

L'elutriació com a mètode de separació de cèl.lules, aplicable a l'estudi de l'espermatogènesi del gall.

J.Boix i J.Roca

Departament de Fisiologia.Facultat de Medicina.
Universitat de Barcelona.

C/. Casanova 143 Barcelona 36

Abstract: Separation of rooster testis cells by centrifugal elutriation.

Centrifugal elutriation uses liquid flow versus centrifugal force to separate a suspension of single cells or particles. When centrifugal and counterflow forces are balanced, particles larger than a specific size, are concentrated in the rotor forming different bands, while smaller particles are washed out. Varying liquid flow rate or centrifugal force, the operator may obtain the desired separation. A suspension of rooster testis cells (10 ml., 10^7 cells/ml.) was loaded in a standard elutriation chamber. During the separation, the rotor speed was 3000 RPM at 4 C, the initial flow rate was 3 ml/min., and was increased successively to 11, 20, 27, 37, and 75 ml/min. Fractions were collected and studied by phase microscope. The process yielded: 1-Residual bodies and testicular spermatozoa. 2-Elongated spermatids. 3-Round spermatids. 4,5,6- Other spherical meiotic and premeiotic cells of increasing sizes.

Introducció.

Des l'any 1948 hi ha descrita una tècnica de centrifugació en contra d'un fluxe de líquid, per Lindahl a la revista "Nature". Però els mecanismes no es simplificaren i comercialitzaren fins l'any 1971, per "Beckman Apparatus". Els principis bàsics del sistema són l'oposició d'una força centrífuga determinada, a un fluxe de líquid. De l'equilibri d'ambdues forces resulta que les partícules de diferents tamanys formen bandes definides. Aquest fenomen té lloc dintre d'una càmera en un rotor de centrifugació adient, que permet definir entre un petit tub d'entrada i un altre de sortida, un fluxe eficaç en sentit contrari a la centrifugació.

La formació de bandes esmentada, es pot visualitzar a través d'un sistema estroboscòpic. (Fig. 1)

A l'incrementar el fluxe, es produeix el desplaçament de les bandes en equilibri, que arribant a les parets convergents de la sortida de la càmera, escapen de la força centrífuga i es poden recollir a la sortida de l'aparell. L'alta homogeneïtat de les poblacions cel.lulars obtingudes, resulta d'aquesta situació d'equilibri prèvia. L'aparell facilita així, la separació dels diferents tipus de cèl.lules o partícules, que es desitjen separar.

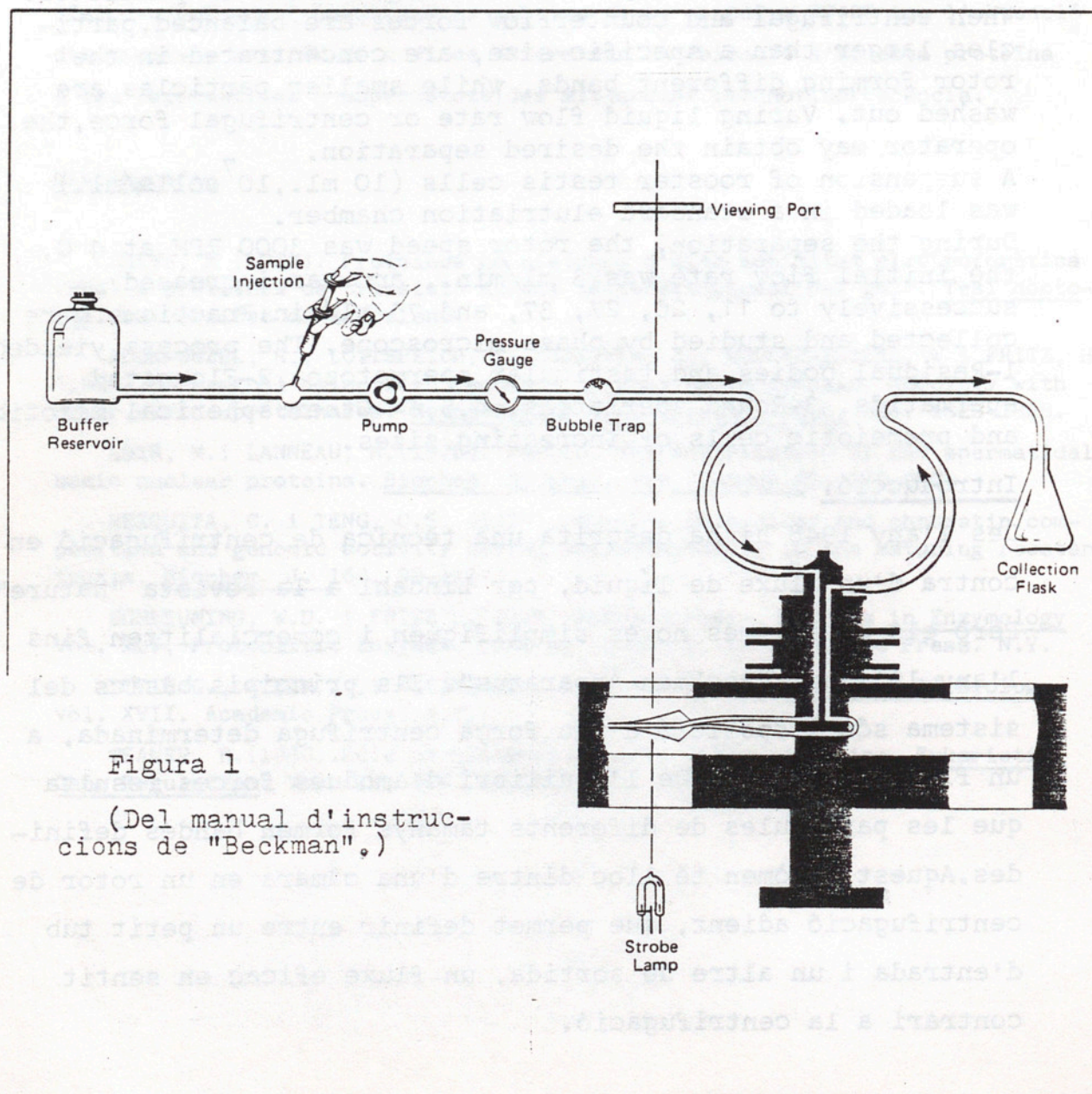


Figura 1

(Del manual d'instruccions de "Beckman".)

Per les seves característiques el mètode explicat, es va dedicar fonamentalment a la separació de cèl.lules de diferents tamany, a partir d'una suspensió, on hi eren barrejades. Hematies de diferent edat, leucòcits de sang perifèrica, cèl. de la melsa, etc...(Sanderson i Bird, 1977)

Durant l'espermatogènesi, les cèl.lules presenten dràstics canvis de tamany, amb taxes de velocitat de sedimentació a 1 g que oscilen de 0,7 a més de 10 mm/hora. Per tant eren susceptibles de ser separades per aquest mètode. (Meistrich, 1977) (Loir i Lanneau, 1977)

El nostre grup, també està interessat en assolir una separació de cèl.lules, amb el màxim d'estadis diferents possibles, en l'espermatogènesi del gall. Fins ara hem utilitzat el mètode de la velocitat de sedimentació a gravetat unitat, tant en nuclis (Mezquita i Teng, 1977) com en cèl.lules.(Oliva et al. 1982)

Aquest sistema té el principal inconvenient de ser lent, ja que requereix 5 hores per a ser realitzat, amb el perill de les alteracions que pot comportar en alguns paràmetres cel.lulars. Actualment disposem del mètode d'elutriació, del que exposarem els resultats, fins ara assolits.

Material i mètodes.

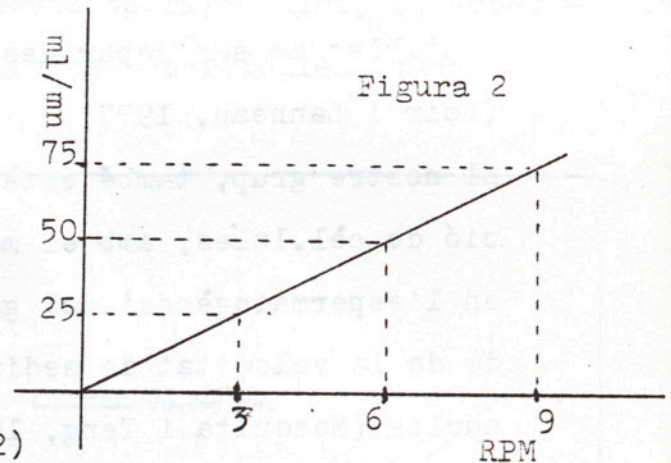
-Galls de la raça Hubbard White Mountain, de 25 a 50 setmanes de vida.

-Preparació d'una suspensió cel.lular de testicle a partir de 25 a 30 gr. de teixit, seccionat acuradament amb tissores corves i afilades. Suspès en 250 cc de M.E.M. amb tripsina al 0,1% (p/v) i incubat a 31 C durant 30 minuts. Filtrat en 4 gasses i centrifugat 20 min. a 2000 RPM en un rotor Beckman

JS-7,5. Resuspengut de nou en 50 cc de M.E.M. contenint inhi-
bidor de la tripsina 0,02% (p/v) i B.S.A. 0,1% (p/v), filtrat
de nou en 6 gasses, i diluït amb PBS a la concentració de cèl.
per ml. dessitjada, és la mostra a elutriar.

-Solució de PBS, com a tampó del sistema d'elutriació. Adient
per l'absència de cations divalents, que evita bona part de
l'agregació cel.lular, que d'altra forma podria interferir el
procés de separació.

-Bomba peristàltica Kontron, de
la que varem procedir a deter-
minar l'equivalència entre el
regulador de les RPM, i el flu-
xe de volum en el sistema d'e-
lutriació. Trobant una relació
lineal, amb pendent= 8,3. (Fig.2)



-Elutriador, és a dir rotor d'elutriació JE-6B i centrífuga
J2-21 de Beckman. Es procedeix a revisar connexions, maniobres
de purga d'aire, i introducció de la mostra, per un circuit
adient a tal finalitat. Un cop introduïda la mostra, ja es co-
mencen a recollir les fraccions elutriades, i augmentant el
fluxe en relació al diàmetre o velocitat de sedimentació a
1 g de les partícules, que dessitjem obtenir, s'obtenen di-
verses fraccions més. Segons la fórmula:

$$F = D^2 \times X \times \left(\frac{\text{RPM}}{1000} \right)^2$$

F= Fluxe en ml./min. D= Diàmetre de la partícula.

X= Constant de Sanderson, que és 0,0378.

RPM= Revolucions per minut del rotor.

Tot això s'expressa gràficament en un normograma (Fig. 3), on
prolongant la línia, que junta 2 punts, es troba el tercer.

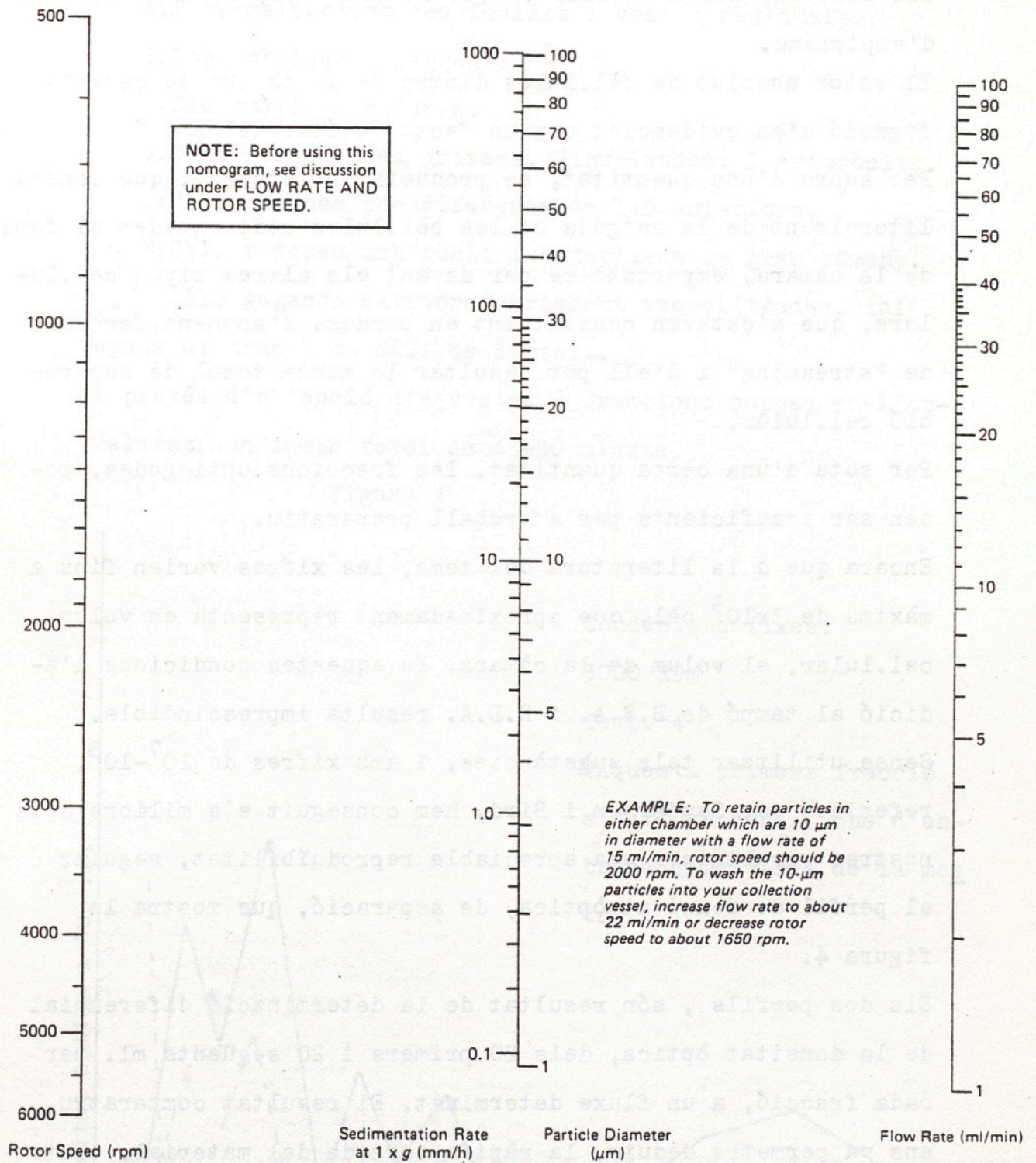


Figura 3 (Del manual d'instruccions de "Beckman".)

Resultats.

De moment creiem, que malgrat l'ajut important de tot l'esmentat, les determinacions de les característiques exactes

del sistema, per a obtenir el que es desitja, té una bona part d'empirisme.

El valor absolut de cèl.lules dintre de la càmera de centrifugació s'ha evidenciat com un factor crític del procés.

Per sobre d'una quantitat, es produeix un fenomen, que consta literalment de la caiguda de les cèl.lules sedimentades al fons de la càmera, emportant-se per davant els altres tipus cel.lulars, que s'estaven constituint en bandes. S'anomena fenomen de "streaming" i d'ell pot resultar la manca total de separació cel.lular.

Per sota d'una certa quantitat, les fraccions obtingudes, poden ser insuficients per a treball preparatiu.

Encara que a la literatura del tema, les xifres varien fins a màxims de 3×10^9 cèl, que aproximadament representa en volum cel.lular, el volum de la càmera. En aquestes condicions l'addició al tampó de B.S.A. i N.D.A. resulta imprescindible.

Sense utilitzar tals substàncies, i amb xifres de 10^7 - 10^8 , referides per Sanderson i Bird, hem conseguit els millors dels nostres resultats i una apreciable reproduïbilitat, seguint el perfil de densitat òptica, de separació, que mostra la figura 4.

Els dos perfils, són resultat de la determinació diferencial de la densitat òptica, dels 20 primers i 20 següents ml. per cada fracció, a un fluxe determinat. El resultat comparatiu ens va permetre deduir, la ràpida sortida del material, tant bon punt variant el fluxe, hi ha unes noves condicions d'equilibri. (Els 20 primers són la línia continua, en la fig.4) La determinació a microscopia òptica de contrast de fase, ens permet concloure l'alta pureça i adequada separació dels tipus cel.lulars, de la suspensió cel.lular del testicle del

gall. Les fraccions escullides i agrupades del perfil mostren:

A: Espermatozoides testiculars i cossos residuals.

B: Espermàtides allargades.

C: Espermàtides rodones.

D: Cèl. rodones més grosses. Binucleades. I eritròcits.

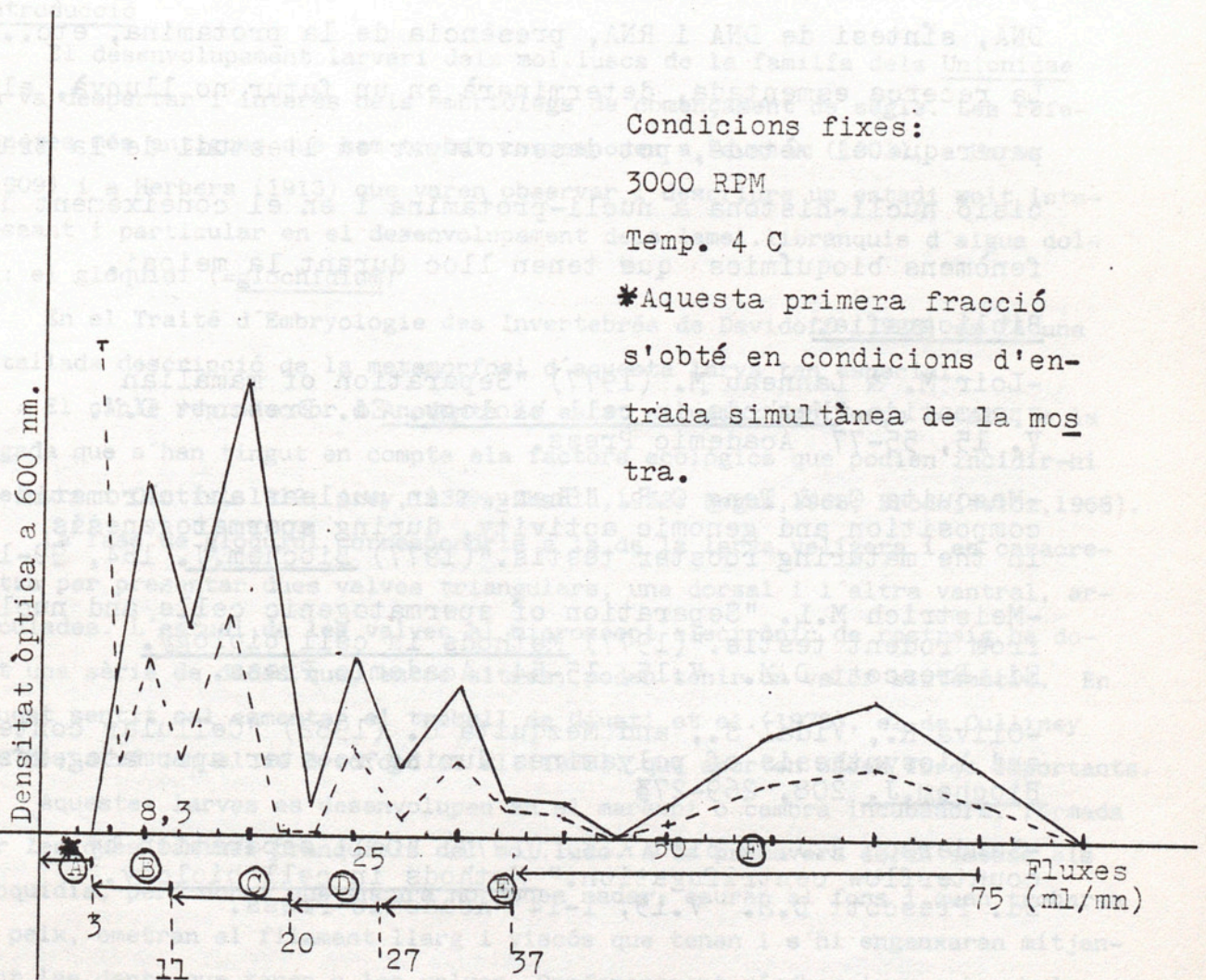
E: Cèl. rodones poc diferents de les anteriors.

F: Cèl. rodones amb nucli i citoplasma de gran tamany.

Cèl. gegants extraordinàriament vacuolitzades, tal vegada es tracta de cèl. de Sertoli.

El procés d'obtenció d'aquestes 6 fraccions suposa en l'actualitat, un temps total de 45-50 minuts.

Figura 4



Discusió.

Actualment estem iniciant-nos en el coneixement de les possibilitats de l'aparell. Un fet interessant ja, és que amb menys d'una hora podem separar tipus cel.lulars diferenciats i amb apreciable pureça. Les perspectives són treballar amb fraccions enriquides en cèl. allargades o rodones, per distingir-hi diferents estadis de diferenciació. Utilitzarem també testicle inmadur, per a caracteritzar on s'ubiquen les espermatogònies i les cèl. de Sertoli, en els perfils esmentats.

Per a identificar millor els tipus cel.lulars, determinarem diferents paràmetres bioquímics de referència. (Quantitat de DNA, síntesi de DNA i RNA, presència de la protamina, etc...)

La recerca esmentada, determinarà en un futur no llunyà, el paper que el mètode, pot desenvolupar en l'estudi de la transició nucli-histona a nucli-protamina i en el coneixement dels fenòmens bioquímics que tenen lloc durant la meiosi.

Bibliografia.

- Loir M. & Lanneau M. (1977) "Separation of mamalian spermatids." Methods in cell biology. Ed. Prescott D.M. V. 15, 55-77 Academic Press.
- Mezquita C. & Teng C.S. "Changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity, during spermatogenesis in the maturing rooster testis." (1977) Biochem.J. 164, 99-111
- Meistrich M.L. "Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testis." (1977) Methods in cell biology. Ed. Prescott D.M. V.15, 15-54 Academic Press.
- Oliva R., Vidal S., and Mezquita C. (1982) "Cellular content and biosynthesis of polyamines during rooster spermatogenesis." Biochem.J. 208, 269-273
- Sanderson R.J. & Bird K.E. (1977) "Cell separation by counterflow centrifugation." Methods in cell biology. Ed. Prescott D.M. V.15, 1-14 Academic Press.