

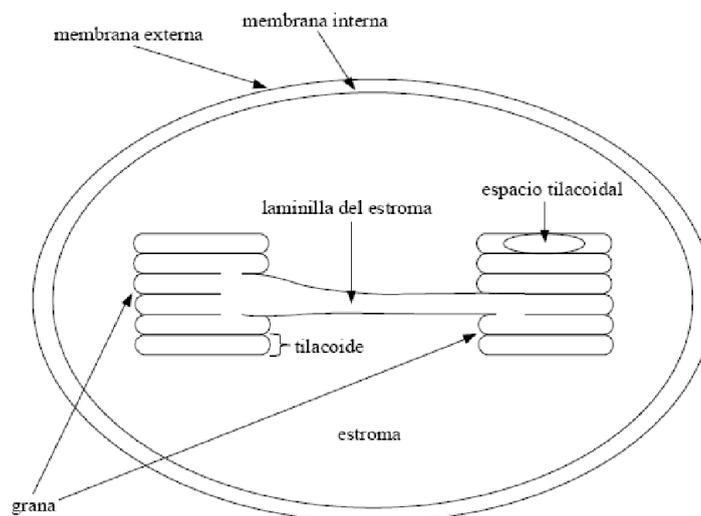
## Práctico 10 - Modalidad virtual - CLOROPLASTOS

### Objetivos:

- Identificar cloroplastos en una fracción subcelular enriquecida en este organelo.
- Analizar la ultraestructura del cloroplasto.

### Introducción:

En algas y plantas superiores, la fotosíntesis ocurre en los cloroplastos. Este organelo posee, al igual que la mitocondria, una envoltura compuesta de dos membranas, una externa y una interna, pero además posee un tercer sistema de membrana, la membrana tilacoidal. Esta membrana forma pequeños sacos aplanados, denominados tilacoides, cuyo lumen es el espacio tilacoidal. Los tilacoides se apilan, formando bloques denominados *grana* (cada bloque en singular es un *granum*). Los grana están interconectados por regiones de la membrana tilacoidal alargadas, denominadas laminillas del estroma, cuyo lumen es continuo con el espacio tilacoidal. El estroma es el espacio interno del cloroplasto que queda por fuera de la membrana tilacoidal (Figura 1).



**Figura 1:** Representación esquemática de un cloroplasto.

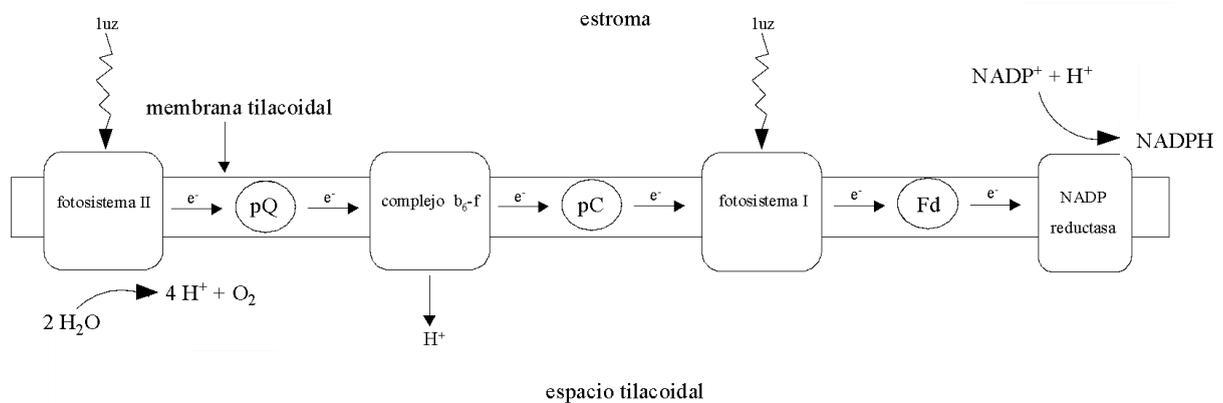
La fotosíntesis es un proceso complejo en el cual la energía de la luz se usa para generar energía química en forma de ATP y poder reductor en forma de NADPH, que se usan a su vez para convertir el  $\text{CO}_2$  del aire en carbohidratos, liberándose paralelamente  $\text{O}_2$  a partir de agua (en plantas, algas y algunas bacterias). La reacción global de la fotosíntesis es:



Las reacciones de la fotosíntesis pueden agruparse en dos clases, las reacciones fotoquímicas, que ocurren en la membrana tilacoidal y en las que se generan ATP y NADPH, y las reacciones bioquímicas, que comienzan en el estroma del cloroplasto y continúan en el citosol, en las que el  $\text{CO}_2$  es convertido en carbohidratos.

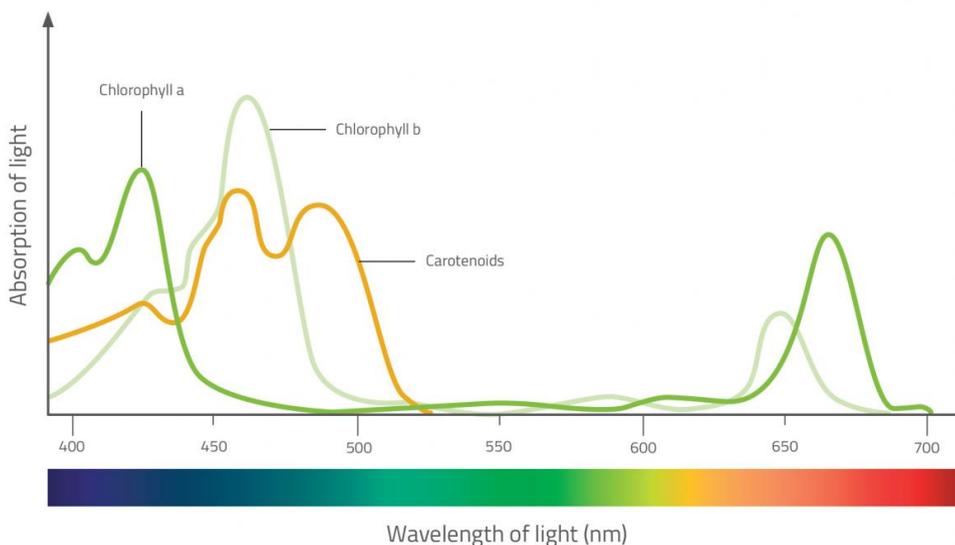
Las reacciones fotoquímicas, mediante las que se obtiene ATP y NADPH, constituyen un proceso de dos fases, denominado fotofosforilación no cíclica, para distinguirlo de otro proceso, la fotofosforilación cíclica, en el que sólo se genera ATP. En la primera fase de la fotofosforilación no cíclica, la absorción de energía de luz por el fotosistema II le permite

remover electrones provenientes del agua y transferirlos a una cadena de transporte, hasta llegar al fotosistema I. Allí, un nuevo evento de absorción de energía proveniente de la luz confiere suficiente energía a los electrones para poder reducir a su aceptor final, el  $\text{NADP}^+$ , formando NADPH (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema del camino seguido por los electrones durante las reacciones fotoquímicas.

Los fotosistemas son complejos formados por varios polipéptidos y distintos tipos de pigmentos (clorofila, carotenoides), y en ellos la luz de diferentes longitudes de onda (figura 3) es absorbida y se utiliza para excitar a un electrón en una molécula de clorofila ubicada en el centro de reacción. En el fotosistema II, este electrón es transferido a la plastoquinona, una pequeña molécula análoga a la coenzima Q de la fosforilación oxidativa. Cada electrón transferido por el fotosistema II se repone con uno proveniente del agua, en una compleja reacción cuyo resultado final es la liberación de  $\text{O}_2$  a partir de agua. La plastoquinona transfiere electrones al complejo  $b_6-f$ , análogo al complejo  $b-c_1$  de la mitocondria, el cual bombea protones dentro del espacio tilacoidal. La plastocianina, una proteína pequeña que contiene un átomo de cobre que varía de estado de oxidación, transporta electrones desde el complejo  $b_6-f$  hasta el fotosistema I. Allí, la absorción de un fotón aumenta la energía de estos electrones, que pueden reducir a la ferredoxina, una proteína con un grupo prostético que contiene hierro y azufre. Ésta, a su vez, transfiere los electrones al  $\text{NADP}^+$ , en una reacción catalizada por la enzima NADP reductasa. Además de generar NADPH, este proceso de transporte de electrones provoca la acumulación de protones en el espacio tilacoidal, con la consecuente generación de un gradiente electroquímico a través de la membrana tilacoidal, el cual es usado para sintetizar ATP.



**Figura 3.** Espectro de absorción de la clorofila a, b y de  $\beta$ -caroteno.

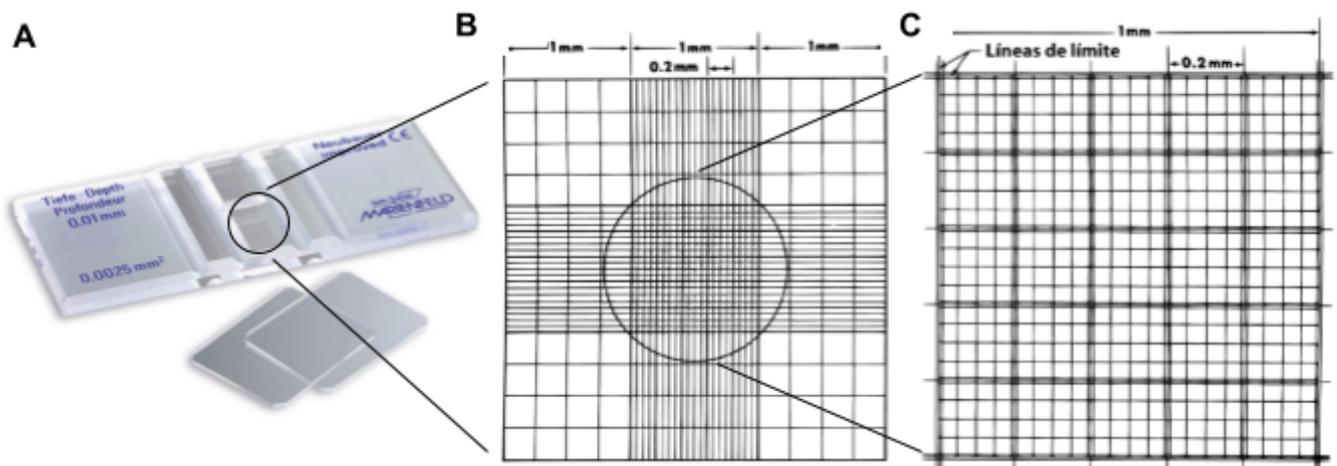
## **Actividad práctica**

En el práctico de esta semana analizaremos la presencia de cloroplastos obtenidos mediante fraccionamiento subcelular a partir de la homogeneización de tejido vegetal (espinaca). Los principios del fraccionamiento subcelular fueron discutidos en prácticos anteriores.

A continuación, se detalla un protocolo que se puede utilizar para la obtención de una fracción enriquecida en cloroplastos a partir de hojas de espinaca (este protocolo no lo llevaremos a cabo en el curso 2021):

- 1.- Colocar el mortero en hielo.
- 2.- Cortar las hojas descartando las ramas principales de tejido vascular (para esto es mejor tomar las hojas por el envés).
- 3.- Triturar en mortero con 10 mL de buffer Tris-HCl/NaCl.
- 4.- Filtrar en gasa.
- 5.- Centrifugar a 400 g (50%) a 4°C por 1 min.
- 6.- Centrifugar el sobrenadante a 1000 g (90%) a 4°C por 5 min.
- 7.- Resuspender el pellet con 10 mL de buffer.

**PARTE A.** Con la fracción subcelular obtenida, realizaremos una cuantificación del número de cloroplastos por unidad de volumen de fracción. Para ello utilizaremos una cámara de Neubauer (también llamado hemocitómetro; figura 3). A continuación, se detalla el procedimiento a realizar para realizar la determinación:



**Figura 3. Cámara de Neubauer.** A) Del tamaño de un portaobjetos, contiene dos grillas delimitadas por ranuras. B) Observación de una de esas grillas en el microscopio óptico a bajo aumento. C) Luego de colocar el vidrio cubreobjeto se forma un espacio con dimensiones definidas que corresponde a 0,1  $\mu$ L en la región cuya imagen magnificada se muestra en (C).

- 1.- Colocar en un tubo de ensayo 4,75 mL de buffer y agregar 0,25 mL de la fracción enriquecida en cloroplastos. Mezclar bien para asegurarse que los cloroplastos están en suspensión.
- 2.- Tomar un hemocitómetro o cámara de Neubauer limpio y seco y colocar el cubreobjetos. Tomar un volumen pequeño (5-10  $\mu$ L) de la suspensión de cloroplastos diluida con una pipeta Pasteur de punta fina y cargar el hemocitómetro dejando que la gota de la punta de la pipeta se deslice entre porta y cubre por capilaridad, cuidando que no se sobrecargue y fluya hacia el espacio entre el cubre y los surcos a los lados de la cámara. Si esto ocurriera, limpiar y secar la

cámara y finalmente limpiar con un pañuelo de papel con alcohol y volver a comenzar. El volumen de conteo es de 0,1µL.

3.- Utilizando el objetivo de 40X, contar el número de cloroplastos en el cuadrado central de la cámara de conteo (el que está separado por un borde triple y que está dividido en 20 grupos de 16 cuadraditos (figura 3).

En el curso 2021, analizaremos imágenes de una fracción diluida de cloroplastos ya cargados en la cámara de Neubauer.

**PARTE B.** Comprobación de la presencia de cloroplastos en la fracción subcelular obtenida mediante la reacción de Hill.

En 1937, Robert Hill descubrió que cuando cloroplastos aislados son iluminados en ausencia de CO<sub>2</sub>, son capaces de reducir un aceptor artificial de electrones (A), liberando O<sub>2</sub> paralelamente. Este resultado fue una de las primeras demostraciones de que el CO<sub>2</sub> no participa directamente en el proceso que produce O<sub>2</sub>, y puede resumirse en la siguiente reacción química, denominada **reacción de Hill**:



Como aceptor artificial de electrones utilizaremos DCPIP que, como vimos anteriormente, absorbe luz a 600nm cuando se encuentra en su forma oxidada y al aceptar electrones se torna incoloro. De esta forma la reacción puede ser monitoreada en un espectrofotómetro a través del cambio de absorbancia. En la reacción de Hill el DCPIP toma el lugar del NADP<sup>+</sup>, aceptando los electrones que llegan a la NADP-reductasa. De esta forma en presencia de DCPIP la fotólisis del agua continúa aún cuando el suministro de NADP<sup>+</sup> se haya agotado.

En el curso 2021 analizaremos los resultados obtenidos a partir del experimento que se detalla en el informe de práctico. Además, analizaremos el efecto del herbicida DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) que inhibe la fotosíntesis al bloquear el sitio de unión de la plastoquinona al fotosistema II.

**PARTE C.** Realizaremos un ejercicio de análisis de algunos resultados publicados sobre dinámica de cloroplastos.

## LECTURAS RECOMENDADAS

- **Capítulo 14, Bruce Alberts 6ta Edición**
- **Capítulo 12, Lodish 8a Edición**
- **Teórico 9**