tratamientos y con desviaciones estándar significativas.

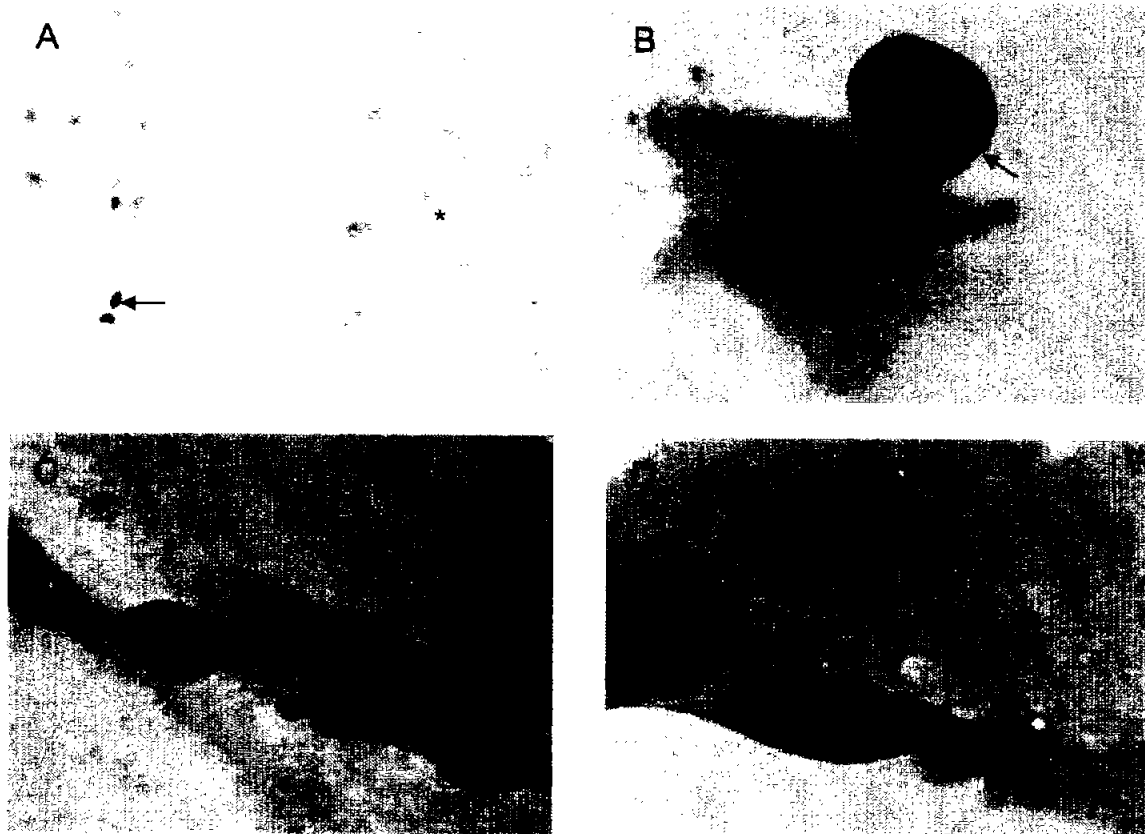
Los datos que presentaron cambios entre tratamientos se analizaron para determinar cuales son secuencias conocidas del genoma de rata y cuales corresponden a secuencias aún desconocidas dentro del genoma (denominadas secuencias EST's) y al mismo tiempo se cuantificó la cantidad de genes que están reprimidos en cada uno de los tratamientos de diferenciación, comparándolos con el grupo control, y cuales están sobreexpresados con alguno de los tratamientos. Posteriormente, se clasificaron los genes conocidos de acuerdo a su función celular y a su participación en las rutas metabólicas de las células. Este análisis se realizó utilizando el programa DAVID del National Institute of Health (NIH) (<http://nova2.idi.ntnu.no/nmc/index.php>).

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación muestran que: 1) existen diferencias en el patrón de expresión de las células cromafines cuando estas se diferencian con NGF o cuando se hace con CM-EBF, y 2) que la expresión de algunos de los genes diferenciales aquí observados es específica de dichas condiciones experimentales.

Los resultados serán presentados en dos partes. La primera parte comprende todos aquellos datos obtenidos a través del método de Differential Display, mientras que la segunda parte abarca los resultados obtenidos a través de la utilización de los microarreglos con DNAC de rata.

Primeramente se realizaron tinciones con rojo oleoso para determinar la proporción de células cromafines contra células de la corteza adrenal (Figura 5). Esta técnica de tinción se seleccionó con la finalidad de observar la cantidad de células de corteza presentes en el cultivo, dado que este tipo celular presenta gránulos de hormonas esteroideas en el citoplasma. Con estas tinciones se observa que el número de células cromafines es mayor a cualquier otro tipo celular en los tres grupos de tratamientos (Figura 5-B, C y D), además de la interacción directa, y posiblemente indispensable, que existe entre las cromafines y los fibroblastos para que las primeras se mantengan en cultivo. En ninguna de las microfotografías se observan células de la corteza, solamente células cromafines y fibroblastos (Figura 5-A).



**Figura 5.** Microfotografías de cultivos primarios de células cromafines no diferenciadas y en proceso de diferenciación. Las células de los cultivos primarios (a los 7 días de cultivo) se tiñeron utilizando la técnica de rojo oleoso, en donde las células cromafines se tiñeron con hematoxilina de Harris y no presentan gránulos de hormonas esteroideas. En el panel A se observa un cultivo control (10X). En los demás paneles las flechas indican células cromafines control, B, y células diferenciadas con NGF, C, o con CM-EBF, D (40X). Los asteriscos señalan algunos de los fibroblastos del cultivo.

## DIFFERENTIAL DISPLAY

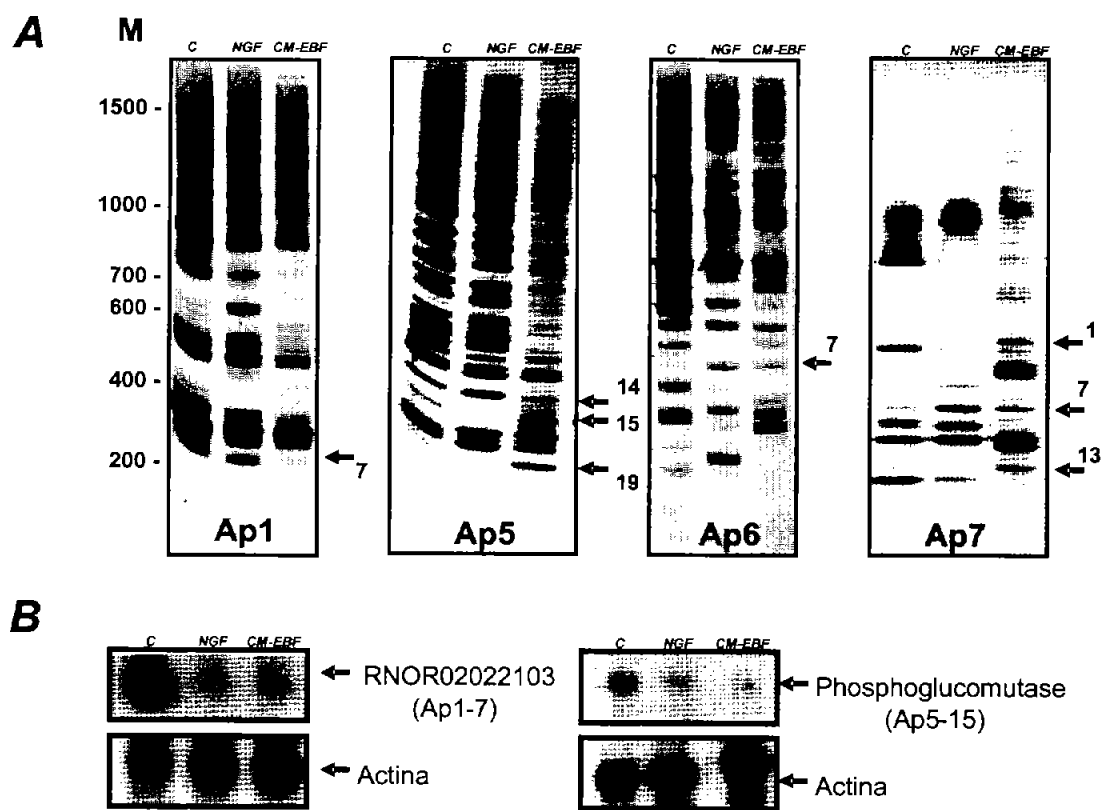
Se observaron al menos 53 bandas diferenciales con cuatro de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR (Ap1, Ap5, Ap6 y Ap7) (Figura 6-A). Se clonaron y secuenciaron ocho de bandas diferenciales (Ap1-7, Ap5-14, Ap5-15, Ap5-19, Ap6-7, Ap7-1, Ap7-7, Ap7-13, nombradas de acuerdo al oligo con el que se reamplificaron). Seis de las bandas (Ap1-7, Ap5-14, Ap5-15, Ap6-7, Ap7-7 y Ap7-13) se reprimen en el tratamiento con CM-EBF y dos se sobreexpresan con dicho tratamiento (Ap5-19 y Ap7-1). En la figura 6-A se muestra uno de los geles representativos de estos experimentos y en se señalan las bandas clonadas.

Las secuencias obtenidas de las bandas diferenciales se presentan en el apéndice B. En la tabla 2 se muestra la correspondencia de cada una de las secuencias de los transcritos clonados.

**Tabla 2.** Correspondencia de los transcritos diferenciales secuenciados.

TRANSCRITO	CORRESPONDENCIA CON EL GENOMA DE RATA
Ap1-7	Proteína hipotética RNOR02022103 de función desconocida
Ap5-14	Proteínas asociadas a microtúbulos tipo 2
Ap5-15	Fosfoglucomutasa-1
Ap5-19	Proteína de interacción neurofibromatosis tipo 2
Ap6-7	Tiamina pirofosfocinasa
Ap7-1	Fosfoglucomutasa-1
Ap7-7	Proteínas asociadas a microtúbulos tipo 2
Ap7-13	Proteína hipotética RNOR01044577 de función desconocida

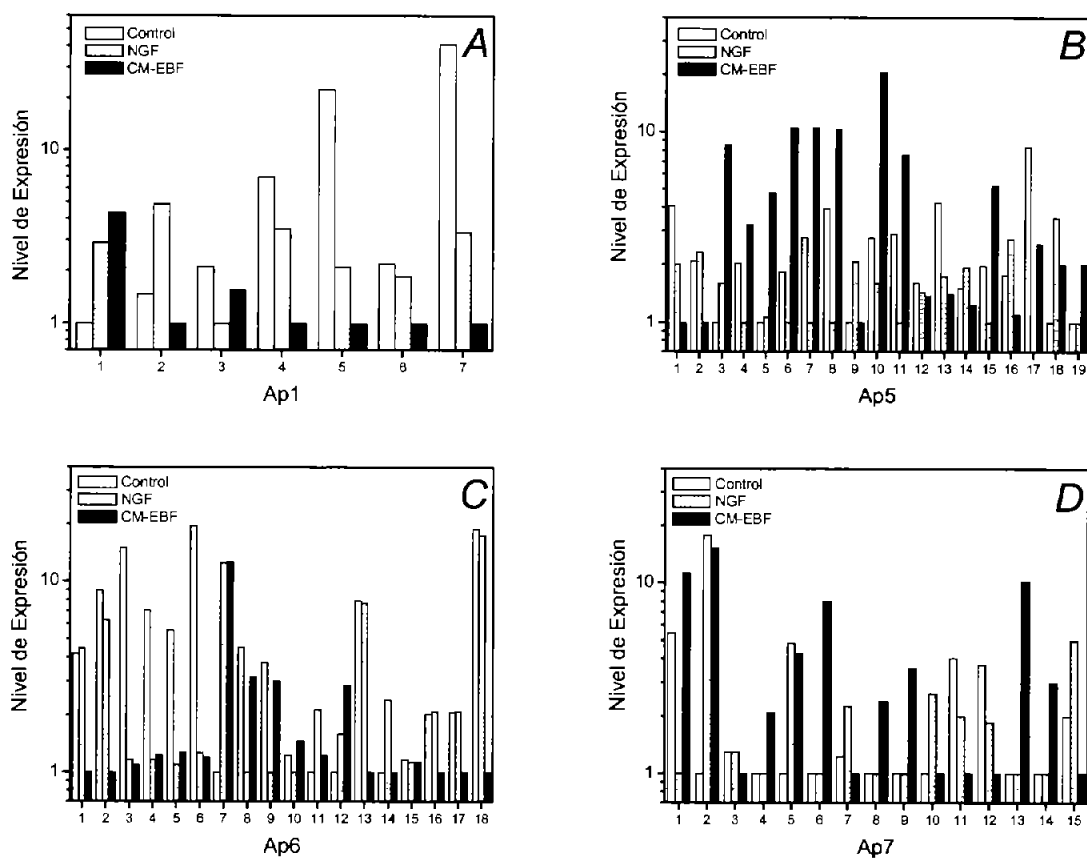
Los ensayos de Northern Blot con dos de las secuencias obtenidas, muestran las diferencias de expresión que existen en el transcrito de la fosfoglucomutasa-1 y en el de la proteína de función desconocida RNOR02022103 (Figura 6-B).



**Figura 6.** Bandas diferenciales observadas con el método de Differential Display. A, gel representativo para comparar los patrones de expresión del RNAm de las células cromafines no diferenciadas (1), diferenciadas con NGF (2) o con CM-EBF (3). B, Northern Blot de dos de las bandas clonadas y secuenciadas, con sus controles de actina. M = marcadores de peso molecular.

El análisis de intensidad de cada uno de los transcritos observados muestra el distinto comportamiento que presentan en las células cromafines cuando se les estimula con NGF o con CM-EBF (Figura 7). Así, en la figura se puede observar que existe un grupo de genes que se sobreexpresan específicamente en el grupo

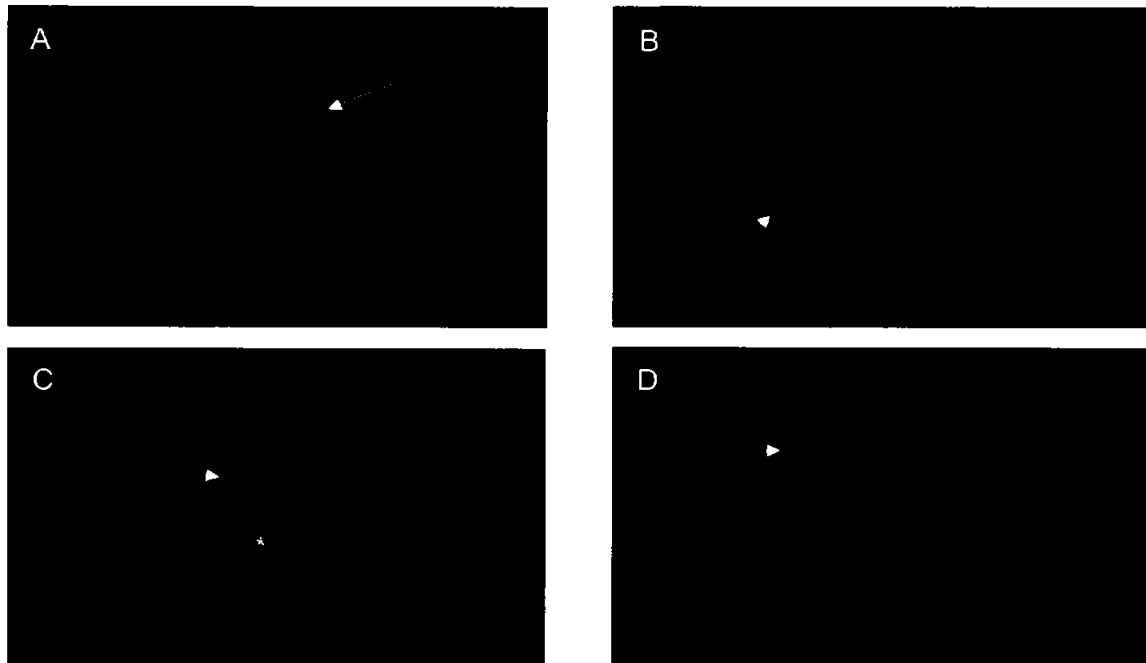
de células tratadas con CM-EBF cuando se utilizó el oligo Ap5 (Figura 7-B), y a la vez se puede observar el mismo efecto en grupos de transcritos correspondientes a células tratadas con NGF (Figura 7-A y C). Las desviaciones estándar obtenidas corroboran que existen diferencias en los patrones de expresión de los transcritos cuando se diferencian las células con CM-EBF.



**Figura 7.** Gráficas de intensidad de los transcritos observados en el análisis de Differential Display. Los transcritos fueron amplificados con cuatro diferentes oligos (A, Ap1; B, Ap5; C, Ap6, D, Ap7) y con cada uno de ellos se observan diferentes patrones de expresión en cada uno de los tres tratamientos dados a los cultivos primarios de células cromafines.

### La expresión de las MAP-2 es específica de las células cromafines diferenciadas

Con la finalidad de comprobar que la expresión de los transcritos analizados es específica de las células cromafines, y no de alguna de las otras células presentes en el cultivo primario, como los fibroblastos o las células de la corteza suprarrenal, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti MAP-2. En estos ensayos se observó que la expresión de este gen particular es mayor en las células cromafines (Figura 8). Se observa claramente que el anticuerpo se une específicamente a las células cromafines diferenciadas (Figura 8-B, C y D) y no así a las del grupo control (Figura 8-A).



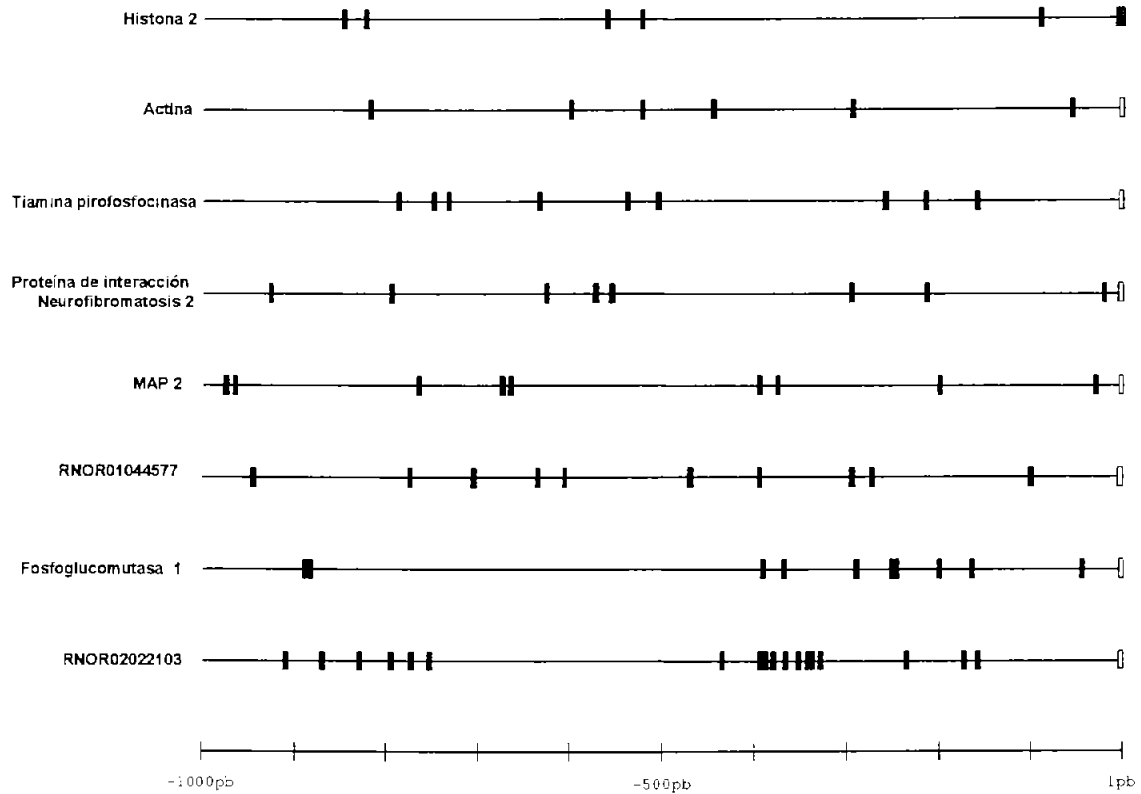
**Figura 8.** Inmunofluorescencia de células cromafines con MAP-2. Los cultivos primarios de células cromafines no tratados (A) tratados con NGF (B y C) o con CM-EBF (D), se marcaron utilizando el anticuerpo anti MAP-2 con rodamina para observar la expresión de dicho gen en cada uno de los grupos de estudio. Las flechas muestran células cromafines y el asterisco indica una célula no cromafín (posiblemente un fibroblasto) no marcada con dicho anticuerpo.



### **Análisis de la región regulatoria 5' de los genes modificados por CM-EBF**

Para determinar si los genes regulados por CM-EBF contienen las secuencias denominadas por Lin y colaboradores (2001) "Elementos de Respuesta Electromagnéticos (CTCT)", en los genes regulados por estos campos se analizaron 1000 pb río arriba a partir del inicio del marco de lectura de cada transcrito reportado en la base de datos. En la figura 9 se muestra la presunta región regulatoria de cada uno de los seis genes regulados por CM-EBF. Se encontró que cada una de las presuntas regiones regulatorias contiene un número diferente de estas secuencias de respuesta, así la secuencia RNOR02022103 contiene 12 cajas CTCT en los primeros 500 pb y 18 en los 1000 pb; en la secuencia de la fosfoglucomutasa se encontraron 8 cajas en las primeras 500 bases, 10 en las 1000 bases; en la región de las MAP-2 5 en 500 bases y 10 en 1000 bases; en la tiamina pirofosfocinasa 4 en 500 bases y 9 en 1000 bases; en la secuencia de la proteína de interacción con fibromatosis tipo 2, 3 en 500 bases y 8 en 1000 bases; y en la proteína hipotética RNOR01044577 5 en 500 bases y 10 en 1000 bases.

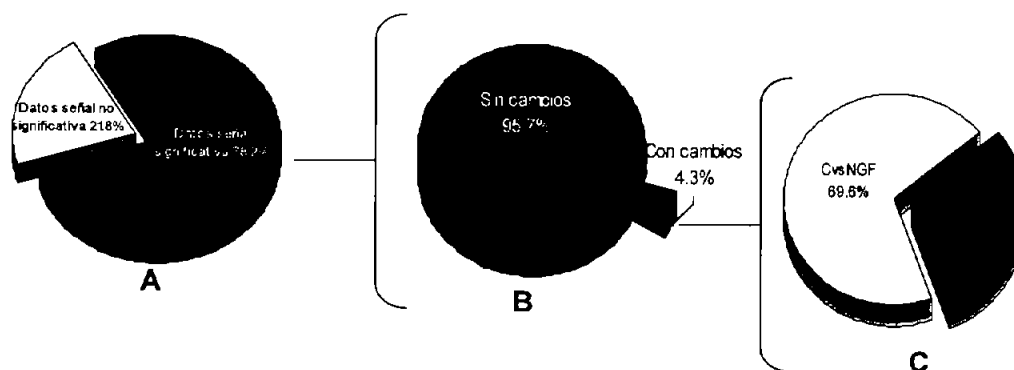
Como control de dicho análisis se detectó el número de cajas CTCT en dos genes que consideramos como de expresión constitutiva en cada uno de los tratamientos celulares. Los controles fueron la actina y la histona-2, en donde solamente encontramos 2 y 3 cajas, respectivamente, en los primeros 500 pb de las regiones regulatorias correspondientes.



**Figura 9.** Análisis de los elementos de respuesta electromagnéticos. En los primeros 1000 pb río arriba de la presunta región reguladora de seis genes regulados por CM-EBF y en dos controles (actina e histona-2) se determinó el número de cajas CTCT, las cuales están representadas con las cajas negras. Las cajas blancas indican el sitio ATG de la secuencia.

## MICROARREGLOS

En los microarreglos de 15K, los cuales contienen 14,101 puntos con secuencias de rata, el 78.3% de los datos (11,026) presenta señales verdaderas para el análisis posterior de la laminilla (estas señales son mayores a la señal de fondo del arreglo), mientras que el 28.2% (3,977 datos) no presenta valores mayores a los de la señal del fondo del microarreglo (Figura 10-A). Dentro de los valores que presentan una señal verdadera, el 95.7% (10,552 datos) no presenta cambios significativos entre tratamientos, no así el 4.3% (474 datos) que se modifica entre los grupos de células cromafines (Figura 10-B). De este 4.3% de cambios, el 69.6% (330 datos) corresponde a cambios que se presentan entre las células cromafines diferenciadas con NGF y aquellas del grupo control, el 11.0% (52 datos) se refiere a los cambios observados entre las células diferenciadas con CM-EBF y aquellas no tratadas, y el 19.4% (92 datos) son cambios que suceden entre ambos tratamientos de diferenciación, NGF y CM-EBF (Figura 10-C).

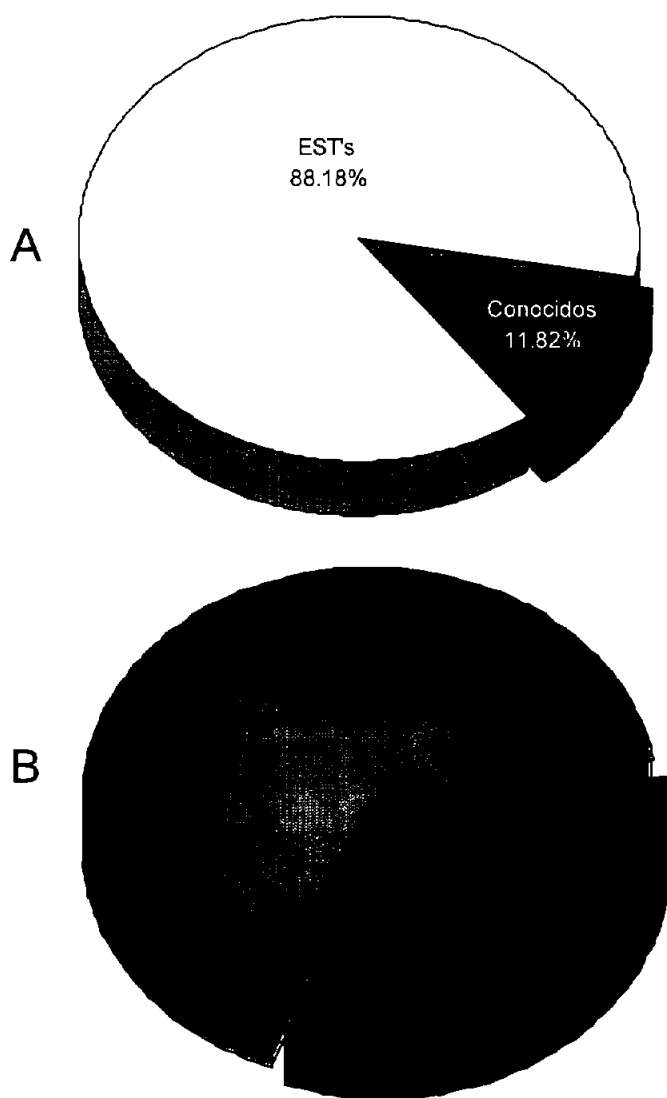


**Figura 10.** Gráficas de porcentajes del análisis consecutivo de datos para determinar cambios verdaderos entre tratamientos de células cromafines. A, porcentajes de datos que presentan una señal verdadera dentro del arreglo después de filtrarlos restándoles la señal de fondo del mismo. B, porcentajes del comportamiento de los valores filtrados que presentan cambios significativos entre tratamientos. C, clasificación por grupos de los porcentajes de datos con cambios significativos entre dos Gráficas de porcentajes del análisis consecutivo de datos para determinar cambios verdaderos entre tratamientos aplicados a las células cromafines.

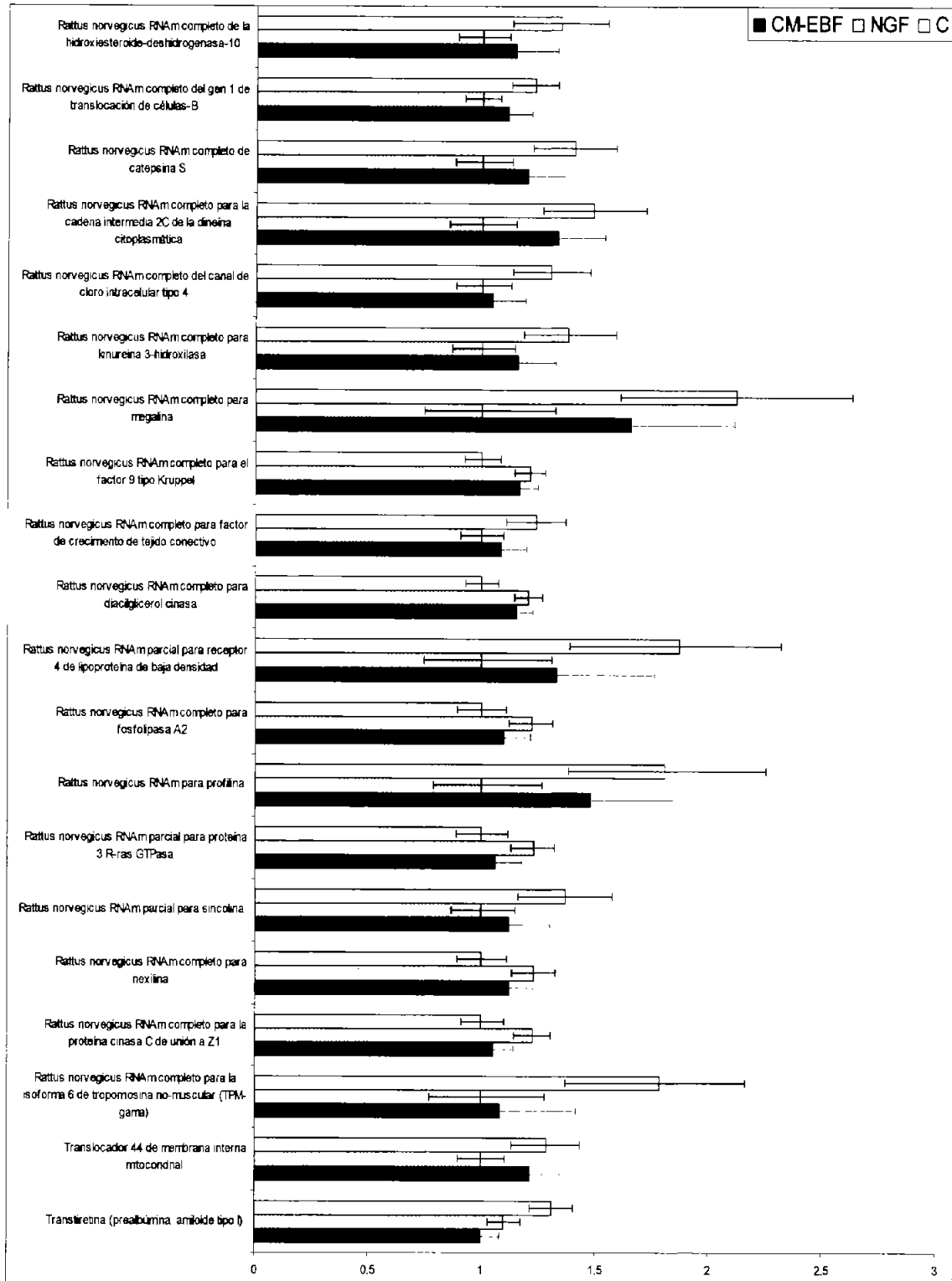
Primeramente al comparar el grupo NGF contra el grupo control se encontró que 330 genes se modifican significativamente.

De los 330 genes que varían entre estos tratamientos, el 88.18% (291) corresponde a secuencias EST's y el 11.82% es de secuencias conocidas (Figura 11-A). De las 330 secuencias significativamente diferentes entre NGF y control, el 33.33% son genes sobreexpresados en el grupo de NGF y 66.67% genes reprimidos (Figura 11-B).

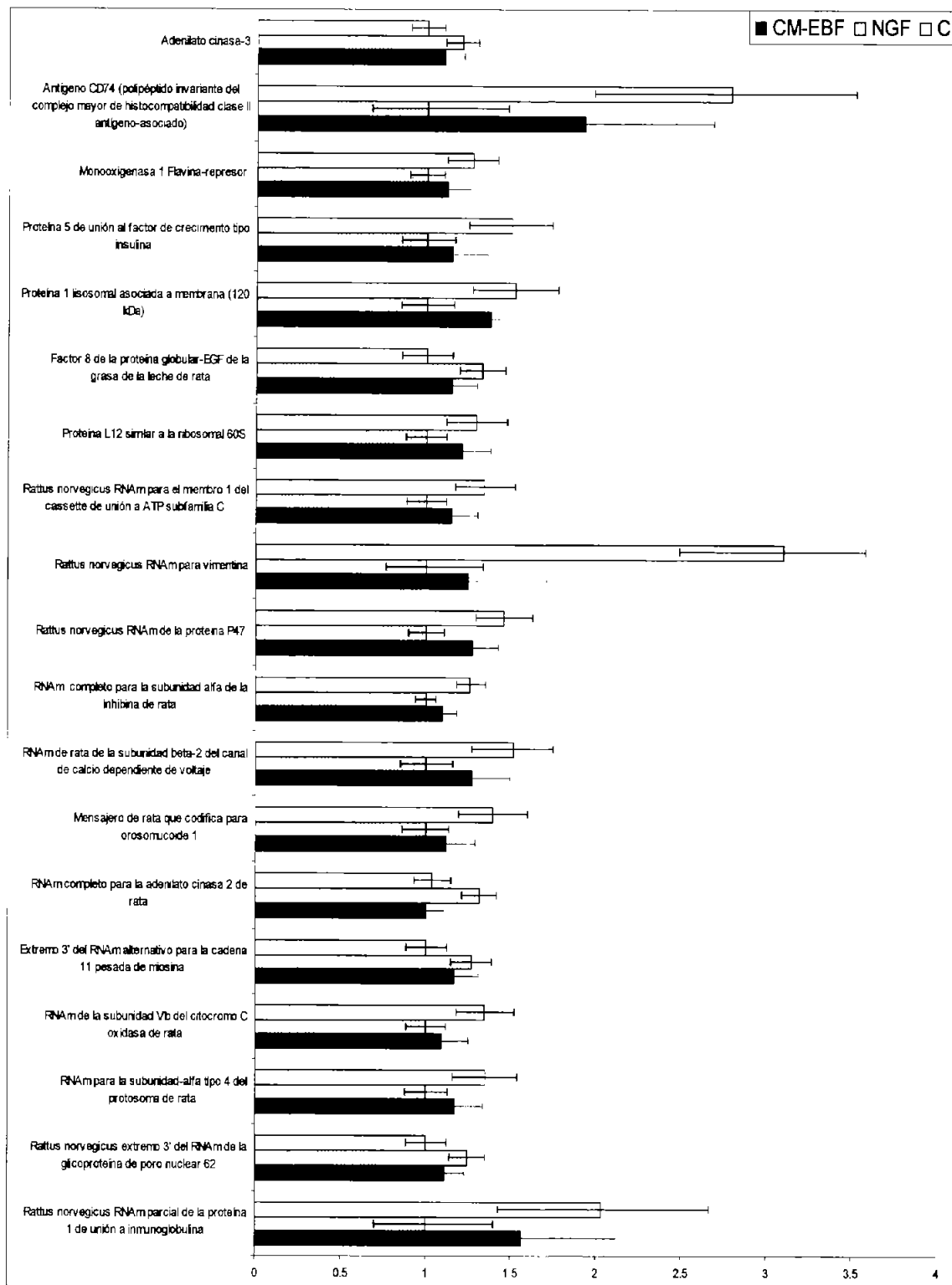
En la figura 12 se muestra la gráfica de genes conocidos estadísticamente diferentes entre estos grupos, con sus respectivos valores del nivel de expresión; los valores presentados en la gráfica son el resultado de comparar el grupo de NGF contra el control, y se presenta también el comportamiento del grupo de CM-EBF al hacer la comparación de los dos primeros. Los genes desconocidos o secuencias EST's que son estadísticamente diferentes se encuentran en el apéndice C.



**Figura 11.** Gráficas de porcentajes de genes conocidos y sobreexpresados al comparar el grupo tratado con NGF y el grupo control. A, porcentajes de secuencias conocidas y secuencias desconocidas. B, porcentajes de genes reprimidos y sobreexpresados en el grupo NGF comparado con el grupo control.



**Figura 12.** Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes conocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con NGF y las células cromafines no tratadas. Los datos se obtuvieron con el programa de análisis BAGEL.

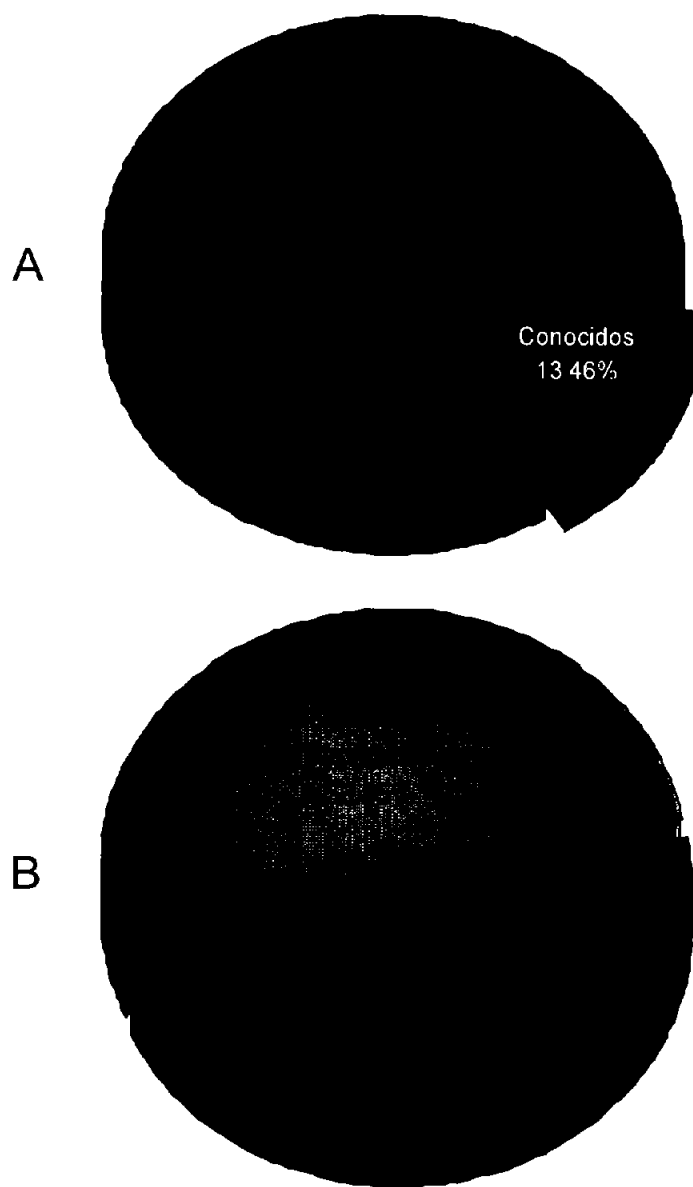


**Figura 12 continuación.** Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes conocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con NGF y las células cromafines no tratadas. Los datos se obtuvieron con el programa de análisis BAGEL.

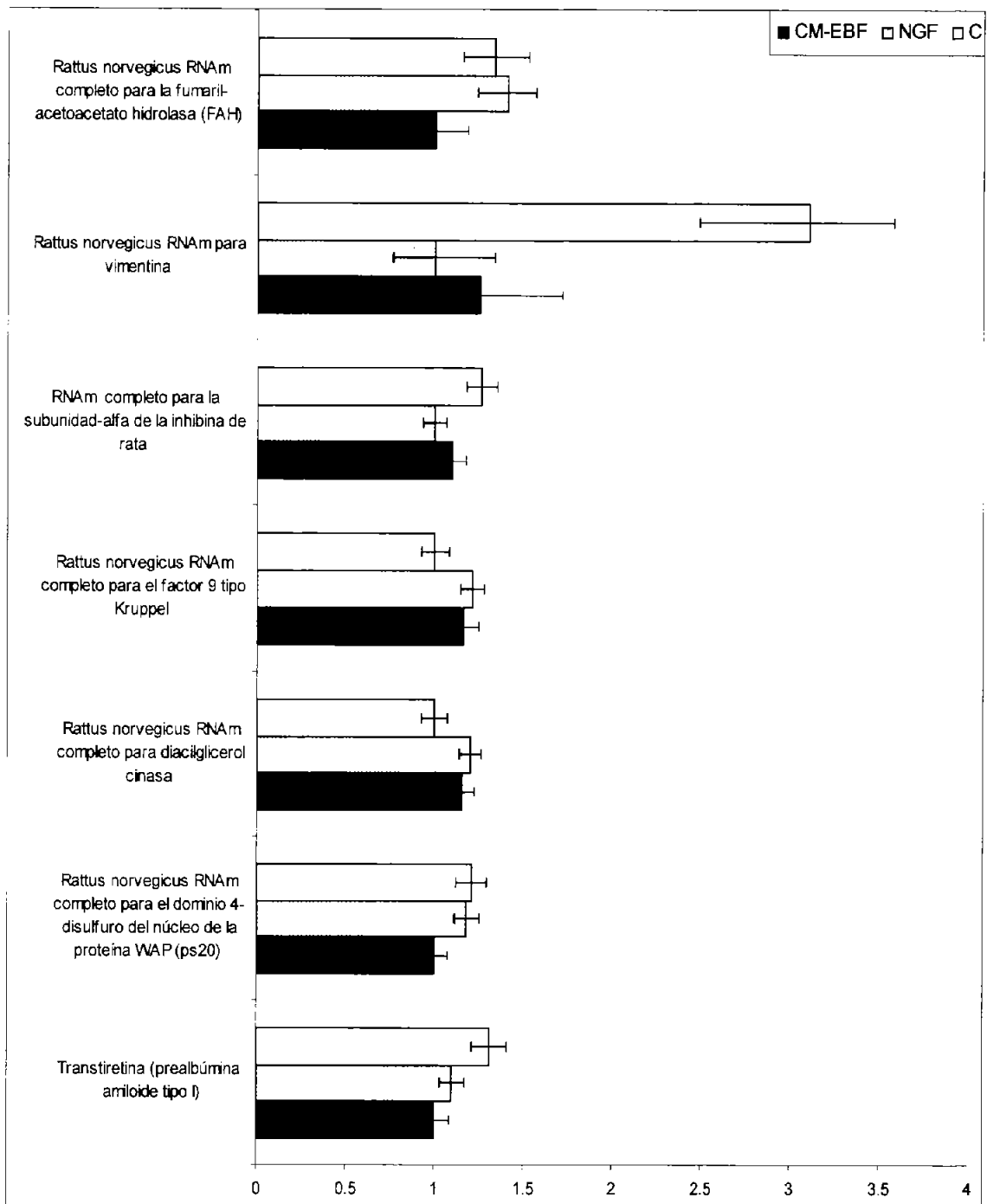
Al comparar el grupo tratado con CM-EBF y el grupo control se encontró que 52 genes presentan cambios entre ambos tratamientos. El 86.54% de las secuencias son secuencias desconocidas y el 13.46% corresponde a secuencias con función asignada dentro del genoma de rata (Figura 13-A). Se observó también que el 53.85% de los 52 genes que cambian entre estos tratamientos, son reprimidos con el estímulo de CM-EBF y el 46.15% están sobreexpresados con este mismo tratamiento (Figura 13-B).

En la figura 14 se presentan los genes conocidos con su valores de expresión entre tratamientos y las desviaciones estándar de dichos valores. En el apéndice D se muestran las gráficas correspondientes a las secuencias EST's, las cuales fueron significativamente diferentes entre el grupo de CM-EBF y el grupo control.





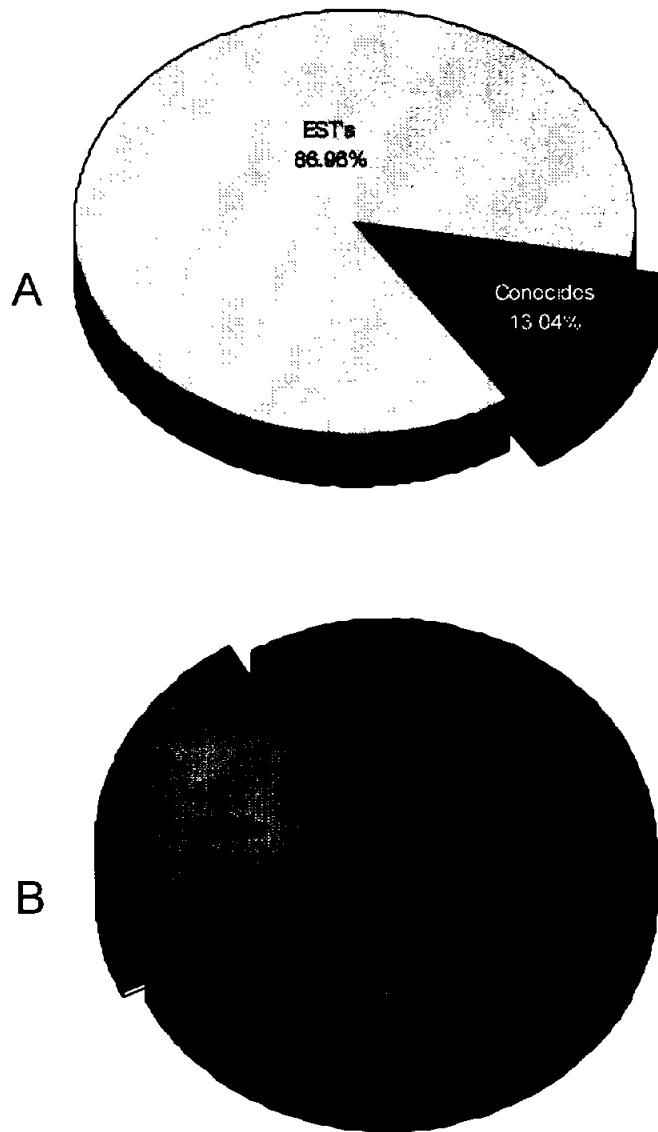
**Figura 13.** Gráficas de porcentajes de genes conocidos y sobreexpresados al comparar el grupo tratado con CM-EBF y el grupo control. A, porcentajes de secuencias conocidas y secuencias desconocidas. B, porcentajes de genes reprimidos y sobreexpresados en el grupo CM-EBF comparado con el grupo control.



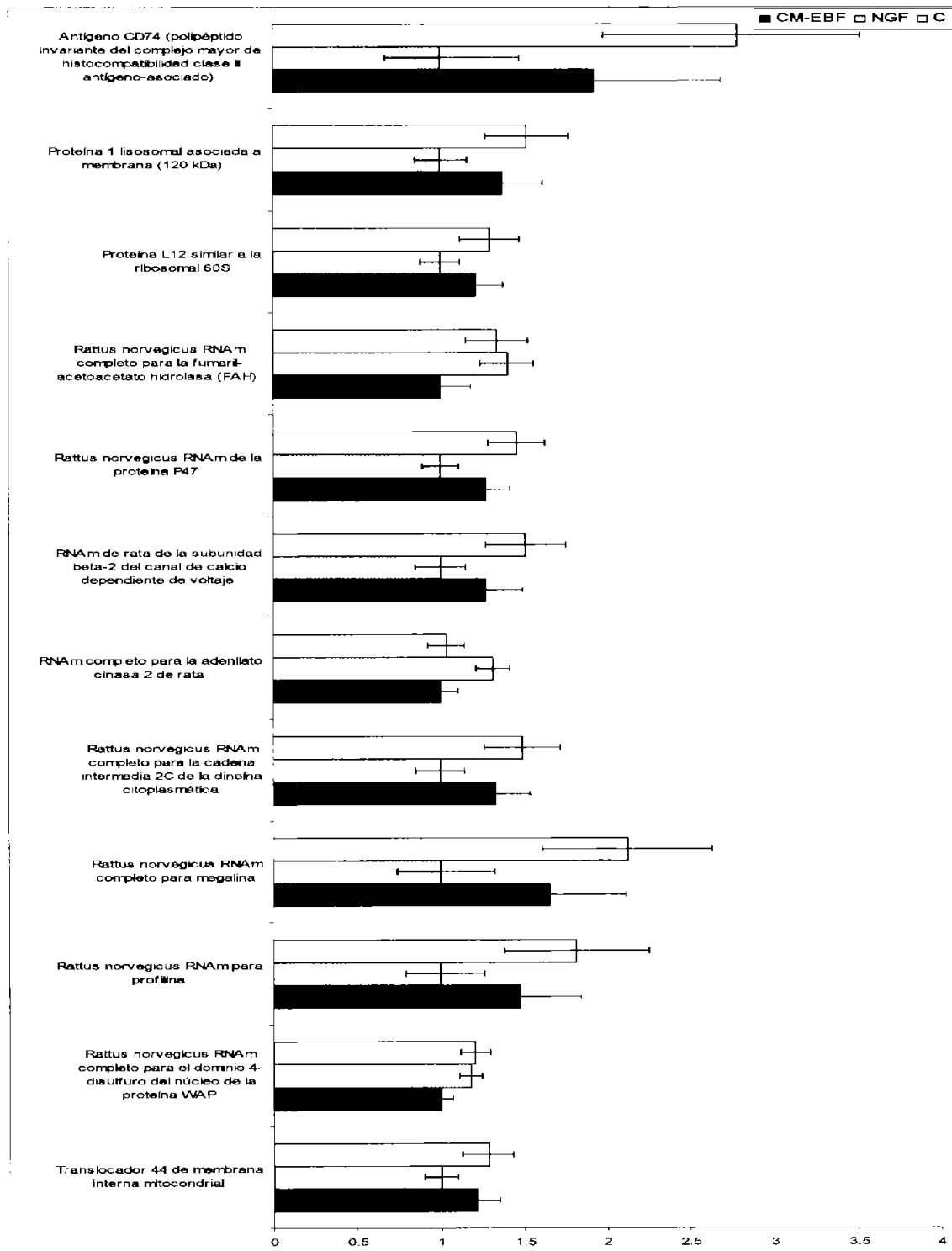
**Figura 14.** Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes conocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con CM-EBF y las células cromafines no tratadas. Los datos se obtuvieron con el programa de análisis BAGEL.

Finalmente, al comparar ambos grupos de diferenciación celular, CM-EBF contra NGF, se encontró que 92 genes se modificaron significativamente. De estos 92 genes el 86.96% (80) corresponde a secuencias EST, mientras que el 13.04% (12) son secuencias conocidas en el genoma de rata (Figura 15-A). El 23.99% (22) de los genes que se modifican son genes que se encuentran reprimidos cuando las células cromafines se tratan con CM-EBF comparadas con el grupo tratado con NGF, y el 76.01% de los 92 genes están sobreexpresados en el grupo estimulado con CM-EBF en comparación con el grupo de NGF (Figura 15-B).

En la figura 16 se presenta la gráfica de los genes conocidos y los valores de expresión de cada uno de ellos, con sus respectivas desviaciones estándar. En el apéndice E se presentan las gráficas de las secuencias EST's que se modifican al comparar los tratamientos de diferenciación cromafín.



**Figura 15.** Gráficas de porcentajes de genes conocidos y sobreexpresados al comparar el grupo tratado con CM-EBF y el grupo de NGF. A, porcentajes de secuencias conocidas y secuencias desconocidas. B, porcentajes de genes reprimidos y sobreexpresados en el grupo CM-EBF comparado con el grupo NGF.



**Figura 16.** Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes conocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con CM-EBF y las células cromafines tratadas con CM-EBF. Los datos se obtuvieron con el programa de análisis BAGEL.

Una vez identificados aquellos genes que se modifican entre los tres tratamientos a los que se sometieron los cultivos de células cromafines, se buscaron similitudes y diferencias entre genes y tratamientos. Los genes expresados en todos los tratamientos, y con función conocida en del genoma de rata, se compararon en la tabla 3. En esta tabla se observa que cinco genes se reprimen en los grupos de diferenciación celular, NGF y CM-EBF, al compararlos con el grupo control. Estos genes corresponden a: transtiretina, a la diacilglicerol cinasa, al factor-9 tipo Kruppel, a la vimentina y a la subunidad alfa de la inhibina de rata.

Las células cromafines tratadas con NGF reprimen nueve genes durante su proceso de diferenciación y sobreexpresan uno, esto al comparar dicho grupo con los otros dos grupos. Los genes que están reprimidos con este tratamiento son de del translocador 44 de membrana interna mitocondrial, de profilina, de megalina, de la cadena 2C de la dineína, de la subunidad beta-2 del canal de calcio dependiente de voltaje, de la proteína P47, de la proteína L2, de la proteína 1 lisosomal asociada a membrana y del antígeno CD74. El gen que se sobreexpresa cuando se tratan las células con NGF es el de la adenilato cinasa-3.

En el tratamiento con CM-EBF las células cromafines reprimen particularmente dos genes: el del dominio 4-disulfuro de la proteína WAP y el de la fumaril-acetoacetato hidrolasa.

El resto de los genes conocidos se presentan al comparar el grupo de NGF contra el grupo control, y la mayoría de ellos están reprimidos (ver Tabla 3).

**Tabla 3.** Genes conocidos que se modifican en los tratamientos aplicados a las células cromafines. \*Entre paréntesis se indica el número de veces que varía el gen entre los dos tratamientos que se están comparando.  $\Phi$  = Sin cambios significativos

NGF vs. CONTROL (*)	CM-EBF vs. CONTROL (*)	CM-EBF vs. NGF (*)
Transtiretina (prealbúmina amiloide tipo I) (1.1:1.3)	Transtiretina (prealbúmina amiloide tipo I) (1.0:1.3)	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para diacilglicerol-cinasa (1.2:1.0)	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para diacilglicerol-cinasa (1.2:1.0)	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para el factor-9 tipo Kruppel (1.2:1.0)	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para el factor-9 tipo Kruppel (1.2:1.0)	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm para vimentina (1.0:3.1)	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm para vimentina (1.2:3.1)	$\Phi$
RNAm completo para la subunidad-alfa de la inhibina de rata (1.0:1.3)	RNAm completo para la subunidad-alfa de la inhibina de rata (1.1:1.2)	$\Phi$
Translocador 44 de membrana interna mitocondrial (1.0:1.3)	$\Phi$	Translocador 44 de membrana interna mitocondrial (1.2:1.0)
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm para profilina (1.0:1.8)	$\Phi$	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm para profilina (1.5:1.0)
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para megalina (1.0:2.1)	$\Phi$	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para megalina (1.6:1.0)
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para la cadena intermedia 2C de la dineína citoplasmática (1.0:1.5)	$\Phi$	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para la cadena intermedia 2C de la dineína citoplasmática (1.3:1.0)
RNAm de rata de la subunidad beta-2 del canal de calcio dependiente de voltaje (1.0:1.5)	$\Phi$	RNAm de rata de la subunidad beta-2 del canal de calcio dependiente de voltaje (1.3:1.0)
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm de la proteína P47 (1.0:1.5)	$\Phi$	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm de la proteína P47 (1.2:1.0)
Proteína L12 similar a la ribosomal 60S (1.0:1.3)	$\Phi$	Proteína L12 similar a la ribosomal 60S (1.2:1.0)
Proteína-1 lisosomal asociada a membrana (120 kDa) (1.0:1.5)	$\Phi$	Proteína-1 lisosomal asociada a membrana (120 kDa) (1.4:1.0)
Antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo mayor de histocompatibilidad clase II antígeno-asociado) (1.0:2.8)	$\Phi$	Antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo mayor de histocompatibilidad clase II antígeno-asociado) (1.9:1.0)
RNAm completo para la adenilato cinasa-2 de rata (1.3:1.0)	$\Phi$	RNAm completo para la adenilato cinasa-2 de rata (1.0:1.3)
$\Phi$	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para el dominio 4-disulfuro del núcleo de la proteína WAP (ps20) (1.0:1.2)	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para el dominio 4-disulfuro del núcleo de la proteína WAP (1.0:1.2)
$\Phi$	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para la fumaril-acetoacetato hidrolasa (FAH) (1.0:1.3)	<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para la fumaril-acetoacetato hidrolasa (FAH) (1.0:1.4)
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para la isoforma 6 de tropomiosina no muscular (TPM-gama) (1.0:1.8)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para la proteína cinasa C de unión a Z1 ((1.2:1.0)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para nexilina (1.2:1.0)	$\Phi$	$\Phi$

**Tabla 3 continuación.** Genes conocidos que se modifican en los tratamientos de diferenciación de las células cromafines. (\*) Entre paréntesis se indica el número de veces que varía el gen en cada un de los tratamientos que se están comparando.  $\Phi$  = Sin cambios significativos

NGF vs. CONTROL (*)	CM-EBF vs. CONTROL (*)	CM-EBF vs. NGF (*)
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm parcial para sincolina (1.0:1.4)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm parcial para proteína 3 R-ras GTPasa (1.2:1.0)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para fosfolipasa A2 (1.2:1.0)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm parcial para receptor 4 de lipoproteína de baja densidad (1.0:1.9)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para factor de crecimiento de tejido conectivo (1.0:1.2)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo para kinureina 3-hidroxilasa (1.0:1.4)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo del canal de cloro intracelular tipo 4 (1.0:1.3)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo de catepsina S (1.0:1.4)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo del gen 1 de translocación de células B (1.0:1.2)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm completo de la deshidrogenasa-hidroxiesteroide-10 (1.0:1.3)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm parcial de la proteína 1 de unión a inmunoglobulina (1.0:2.0)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> extremo 3' del RNAm de la glicoproteína de poro nuclear 62 (1.2:1.0)	$\Phi$	$\Phi$
RNAm para la subunidad alfa tipo 4 del protosoma de rata (1.0:1.3)	$\Phi$	$\Phi$
RNAm de la subunidad Vb del citocromo C oxidasa de rata (1.0:1.3)	$\Phi$	$\Phi$
Extremo 3' del RNAm alternativo para la cadena 11 pesada de miosina (1.2:1.0)	$\Phi$	$\Phi$
Mensajero de rata que codifica para orosomucoide 1 (1.0:1.4)	$\Phi$	$\Phi$
<i>Rattus norvegicus</i> RNAm para el miembro 1 del cassette de unión a ATP subfamilia C (1.0:1.3)	$\Phi$	$\Phi$



**Tabla 3 continuación.** Genes conocidos que se modifican en los tratamientos de diferenciación de las células cromafines. (\*) Entre paréntesis se indica el número de veces que varía el gen en cada uno de los tratamientos que se están comparando.  $\Phi$  = Sin cambios significativos

NGF vs. CONTROL (*)	CM-EBF vs. CONTROL (*)	CM-EBF vs. NGF (*)
Factor-8 de la proteína globular-EGF de la grasa de la leche de rata(1.3:1.0)	$\Phi$	$\Phi$
Proteína 5 de unión al factor de crecimiento tipo insulina (1.0:1.5)	$\Phi$	$\Phi$
Monooxigenasa-1 Flavina-represor (1.0:1.3)	$\Phi$	$\Phi$
Adenilato cinasa 3 (1.2:1.0)	$\Phi$	$\Phi$

Una vez clasificados los genes conocidos de acuerdo al tratamiento aplicado a las células cromafines, se analizó la función celular que desempeñan dichos genes. Los genes se agruparon por función de acuerdo al programa DAVID. Con los datos obtenidos se realizó la tabla 4, en donde se observa que algunos de los genes participan en diversas funciones celulares y se muestra la variación de expresión en las células cromafines al comparar los tratamientos analizados en el presente trabajo. La mayoría de los genes son componentes de membranas celulares (18 genes de los 41 conocidos).

Por otro lado, 14 genes participan en diversas funciones fisiológicas necesarias para la célula, mientras que 12 de ellos presentan funciones de adherencia celular. Nueve genes tienen actividad catalítica y 5 son transportadores celulares. Los genes conocidos implicados en desarrollo celular, en la transducción de señales y en la respuesta inmune, son dos para cada uno de los tres grupos mencionados. Y finalmente, un gen participa en la actividad motora celular y otro funge como

proteína chaperona. En la tabla 4 se muestran también aquellos genes a los que aún no se les ha asignado una función celular específica.

**Tabla 4.** Funciones celulares de los genes conocidos que se modifican en los tratamientos aplicados a las células cromafines. Entre paréntesis se indica el número de veces que varía el gen mencionado al comparar dos tratamientos. ( )=NGF vs. Control, ( )\*=CM-EBF vs. Control

CLASIFICACIÓN	GEN	FUNCIONES CONOCIDAS	EXPRESIÓN
COMPONENTES CELULARES	Vimentina	Filamentos intermedios; complejo de cinesina	(1.0:3.1)
	Translocador 44 de membrana interna mitocondrial	Componente de la membrana interna celular; componente de la membrana interna mitocondrial	(1.0:1.3)
	Sincolina	Componente membranal de las vesículas secretoras	(1.0:1.4)
	Proteína cinasa C de unión a Z1	Componente del complejo de la cinesina	(1.2:1.0)
	Proteína globular-EGF de grasa de la leche	Componente del espacio extracelular	(1.3:1.0)
	Subunidad alfa tipo 4 del protosoma de rata	Componente del protosoma	(1.0:1.3)
	Profilina	Participa en la organización y la biogénesis del citoesqueleto y en la organización de actina	(1.0:1.8)
	Fosfolipasa A2	Componente de membrana	(1.2:1.0)
	Proteína 1 lisosomal asociada a membrana	Componente del espacio extracelular; componente integral de la membrana	(1.0:1.5)
	Megalina	Componente de membrana	(1.0:1.9)
	Monooxigenasa 1 Flavina-represor	Componente del espacio extracelular; componente integral de membrana	(1.0:1.3)
	Cadena intermedia 2C de la dineína citoplasmática	Componente del complejo actina-dineína y complejo de dineína; participa en el proceso de organización de microtúbulos	(1.0:1.5)
	Subunidad Vb del citocromo C oxidasa	Componente de la membrana interna y de la membrana mitocondrial	(1.0:1.3)
	Antígeno CD74	Componente integral de la membrana	(1.0:2.8)
	Catepsina S	Componente lisosomal	(1.0:1.4)
	Miembro 1 del cassette de unión a ATP subfamilia C	Componente integral de la membrana	(1.0:1.3)
	Subunidad alfa de la inhibina	Componente del espacio extracelular	(1.0:1.3)
Adenilato cinasa-2	Componente de la membrana mitocondrial	(1.3:1.0)	
IMPLICADOS EN PROCESOS FISIOLÓGICOS	Transtiretina (prealbúmina amiloide tipo I)	Participa en producción de hormona tiroidea	(1.1:1.3)
	Sincolina	Regulación de exocitosis dependiente de calcio; componente de membrana de vesículas secretoras	(1.0:1.4)
	Subunidad alfa tipo 4 del protosoma	Participa en el catabolismo dependiente de ubiquitina	(1.0:1.3)
	Translocador 44 de membrana interna mitocondrial	Blanco de proteínas	(1.0:1.3)
	Profilina	Participa en la organización y la biogénesis del citoesqueleto y en la organización de actina	(1.0:1.8)
	Fosfolipasa A2	Participa en el catabolismo de lípidos	(1.2:1.0)

Tabla 4 *continuación*. Funciones celulares de los genes conocidos que se modifican en los tratamientos aplicados a las células cromafines. Entre paréntesis se indica el número de veces que varía el gen mencionado al comparar dos tratamientos. ( )=NGF vs. Control, ( )\*=CM-EBF vs. Control

CLASIFICACIÓN	GEN	FUNCIONES CONOCIDAS	EXPRESIÓN
IMPLICADOS EN PROCESOS FISIOLÓGICOS	Megalina	Participa en endocitosis; endosoma regulador de endocitosis; participa en el metabolismo de vitaminas	(1.0:2.1)
	Subunidad alfa de la inhibina	Actividad hormonal; regulador negativo en la secreción de hormonas folículo estimulada; regulador negativo en la biosíntesis de interferón gama; regulador negativo de la fosforilación	(1.0:1.3)
	Proteína 1 de unión a inmunoglobulina	Activación de células B; regulador en la transducción de señales, responde a factores bióticos	(1.0:2.0)
	Factor de crecimiento de tejido conectivo	Participa en las cascadas de señales intracelulares	(1.0:1.2)
	Diacilglicerol cinasa	Participa en cascadas de señalización intracelular	(1.2:1.0)
	Adenilato cinasa-2	Participa en el metabolismo de la adenina	(1.3:1.0)
	Adenilato cinasa-3	Participa en el metabolismo de pirimidinas	(1.2:1.0)
	Deshidrogenasa-hidroxiesteroide-10	Participa en la degradación de amino ácidos	(1.0:1.3)
	Fumaril-acetoacetato hidrolasa (FAH)	Participa en el metabolismo de amino ácidos aromáticos; participa en el catabolismo de la fenilalanina; regulador de la transcripción dependiente de DNA; participa en el catabolismo de la tirosina	(1.0:1.3)*
	Dominio 4-disulfuro del núcleo de la proteína WAP (ps20)	Inhibidor de endopeptidasas tipo serina	(1.0:1.2)*
UNIÓN CELULAR	Transtretina (prealbúmina amiloide tipo I)	Unión a retinól; unión a esteroides	(1.1:1.3)
	Translocador 44 de membrana interna mitocondrial	Unión a ATP	(1.0:1.3)
	Profilina	Unión a actina	(1.0:1.8)
	Fosfolipasa A2	Unión al calcio	(1.2:1.0)
	Megalina	Unión a iones calcio; unión a proteínas	(1.0:2.1)
	Subunidad alfa de la inhibina	Unión a proteínas	(1.0:1.3)
	Diacilglicerol cinasa	Unión a diacilglicerol	(1.2:1.0)
	Factor de crecimiento de tejido conectivo	Adhesión celular; unión a heparina	(1.0:1.2)
	Miembro 1 del cassette de unión a ATP subfamilia C	Unión a ATP; unión a nucleótidos	(1.0:1.3)
	Proteína globular-EGF de grasa de la leche	Adhesión celular	(1.3:1.0)
	Adenilato cinasa-2	Unión a ATP	(1.3:1.0)
	Fumaril-acetoacetato hidrolasa (FAH)	Unión a DNA	(1.0:1.3)*
ACTIVIDAD CATALÍTICA	Subunidad alfa tipo 4 del protosoma	Actividad de endopeptidasa; actividad de hidrolasa; actividad de peptidasa; actividad de endopeptidasa protosomal	(1.0:1.3)
	Fosfolipasa A2	Fosfolipasa citosólica y de secreción dependiente de calcio; actividad de hidrolasa	(1.2:1.0)
	Monooxigenasa 1 Flavina-represor	Actividad de óxidoreductasa	(1.0:1.3)
	Diacilglicerol cinasa	Actividad de cinasa; activa proteínas cinasas C; actividad de transferasas	(1.2:1.0)
	Subunidad Vb del citocromo C oxidasa	Actividad de óxidoreductasa	(1.0:1.3)
	Subunidad alfa de la inhibina	Actividad de citocina	(1.0:1.3)
	Catepsina S	Actividad de endopeptidasa; actividad de peptidasa; actividad de hidrolasa; participa en proteólisis	(1.0:1.4)

Tabla 4 continuación. Funciones celulares de los genes conocidos que se modifican en los tratamientos aplicados a las células cromafines. Entre paréntesis se indica el número de veces que varía el gen mencionado al comparar dos tratamientos. ( )=NGF vs. Control, ( )\*=CM-EBF vs. Control

CLASIFICACIÓN	GEN	FUNCIONES CONOCIDAS	EXPRESIÓN
ACTIVIDAD CATALÍTICA	Adenilato cinasa-2	Actividad de cinasa; actividad de fosfotransferasa; actividad de transferasa	(1.3:1.0)
	Fumaril-acetoacetato hidrolasa (FAH)	Actividad hidrolítica	(1.0:1.3)
TRANSPORTADORES CELULARES	Transtiretina (prealbúmina amiloide tipo I)	Actividad de acarreador; transportador	(1.1:1.3)
	Translocador 44 de membrana interna mitocondrial	Transporte de proteínas intracelulares; translocador en membrana interna mitocondrial; translocador de proteínas; actividad de translocasa	(1.0:1.3)
	Monooxigenasa 1 Flavina-represor	Transportador de electrones; microsoma	(1.0:1.3)
	Subunidad Vb del citocromo C oxidasa	Transportador de electrones; componente de la membrana mitocondrial interna	(1.0:1.3)
	Miembro 1 del cassette de unión a ATP subfamilia C	Actividad de transportador por unión al cassette ABC	(1.0:1.3)
DESARROLLO	Subunidad alfa de la inhibina	Actividad de factor de crecimiento; participa en el arresto durante el ciclo celular; participa en diferenciación celular; participa en mantenimiento y crecimiento celular; inductor de apoptosis; participa en biosíntesis de hemoglobina; regulador negativo en la diferenciación de células B; regulador negativo del ciclo celular; regulador negativo en la diferenciación de macrófagos	(1.0:1.3)
	Factor de crecimiento de tejido conectivo	Participa en angiogenesis	(1.0:1.2)
RESPUESTA INMUNE	Subunidad alfa de la inhibina	Proteína de defensa/inmunidad	(1.0:1.3)
	Antígeno CD74	Participa en la respuesta inmune	(1.0:2.8)
TRANSDUCTORES DE SEÑALES	Megalina	Actividad de receptor	(1.0:2.1)
	Subunidad alfa de la inhibina	Receptor de superficie para transducción de señales; señales célula-célula	(1.0:1.3)
ACTIVIDAD MOTORA	Cadena intermedia 2C de la dineína	Actividad motora	(1.0:1.5)
CHAPERONAS	Antígeno CD74	Actividad de chaperona	(1.0:2.8)
FUNCIÓN NO ASIGNADA	Tropomiosina no muscular (TPM-gama)		(1.0:1.8)
	Proteína 3 R-ras GTPasa		(1.2:1.0)
	Proteína L12 similar a la ribosomal 60S		(1.0:1.3)
	Proteína 3 R-ras GTPasa		(1.2:1.0)
	Proteína P47		(1.0:1.5)
	Orosomucoide 1		(1.0:1.4)
	Nexilina		(1.2:1.0)
	Receptor 4 de lipoproteína de baja densidad		(1.0:1.9)
	Kinureína 3-hidroxilasa		(1.0:1.4)
	Factor 9 tipo Kruppel		(1.2:1.0)
	Subunidad beta-2 del canal de calcio dependiente de voltaje		(1.0:1.5)
	Gen 1 de translocación de células B		(1.0:1.2)
	Canal de cloro intracelular tipo 4		(1.0:1.3)
	Glicoproteína de poro nuclear 62		(1.2:1.0)
Cadena 11 pesada de miosina		(1.2:1.0)	
Proteína 5 de unión al factor de crecimiento tipo insulina		(1.0:1.5)	

Al analizar la participación de los genes de función celular conocida en las rutas metabólicas, se encontró que 8 de dichos genes están implicados, principalmente, en rutas del metabolismo y la degradación de compuestos celulares como aminoácidos y ácidos nucleicos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Genes conocidos y su participación en distintas rutas metabólicas celulares.

<i>GEN</i>	<i>RUTA METABÓLICA</i>
Adenilato cinasa-2	Metabolismo de purinas
Adenilato cinasa-3	Metabolismo de pirimidinas
Diacilglicerol cinasa	Metabolismo de lípidos de glicerol
	Sistema de señales inducidas por fosfatidilinositol
Fosfolipasa A2	Metabolismo de lípidos de glicerol
	Degradación de fosfolípidos
	Metabolismo de prostaglandinas y leucotrieno
Fumaril-acetoacetato hidrolasa (FAH)	Degradación del estireno
	Metabolismo de la tirosina
Deshidrogenasa-hidroxiesteroide-10	Degradación del benzoato vía CoA
	Metabolismo del butanoato
	Biosíntesis de ácidos grasos
	Metabolismo de ácidos grasos
	Degradación de la lisina
	Metabolismo del triptófano
Subunidad Vb del citocromo C oxidasa	Degradación de valina, leucina e isoleucina
Subunidad alfa tipo 4 del protosoma	Fosforilación oxidativa
	Degradación intracelular de proteínas

## DISCUSIÓN

Los procesos de diferenciación celular han sido ampliamente estudiados con la finalidad de entender cuales son los mecanismos que participan en estos cambios. Con este fin, se han utilizado diversos modelos de estudio *in vitro*, en donde se observan los cambios que se generan cuando las células pasan de un estado diferenciado a otro.

Uno de estos modelos de estudio es el cultivo de células cromafines, las cuales se diferencian a células neuronales cuando se les estimula con factores como el factor de crecimiento neuronal (NGF) o los campos magnéticos de extrema baja frecuencia (CM-EBF) [Aloe y Levi-Montalcini, 1979; Drucker-Colín y cols., 1994]. A pesar de que ambos estímulos cambian a las células cromafines a células tipo neuronas, existen diferencias morfológicas y bioquímicas relacionadas con cada uno de los factores con que se estén tratando las células.

Así, las células estimuladas con NGF presentan una mayor cantidad de microtúbulos en las extensiones neuríticas, mientras que en las células tratadas con CM-EBF se observan neurofilamentos [Feria-Velasco y cols., 1998]; de igual forma, las células tratadas con NGF secretan mayor cantidad de noradrenalina, y las estimuladas con CM-EBF liberan dopamina [Verdugo-Díaz y cols., 1998]. Aunado a esto, se sabe que las células cromafines diferenciadas con NGF, a los siete días de cultivo, crean una dependencia hacia éste factor, caso contrario de lo

que se observa con las células tratadas con CM-EBF, durante el mismo periodo de tiempo.

Estos hechos nos hablan de que los procesos implicados en la diferenciación de las células cromafines son distintos cuando se estimulan las células con NGF o con CM-EBF, razón por la cual se decidió analizar el patrón de expresión genética de éstas células, a los 7 días de cultivo, utilizando dos metodologías: Differential Display y Microarreglos de DNAc.

Cabe mencionar que a los 7 días de cultivo el proceso de diferenciación de las células cromafines no se ha completado, ya que las células continúan diferenciándose hasta formar grandes prolongaciones neuríticas y adoptar una morfología triangular [Ogawa y cols., 1986]. Sin embargo, dado que los estudios previos del laboratorio (morfológico y bioquímicos) se realizaron a los 7 días de cultivo, nos interesamos en analizar la expresión genética de las células en dicho tiempo de cultivo para saber lo que ocurre en ese momento y completar los estudios hasta entonces realizados.

Las metodologías aquí utilizadas nos permiten conocer la expresión de genes en un sistema celular. Con el método de Differential Display podemos observar, a través de amplificaciones por RT-PCR, los RNAm que se expresan en un momento dado dentro de la célula y, al comparar las muestras de diferentes tratamientos podemos determinar las variaciones de expresión, de un mismo mensajero, que existen entre los tratamientos de interés. La sensibilidad del

método nos permite observar y comparar la expresión de un gran número de RNA's mensajeros en un mismo análisis. Sin embargo, debido a la utilización de oligonucleótidos arbitrarios, no es posible amplificar todos los mensajeros que se están expresando en las células, solo se amplifican aquellos que contienen las secuencias complementarias a dichos oligos.

Por otro lado, los Microarreglos de DNAC presentan la ventaja de que en un mismo experimento de hibridación, con el subsiguiente análisis del arreglo, es posible conocer el nivel de expresión de cientos o miles de RNA's mensajeros. A pesar de las grandes ventajas y la gran cantidad de información que proporcionan los microarreglos, la metodología tiene las principales desventajas de que para el análisis de la gran cantidad de información que arrojan los microarreglos, se requiere de múltiples programas de análisis, porque no se ha llegado a un consenso sobre cual de todos ellos es el mejor a utilizar y es así, que analizar todos los datos es un proceso complejo que requiere una gran inversión de tiempo.

Las dos metodologías aquí utilizadas nos proporcionaron información muy valiosa que nos ayuda a entender los cambios genéticos que se presentan en las células cromafines cuando se les induce a diferenciarse. Al mismo tiempo, un método corrobora lo observado con el otro y así, los datos aquí presentados adquieren mayor validez.



Con ambas metodologías se observó que los patrones de expresión son diferentes entre los tratamientos de NGF y de CM-EBF. Además, se estableció que el proceso de diferenciación cromafín requiere que la mayor cantidad de genes, que se expresan en estas células en condiciones normales, se repriman para dar lugar al estado neuronal terminal.

Específicamente, con el método de Differential Display se analizaron 53 transcritos con cambios en la expresión entre los tratamientos. Se encontró que la mayoría de los transcritos están reprimidos durante la diferenciación celular, comparados con el grupo control (Figura 6). Esto sugiere que durante el proceso se requiere que la célula apague grupos completos de genes; resultados similares fueron reportados por Angelastro y colaboradores (2000) en células PC12 tratadas con NGF. En el análisis con Differential Display se observó también que hay grupos específicos de genes que se sobreexpresan durante la diferenciación de las células cromafines con CM-EBF (Figura 7-B).

En el análisis de los microarreglos lo primero que se observó fue que la mayor parte de los genes (el 95.7%) no presenta cambios durante los procesos de diferenciación aquí estudiados. Resultados similares han sido reportados en células PC12 tratadas con NGF [Angelastro y cols., 2000], en donde se menciona que menos del 10% de los genes sufren cambios durante la neurogenización de éstas células, y en trofoblastos diferenciados, en donde se menciona que son pocos los genes que varían en este proceso celular [Aronow y cols., 2001].

Dentro de los cambios observados en la expresión de genes, detectamos que la mayoría de ellos, el 69.6%, corresponde a cambios generados entre el grupo de NGF y el control, mientras que el grupo de CM-EBF contra el control, solo representan el 11% de los cambios. El resto de las modificaciones se suscita entre los grupos de diferenciación (NGF y CM-EBF). Esto nos indica que los mecanismos de diferenciación inducidos por NGF requieren de la regulación de un mayor número de genes (330) que los requeridos cuando las células se tratan con CM-EBF (52 genes).

De manera complementaria a los resultados anteriores, encontramos que uno de los genes que se sobreexpresan en el tratamiento cromafin con NGF es el gen de la glicoproteína de poro nuclear. Se sabe que la interacción de ésta glicoproteína con Sp1 refleja la organización nuclear requerida para la unión del DNA transcribible con los factores de transcripción [Han y cols., 1998]. El incremento en la expresión de la glicoproteína de poro nuclear en las células cromafines tratadas con NGF debe ser un factor determinante para la regulación de genes en estas células. Durante dicho tratamiento deben presentarse una gran cantidad de modificaciones nucleares que permitan cambios en la expresión de los 330 genes aquí reportados, lo que explica el requerimiento celular de la sobre expresión de la glicoproteína de poro nuclear exclusivamente del tratamiento con NGF.

Al analizar los genes que varían entre tratamientos, encontramos que la mayoría se encuentra reprimidos cuando las células cromafines se estimulan con NGF o con CM-EBF, 66.7% y 53.8% respectivamente. Esto hecho parece presentarse en

varios procesos celulares, como es el caso de la diferenciación de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en donde encontraron que el 19% de los genes están reprimidos contra el 9% que se sobreexpresa (del total de un microarreglo de 15K) [Truckenmiller y cols., 2001].

Sin embargo, este comportamiento no se observa cuando se compara el tratamiento de CM-EBF contra el de NGF, ya que en tal análisis se presenta el caso contrario, es decir, solamente se reprime el 24% de los genes en el grupo de CM-EBF. Esto puede explicarse si consideramos que ambos tratamientos están induciendo la diferenciación celular cromafin, mientras que en los reportes existentes solo comparan un estado celular contra su estado diferenciado, no hacen un análisis comparativo entre dos tipos de diferenciación generada por factores distintos.

Los resultados aquí presentados nos indican que cuando las células cromafines se estimulan con CM-EBF, el 76% de los genes que se modifican están sobreexpresados en este grupo y no en el de NGF, es decir, entre estos tratamientos hay una gran cantidad de genes que varían, de los cuales la mayoría se sobreexpresa en el grupo de campos magnéticos.

Una vez establecido el tipo de regulación que se presenta en cada tratamiento, se analizaron los genes que presentan cambios durante la neurogenización de las células cromafines, y se encontró que la mayoría corresponde a secuencias EST, sin función conocida en el genoma de rata. Con el tratamiento de NGF el 88.2%

son EST's, y en el grupo de CM-EBF el 86.5%, comparados con el grupo control. En la comparación de los grupos CM-EBF y NGF, el 86.9% corresponde a secuencias EST. En las células SH-SY5Y se observa el mismo fenómeno [Truckenmiller y cols., 2001], lo que nos indica que un gran número de genes no definidos participa en los estadios tempranos de los procesos de diferenciación neuronal, y su conocimiento futuro ayudará a entender mejor estos procesos celulares.

En el presente trabajo trataremos de entender el proceso de diferenciación de las células cromafines, analizando el papel que juegan los genes conocidos que se modifican y que aquí se reportan. Estos genes se encuentran ordenados en la tabla 3 de acuerdo al tratamiento al que se sometieron las células cromafines. En la tabla se observa que los niveles de expresión de los genes son muy similares entre ellos, tanto en las células diferenciadas como en el control. Es decir, un mismo gen se comporta de manera similar en el grupo de NGF y en el de CM-EBF si se le compara con el grupo control. Esto nos indica que hay genes cuya regulación es muy similar en ambos tratamientos de diferenciación y además, nos dice que el control sobre estos genes debe ser importante para las células cromafines diferenciadas.

Los clasificación de los genes conocidos, de acuerdo al tratamiento aplicado, nos permitió observar cuales genes se modifican en cada uno de los tres grupos comparativos. En la tabla 3 se presentan 5 genes conocidos en los grupos de NGF vs. Control y en el de CM-EBF vs. control; éstos genes son los que se

modifican con cualquiera de los dos tratamientos de diferenciación aquí estudiados (NGF o CM-EBF) con respecto al grupo control. De la misma forma se observó la expresión conjunta de 10 genes en los grupos de NGF vs. control y CM-EBF vs. NGF; estos genes conforman el grupo de cambios necesarios para que las células cromafines se diferencien con NGF.

Con la tabla 3 se encontró también que dos genes se reprimen de manera similar en el grupo de CM-EBF vs. control y en el de CM-EBF vs. NGF, y estos genes constituyen aquellas regulaciones genéticas constantes cuando las células cromafines se diferencian con CM-EBF. Por último, se observa que 24 genes conocidos están presentes solamente en el grupo comparativo entre NGF y control, y la mayoría de ellos están reprimidos con el primer tratamiento y representan el grupo de genes que se modifican exclusivamente cuando las células cromafines se tratan con NGF.

Las observaciones realizadas entre los genes y sus tratamientos, corroboran los hallazgos bioquímicos y morfológicos previamente realizados por nuestro grupo de investigación, en donde se encontraron diferencias entre el tratamiento con NGF y el de CM-EBF. Ahora sabemos que también hay diferencias genéticas relacionadas con cada uno de dichos tratamientos.

El primer gen diferencial de función conocida que se detectó y analizó, fue el de la proteína 2 asociada a microtúbulos. El nivel de expresión de dicha proteína cuando las células cromafines se trataron con NGF, es 0.5 veces mayor y 0.2

veces mayor que en el grupo control y en el de CM-EBF, respectivamente. Se sabe que para la formación de prolongaciones celulares es necesario el arreglo de microfilamentos en donde participan las MAP-2, mientras que en la neurogenización celular participan específicamente los neurofilamentos [Alberts y cols., 2002]. En el año de 1998, Feria-Velasco y colaboradores reportaron que las células cromafines diferenciadas con NGF contienen microfilamentos en las extensiones neuríticas, hecho que se corrobora con los resultados aquí obtenidos.

Con estos antecedentes, determinamos con ensayos de inmunofluorescencia, si la expresión del gen para MAP-2 es mayor en las células cromafines tratadas con NGF, y más importante aún, si es específica de estas células o de otras que se encuentran presentes en el cultivo primario (específicamente fibroblastos).

En la Figura 8 se observan estos ensayos y es evidente que las células tratadas con NGF presentan mayor fluorescencia que aquellas estimuladas con CM-EBF, mientras que en las células no diferenciadas del grupo control no hay fluorescencia alguna. En el panel C de dicha figura se observa que la expresión de MAP-2 es específica de las células cromafines, ya que se observa bajo la célula central un fibroblasto sin marcaje por el anticuerpo.

Conjuntando los resultados anteriores podemos decir que para la formación de las prolongaciones neuríticas en las células cromafines, se requiere de la expresión de distintos genes de citoesqueleto, dado que con el tratamiento de NGF las extensiones están constituidas por microtúbulos, y en las células cromafines

tratadas con CM-EBF la expresión de la proteína MAP-2 es menor. Además, es evidente que la expresión de este gen es específica de las células cromafines y no de otras células presentes en el cultivo primario.

En los análisis con microarreglos, el gen que codifica para las proteínas MAP-2 no presentó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos. Esto se puede explicar debido a que solamente se consideraron para el análisis final aquellos genes que presentaban al menos 1.2 veces de variación en el niveles de expresión de un grupo contra otro. Y como se mencionó en los párrafos anteriores, la variación de expresión entre tratamientos no fue mayor a 0.5 veces, de acuerdo a la intensidad de la banda diferencial. Posiblemente, si se realizara el análisis de los microarreglos con valores inferiores, se encontraría que la expresión del gen para MAP-2 se modifica entre tratamientos.

Una vez analizada la expresión diferencial de las proteínas MAP-2 en cada uno de los tratamientos realizados, procedimos a analizar los demás genes conocidos pero nos encontramos con que para la mayoría de ellos no existen reportes relacionados a las células cromafines. Debido a esto decidimos conocer la función biológica de cada uno de los genes conocidos utilizando el programa DAVID, y tratar de interpretar el papel biológico que desempeñan en las células cromafines.

Con el programa DAVID se clasificaron los genes de acuerdo a su función celular y a su participación en las rutas metabólicas de las células (Tablas 4 y 5, respectivamente). Se encontró que entre el 70 y el 80% de los genes, tienen una

o varias funciones celulares. Entre estas funciones destacan las de las moléculas que participan en la unión celular (como la inhibina, transtiretina, diacilglicerol-cinasa, fumarilacetoacetato-hidrolasa, profilina, fosfolipasa A2, cassette de unión a ATP, entre otros) o como componentes celulares (como la vimentina, profilina, translocador 44, antígeno CD74, dineína). En ambas funciones, la mayoría de los genes están reprimidos en las células cromafines diferenciadas.

Además se encontraron 18 genes que forman parte integral de las membranas de las células o de sus mitocondrias, y 16 genes que regulan diversas funciones fisiológicas en las células. Nueve genes se clasificaron como genes con actividad catalítica, y en menor número se agruparon genes cuyas proteínas son importantes en el desarrollo celular (lo que implica proceso de crecimiento, diferenciación y apoptosis, entre otros) y otros genes son transductores de señales.

Los reportes existentes relacionados con las proteínas integrales de membrana son muy diversos, y sabemos que estas proteínas forman membranas celulares, vesiculares o mitocondriales, pero también realizan otras funciones en las células, y algunas de dichas funciones pueden relacionarse directamente con los procesos de diferenciación celular. Como ejemplo de esto está la adenilato cinasa-2, componente de membranas mitocondriales, y cuyo papel de cinasa la involucra en la regulación de ATP/ADP [Villa y cols., 2003]. La adenilato cinasa-2 posiblemente participa generando la energía celular necesaria para la realización de todas las reacciones requeridas para diferenciar a las células cromafines.



Otras proteínas de membrana como el antígeno CD74 se relacionan directamente con procesos de diferenciación de células dendríticas [El-Sukkari y cols., 2003]. Con estos datos podemos suponer que el antígeno se sobreexpresa en células maduras determinadas, pero éste tipo de expresión no es necesario en células inmaduras en proceso de diferenciación, lo que puede justificar la baja expresión del antígeno CD74 en el tratamiento de células cromafines con NGF. Sin embargo, en el tratamiento con CM-EBF observamos que el nivel de expresión del antígeno CD47 es casi el doble del observado en NGF (pero aún así es menor al del grupo control), lo que nos habla de que posiblemente las células cromafines diferenciadas con campos magnéticos presentan un estado diferenciado distinto al de las células tratadas con NGF.

Estos antecedentes nos ayudan a explicar el hecho de que las células tratadas con CM-EBF después de 7 días no requieren de la exposición a dichas ondas para sobrevivir. Posiblemente, las células cromafines diferenciadas con CM-EBF, a los 7 días de cultivo, presentan un estado celular distinto al de las tratadas con NGF. Se sabe que la dependencia de las células hacia un factor puede involucrar diversas situaciones entre las que destaca el tamaño celular. Una célula se vuelve dependiente de un factor cuando crece demasiado [Whitmarsh y Davis, 2000].

También sabemos que los procesos celulares finos están relacionados con un estado diferenciado avanzado, mientras que las células diferenciadas en menor grado, presentan procesos celulares más burdos. Las observaciones hechas por

Feria-Velasco y colaboradores en 1998 nos muestran que las extensiones neuríticas de las células cromafines diferenciadas con CM-EBF son más toscas que las de las cromafines diferenciadas con NGF.

La no dependencia de las células cromafines hacia los CM-EBF y el tipo de extensiones neuríticas que presentan, nos hablan de que estas células, a los 7 días de estímulo, se encuentran en un estado de diferenciación distinto al inducido por el NGF en el mismo periodo de tiempo. Podríamos decir que el estado de diferenciación generado tras 7 días de estimulación cromafín con CM-EBF, corresponde a un estado previo de diferenciación con respecto al observado con el NGF también a los 7 días de cultivo.

Al analizar la participación de los genes conocidos en las rutas metabólicas celulares, se encontró que la mayoría de los genes están relacionados con el metabolismo de amino ácidos, con el metabolismo de purinas y con la hidrólisis de proteínas. Los resultados aquí encontrados nos indican que los cambios genéticos observados en el grupo de células cromafines tratadas con CM-EBF están relacionados con la regulación del metabolismo energético celular, pero aún son necesarios más estudios para entender por qué las células cromafines diferenciadas con CM-EBF requieren en menor grado de la participación de enzimas hidrolíticas.

Los resultados anteriores nos indican que las células cromafines en proceso de diferenciación neuronal requieren tanto de la síntesis como de la degradación de

ácidos nucleicos y de proteínas. La síntesis de ácidos nucleicos puede estar relacionada con la producción de RNAm necesarios para que se realicen los cambios celulares observados. Ahora sabemos que en este proceso de diferenciación es necesaria la participación de distintas enzimas y factores transductores de señales, que regulen las casadas de señalización intracelular. Además, como las células cromafines diferenciadas incrementan su tamaño, se requiere también de la participación de múltiples componentes celulares para la conformación de las membranas.

Solamente dos genes tienen un papel conocido en el desarrollo y/o en los procesos de diferenciación celular: el gen de la subunidad alfa de la inhibina y el gen para el factor de crecimiento de tejido conectivo. Este factor pertenece a las proteínas de matriz celular que participan en la regulación de proliferación, diferenciación, supervivencia, adhesión y migración celular, además de que participan en la regulación de los niveles de calcio intracelular [Lombet y cols., 2003].

La represión en la expresión de las proteínas implicadas en el desarrollo celular, nos habla de que a los 7 días de cultivo celular, posiblemente las células cromafines no requieren ya de altos niveles de genes que participan en su desarrollo. Tal vez, en los primeros días de cultivos se expresan más genes conocidos implicados directamente con los procesos de diferenciación celular.

A pesar de que los análisis genéticos aquí realizados se hicieron en un estado avanzado de diferenciación cromafín, no hay que perder de vista que las células

continúan diferenciándose al menos hasta los 10 días de cultivo [Drucker-Colín y cols., 1994]. Pero esto no descarta la idea de que durante los primeros días de tratamiento se expresen en niveles más altos algunos de los genes aquí reportados, o genes que a los 7 días de cultivo no presentaron cambios significativos respecto al grupo control.

Además, reportes previos nos indican que en células PC12 diferenciadas con NGF hay cambios en genes que regulan la expresión de moléculas de adhesión, receptores de membrana y en algunos que participan en la fosforilación de proteínas [Angelastro y cols., 2003; Grumolato y cols., 2003; Jung y cols., 2003]. Estos antecedentes corroboran nuestros datos y nos indican que las células diferenciadas no solo presentan cambios en la expresión genética durante los primeros días de tratamiento, sino también en su estado diferenciado. Sin embargo, queda clara la necesidad de hacer cinéticas de expresión para corroborar o descartar la hipótesis de que existe una expresión mayor durante los primeros días de diferenciación celular cromafín.

Posiblemente lo primero que requieren las células cromafines es salir del arresto en el que se encuentran para diferenciarse, y para esto requieren de proteínas que participen en el control del ciclo celular. Una de las proteínas que se sobreexpresa en las células control es la inhibina, relacionada con el arresto del ciclo celular [Swissprot], lo que podría explicar el hecho de que las células cromafines control sobre expresen esta proteína, para mantener las células en

arresto e impedir que continúen con su proceso de diferenciación hacia células neuronales.

Una vez que entran nuevamente al ciclo celular, se deben necesitar factores de transcripción que regulen la expresión de genes necesarios para la diferenciación celular. Dentro de los genes aquí reportados hay dos que se les relaciona con la transcripción: la diacilglicerol-cinasa y el factor tipo Kruppel.

La diacilglicerol-cinasa por su parte, ocupa un papel central en la síntesis de complejos lipídicos y en la señalización celular, y se sabe que sus niveles citoplásmicos pueden influenciar una gran variedad de procesos entre los que se incluyen el crecimiento y la diferenciación [Bunting y cols., 1996]. De igual forma, se sabe que el factor tipo Kruppel regula la transcripción de genes, al unirse a secuencias ricas en GC presentes en los promotores de genes tejido-específicos y de expresión constitutiva [Zhang y cols., 2003]. Por su parte, la sincolina GP2 puede estar implicada también en la transducción de señales de los gránulos de membrana [Kalus y cols, 2002]. Estos reportes nos hablan de la importancia de las señales adecuadas para que se transcriban los genes necesarios para la diferenciación celular.

En cuanto a las modificaciones transcripcionales que se observan en las células tratadas con CM-EBF, existen reportes en donde la expresión de algunos genes se altera cuando las células se someten a campos magnéticos. Tal es el caso de los linfocitos-T, en donde la expresión de c-myc, c-fos y c-jun se modifica cuando

estas células se estimulan con CM-EBF [Balcer-Kubiczek y cols., 2000] Por el contrario, otros reportes mencionan que en modelos como el erizo de mar, los campos magnéticos no inducen cambios genéticos [Lyle y cols., 1991].

Todos los cambios observados durante la diferenciación inducida por NGF o por CM-EBF, se pueden resumir en cambios que comprenden movimiento de iones o moléculas a través de canales dependientes de voltaje o de vesículas celulares, en reacciones enzimáticas reguladas por cinasas, en modificaciones de las rutas metabólicas para la obtención de energía celular, en rearrreglos del citoesqueleto a través de proteínas que modifican o estabilizan los filamentos celulares de actina, y en la regulación de factores o proteínas que participan en la formación de extensiones neuríticas.

Resultados similares se han reportado en otros modelos biológicos, como las células PC12 diferenciadas con CM-EBF [McFarlane y cols., 2000], en células ROS 17/2.8 expuestas a este mismo tipo de ondas [Shahidain y cols., 2001] y en tejidos humanos en donde las interacciones entre iones, moléculas, proteínas y membranas están reguladas por el efecto de las fuerzas electromagnéticas [Liboff y cols., 1984]. También se ha reportado que los campos magnéticos inducen la expresión de proteínas relacionadas con el estrés celular como la HSP70 [Lin y cols., 1999].

En este trabajo encontramos que dos genes relacionados con estrés se reprimen en las células diferenciadas con NGF, lo que nos indica que no hay un efecto

estresante en las células cromafines tratadas con este factor y que la no expresión de ambos genes en el grupo de CM-EBF es signo de que no hay un factor de estrés expresado, a los 7 días de cultivo, durante el cultivo cromafín. El primero de estos genes corresponde a la proteína-1 de unión a inmunoglobulinas. Esta proteína es una chaperona cuya función consiste en proteger del estrés a las células de retículo endoplásmico; en células PC12 se ha relacionado la sobre expresión de dicha proteína con tratamientos que inducen estrés en éste organelo celular [Shimoke y cols., 2003].

La otra proteína relacionada con el estrés celular que se reprime cuando las células cromafines se diferencian con NGF es la subunidad-alfa-4 del protosoma. Se ha reportado que en células endoteliales de cordón umbilical humano tratadas con antioxidantes, dicha subunidad se reprime [Takabe y cols., 2000]. Con éste reporte podemos soportar la idea de que el tratamiento con NGF no induce estrés celular, y que por el contrario, puede participar en la regulación antioxidativa de las células cromafines, mientras que las células tratadas con CM-EBF no requieren de la expresión de dicho gen.

Todos los resultados nos indican que la estimulación con CM-EBF genera cambios específicos en los genes de las células, y dichos cambios deben estar regulados por mecanismos inducidos por las ondas electromagnéticas. También sabemos que la estimulación con campos magnéticos requiere de una represión a menor escala, al menos en los genes aquí reportados, que la requerida durante el

tratamiento con NGF. La manera en que esto sucede es desconocida, y hoy en día solamente existen teorías para explicar estos hechos.

Lin y colaboradores en el año 2001, propusieron que la expresión de genes regulada por CM-EBF se debe a la presencia de cajas CTCT en el promotor de dichos genes. En su reporte indican que una región de 900 pb que contiene ocho secuencias CTCT es la causante de incrementar 1.5 veces la expresión de CAT en construcciones celulares estimuladas con CM-EBF. Esto nos habla del posible papel que juegan estas cajas en los genes regulados por campos magnéticos. Para saber si los transcritos analizados con Differential Display presentan estas secuencias, se analizaron 1000 pb río arriba a partir del primer ATG de la región codificante de cada una de las secuencias obtenidas.

En la Figura 9 se muestra el número de cajas CTCT encontradas en cada una de las ocho secuencias. Se observa que la mayoría de los transcritos sobreexpresados con CM-EBF, presentan entre 8 y 10 de éstas cajas, mientras que una de las proteínas hipotéticas, la RNOR02022103 (con una expresión reprimida 40 veces en CM-EBF, con respecto al control), contiene 18 cajas CTCT en 1000 pb. Esto nos indica que posiblemente el número de cajas CTCT presentes en la región codificante de los genes regulados por CM-EBF, puede influir positiva o negativamente en la expresión de genes que participan en la diferenciación celular, mientras que genes de expresión constitutiva, como el de la actina o el de la histona-2, con un número mínimo de cajas CTCT, no se regulan con estos campos magnéticos. Es decir, el número de cajas CTCT en la región



codificante 5' esta posiblemente relacionado de manera directa con la expresión de genes inducida por CM-EBF.

Entre las teorías que existen para explicar la interacción célula-onda magnética, específicamente para nuestro modelo celular podemos descartar aquella propuesta por Lange en el 2000, en la que propone que las microvellosidades de las células censan la onda magnética y liberan reservorios de calcio al citoplasma. Esta teoría no se aplica dado que las células cromafines no presentan microvellosidades.

De la misma manera, nuestros resultados tampoco fortalecen la hipótesis de Blank y Goodman (1999) en la que se indica que hay un efecto directo de las ondas electromagnéticas sobre la transcripción el DNA, y que dicho efecto es generado por grandes flujos de electrones. Al menos a los 7 días de cultivo, las células cromafines reprimen la expresión de dos genes transportadores de electrones: el gen de la monooxigenasa y el del citocromo C oxidasa. Si las células cromafines tratadas con CM-EBF presentaran grandes flujos de electrones, estos genes estarían sobreexpresados para realizar dicha función de manera eficaz.

Los elementos de respuesta a campos magnéticos pueden explicar un mecanismo de respuesta genético cuando las células se someten a CM-EBF, y de acuerdo a nuestros resultados esto parece ser una respuesta al mecanismo de acción de los campos magnéticos. Sin embargo, aún son necesarios más estudios que nos

permitan entender la forma en que las células censan las ondas magnéticas y transmiten las señales necesarias para la transcripción de genes.

Dado que nuestros resultados no se apegan a una sola de las teorías que tratan de explicar el mecanismo de acción de los CM-EBF, y de acuerdo a los resultados aquí obtenidos, creemos que la cascada de eventos intracelulares inducidos por dichos campos puede estar coordinada de la siguiente manera.

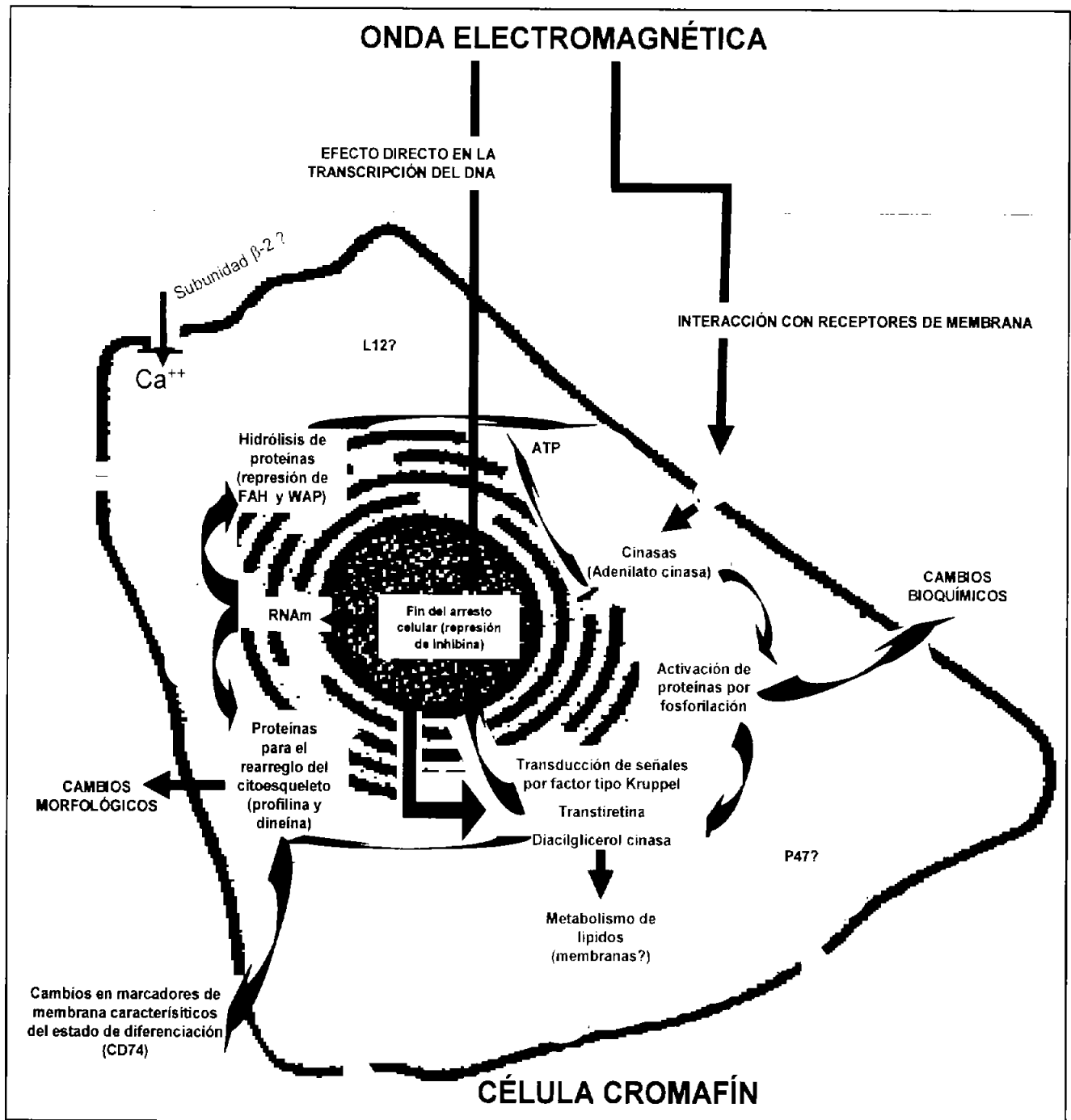
Primeramente las células cromafines deben salir del arresto del ciclo celular en el que se encuentran reprimiendo el gen de la inhibina, posteriormente es necesaria la señalización intracelular que puede ser realizada por la sobre expresión del factor tipo Kruppel y de la diacilglicerol cinasa, con la represión de la transtiretina y una actividad normal en el transporte realizado por el translocador 44. Algunas cinasas como la adenilato cinasa 2 pueden participar en la transferencia de grupos fosfato requerida para que se lleven a cabo cascadas intracelulares.

En las células cromafines diferenciadas con CM-EBF no hay una sobreproducción de ácidos nucleicos (porque no hay división celular y si hay una reducción en la transcripción de genes lo que requiere menor cantidad de RNAm producido), particularmente de adenina, por lo que la expresión de la adenilato cinasa-2 es normal. Para las diversas reacciones citosólicas se requiere de energía metabólica la cual puede ser proporcionada al aumentar la actividad de peptidasas inhibiendo la proteína WAP y la hidrólisis realizada por la FAH.

Una vez realizada la transcripción de genes, viene la producción de proteínas que lleva a cambios en el citoesqueleto, entre otras cosas. Se reprime la síntesis de vimentina a los 7 días de cultivo, y la síntesis de profilina y dineína se mantiene como en el nivel basal, regulando las uniones a actina. También, componentes de membrana como la proteína 1 lisosomal mantienen niveles similares a los de las células control, las proteínas integrales de membrana de este tipo no se incrementan. Finalmente, una vez alcanzado el estado diferenciado cromafín, la expresión de moléculas como el CD74 pueden ser necesarias para que la célula se reconozca como una célula diferenciada.

A continuación se presenta un diagrama en donde se explica la posible interacción de cada uno de los genes conocidos que se expresan diferencialmente en las células cromafines tratadas con CM-EBF (Figura 17).

Todos los resultados aquí presentados tienen la finalidad de contribuir al entendimiento de los mecanismos de regulación celular inducidos por CM-EBF para prevenir sus efectos dañinos sobre los seres vivos y aprovechar las características particulares que generan en células como las cromafines, en donde se incrementa la síntesis de dopamina.



**Figura 17.** Mecanismo de acción propuesto para explicar el efecto de los campos magnéticos de extrema baja frecuencia sobre las células cromafines.

## CONCLUSIONES

- Los campos magnéticos de extrema baja frecuencia inducen una respuesta transcripcional específica y distinta a la respuesta observada por el factor de crecimiento neuronal, en células cromafines diferenciadas.
- El estado diferenciado de las células cromafines tratadas 7 días con CM-EBF (60 Hz, 0.7 mT) es distinto al observado a los 7 días de tratamiento con NGF (50 ng/mL).
- La diferenciación inducida por CM-EBF en células cromafines requiere de la regulación de una cantidad menor de genes que los inducidos durante la diferenciación inducida por NGF.
- Durante la neurogenización de las células cromafines, con CM-EBF o con NGF, la mayoría de los genes que presentan cambios estadísticamente significativos, están reprimidos.
- Existe un gran número de secuencias con función desconocida que participan en el proceso de diferenciación inducido por CM-EBF o por NGF, en las células cromafines. El conocimiento de estas secuencias ayudará a entender mejor los cambios inducidos por las ondas electromagnéticas.
- Los genes conocidos e implicados en la formación de células tipo neuronas, a partir de células cromafines estimuladas con CM-EBF, participan en el arreglo de actina, en la hidrólisis de proteínas y en el transporte de iones y otras moléculas intracelulares, principalmente.

## PERSPECTIVAS

- ◆ Se recomienda la realización de cinéticas de expresión a diferentes tiempos de cultivo para conocer las variaciones de la expresión genética cromafín, desde que se inicia el proceso de diferenciación celular hasta que finaliza. Esta información aclarará el mecanismo inducido por los CM-EBF.
- ◆ Para entender mejor los mecanismos de acción de los campos magnéticos, y saber si la cascada de eventos intracelulares aquí propuesta es plausible, es necesario que se realicen ensayos en donde se reprima completamente la expresión de genes que participan en la diferenciación inducida por CM-EBF, como el del factor tipo Kruppel y el de la diacilglicerol-cinasa.
- ◆ Con los genes conocidos se pueden realizar ensayos de transfección celular en donde se sobre exprese alguno de los genes con la finalidad de inducir el efecto observado con los CM-EBF sin la necesidad de que las células se sometan a dicho campo.
- ◆ Se recomienda actualizar las bases de datos del genoma de rata para analizar las secuencias desconocidas, o secuencias EST, significativamente diferentes. Este análisis podrá especificarnos cuales son todos los mecanismos intracelulares que se requieren en las cromafines para que salgan de su arresto celular y lleguen a ser células neuronales.

## REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). Molecular Biology of the Cell. Fourth edition, Garland Science Print. USA
2. Alemà S, Casalbore P, Agostini E, Tatò F (1985). Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells induced by v-src oncogene. Nature 316:557-559.
3. Aloe L, Levi-Montalcini R (1979). Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells *in vivo* into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 76:1246-1250
4. Anderson D, Axel R (1985). Molecular probes for the development and plasticity of neural crest derivatives. Cell 42:649-662
5. Angelastro JM, Ignatova TN, Kukekov VG, Steindler DA, Stengren GB, Mendelsohn C, Greene LA (2003). Regulated expression of ATF5 is required for the progression of neural progenitor cells to neurons. J Neurosci 23(11):4590-600
6. Angelastro JM, Kilmaschewski L, Tang S, Vitolo OV, Weissman TA, Donlin LT, Shelanski ML, Greene LA (2000). Identification of diverse nerve growth factor-regulated genes by serial analysis of gene expression (SAGE) profiling. PNAS 97(19):10424-10429
7. Aoki T, Koike T, Nakano T, Shibahara K, Nishimura H, Kikuchi H, Honjo T (1997). Rat TAFII<sub>31</sub> gene is induced upon programmed cell death in differentiated PC12 cells deprived of NGF. Biochem Biophys Res Comm 234:230-234

8. Aronow BJ, Richardson BD, Hanswenger S (2001). Microarray analysis of trophoblast differentiation: gene expression reprogramming in key gene function categories. *Physiol Genomics* 6:105-116
9. Balcer-Kubiczek EK, Harrison GH, Davis CC, Haas ML, Koffman BH (2000). Expression analysis of human HL60 cells exposed to 60 Hz square- or sine-wave magnetic fields. *Radiat Res* 153(5 Pt 2):670-8
10. Blank M, Goodman R (1999). Electromagnetic fields may act directly on DNA. *J Cell Biochem* 75(3):369-74
11. Brown G, Hughes PJ, Michell RH (2003). Cell differentiation and proliferation – simultaneous but independent? *Exp Cell Reseach* 291:282-288
12. Bunting M, Tang W, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM (1996). Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 271(17):10230-6
13. Cameron I, Hardman W, Winters W, Zimmerman S, Zimmerman A (1993). Environmental magnetic fields: influences on early embryogenesis. *J Cellular Biochem* 51:417-425
14. Carey M, Smale S (2000). Transcriptional regulation in eukaryotes. Concepts, strategies and techniques. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA
15. Chan YS, Chen LW, Lai CH, Shum DK, Yung KK, Zhang FX (2003). Receptors of glutamate and neurotrophin in vestibular neuronal functions. *J Biomed Sci* 10(6 Pt 1):577-87
16. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Krieglstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schutz G (1995). Targeted disruption of



- the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9:1608-1621
17. Cosgaya J, García-Villalba P, Perona R, Aranda A (1996). Comparison of the effects of retinoic acid and nerve growth factor on PC12 cell proliferation, differentiation, and gene expression. *J Neurochem* 66(1):89-98.
  18. Czerske E, Al-Barazi H, Casamento J, Davis C, Elson E, Ning J, Swicord M (1991). Comparison of the effect of elf fields on c-myc oncogene expression in normal and transformed human cells. *Bioelectromagnetic Society, Thirteenth Annual Meeting, Salt Lake City, UT, B-2-14*
  19. Czyz J, Nikolova T, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM (2004). Non-thermal effects of power-line magnetic fields (50 Hz) on gene expression levels of pluripotent embryonic stem cells—the role of tumour suppressor p53. *Mutation Research* 557:63–74
  20. D’Arcangelo G, Halegoua S (1993). A branched signalling pathway for nerve growth factor is revealed by Src-, Ras-, and Raf- mediated gene inductions. *Mol Cell Biol* 13(6):3146-3155
  21. Damon D, D’Amore P, Wagner J (1990). Nerve growth factor and fibroblast growth factor regulate neurite outgrowth and gene expression in PC12 cells via both protein kinase C –and cAMP- independent mechanisms. *J Cell Biol* 110:1333-1339
  22. Dechant G, Neumann H (2002). Neurotrophins. *Adv Exp Med Biol* 513:303-34
  23. Delgado MR, Leal J, Monteagudo JL, García MG (1982). Embryological changes induced by weak, extremely low frequency electromagnetic fields. *J Anat* 134:533-551

24. Doupe AJ, Landis SC, Patterson PH (1985). Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J Neurosci* 5:2119-2142
25. Drucker-Colín R, Verdugo-Díaz L, Méndez M, Carrillo-Ruiz 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
26. El-Sukkari D, Wilson NS, Hakansson K, Steptoe RJ, Grubb A, Shortman K, Villadangos JA (2003). The protease inhibitor cystatin C is differentially expressed among dendritic cell populations, but does not control antigen presentation. *J Immunol* 171(10):5003-11
27. Eveleth D, Hanecak R, Fox G, Fan H, Bradshaw R (1989). V-src genes stimulate neurite outgrowth in pheochromocytoma (PC12) variants unresponsive to neurotrophic factors. *J Neurosci Res* 24:67-71
28. Félix A, Oyarzabal J, Velasco M (1974). *Lecciones de Física*. Tercera edición, Compañía Editorial Continental. España
29. Fera-Velasco A, Castillo-Medina S, Verdugo-Díaz L, Castellanos E, Orozco-Suárez S, Sánchez-Gómez C, Drucker-Colín R (1998). Neuronal differentiation of chromaffin cells in vitro, induced by extremely low frequency magnetic fields or nerve growth factor: a histological and ultrastructural comparative study. *J Neurosci Res* 53:569-582

30. Finotto S, Krieglstein K, Schober A, Deimling F, Lindner K, Bruhl B, Beier K, Metz J, Garcia-Ararras JE, Roig-Lopez JL, Monaghan P, Schmid W, Cole TJ, Kellendonk C, Tronche F, Schutz G, Unsicker K (1999). Analysis of mice carrying targeted mutations of the glucocorticoid receptor gene argues against an essential role of glucocorticoid signalling for generating adrenal chromaffin cells. *Development* 126(13):2935-44
31. Gilbert SF (2000). *Developmental Biology*. Sixth edition, Sinauer Associates Inc. Publishers. USA
32. Goodman R, Chizmadzhev Y, Shirley-Henderson A (1993). Electromagnetic fields and cells. *J Cellular Biochem* 51:436-441
33. Granholm AC, Srivastava N, Mott JL, Henry S, Henry M, Westphal H, Pichel JG, Shen L, Hoffer BJ (1997). Morphological alterations in the peripheral and central nervous systems of mice lacking glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): immunohistochemical studies. *J Neurosci* 17(3):1168-78
34. Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS 3rd, Evans DR (2000). Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 403(6767):328-32
35. Grumolato L, Elkahloun AG, Ghzili H, Alexandre D, Coulouarn C, Yon L, Salier JP, Eiden LE, Fournier A, Vaudry H, Anouar Y (2003). Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in pheochromocytoma cells reveal pleiotropic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cell proliferation, survival, and adhesion. *Endocrinology* 144(6):2368-79

36. Guardavaccaro D, Montagnoli A, Ciotti M, Gatti A, Lotti L, Di Lazzaro C, Torrisi M, Tirone F (1994). Nerve growth factor regulates the subcellular localization of the nerve growth factor-inducible protein PC4 in PC12 cells. *J Neurosci Res* 37:660-674
37. Han I, Roos MD, Kudlow JE (1998). Interaction of the transcription factor Sp1 with the nuclear pore protein p62 requires the C-terminal domain of p62. *J Cell Biochem* 68(1):50-61
38. Hedborg F, Ohlsson R, Sandstedt B, Grimelius L, Hoehner JC, Pahlman S (1995). IGF2 expression is a marker to paraganglionic/SIF cell differentiation in neuroblastome. *Am J Pathol* 146:833-847
39. Henion PD, Landis SC (1992). Developmental regulation of leucine-enkephalin expression in adrenal chromaffin cells by glucocorticoides and innervation. *J Neurosci* 12:3818-3827
40. Hervonen A, Linnoila I, Tainio H, Vaalasti A, Mascorro JA (1985). Immunohistochemical evidence for the occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing nerve fibres in human fetal abdominal paraganglia. *J Anat* 143:121-8
41. Huuskonen H, Lindbohm M, Juutilainen J (1998). Teratogenic and reproductive effects of low-frequency magnetic fields. *Mutation Res* 410:167-183
42. Islas-Suarez L, Gomez-Chavarin M, Drucker-Colin R, Hernandez-Cruz A. Properties of the sodium current in rat chromaffin cells exposed to nerve growth factor in vitro. *J Neurophysiol* 72(4):1938-48

43. Jacobson J (1994). Influence of electromagnetism on genes and associated structures. *Isr J Med Sci* 30:245-248
44. Jimenez N, Hernandez-Cruz A (2001). Modifications of intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of rat adrenal chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 13(8):1487-500.
45. Jung KM, Cotman SL, Halfter W, Cole GJ (2003). The heparan sulphate proteoglycan agrin modulates neurite outgrowth mediated by FGF-2. *J Neurobiol* 55(3):261-77
46. Kalthoff K (2001). *Analysis of biological development*. McGraw-Hill, second edition. USA
47. Kalus I, Hodel A, Koch A, Kleene R, Edwardson JM, Schrader M (2002). Interaction of syncollin with GP-2, the major membrane protein of pancreatic zymogen granules, and association with lipid microdomains. *Biochem J* 362(2):433-42
48. Kobayashi S, Coupland RE (1993). Morphological aspects of chromaffin tissue: the differential fixation of adrenaline and noradrenaline. *J Anat* 183:223-235
49. Kremer N, D'Arcangelo G, Thomas S, DeMarco M, Brugge J, Halegoua S (1991). Signal transduction by nerve growth factor and fibroblast growth factor in PC12 cells requires a sequence of Src and Ras actions. *J Cell Biol* 115(3):809-819
50. Lacy-Hulbert A, Metcalfe J, Hesketh R (1998). Biological responses to electromagnetic fields. *FASEB Journal* 12:395-420.

51. Langley K, Grant NJ (1999). Molecular markers of simpathoadrenal cells. *Cell Tissue Res* 298:185-206
52. Leon C, Grant NJ, Aunis D, Langley K (1992). Expression of cell adhesion molecules and catecholamine synthetizing enzymes in the developing rat adrenal gland. *Dev Brain Res* 70:109-121
53. Levi-Montalcini R, Hamburger V (1953). A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J Exp Zool* 123:233-278
54. Levin M (2003). Bioelectromagnetics in Morphogenesis. *Bioelectromagnetics* 24:295-315
55. Liang P, Parde A (1992). *Science* 257:967
56. Liboff AR, Williams T, Strong DM, Wistar R (1984). Time-varying magnetic fields: Effect on DNA synthesis. *Science* 223:810-820
57. Lin H, Blank M, Goodman R (1999). A magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter. *J Cell Biochem* 75:170-176
58. Lin H, Blank M, Rossol-Haseroth K, Goodman R (2001). Regulating genes with electromagnetic response elements. *J Cell Biochem* 81:143-148
59. Livett B (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* 64(4):1103-1161
60. Lombet A, Planque N, Bleau AM, Li CL, Perbal B (2003). CCN3 and calcium signalling. *Cell Commun Signal* Aug 15;1(1):1
61. Lyle LB, Wang X, Ayotte R, Chopart A, Adey WR (1991). Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 12:145-156

62. Maina F, Hilton MC, Andres R, Wyatt S, Klein R, Davies AM (1998). Multiple roles for hepatocyte growth factor in sympathetic neuron development. *Neuron* 20:835-846
63. McFarlane EH, Dawe GS, Marks M, Campbell IC (2000). Changes in neurite outgrowth but not in cell division induced by low EMF exposure: influence on field strength and culture conditions on responses in rat PC12 pheochromocytoma cells. *Bioelectrochem* 52:23-28
64. Miki H, Ohmori M, Hirakawa E, Winters W (1999). Effects of environmental level magnetic field exposures on transcription of CMV immediate early promoter DNA in cell-free in vitro transcription system. *Bioelectromagnetics* 20:519-521
65. Morgado-Valle C, Verdugo-Díaz L, García D, Morales-Orozco C, Drucker-Colín R (1997). 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* 632:1-14
66. Moulder JE (1998). [http://www.lpi.tel.uva.es/~nacho/docencia/EMC/trabajos\\_02\\_03/antenas\\_de\\_telefonia\\_movil\\_y\\_salud/web.htm](http://www.lpi.tel.uva.es/~nacho/docencia/EMC/trabajos_02_03/antenas_de_telefonia_movil_y_salud/web.htm)
67. Ogawa M, Ishikawa T, Ohta H (1986). Transdifferentiation of endocrine chromaffin cells into neuronal cells. *Current Topics in Dev Biol*, chapter 7. USA
68. Omori Y, Iuchi H, Nakaya K, Tanaka H, Ishikawa K, Satoh Y, Ono K (1993). Gamma-aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity in the mouse adrenal gland. *Histochemistry* 100:203-213

69. Pandit SD, Li K (2004). A primer on molecular biology for imagers: II. Transcription and gene expression. *Acad Radiol* 11:333-344
70. Phillips J (1993). Effects of electromagnetic field exposure on gene transcription. *J Cellular Biochem* 51:381-386.
71. Phillips JL, Haggren W, Adey WR (1991). Effects of 60 Hz magnetic field exposure of specific gene transcription in CEM-CM3 human T-lymphoblastoid cells. Bioelectromagnetic Society, Thirteenth Annual Meeting, UT, B-4-3. Salt Lake City, USA
72. Pilla A (1999). Electromagnetic therapeutics: mechanisms and clinical applications. Twenty-first annual meeting BEMS, 5-1. Long Beach California, USA
73. Pirozzoli MC, Marino C, Lovisolo GA, Laconi C, Mosiello L, Negroni A (2003). Effects of 50 Hz electromagnetic field exposure on apoptosis and differentiation in a neuroblastoma cell line. *Bioelectromagnetics* 24:510-516
74. Rausch DM, Dickens G, Doll S, Fujita K, Koizumi S, Rudkin BB, Tocco M, Eiden LE, Guroff G (1989). Differentiation of PC12 cells with v-src: comparison with nerve growth factor. *J Neurosc Res* 24:49-58
75. Ross AH, Sobue G, Hotta H, Reddy U (1991). Biochemical characterization of the nerve growth factor receptor in neural-related tumors. *Curr Topics Microbiol Immunol* 165:27-38
76. Schober A, Unsicker K, Krieglstein K (2000). Molecular cues for the development of adrenal chromaffin cells and their preganglionic innervation. *Eur J Clin Invest* 30:suppl 3:87-90
77. Serway R (1999). *Electricidad y Magnetismo*. Editorial McGraw-Hill. México



78. Shahidain R, Mullins RD, Sisken JE (2001). Calcium spiking activity and baseline calcium levels in ROS 17/2.8 cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields (ELF EMF). *J Radiat Biol* 77(2):241-248
79. Shimoke K, Kudo M, Ikeuchi T (2003). MPTP-induced reactive oxygen species promote cell death through a gradual activation of caspase-3 without expression of GRP78/Bip as a preventive measure against ER stress in PC12 cells. *Life Sci Jun 20*;73(5):581-93
80. Sisken BF, Kanje M, Lundborg G, Kurtz W (1990). Pulsed electromagnetic fields stimulate nerve regeneration in vivo and in vitro. *Restorative Neurology and Neurosci* 1:303-309
81. Smith A (2000). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Revised edition, Oxford University Press. United Kingdom
82. Tagüeña J, Martina E (1988). *De la brújula al espín. El magnetismo*. Fondo de Cultura Económica vol. 56. México
83. Takabe W, Mataka C, Wada Y, Ishii M, Izumi A, Aburatani H, Hamakubo T, Niki E, Kodama T, Noguchi N (2000). Gene expression induced by BO-653, probucol and BHQ in human endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 7(4):223-30
84. Takekoshi K, Nomura F, Isobe K, Motooka M, Nammoku T, Nakai T (1998). Identification and initial characterization of stathmin by the differential display method in nerve growth factor-treated PC12 cells. *Eur J Endocri* 138:707-712
85. Tao Q, Henderson A (1991). EMF induces differentiation in HL-60 cells. *J Cellular Biochem* 73:212-217

86. Townsend JP, Hartl DL (2002). Bayesian analysis of gene expression levels: statistical quantification of relative mRNA level across multiple strains or treatments. *Genome Biology* 3(12):0071.1-0071-16
87. Truckenmiller ME, Vawter MP, Cheadle C, Coggiano M, Donovan DM, Freed WJ, Becker KG (2001). Gene expression profile in early stage of retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Restor Neurol Neurosci* 18(2-3):67-80
88. Unsicker K, Finotto S, Kriegstein K (1997). Generation of cell diversity in the peripheral autonomic nervous system: the sympathoadrenal cell lineage revisited. *Ann Anat* 179:495-500
89. Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H (1978). Nerve growth factor-induced fibre outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoides. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3498-3502
90. Unsicker K, Seidl K, Hofmann HD (1989). The neuron-endocrine ambiguity of sympathoadrenal cells. *Int J Dev Neurosci* 7:413-417
91. Valberg P, Kavet R, Rafferty C (1997). Can low-level 50/60 Hz and magnetic fields cause biological effects?. *Radiation Res* 148:2-21
92. Verdugo-Díaz L, Palomero-Rivero M, Drucker-Colín R (1998). Differentiation of chromaffin cells by extremely low frequency magnetic fields changes ratios of catecholamine type messenger. *Bioelectrochem Bioenerg* 46:297-300
93. Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R (2002). Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs* 171:64-76
94. Vician L, Basconcello R, Herschman H (1997). Identification of genes preferentially induced by nerve growth factor versus epidermal growth factor in

- PC12 pheochromocytoma cells by means of representational difference analysis. *J Neurosc Res* 50:32-43
95. Villa H, Perez-Pertejo Y, Garcia-Estrada C, Reguera RM, Requena JM, Tekwani BL, Balana-Fouce R, Ordonez D (2003). Molecular and functional characterization of adenylate kinase 2 gene from *Leishmania donovani*. *Eur J Biochem* Nov;270(21):4339-47
  96. Wakade AR, Wakade TD, Pooch M, Bannon MJ (1996). Noradrenaline transport and transporter mRNA of rat chromaffin cells is controlled by dexamethasone and nerve growth factor. *J Physiol (Lond)* 494:67-75
  97. Whitmarsh AJ, Davis RJ (2000). A central control for cell growth. *Nature* 403:255-256
  98. Zhang XL, Zhang D, Michel FJ, Blum JL, Simmen FA, Simmen RC (2003). Selective interactions of Kruppel-like factor 9/basic transcription element-binding protein with progesterone receptor isoforms A and B determine transcriptional activity of progesterone-responsive genes in endometrial epithelial cells *J Biol Chem* Jun 13;278(24):21474-82

## APÉNDICE A

Especificaciones de los microarreglos utilizados. Los microarreglos utilizados se compraron en "Norwegian Microarray Consortium, a national FUGE plataform for DNA Microarray Technology", cuya dirección en internet es: <http://nova2.idi.ntnu.no/nmc/index.php?page=products>. Se adquirieron dos tipos de microarreglos dado que los arreglos de 14K dejaron de elaborarlos y se sustituyeron por los de 15K. A continuación se mencionan las especificaciones de ambos tipos.

### **Rat 14K cDNA duplicates**

**Organismo:** Rata **Tipo:** DNAC

13800 sondas de DNAC verificadas por Research Genetics y 10 DNAC producidos por la propia compañía se imprimieron por duplicado en laminillas Coming CMT Gaps II. Las sondas se disolvieron en DMSO al 50% para asegurar una alta calidad de impresión. También se incluyen en el arreglo 10 diferentes DNAC de *Arabidopsis thaliana* (Stratagen Spotreporter). Los RNAm de las sondas de arabidopsis facilitan su utilización como controles durante la hibridación del microarreglo.

### **Rat 15K cDNA duplicates**

**Organismo:** Rata **Tipo:** DNAC

14500 sondas de DNA c verificadas por Research Genetics y 10 DNAC de rata producidos por la propia compañía se imprimieron por duplicado en laminillas Corning CMT Gaps II. Las sondas se disolvieron en DMSO al 50% para asegurar

una alta calidad de impresión. También se incluyen en el arreglo 10 diferentes DNAC de *Arabidopsis thaliana* (Stratagen Spotreporter). Los RNAm de las sondas de arabidopsis facilitan su utilización como controles durante la hibridación del microarreglo.

## APÉNDICE B

Secuencias diferenciales obtenidas con el método de Differential Display

### Banda Ap1- 7

```

1   TACAACGAGG CTTAATGTGA GAGCCGAGGA AGTG TTCAGT AATCTAGTTT
51  GACAAACACT GATCTCTAAG AAGGCACTAC AATCAGACAG GTGGTCTTGG
101 CAAATAGAAA TGTTGAGATG AATTGTTGTA CCTTTTAGGA GACTGTATAT
151 TTTGGATGGT GATGGTGATG GTGATGCGAT CCCCTCGTTG TAA

```

### Banda Ap5-14

```

1   GAACCAATCC CTTACTATTC ATTTCTTCTC TTTCTCTTTT CCTTTTCCCA
51  TTTGCTAAAG TTGAAAGTAG GAAAATAGTT TTGGATATCT TTTCTTGTTT
101 TCCAAATAGT ATCGGTCGAT GGGACATATG AAAAAAAAAA AACAAAAAAAA
151 AAGTATCGGT CGATGGGACA TATGAAAAAA AAAAAAACGG AACCAATCAA
201 AAAAAAATG GAACCAATCA GTCAAAAATC CGAGTCACCC TTAAAAGAAG
251 ATTAAAAGAC TGCAACAAAG CTAGTTCTAA TCCTGGATGA CTTGTTATGG
301 GTTTTAACGG ATTAATCG

```

### Banda Ap5-15

```

1   GGACACCAAT CAGGAGTGTC CTCCCTAGGA GCAAGAGCAC CTGGTAATTC
51  ACAGTAGCAA TCATGGACTT ACTCTCTAGG CCCAGAGTTT CACAAAAAAC
101 ACACAATGTT TTTATGCTCC ATGGTGTCTC CTGAGTCATA GAGACACCGT
151 GTGAATACAC CTTGAATAGA TAAATGAGTG AACAGTAACC AGAGTAAGGT
201 TGAGTGATAT TCAAAGCTTC ACTCTTGATA CAAAAGCACA CCTCCATATT
251 GGAAATGTCT CATCATAGCT TTA CTCTGAA TCAACTACAA CCACCAATCA
301 AGGACTACAG ATCCAGTCTT CAGCCTGCCT TTACGATGGG GTTCC

```

### Banda Ap5-19

```

1   GGAACCAATC TACAAAAAAA CAAAAAACAA AAAACAAAAA AATAAAACAA
51  AACAAAACAA AAAACCAAAA CAACAAAAAA AAAAAACTAT CACCACCACC
101 AAACAACAAT AAAGACAGAC ATGTATAAAA CTA CTTATAA AAAAACCTCA
151 CATTGCTGTA CTCTTCCCGG TGATTGGTTC C

```

**Ap6-7**

1 AAACTCCGTC CAATATTTTT AAAATTTTAA ATGGTAAATT CTTTAATCCT  
51 CAATTTGTTG TCACCTAATT TCTTGTTTTT TTGTTTCTAA GATGGTTATT  
101 CTTTCTTTTA TGAAATTAAT CCTTTGTGGT TTTTAAAT GTATTATTTT  
151 TTACTTATTT AATATTGTTA TATGAGCAA TTTCTAGTCA TTTAAATCAC  
201 AAAGGGTTTG GAAATGATTA AAGAATTATT TAATTTAATA CGCTAAGATT  
251 GAGTTAGTTA GGAAAGTGGT ATATAGTTAG TATAAGTAAG AAGTAAGAAT  
301 TCTTACTGTT TGTAATTTAA AAAACAAAAC AATCCGCCAA CAAAAACAA  
351 ACAAATGAAA AAGCCGAGCG AAAATAAATT ACACAAATTA AAATGGTAAA  
401 GTGAAAAAAG GAGAGATAAA CCATGGTAGC AACGAAAACA AAAAAGGTTG  
451 CCGTCTCCGG CAAAAGACAA ATCGCCATTC CAAAAGAATT CTTTGATGCG  
501 ATCGGTATTG AAAAAGAGAT TATTATGGAA CTGAATGACC GAGTTA

**Banda Ap7-1**

1 GAACCATCAG GAGTGTCCTC CCTAGGAGCA AGAGCACCTC GGTAATTCAC  
51 AGTAGCAATC ATGGACTTAC TCTCTAGGCC CAGAGTTTCA CAAAAACAC  
101 ACAATGTTTT TATGCTCCAT GGTGTCTCCT GAGTCATAGA GACATCGTGT  
151 GAATACACCT TGAATAGATA AATGAGTGAA CAGTAACCGA GTAAGGTTGA  
201 GTGATATTCA AAGCTTCACT CTTGATACAA AAGCACACCT CCATATTGGA  
251 AATGTCTCAT CATAGCTTTA CTCTGTATCA ACTACAACCA CCAATCAAGG  
301 ACTACAAATC CAGTCTTCAG CCTCCCTTTA CGATTGGTTC CAATCG

**Banda Ap7-7**

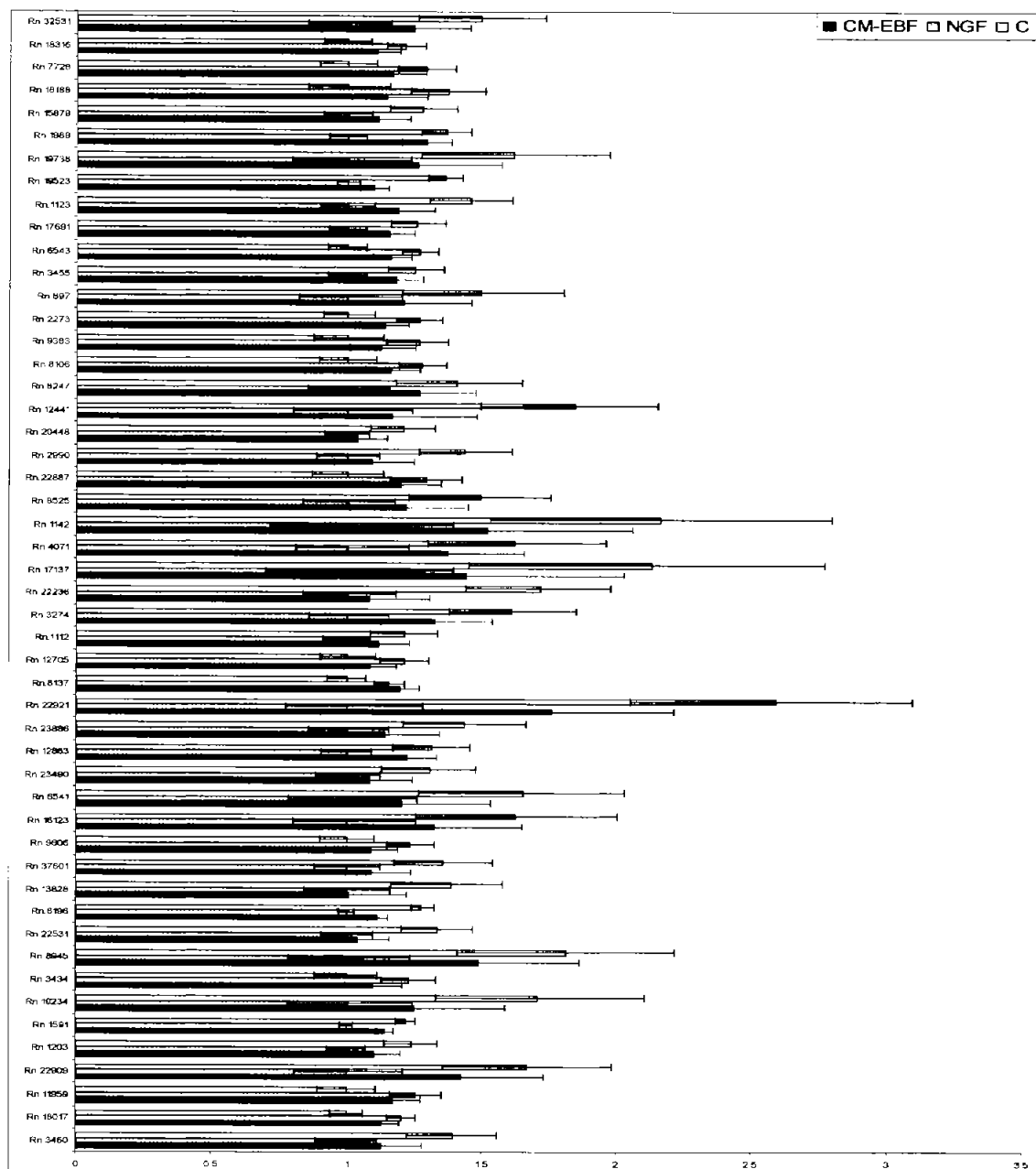
1 GAACCAATCC CTTACTATTC TTTCTTCTCT TTCTCTTTTC CTTTTTCCAT  
51 TTGCTAAAGT TGAAAGTAGG AAAATAGTTT TGGATATCTT TTCTTGTTCT  
101 CAAATAGTAT CGGTCGATGG GACATATGAA AAAAAAAAAA CAAAAAAAAA  
151 GTATCGGTCC ATGGGACATA TGAAAAAAAAA AAAAACGGAA CCAATCAAAA  
201 AAAAAATGGA ACCAATCAA AAAAAAATGG AACCAATCAG TCAAAAATCC  
251 GAGTCACCTT TAAAAGAAGA TTAAAAGACT GCAATGTCAT TGCAACAAAG  
301 CTAGTTCTAA TCCTGGATGA CTTGTTATGG GTTTTAACGG ATTAATCG

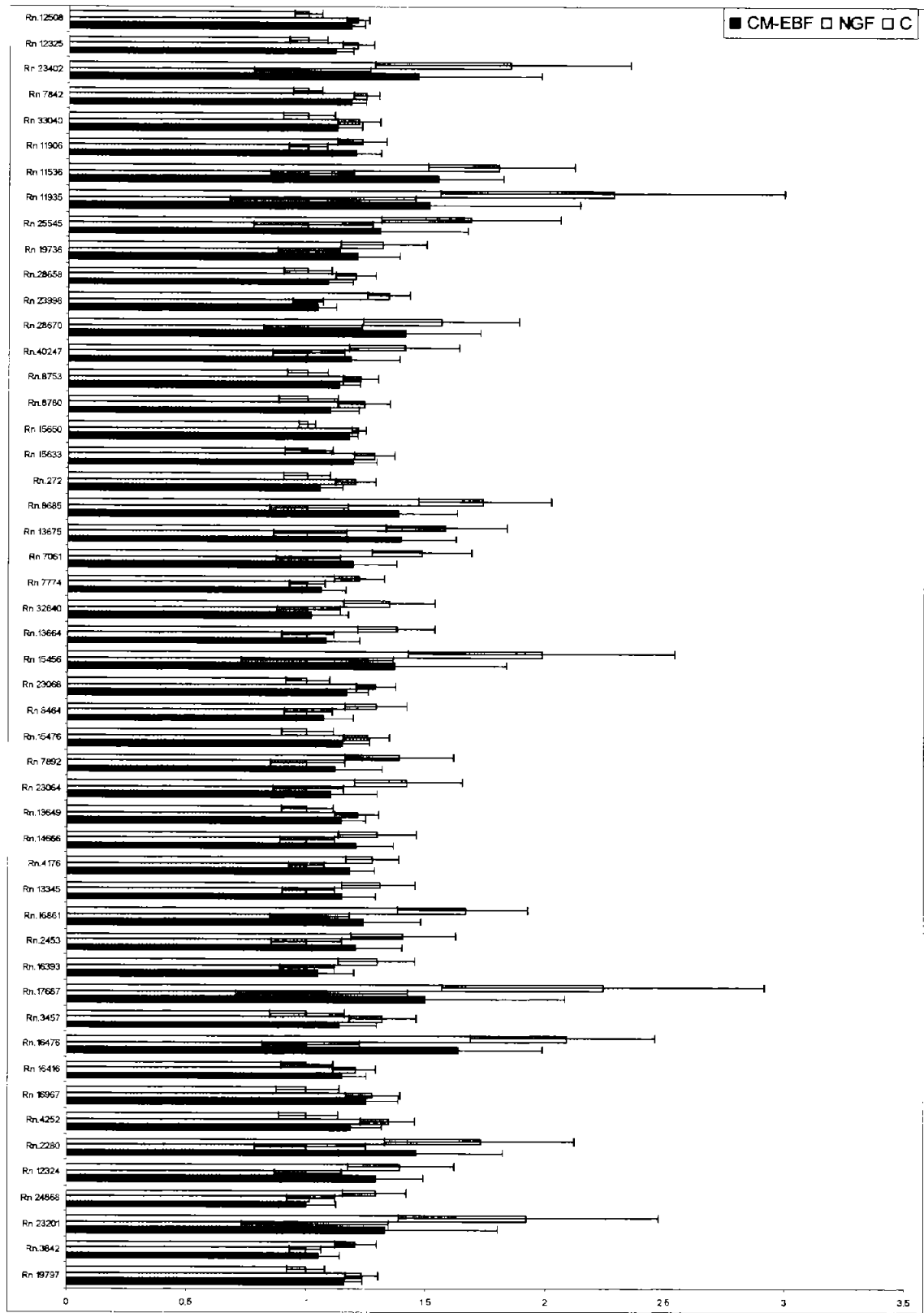
**Banda Ap7-13**

1 AACCAAGCTAA TCAGATGACC GACAGACCAA CGAGGGAGGG GCCCGGAAAC  
51 CCAAGACAG CCCAAAAAGA GAGCCGAATC AACCAAGACAC TGGCACGTAG  
101 GTCACACAAC GTATGTGGAG A

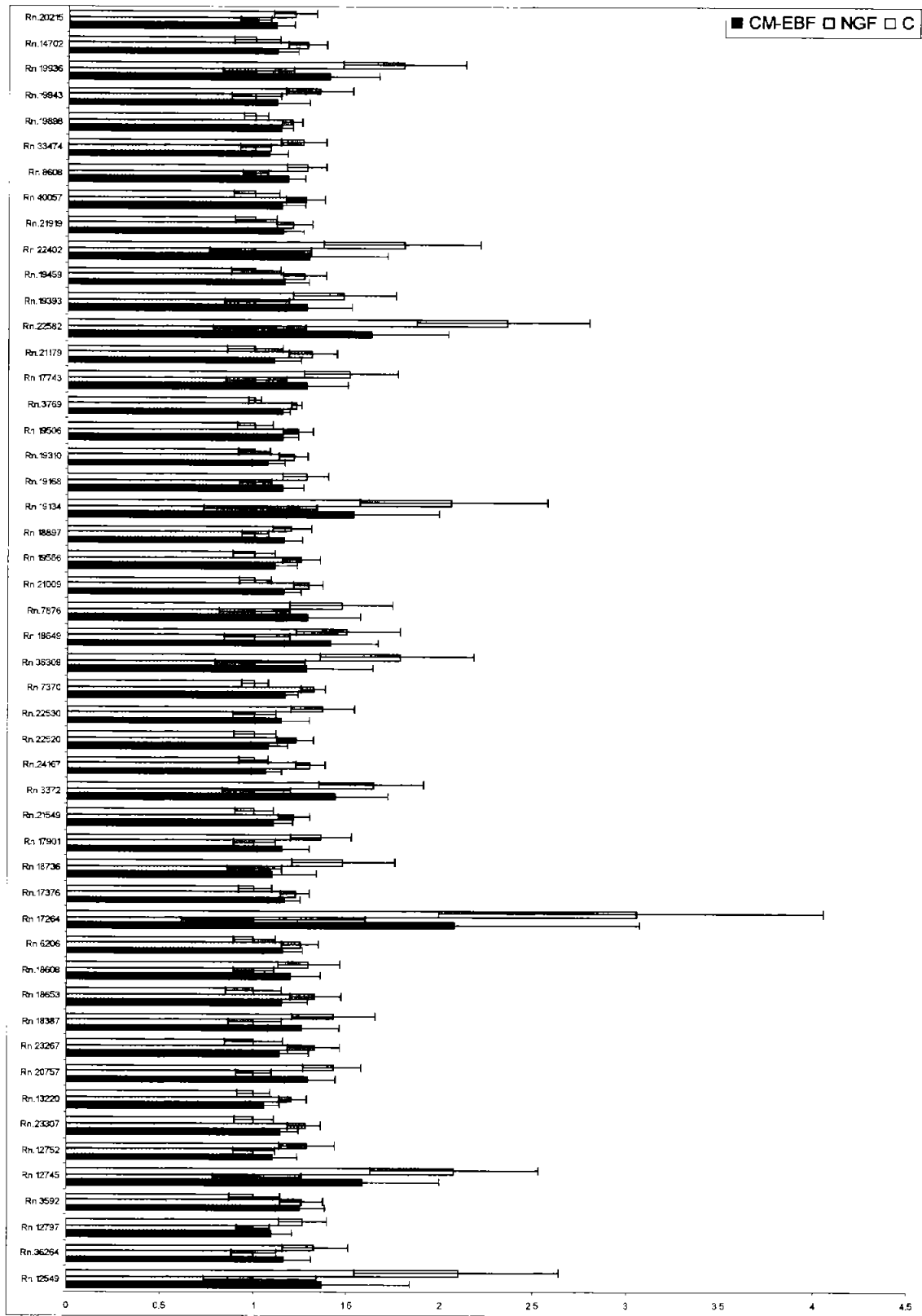
## APÉNDICE C

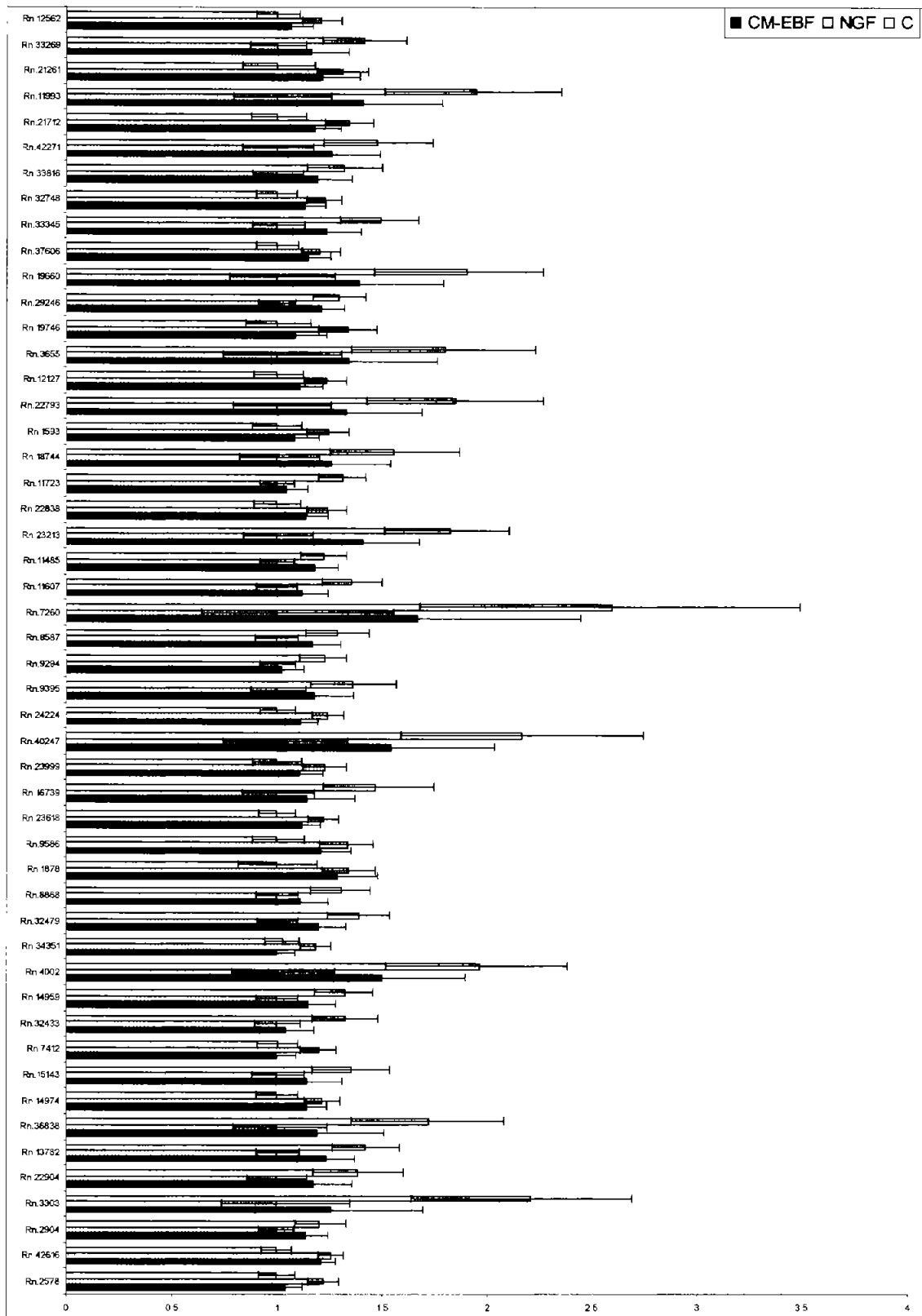
Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes desconocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con NGF y las células cromafines no tratadas. Los datos se obtuvieron con el programa de análisis BAGEL.

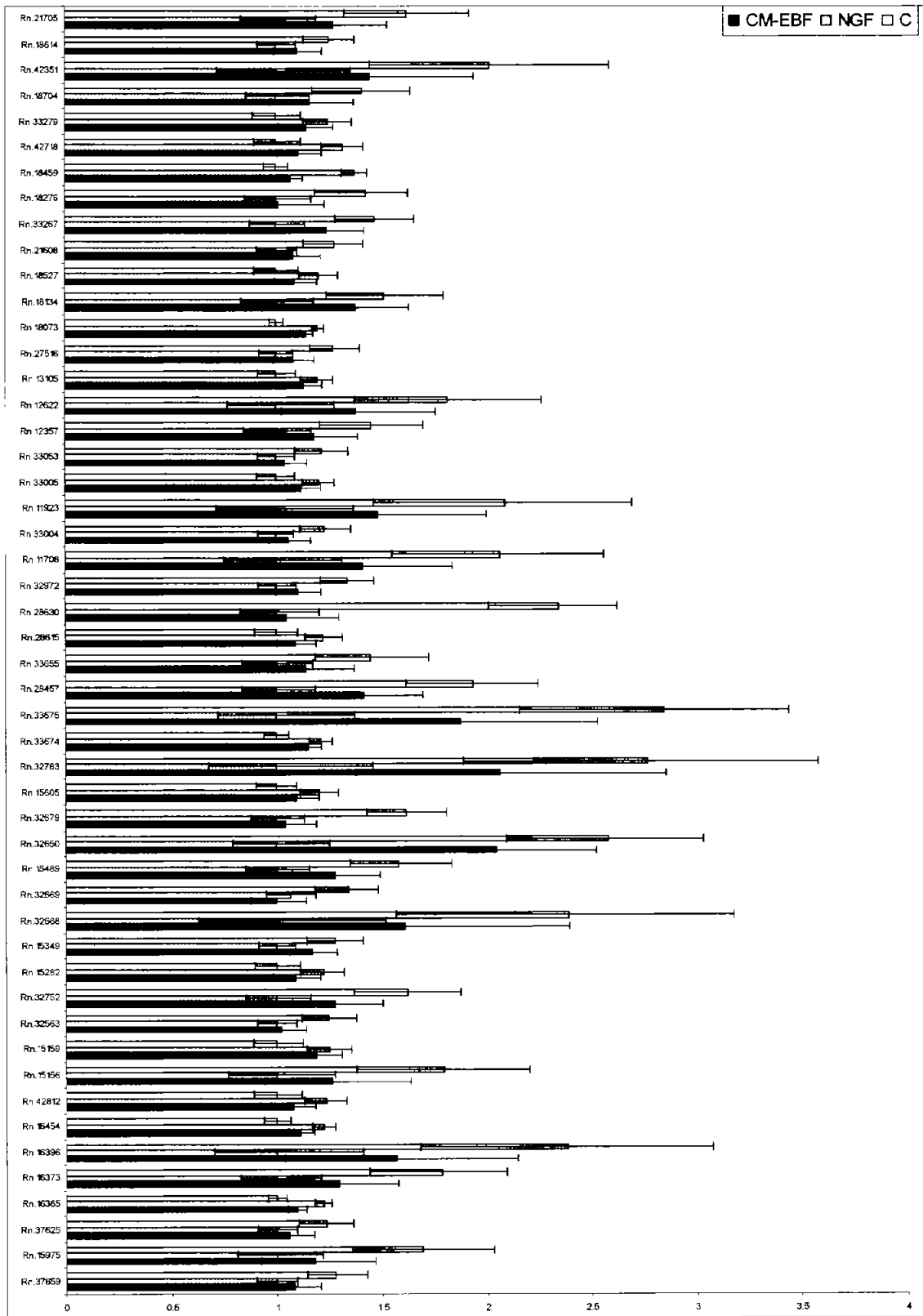


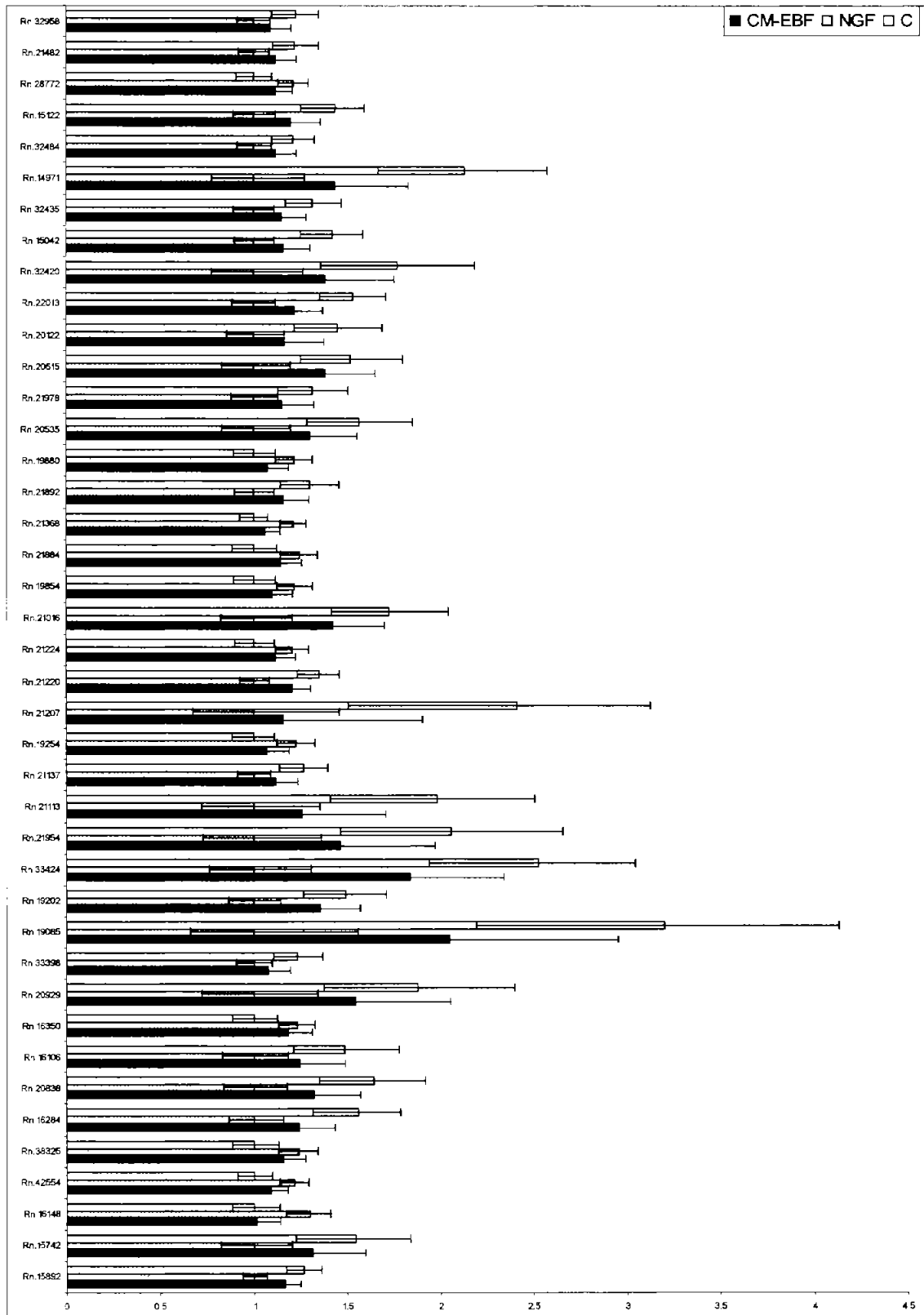






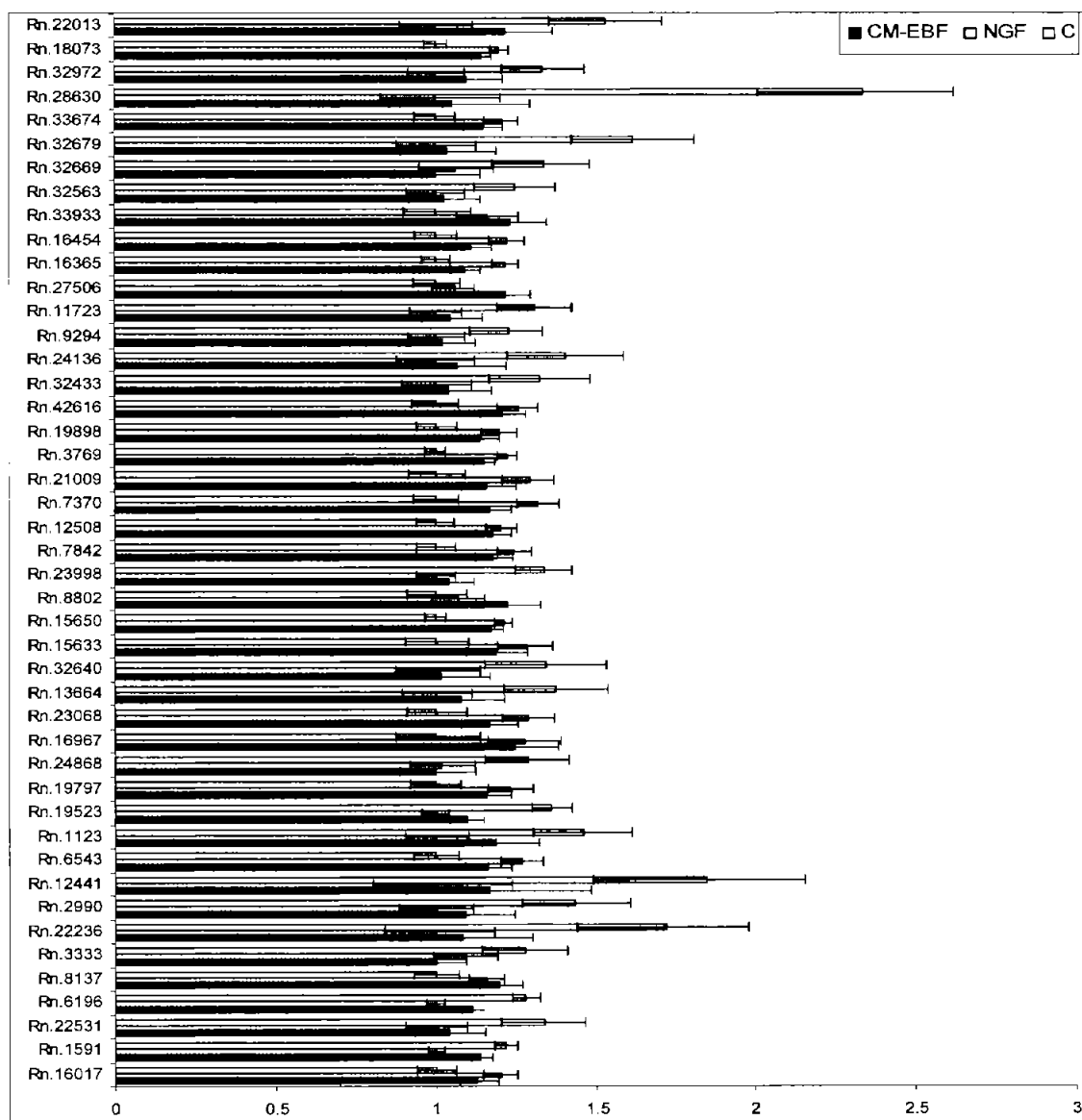






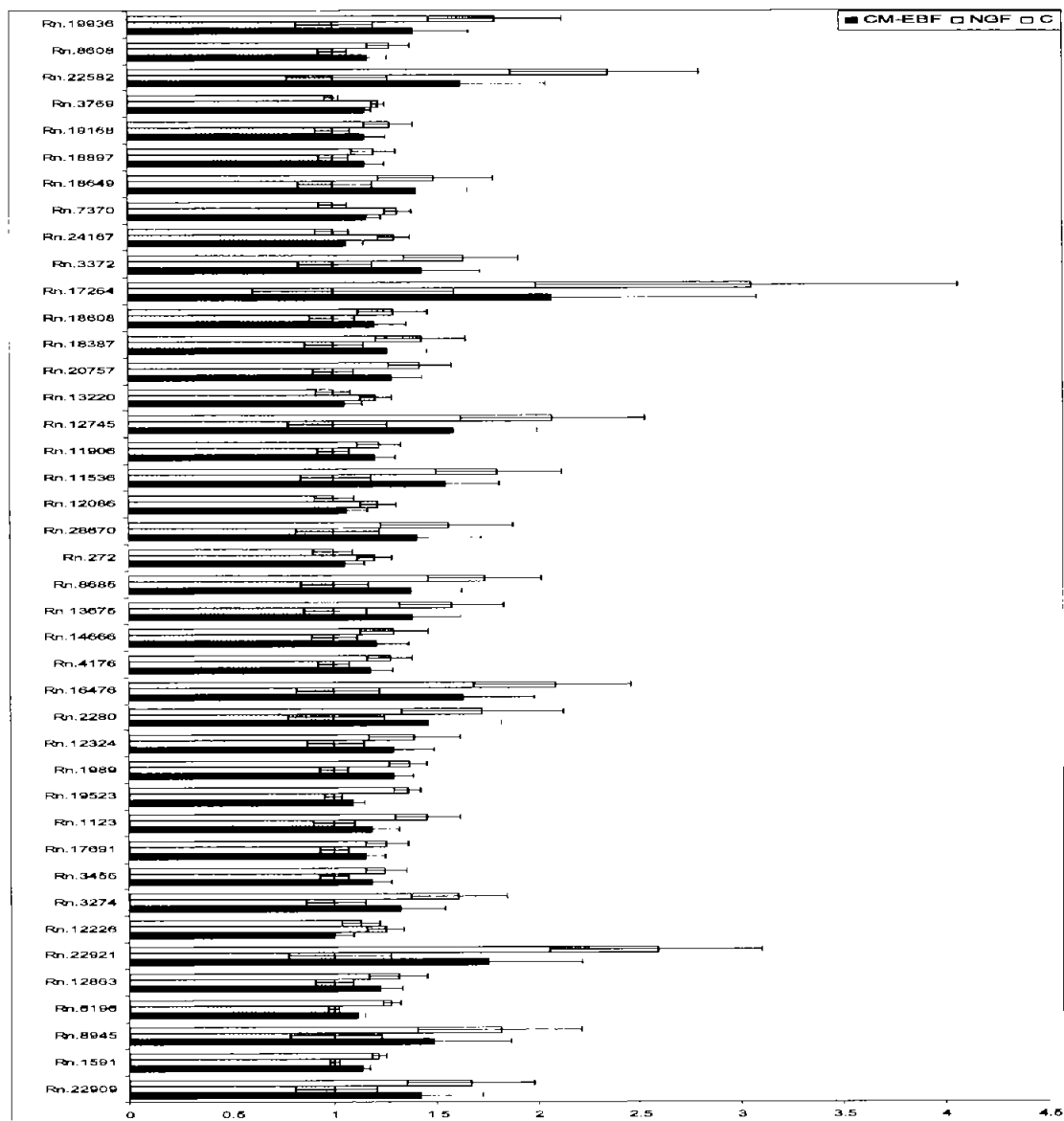
## APÉNDICE D

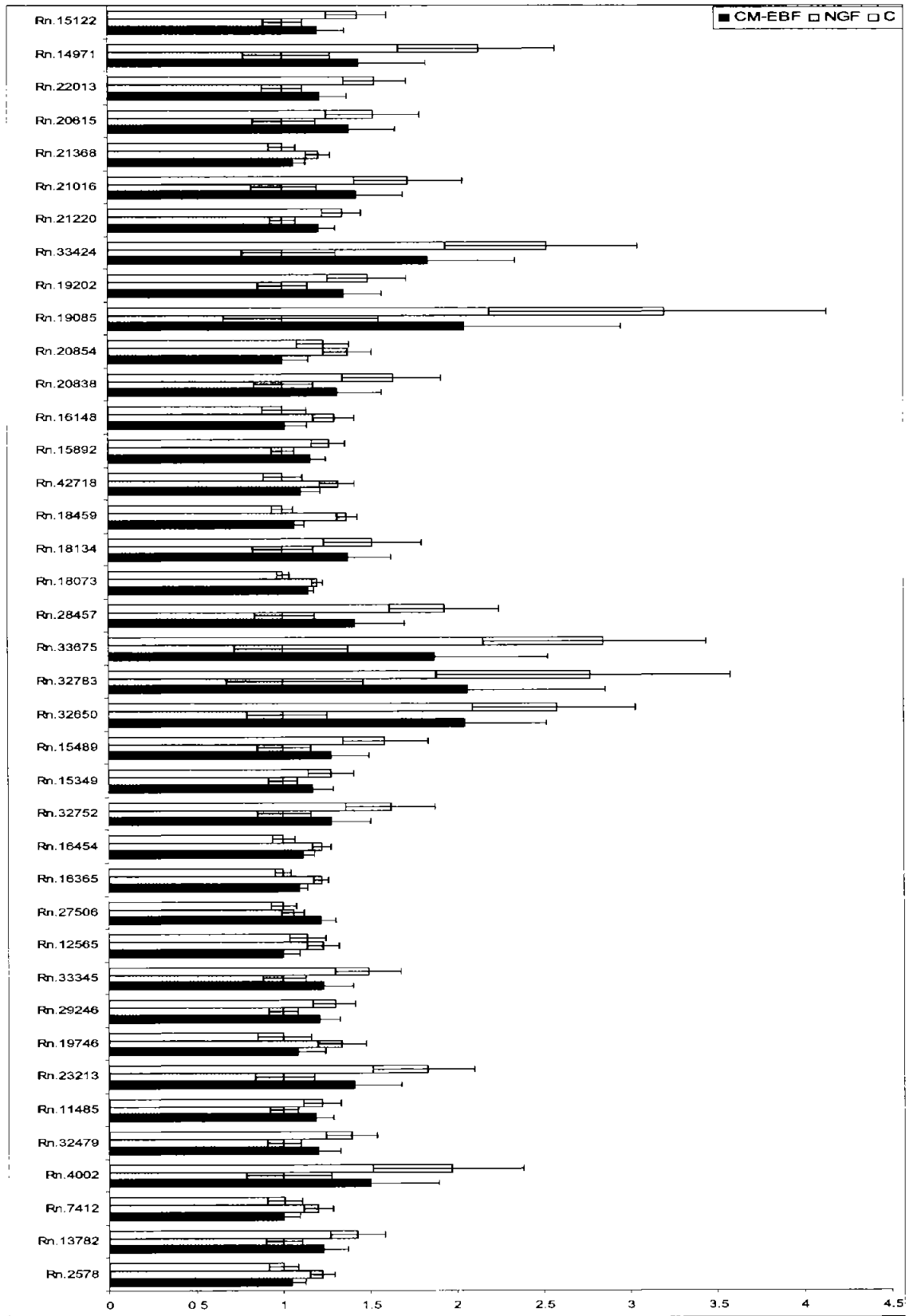
Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes desconocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con CM-EBF y las células cromafines no tratadas. Los datos se obtuvieron con el programa de análisis BAGEL.



## APÉNDICE E

Nivel de expresión con desviaciones estándar de los genes desconocidos que cambian cuando se comparan las células cromafines tratadas con NGF y las células tratadas con CM-EBF. Los datos se obtuvieron con el programa de análisis BAGEL.







## Differentiation of chromaffin cells elicited by ELF MF modifies gene expression pattern

Tatiana Olivares-Bañuelos<sup>a</sup>, Luz Navarro<sup>b</sup>, Alicia González<sup>a</sup>, Rene Drucker-Colín<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-250, México, D.F. 04510, Mexico

Received 14 August 2003; revised 11 December 2003; accepted 20 January 2004

### Abstract

Chromaffin cells exposed to extremely low frequency magnetic fields (ELF MF, 60 Hz, 0.7 mT) differentiate into sympathetic neuron-like cells. This complex process must involve both qualitative and quantitative variations in gene expression. This study looks at whether ELF MF treatment provokes changes in the global transcription profile of chromaffin cells, using the RT-Differential Display method. When the gene expression patterns of experimental groups (nerve growth factor (NGF) and ELF MF) were compared to those receiving no treatment, at least 53 transcripts showing differential expression were detected. Eight RT-PCR products, corresponding to six genes, were re-amplified, sequenced and compared with the rat gene bank. Sequence analysis showed that these genes most likely encode: phosphoglucomutase-1, neurofibromatosis-2 interacting protein, microtubule associated protein-2, thiamine pyrophosphatase, and two unidentified hypothetical proteins (RNOR02022103 and RNOR01044577), and that the presumed regulatory regions of these genes contained CTCT-clusters, which are thought to be required for electromagnetic field-dependent gene expression.

© 2004 Published by Elsevier Ltd.

**Keywords:** ELF MF; Differential display; Chromaffin cells; NGF

### 1. Introduction

Chromaffin cells have been used extensively as models to study differentiation. Several reports have shown that such cells can change from an endocrine phenotype to a sympathetic neuron-like phenotype when stimulated with either NGF or ELF MF (Black et al., 1986; Drucker-Colin et al., 1994; Unsicker et al., 1978). We have recently demonstrated that ELF MF neuron-like differentiated cells from Wistar neonatal rats predominantly form dopaminergic cells (Verdugo-Díaz et al., 1998) and develop neurites with a large number of tyrosine hydroxylase-positive vesicles, as well as augmented neurofilaments (Feria-Velasco et al., 1998).

It has also been shown that this differentiation process largely depends on L-type Ca<sup>+</sup> channels (Morgado-

Valle et al., 1997). Thus, it can be expected that EMF stimulation will result in the induction of a variety of biochemical processes and changes in gene expression, leading to short and long term effects on cellular behavior (Goodman and Henderson, 1988; Jacobson, 1994; Phillips, 1993). Exposure to EMF additionally alters cell growth rate and decreases synthesis of both mRNA and proteins (Czerske et al., 1991; Goodman and Henderson, 1988; Liboff et al., 1984; Marron et al., 1988; Phillips et al., 1991; Takahashi et al., 1986). Changes in the cell surface and induction of nerve regeneration have also been observed (Sisken et al., 1990). Modification of intracellular processes, such as membrane reorganization and redistribution of ions and other small molecules (Goodman et al., 1993), also accompanies the process.

The mechanisms by which magnetic fields induce functional modifications are not fully understood. Concern about the potential health effects of ELF MF is due in part to the fact that some epidemiological studies

\* Corresponding author. Tel.: +52-5-550-6662; fax: +52-5-550-0904  
E-mail address: drucker@servidor.unam.mx (R. Drucker-Colín).  
Abbreviations: EMF, Electromagnetic fields; ELF MF, Extremely low frequency magnetic fields; NGF, Nerve growth factor.



suggest an association between certain neoplasms, especially childhood leukemia, and exposure to such fields (Shahidain et al., 2001). With regard to the modification of gene expression by exposure to ELF MF, it has been found that magnetic fields increase the binding of transcriptional activators to their cognate sequences, and several hypotheses have been put forward to explain how this is achieved (Blank and Goodman, 2001; Goodman and Blank, 2002).

The present study attempts to identify genes that could be involved in ELF MF-induced chromaffin cell differentiation. To this end, we used the mRNA differential display method. This experimental approach allowed the analysis of a large number of expressed transcripts, thus we were able to show the existence of specific patterns present exclusively in ELF MF treated cells. In order to gain a better insight into the selectivity of ELF MF elicited patterns, we also analyzed the expression profile of NGF treated cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chromaffin cell cultures

Adrenal medulla cells from 80 neonatal rats (Wistar, 1–3 days old) were obtained and homogeneous chromaffin cell pellets were prepared from them. Enzymatic dissociation was carried out using 40 mg/ml collagenase (Worthington, Type I) and 15 mg/ml deoxyribonuclease I (Sigma, Type II) in a calcium-free Spinner's Saline Solution (Sigma, product No. H2387) for 45 min at 37 °C with continuous stirring (Unsicker et al., 1978). The tissue was mechanically dispersed with a Pasteur pipette and the cell suspension was centrifuged for 10 min at 900 rpm at 20 °C. Both chromaffin cell viability and purity were 95% (as determined by the trypan blue exclusion method, counting cells with a Neubauer chamber). The cell suspension was plated over fifteen 35mm Petri dishes ( $1 \times 10^6$  cells per dish) and divided into three experimental groups (5 per group). The culture medium was Dulbecco's modified Eagle (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 4.5 mg/ml insulin (Sigma), 100 U/ml penicillin (Sigma), 100 mg/ml streptomycin (Sigma), and 2.5 mg/ml fungizone (Gibco).

### 2.2. Experimental groups

Three chromaffin cell groups were prepared: (1) control group, chromaffin cells without any stimulation, (2) NGF group, cells cultured in the presence of 50 ng/ml NGF added to the culture every three days, and (3) ELF MF group, cells exposed to ELF MF stimulus, 0.7 mT, 60 Hz. The first two groups were placed in a separate incubator to prevent exposure to ELF MF. Cells were grown for 7 days in a mixture of 5% CO<sub>2</sub>/95% air, at 37 °C. The culture medium was changed every three days.

### 2.3. ELF MF treatment

The cultures exposed to ELF MF were placed in an incubator with acrylic supports and two pairs of Helmholtz coils, as previously described (Drucker-Colin et al., 1994). Each coil consisted of 1000 turns of enameled copper wire (22 mm diameter) contained in plastic boxes ( $10.5 \times 10.5 \times 3.5$  cm). The coils generated a vertical magnetic field over the dishes (resistance of 10 ohms and inductance of 83.23 mH) in the form of a sinusoidal wave with a frequency of 60 Hz and amplitude of 0.7 mT. The magnetic field background was 0.44  $\mu$ T. Petri dishes were placed between two coils at a distance of 21 cm and the magnetic field intensity over each dish was measured with an Electromagnetic Field Radiation Tester (Lutron, EMF-827). Chromaffin cells were exposed to ELF MF (as described by Drucker-Colin et al., 1994) for 4 h a day for 7 days (2 h in the morning and 2 h in the afternoon), beginning on the second day of culture. As a control, we alternated the use of the incubators (switching the Helmholtz coils) so that the three groups were incubated under exactly the same conditions.

### 2.4. Total RNA isolation

RNA isolation was carried out following the manufacturer's protocol (TRIzol, Gibco BRL). RNA samples were suspended in 20  $\mu$ l RNase-free water (DEPC). Total RNA was analyzed on denaturing (1  $\times$  MOPS and 6.6% formaldehyde, Gibco BRL) 1% agarose gels (Gibco BRL) and quantified at 260 nm.

### 2.5. Differential display

A reverse transcription (RT) reaction was carried out with 4  $\mu$ g total RNA from each group ( $n=3$ ), using an anchored primer (T<sub>11</sub>G) and 1 U of reverse transcriptase enzyme (Gibco BRL). For each RT product, PCR cDNA amplification was performed. The reaction mixture was brought to a final volume of 20  $\mu$ l with an adjusted concentration of 2.5 U Taq Polymerase II recombinant enzyme and 2.0 mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco BRL) plus the anchored primer T<sub>11</sub>G and one of the nine arbitrary primers (Ap1. TAC AAC GAG G; Ap2. TGG ATT GGT C; Ap3. CTT TCT ACC C; Ap4. TTT TGG CTC C; Ap5. GGA ACC AAT C; Ap6. AAA CTC CGT C; Ap7. TCG ATA CAG G; Ap8. TGG TAA AGG G; Ap9. TCG GTC ATA G) (Peng et al., 1995). PCR was carried out as follows: denaturing at 94 °C for 0.5 min, annealing at 42 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 0.5 min for 45 cycles (Liang & Pardee, 1992). Samples of each PCR reaction group were electrophoresed on a 6% native polyacrylamide gel of 10  $\times$  20 cm, as described by Peng et al. (1995). Differential bands were compared using the ImagenQuant Software, which quantify the intensity of each band on the gel and

1589

1590

1591

1592

1593

1594

1595

1596

1597

1598

1599

1600

1601

1602

1603

1604

1605

1606

1607

1608

1609

1610

1611

1612

1613

1614

1615

1616

1617

1618

1619

1620

1621

1622

1623

1624

1625

1626

1627

1628

1629

1630

1631

1632

1633

1634

1635

1636

1637

1638

1639

1640

standardize all the values according their background. Chosen bands were recovered and re-amplified by PCR using the above conditions. PCR re-amplified fragments were run on a 1% agarose (Gibco BRL) gel and cDNA was purified with a QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen). Samples were stored at 4 °C until cloned.

### 2.6. Northern blot

Twenty µg total RNA obtained from each chromaffin cell group was run on a denaturing (1 × MOPS and 6.6% formaldehyde, Gibco BRL) 1% agarose gel of 11 × 14 cm. The gel was run for 2 h at 80 mV with 1 × MOPS and transferred to a nylon membrane (Gene Screen plus, Dupont). Prehybridization was carried out for 2 h with 6 × SSC (Standard Saline Citrate, Gibco BRL), 5 × Denhardt's, 50% formamide plus 85 µg/ml salmon sperm DNA (Gibco BRL). 100 ng of the re-amplified cDNA samples were labeled with 50 µCi  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (NEN) using a random primer labeling kit (Life Technologies). The membrane was hybridized overnight at 42 °C, with the previous pre-hybridization solution plus  $1 \times 10^6$  cpm/ml labeled probe. The membrane was washed once in 6 × SSC plus 0.1% SDS at room temperature, and twice with 0.1 × SSC plus 0.1% SDS at 42 °C (Fourney et al., 1987). The membrane was exposed to X-ray film (Kodak), which was developed after 2 days.

### 2.7. DNA sequence

The differential bands were cloned in T-vector, amplified in pBSSK<sup>+</sup> plasmid (Invitrogen) and sequenced in an automatic sequencer from Applied Biosystems (Perkin Elmer), ABI PRISM™ 310 version 3.2, using the T7 primer (GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG).

## 3. Results

### 3.1. Low frequency magnetic fields modify gene expression in chromaffin cells

Gene expression in differentiated chromaffin cells was analyzed using the differential display method, with four primers (Ap1, Ap5, Ap6 and Ap7) showing at least 53 differential bands between groups (see Fig. 1-A). Arrows indicate the bands chosen for further analysis: Ap1-6, Ap1-7, Ap5-13, Ap5-14, Ap5-17, Ap6-7, Ap7-7 and Ap7-13 (they were named according to the primer that was used). Sequencing of specific fragments and comparison with the rat genome sequence, accessed through the Ensembl Data Base (www.ensembl.org on 4 December 2003), revealed that six RT PCR products were down-regulated by ELF MF, as follows: Ap1-7 corresponded to a predicted protein RNOR02022103 unknown function, Ap5-15 and Ap7-1 to phosphoglucomutase-1, Ap5-19 to neurofibromatosis

2-interacting protein, and Ap5-14 and Ap7-7 to microtubule-associated protein 2. Two up-regulated transcripts were chosen: Ap6-7 corresponded to thiamine pyrophosphokinase, and Ap7-13 to RNOR01044577 hypothetical protein. Northern analysis of total chromaffin cell RNA, probed with Ap5-15 and Ap1-7 cDNA fragments, validated the observations obtained (Fig. 1-B) from differential display.

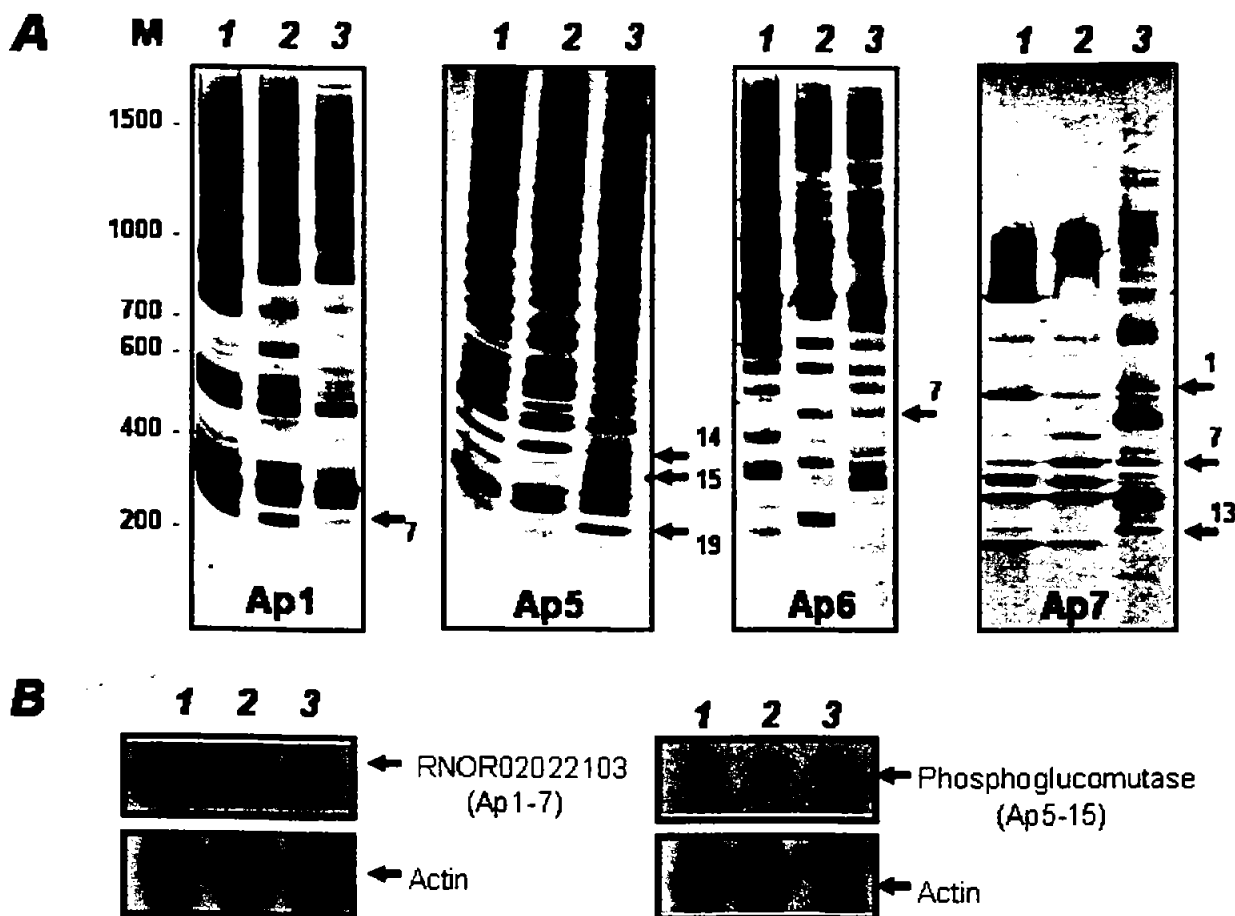
The expression patterns from the 53 transcripts are presented in Fig. 2, showing that down-regulation is more prevalent in ELF MF and NGF-treated cells than in controls (Fig. 2-A, B, C and D). With respect to the up-regulated genes, Fig. 2-B shows that there is a conspicuous group of eight transcripts whose expression is particularly increased in ELF MF treated cells. Conversely, Fig. 2-A and C show a group of up-regulated transcripts that is peculiar to NGF treated cells. Reproducibility of results is evident from the standard deviation that was obtained, indicating that neural differentiation is accompanied by changes in gene expression.

### 3.2. Analysis of the 5' regulatory region of ELF MF-regulated genes

In order to determine the presumed regulatory regions, known as Electromagnetic Response Elements (Lin et al., 2001), of the six genes whose transcripts were regulated by ELF MF treatment, we analyzed a 1000 bp sequence located in the 5' region up-stream of the ATG coding sequence of each reported gene. As Fig. 3 shows, the presumed regulatory region of the six analyzed genes contained CTCT sequences. The RNOR02022103 presumed regulatory region contains 12 CTCT boxes within the first 500 bp, and 18 boxes in the 1000 bp. The 1000 bp representing the regulatory region of the rest of the identified genes carry a variable number of CTCT motifs, from 8 to 10 (Fig. 3), and in most cases a cluster of motifs is found within the first 500 bp. As a control, we determined the number of CTCT boxes contained in the regulatory region of the constitutively expressed actin and Histone-2 genes; in these cases, only 2 to 3 boxes were found in the first 500 bp region.

## 4. Discussion

Chromaffin cells constitute a model of cellular differentiation that has been widely studied (Drucker-Colin et al., 1994; Unsicker et al., 1978). It has been shown that ELF MF treatment elicits a process leading to the differentiation of chromaffin cells into dopaminergic neuron-like cells (Verdugo-Diaz et al., 1998) presenting an increased number of neurofilaments (Feria-Velasco et al., 1998) in neonatal Wistar rats. This differentiation process is complex and implies important



760 Fig. 1. (A) Representative silver-stained polyacrylamide gel of differential expressed transcripts from chromaffin cells. The cDNA was amplified with  
 761 an anchorage primer (T<sub>11</sub>G) and 4 arbitrary primers (Ap1, Ap5, Ap6 and Ap7). The expression pattern of transcripts from 3 experimental groups  
 762 was observed: (lane 1) control (without stimuli); (lane 2) Nerve Growth Factor (NGF, 50 ng/ml); and (lane 3) Extremely Low Frequency  
 763 Electromagnetic Fields (ELF MF, 0.7 mT, 60 Hz, 4 h/day). The arrows indicate the re-amplified and sequenced bands. Quantitative analysis of  
 764 differential bands was performed using Image Quant Strom software. Primer sequences: Ap1: TAC AAC GAG G; Ap5: GGA ACC AAT C; Ap6:  
 765 AAA CTC CGT C; Ap7: TCG ATA CAG G. (B) Representative Northern Blot assay of two re-amplified bands: Phosphoglucumutase-I (Ap5-13)  
 766 and RNOR02022103 (Ap1-7) from each of the experimental groups (1, 2 and 3). Actin controls are shown at the bottom.

742 modifications to gene expression are occurring, as was  
 743 confirmed by this study.

744 For example, Fig. 1-A and Fig. 2 show sharp differ-  
 745 ences in the transcriptional profile of the cells, due to  
 746 modifications in 53 transcript expression patterns. The  
 747 fact that 30 transcripts had decreased expression indica-  
 748 tes that down-regulation is prevalent in both ELF MF  
 749 and NGF-treated cells. This suggests that the differen-  
 750 tiation process elicited by these two factors causes  
 751 changes in cellular programs, turning off expression  
 752 of complete sets of genes. Similar results have been  
 753 reported by Angelastro et al. (2000) with PC12 NGF  
 754 treated cells. Other genes are over-expressed, so the  
 755 combination of the two may be responsible for the  
 756 process.

757 The metabolic pathway involved in each stimulus is  
 758 different, as shown by the comparison of the expression  
 759 profiles of ELF MF and NGF-treated cells in Fig. 2.

1767 Although in both cases down-regulation was predomi-  
 1768 nant, it appears that a set of up-regulated genes was  
 1769 conspicuously increased in ELF MF treated cells (Fig.  
 1770 2-B). Conversely, Fig. 2-A and C show a group of  
 1771 up-regulated transcripts peculiar to NGF treated cells.  
 1772 Taken together, these results indicate that ELF MF  
 1773 treatment produces specific modifications in the gene  
 1774 expression profile, which are different to those obtained  
 1775 with NGF. Identification of the genes whose regulation  
 1776 is specifically increased by ELF MF treatment will surely  
 1777 shed light on the nature of the signal transduction  
 1778 pathway needed for ELF MF-dependent differentiation.  
 1779 It is worth mentioning that the ELF MF treated cells, as  
 1780 a control, were cultured in an incubator that had been  
 1781 used for control and NGF treated cells in a previous  
 1782 experiment.

1783 Modification of gene expression after ELF MF treat-  
 1784 ment has been reported in other systems. For example,

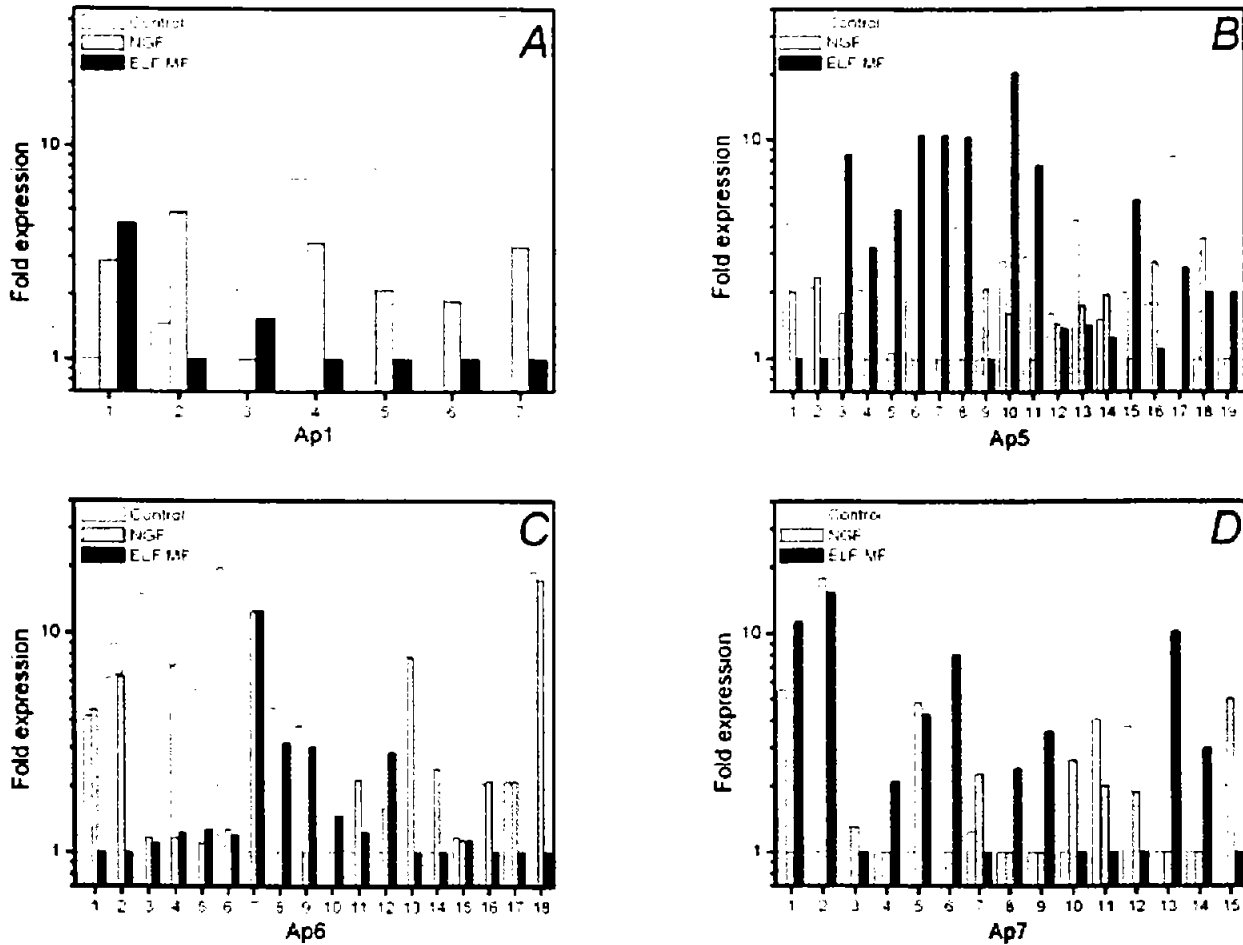


Fig. 2. Expression patterns of ELF MF chromaffin cell transcripts according to the amplification primer. (A) Ap1; (B) Ap5; (C) Ap6 and (D) Ap7. White bars, control; grey bars, NGF and black bars, ELF MF. Mean data from three experiments; standard deviation is shown.

leukemic and normal T-lymphocytes modified the expression of c-myc, c-jun and c-fos in sea urchins, although no change in expression pattern was reported (Balcer-Kubiczek et al., 2000; Lyle et al., 1991).

It is thought that exposure to ELF MF induces a stress response (Lin et al., 1999). Of the six genes that we were able to identify, the only one that has been related to stress is that encoding phosphoglucomutase type 1. This enzyme participates in galactose metabolism, converting galactose to glucose-1-phosphate, and it has been reported that the yeast gene encoding phosphoglucomutase-1 reduces its expression after stress treatments (Hirata et al., 2003). These results suggest that ELF MF chromaffin differentiated cells could change the expression profile of genes whose products are related to a stress response.

That low frequency electromagnetic fields induce increased gene expression through the action of CTCT binding sites has previously been proposed (Lin et al., 2001). It has also been shown that a 900 bp region containing eight CTCT sequences within the fragment

was capable of promoting ELF MF-induced expression of CAT or luciferase reporter constructs. Furthermore, it was found that the presence of even one CTCT site was sufficient to sustain a 1.5-fold increase in CAT response (Lin et al., 2001). Thus, it has been concluded that these elements play a crucial role in ELF MF-induced gene expression. Considering these propositions, analysis of a 1000 bp zone, located at 5' region of the ATG from the full coding sequence, was performed to determine the CTCT sequences therein.

As Fig. 3 shows, the presumed regulatory regions of the six analyzed genes contained CTCT sequences within their first 1000 bp. The identified genes of phosphoglucomutase-1, microtubule-associated protein 2, thiamine pyrophosphokinase, RNOR01044577 hypothetical protein, and neurofibromatosis 2 interacting protein carry a variable number of CTCT motifs, from 8 to 10, in the 1000 bp (Fig. 3).

However, the control genes that are not regulated by ELF MF (histone 2 and actin) contained a similar amount and distribution of CTCT sequences to some of

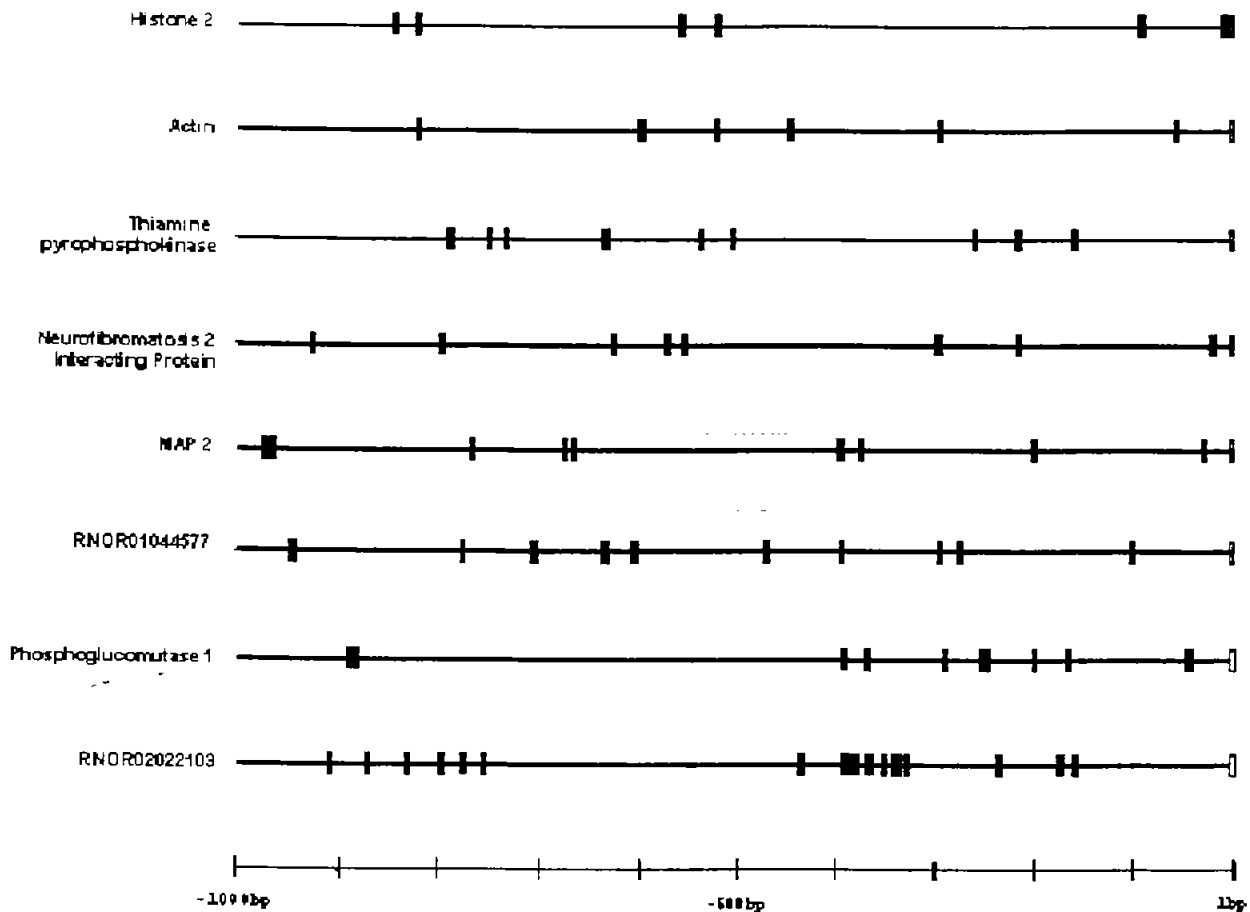


Fig. 3. Promoter regions of genes identified by differential display. Black boxes represent CTCT sequences, white boxes represent ATG.

the ELF MF-dependent genes. Thus, a more careful analysis will have to be performed in order to establish the role of the CTCT boxes. Most interesting was the finding that two genes showed a cluster of motifs within the first 500 bp. In particular, the RNOR02022103 predicted promoter sequence contained 18 CTCT boxes in 1000 bp (12 boxes in 500 bp). This number far exceeds the one found for c-myc promoter (eight boxes in 900 bp) (Lin et al., 1999). In contrast, the regulatory regions of the constitutively expressed actin and histone 2 genes have only three CTCT boxes in the first 500 bp region.

Thus, it can be speculated that the organization of the promoter region of ELF MF regulated genes containing clusters of CTCT boxes could be essential for their induced expression. However, other sequences that play a role in the ELF MF transcriptional response must also be present, since, as mentioned earlier, not all the studied genes show CTCT clusters. Although the presence of the CTCT motif has been associated with increased ELF MF-dependent expression, our results show that RNOR02022103 responds to ELF MF treatment with a 40-fold decreased expression compared to control cells. Thus, it seems plausible that CTCT ele-

ments could participate in either up- or down-regulation responses. Similarly, the CTCT motifs present in the phosphoglucomutase gene could participate in its diminished expression after ELF MF treatment.

Taken together, our results indicate: (i) that ELF MF treatment elicits a peculiar transcriptional response, qualitatively different to that elicited by NGF, and (ii) that there is an increased density of CTCT elements in ELF MF down-regulated promoters. This observation supports the proposition that the large repulsive forces generated by ELF MF could cause a physical modification of the DNA structure of the region (Blank and Goodman, 2001), which could either favor or hinder transcription.

#### Acknowledgements

This work was partially supported by CONACyT 119311 to TNOB and 25122-M to RDC, and by Fideicomiso UNAM to RDC. We also want to thank Juan Carlos Calcino, Rafael Goudea, Diana Millan-Aldaco, Marcela Palomero-Rivero, Alexander de Luna and

1853  
1854  
1855  
1856  
1857  
1858  
1859  
1860  
1861  
1862  
1863  
1864  
1865  
1866  
1867  
1868  
1869  
1870  
1871  
1872

Victor Anaya for their technical assistance, and Ma. Teresa Torres-Peralta for typing the manuscript.

## References

- Angelastro JM, Klimaschewski L, Tang S et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(19):10424–9.
- Palcer-Kubiczek EK, Harrison GH, Davis CC, Haas ML, Koffman BH. Expression analysis of human HL60 cells exposed to 60 Hz square- or sine-wave magnetic fields. Radiat Res 2000;153:670–8.
- Black M, Aletta J, Greene L. Regulation of microtubule composition and stability during nerve growth factor-promoted neurite outgrowth. J Cell Biol 1986;103:545–57.
- Blank M, Goodman R. Electromagnetic initiation of transcription at specific DNA sites. J Cell Biochem 2001;81:689–92.
- Wozniarske E, Al-Barazi H, Casamento J, Davis C, Elson E, Ning J, et al. Comparison of the effect of elf fields on c-myc oncogene expression in normal and transformed human cells. Bioelectromagnetic Society, Thirteenth Annual Meeting, Salt Lake City, UT, 1991, B-2–14.
- Drucker-Colin R, Verdugo-Díaz L, Méndez M, Carrillo-Ruiz J, Morgado-Valle C, Hernández-Cruz A et al. 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 1994;5:485–98.
- Urrutia-Velasco A, Castillo-Medina S, Verdugo-Díaz L, Castellanos E, Orozco-Suárez S, Sánchez-Gómez C et al. Neuronal differentiation of chromaffin cells *in vitro*, induced by extremely low frequency magnetic fields or nerve growth factor: a histological and ultrastructural comparative study. J Neurosci Res 1998;53:569–82.
- Fourney R, Miyakoshi J, Day R, Paterson M. Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. Focus Life Technologies 1987; 10:5–7.
- Goodman R, Blank M. Insights into electromagnetic interaction mechanisms. J Cell Physiol 2002;192:16–22.
- Goodman R, Chizmadzhev Y, Shirley-Henderson A. Electromagnetic fields and cells. J Cell Biochem 1993;51:436–41.
- Goodman R, Henderson AS. Exposure of salivary gland cells to low frequency electromagnetic fields alters polypeptide synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:3928–32.
- Marata Y, Andoh T, Asahara T, Kikuchi A. Yeast glycogen synthase kinase-3 activates Msn2p-dependent transcription of stress responsive genes. Mol Biol Cell 2003;14:302–12.
- Robson J. Influence of electromagnetism on genes and associated structures. Isr J Med Sci 1994;30:245–8.
- Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 1992; 257:967–71.
- Lin H, Blank M, Goodman R. A magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter. J Cell Biochem 1999;75:170–6.
- Lin H, Blank M, Rossol-Haseroth K, Goodman R. Regulating genes with electromagnetic response elements. J Cell Biochem 2001; 81:143–8.
- Liboff AR, Williams T, Strong DM, Wistar R. Time-varying magnetic fields: Effect on DNA synthesis. Science 1984;223:810–20.
- Lyle LB, Wang X, Ayotte R, Chopart A, Adey WR. Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields. Bioelectromagnetics 1991;12:145–56.
- Marron MT, Goodman EM, Sharpe PT, Greenebaum B. Low frequency electric and magnetic fields have different effects on the cell surface. FEBS Lett 1988;230:13–6.
- Morgado-Valle C, Verdugo-Díaz L, García D, Morales-Orozco C, Drucker-Colin R. The role of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. Cell Tissue Res 1997;632:1–14.
- Peng L, Bauer D, Averboukh L, Warthoe P, Rohrwild M, Muller H et al. Analysis of altered gene expression by differential display. Methods Enzymol 1995;254:304–21.
- Phillips J. Effects of electromagnetic field exposure on gene transcription. J Cell Biochem 1993;51:381–6.
- Phillips JL, Haggren W, Adey WR. Effects of 60 Hz magnetic field exposure of specific gene transcription in CEM-CM3 human T-lymphoblastoid cells. Bioelectromagnetic Society, Thirteenth Annual Meeting, Salt Lake City, UT, 1991, B-4–3.
- Shahidain R, Mullins RD, Siskin JE. Calcium spiking activity and baseline calcium levels in ROS 17/2.8 cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields (ELF EMF). Int J Radiat Biol 2001;77(2):241–8.
- Sisken BF, Kanje M, Lundborg G, Kurtz W. Pulsed electromagnetic fields stimulate nerve regeneration *in vivo* and *in vitro*. Restor Neurol Neurosci 1990;1:303–9.
- Takahashi K, Kaneko I, Date M, Fukada E. Effect of pulsing electromagnetic fields on DNA synthesis in mammalian cells in culture. Experimentia 1986;42:185–6.
- Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cell: Impairment by glucocorticoids. Proc Natl Acad Sci U S A 1978; 81:2242–6.
- Verdugo-Díaz L, Palomero M, Drucker-Colin R. Differentiation of chromaffin cells by extremely low frequency magnetic fields changes ratios of catecholamine type messenger. Bioelectrochemistry & Bioenergetics 1998;46:297–300.

# Effects of Extremely Low Frequency Electromagnetic Field Stimulation on Cultured Chromaffin Cells

LETICIA VERDUGO-DÍAZ,<sup>a</sup> TATIANA OLIVARES-BAÑUELOS,<sup>a</sup>  
LUZ NAVARRO,<sup>a</sup> AND RENÉ DRUCKER-COLÍN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F. México

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

**KEYWORDS:** neurite-like; differentiation; NGF; catecholamine release; calcium channel; gene expression

Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF EMF) have a wide variety of effects in biological systems.<sup>1</sup> Rat chromaffin cells *in vitro* show morphological and biochemical changes when exposed to ELF EMF similar to those produced by nerve growth factor (NGF).<sup>2</sup> To date, however, there are no studies comparing the effects of ELF EMF stimulation with those produced by NGF on the morphological and ultrastructural phenotype, on catecholamine release, on membrane excitability, and on gene expression of cultured chromaffin cells.

Cultures of postnatal rat chromaffin cells (differentiated by 50 ng/mL of NGF or ELF EMF for 7 days) were prepared as described by Unsicker *et al.*<sup>3</sup> The ELF EMF stimulation was applied daily at 60 Hz, 0.7 mT, for 2 h in the morning and 2 h in the afternoon.

ELF EMF stimulation produced neurite growth of cultured chromaffin cells in a manner similar to that of NGF exposure. The combination of the two procedures did not induce changes above those observed by NGF alone.<sup>2</sup> Cells stimulated with ELF EMF presented straighter neuritic extensions with a greater number of varicosities. Numerous neurotubules were observed, both in the cell soma and in their neuritic extension.<sup>4</sup> Both NGF- and EMF-treated chromaffin cells released [<sup>3</sup>H]-noradrenaline equally in response to a depolarizing concentration of KCl.<sup>2</sup> Levels of catecholamine on media culture detected by high-performance liquid chromatography showed that differentiated cells released more dopamine than adrenaline, while chromaffin undifferentiated cells released more adrenaline than dopamine<sup>5</sup> (FIG. 1C). Na<sup>+</sup> current density of EMF stimulation increased, but to a lesser extent than that seen in NGF-

Address for correspondence: Dr. René Drucker-Colín, Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 04510 México, D.F. México. Voice: 525-550-6662; fax: 525-550-0904.

drucker@servidor.unam.mx

Ann. N.Y. Acad. Sci. 971: 1-3 (2002). © 2002 New York Academy of Sciences.

treated cells (FIG. 1B). When the L-Ca<sup>2+</sup> channel blocker, nifedipine, was applied simultaneously with ELF EMF, differentiation did not take place, but it did when an N-Ca<sup>2+</sup> channel blocker was used. In contrast, none of the Ca<sup>2+</sup> channel blockers prevented differentiation in the presence of NGF<sup>6</sup> (FIG. 1A).

Finally, the analysis of gene expression using the RT-DD method and 9 arbitrary primers and 1 anchorage primer showed at least 53 differential bands. Three differential bands expressed only in the ELF EMF group and 2 bands that decreased were reamplified, cloned, and sequenced (FIG. 1E). The specific sequences of EMF are not found in the Gene Bank and those that decreased by the stimulus show sequences similar to MAP-2 sequences.

It is assumed that elevations of intracellular Ca<sup>2+</sup> are critical in inducing long-term changes in neurons. Indeed, agents that elevate intracellular Ca<sup>2+</sup> trigger gene expression<sup>7</sup> and induce differentiation and growth.<sup>8</sup> Our results suggest that the enhancement of Ca<sup>2+</sup> currents and the differential gene expression could be some of the mechanisms of action that EMF induce in order to produce the differentiation of chromaffin cells in culture.

#### REFERENCES

1. POOL, R. 1990. Electromagnetic fields: the biological evidence. *Science* **249**: 1378-1381.
2. DRUCKER-COLIN, R. *et al.* 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.
3. UNSICKER, K. *et al.* 1978. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2242-2246.
4. FERIA-VELASCO, A. *et al.* 1998. Neuronal differentiation of chromaffin cells *in vitro*, induced by extremely low frequency magnetic fields or nerve growth factor: a histological and ultrastructural comparative study. *J. Neurosci. Res.* **53**: 569-582.
5. VERDUGO-DÍAZ, L. *et al.* 1998. Differentiation of chromaffin cells by extremely low frequency magnetic fields changes ratios of catecholamine type messenger. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **46**: 287-300.
6. MORGADO-VALLE, C. *et al.* 1998. The role of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. *Cell Tissue Res.* **291**: 217-230.
7. SHENG, M. & M.E. GREENBERG. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**: 447-485.
8. KATER, S.B. & L.R. MILLS. 1991. Regulation of growth cone behavior by calcium. *J. Neurosci.* **11**: 891-899.

**FIGURE 1.** (A) Percentage of chromaffin cells that differentiate into the neuronal cell type. The effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on neurite outgrowth induced by ELF MF is shown. (B) The enhancement of I<sub>Ba</sub> under ELF MF stimulation. Superimposed traces of the same cell under 2 μM nifedipine and 100 μM cadmium. Voltage step to 10 mV from -80 mV. (C) Levels of adrenaline and dopamine in the supernatant of undifferentiated and differentiated (with NGF or ELF MF) chromaffin cells. (D) Photomicrograph of a cultured chromaffin cell showing a typical example of neurite-like growth under ELF MF stimulation for 7 days. (E) Differential expression obtained for 5 bands by the differential display method.