

Ultraestructura de rotavirus

Francisco Hernández

Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica.

Hiroshi Akahori,

Naka Works, Hitachi Ltd., Japón.

(Recibido: 18 de junio de 1985)

Abstract: The human rotavirus is an icosadeltahedral structure, with a characteristic pattern of a triangulation number (T) of 13 with a skew symmetry. The inner layer of the rotavirus has 132 morphological units, with 260 structural units of trimetric structure. It is possible that the outer layer is a smooth geodesic shell.

Los virus isomórficos ultraestructuralmente corresponden a modelos icosaedrales (Crick y Watson, 1956; Gaspar y Klug, 1962). El icosaedro deriva de la subdivisión de las caras de un icosaedro en un determinado número de triángulos equiláteros, denominado índice de triangulación (T). A su vez, el icosaedro es un sólido de 20 caras triangulares equiláteras, que delimitan 30 lados y 12 vértices, caracterizándose esta estructura por presentar los ejes de simetría 2, 3 y 5 (Horne y Wildy, 1961).

La envoltura viral o cápside, está constituida por unidades morfológicas o capsómeros, que a su vez están integrados por unidades estructurales y éstas por subunidades. Por cada virión isomórfico, existen dos tipos de capsómeros: pentámeros, que corresponden a arreglos de cinco unidades estructurales y que se localizan en los vértices del icosaedro, por lo tanto hay 12 pentámeros por virión. El otro tipo de capsómero es el hexámero y su número depende del índice T del virus analizado. En la mayoría de los virus, los hexámeros se localizan distribuidos regularmente a partir de los bordes de cada una de las caras del virión, siendo posible contar el número de capsómeros localizados en el eje que une dos pentámeros vecinos, lo que se conoce como índice *n*. Es posible calcular el número total de capsómeros (N) de un virión, aplicando la fórmula: $N = 10(n-1)^2 + 2$ (Horne, 1974). Sin embargo, existen algunos ejemplos de virus con simetría oblícuca, en los cuales no se localizan hexámeros en el eje que une dos pentámeros vecinos (Yanagida, 1977)

y por lo tanto, no es posible calcular el índice *n* y obviamente a través de este proceso no es posible calcular el número total de capsómeros en esos virus.

El número de capsómeros de un virus se puede calcular en forma aproximada, mediante el número de capsómeros periféricos (ncp) que muestra la partícula, a partir de la fórmula: $N = (ncp)^2 / \pi$ (Roseto *et al.*, 1979).

A la vez, el número de capsómeros periféricos se puede contar en microfotografías procesadas mediante la técnica de reforzamiento de imágenes por rotación (Marhkam *et al.*, 1963).

En cuanto a la ultraestructura de rotavirus se han hecho varias descripciones, que son contradictorias entre sí (Esparza y Gil, 1978; Kogasaka *et al.*, 1979; Martin *et al.*, 1975; Roseto *et al.*, 1979; Stannard y Schoub, 1977). Sin embargo, hay un acuerdo general en considerar que este virus presenta una doble capa o cápside, e incluso dos grupos de investigadores coincidieron en afirmar que la capa externa presenta una serie de perforaciones hexagonales que le brindan un aspecto de panal de abejas (Stannard y Schoub, 1977; Kogasaka *et al.*, 1979). Pero en lo referente a la ultraestructura de la capa interna, los informes publicados discrepan en cuanto al número de capsómeros, índice T e incluso en el número de capsómeros periféricos. En el cuadro 1 se resumen los datos más relevantes de las descripciones ultraestructurales de rotavirus.

Este informe pretende dar una visión de conjunto respecto a la ultraestructura de rotavirus, empleando varias técnicas de análisis al microscopio electrónico, que permiten obtener información complementaria.

MATERIAL Y METODOS

Virus: Se analizaron muestras de heces positivas por rotavirus, provenientes de niños con diarrea y de terneros. En ambos casos las muestras se clarificaron mediante centrifugación a 2000 g. durante 30 minutos y luego se concentraron mediante ultracentrifugación a 100000 g durante una hora.

Tinción Negativa: Se hicieron extendidos de rotavirus sobre láminas de mica y se procesaron de acuerdo con la técnica de doble tinción negativa de Horne y Ronchetti (1974). Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión (MET: Hitachi HU-12A). Algunos especímenes fueron fotografiados en ángulos de inclinación de 5, 10 y 20 grados, respecto al eje del haz de electrones, empleando un dispositivo de inclinación (Hitachi HK 6) adaptado al MET. Además, se analizaron los patrones de difracción óptica de algunas de esas microfotografías (Klug y Berger, 1964; Klug y Rosier, 1966; Soley *et al.*, 1983).

Refuerzo de imágenes: Los negativos fotográficos de viriones sometidos a diversos ángulos de inclinación fueron impresos según el método de refuerzo de imágenes por rotación de Markham *et al.*, (1963).

Réplicas de platino: Algunos concentrados de rotavirus fueron congelados en nitrógeno líquido y el agua de las preparaciones se sublimó a -90°C durante una hora, en un evaporador de metales (Hitachi HU-S5). Luego los viriones fueron sombreados con platino, en un ángulo de incidencia de 45° a 10^{-7} torr. evaporando el metal. Posteriormente la materia orgánica de esas preparaciones fue digerida con hipoclorito de sodio al 10%, liberándose así la réplica de platino de los viriones, la que fue recogida sobre rejillas de cobre para microscopía y analizada en el MET. Además, se fotografiaron viriones, inclinando la preparación -5 y $+5$ grados, respecto a la posición normal, de manera que entre ambas microfotografías había 10° de diferencia; estos pares de imágenes constituyen estereo

pares, que pueden analizarse mediante un estereoscopio para obtener una visión tridimensional.

RESULTADOS

Estructura general: Tanto los rotavirus de origen humano como bovino presentaron un aspecto idéntico. En ambos casos se observaron partículas lisas, cuyo diámetro promedio fue de $71,6 \pm 1,03$ nm y partículas rugosas de $61,1 \pm 2,2$ nm (Fig. 1). A la vez, los viriones vacíos cuyo interior fue ocupado por el "colorante" electrodensito, mostraron una estructura central hexagonal, compatible con una arquitectura viral icosaédrica.

Número de Unidades Periféricas y número total de capsómeros: El análisis de microfotografías procesadas mediante la técnica de refuerzo de imágenes por rotación, mostró que un mismo virion, fotografiado en diversos ángulos de inclinación presentaba imágenes claras cuando se hacía rotar 20 ó 21 veces. En la figura 2 se muestran estos hallazgos: la serie A corresponde al virion fotografiado en condiciones de operación normal en el MET, o sea sin inclinación, y muestra que esta partícula presenta imágenes claras con 20 y 21 giros; en tanto la serie B, corresponde al virus inclinado 5° , la imagen más clara es la de 20 giros, mientras que en la serie D, con un inclinación de 20° la imagen más clara es la de 21 giros. De manera que para el mismo virion es posible contar 20 ó 21 unidades periféricas, según el ángulo en que se analice.

El número de capsómeros total (N) se puede calcular a partir del número de capsómeros periféricos (ncp), suponiendo que éste representa un promedio entre 20 y 21, obteniéndose un valor de 133,8 cuyo valor más cercano al número de capsómeros de una estructura icosaédrica es 132 (Roseto *et al.*, 1979). Además, si se calcula el índice de triangulación a partir de 133,8 capsómeros, aplicando los principios de cuasiequivalencia de Gaspar y Klug (1962), según la fórmula $T = (N - 12) / 6 + (12.5) / 60$ (Horne, 1974); se obtiene un valor de 13.1; que sería equivalente a 13, que corresponde al índice de triangulación de un virion de simetría oblicua, con una cápside integrada por 132 capsómeros.

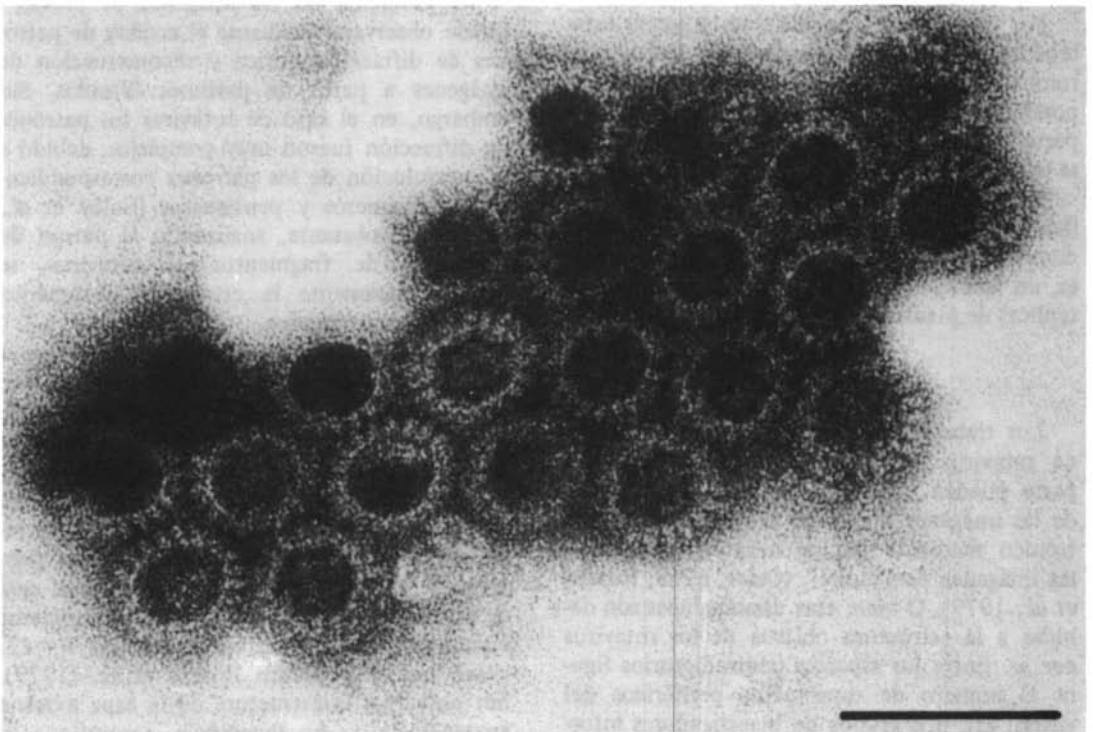
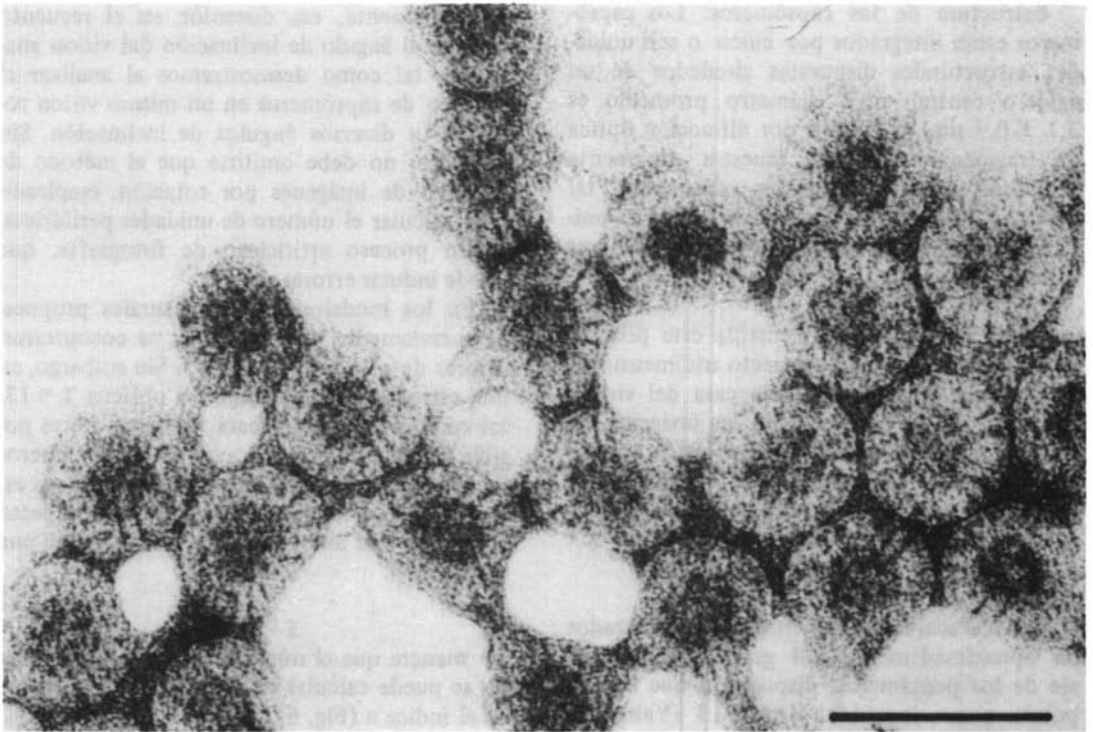
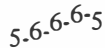


Fig. 1. Tinción negativa de rotavirus, A. Grupo de viriones lisos o completos, o sea que presentan cápsida interna y externa. B. Viriones rugosos, han perdido la capa externa, por lo cual presentan un borde dentado, conferido por los capsómeros de la cápsida interna. La flecha señala un virión liso. (Barra = 100 mm).

Estructura de los capsómeros: Los capsómeros están integrados por cinco o seis unidades estructurales dispuestas alrededor de un agujero central cuyo diámetro promedio es $3,7 \pm 0,9$ nm. El análisis por difracción óptica de fragmentos de virus muestra claramente el patrón hexamérico de los capsómeros, tal como se ilustra en la figura 3. A la vez, las unidades estructurales están integradas por tres subunidades.

Réplicas de platino: Mediante este proceso se obtienen imágenes de aspecto tridimensional que corresponden a una sola cara del virion, obviando así el problema de las imágenes de "moiré". En estas microfotografías se aprecia claramente la disposición de los hexámeros entre dos pentámeros vecinos, cuyo patrón es:



(Fig. 4). O sea, los hexámeros están desplazados en aproximadamente -14 grados respecto al eje de los pentámeros, disposición que corresponde a un icosaedro T-13 (Yanagida, 1977).

Por otra parte, el análisis de imágenes esteoscópicas, muestra una serie de estructuras rombales, en la superficie del virion que corresponden a dímeros de unidades estructurales, pertenecientes a dos capsómeros vecinos, como se aprecia en la figura 5.

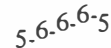
En cuanto a la capa externa, nuestros hallazgos indican que su espesor es de aproximadamente 10 nm y su superficie externa es lisa, no fenestrada, como puede apreciarse en las réplicas de platino.

DISCUSION

Los trabajos previos sobre la ultraestructura de rotavirus presentan discrepancias, que en parte pueden explicarse por artificios propios de las imágenes obtenidas al microscopio electrónico mediante tinción negativa, como son las imágenes de "moiré" (Oster, 1968; Roseto *et al.*, 1979). O bien, esas discrepancias son debidas a la estructura oblicua de los rotavirus *per se*. Entre los aspectos contradictorios figura el número de capsómeros periféricos del virion; así, dos grupos de investigadores informaron el hallazgo de 20 unidades (Martin *et al.*, 1975; Kogasaka *et al.*, 1979), mientras que Esparza y Gil (1979) calcularon 21 unidades.

Aparentemente, esa disensión en el recuento se debe al ángulo de inclinación del virion analizado, tal como demostramos al analizar el número de capsómeros en un mismo virion sometido a diversos ángulos de inclinación. Sin embargo, no debe omitirse que el método de refuerzo de imágenes por rotación, empleado para calcular el número de unidades periféricas, es un proceso artificioso de fotografía, que puede inducir errores.

En los modelos ultraestructurales propuestos previamente para rotavirus, se encontraron valores de $n = 3$, $n = 4$, $n = 5$. Sin embargo, en una estructura icosaedrica oblicua T = 13, tal como proponemos para rotavirus, no es posible calcular el índice n , ya que los hexámeros localizados entre dos pentámeros vecinos, están en un eje desplazado en -14° con respecto al eje que une ambos pentámeros, o sea en una disposición



De manera que el número total de capsómeros no se puede calcular en este modelo, basándose en el índice n (Fig. 6).

El problema de las imágenes de "moiré" puede observarse mediante el análisis de patrones de difracción óptica y reconstrucción de imágenes a partir de patrones filtrados. Sin embargo, en el caso de rotavirus los patrones de difracción fueron muy complejos, debido a la convolución de los patrones correspondientes a hexámeros y pentámeros (Soley *et al.*, 1983). No obstante, analizando el patrón de difracción de fragmentos de rotavirus, se dilucidó claramente la estructura hexamérica de algunos capsómeros.

Otro método para eliminar las imágenes de "moiré", es analizar réplicas de platino obtenidas de viriones (Roseto *et al.*, 1979); con este método se obtienen imágenes claras correspondientes a la cara superior del virion, ya que es la única superficie de la partícula recubierta por el platino. El análisis de réplicas permitió identificar al menos dos pentámeros en cada partícula de rotavirus, que mostraron una disposición de capsómeros compatible con un patrón de simetría T = 13, como había propuesto Roseto *et al.*, (1979). Sin embargo, la estructura de la capa externa apareció lisa y no fenestrada, contrario a lo que otros autores habían propuesto (Stannard y Schoub, 1978; Kogasaka *et al.*, 1979; Roseto *et al.*, 1979).

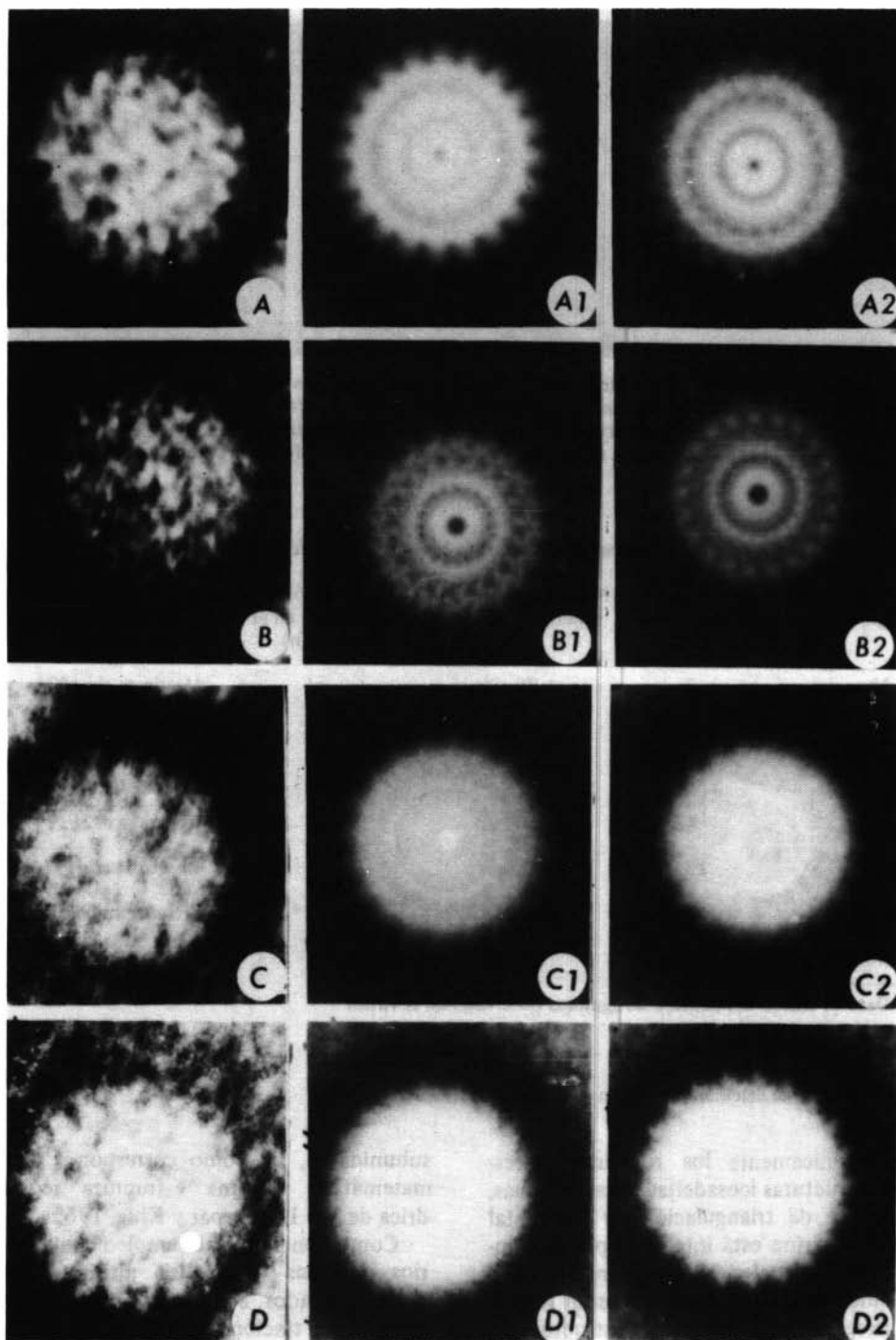


Fig. 2. Arreglo fotográfico de una partícula de rotavirus. La columna de la izquierda corresponde a micrografías tomadas directamente al microscopio electrónico. A. En condición normal. B, C y D. Inclinando la preparación 5, 10 y 20 grados respectivamente. Las columnas central y derecha corresponden a fotografías procesadas según la técnica de reforzamiento de imágenes por rotación. La columna central corresponde a 20 giros y la derecha a 21 giros. Nótese que la foto A-1 muestra un perfil claro, indicando que el virión presenta 20 estructuras periféricas. No obstante la misma partícula inclinada 20 grados (Fig. D-2) presenta 21 unidades periféricas. (Para más detalles ver el texto).

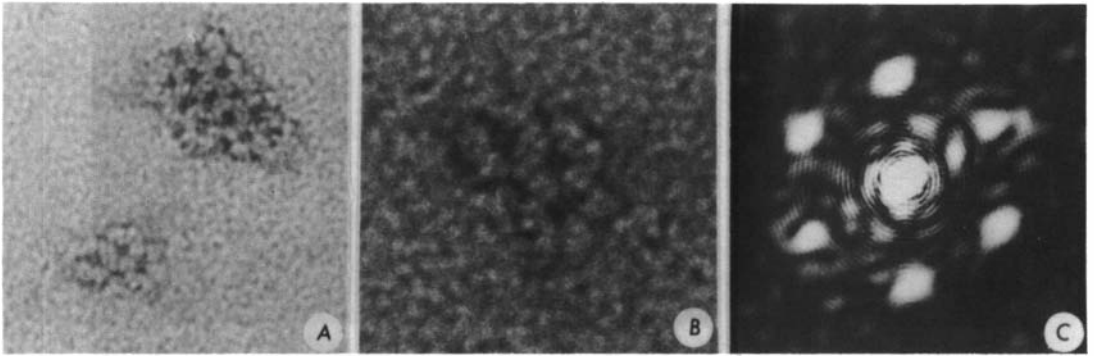


Fig. 3.A. Fragmentos de cápsida de rotavirus (tinción negativa) que muestran un arreglo de capsómeros hexaméricos. En la figura B se muestra uno de los segmentos a mayor magnificación. La fotografía C corresponde al patrón de difracción del fragmento de la foto B; obsérvese el patrón claro que indica un arreglo de seis unidades coordinadas, que confirma la estructura hexamétrica. (Para mayor información consultar la referencia de Soley *et al.* 1983).

CUADRO 1

Análisis ultraestructural de la cápsida interna de rotavirus

No. de capsómeros (o agujeros)	Índice de triangulación (T)	No. de unidades periféricas	No. de capsómeros (o huecos) en el borde (n)	Referencia
32	3	20	ni	Martin <i>et al.</i> , 1975
180	9*	ni	4	Stannard y Schoub, 1977
162	16	21	5	Esparza y Gil, 1978
42	4	20	3	Kogasaka <i>et al.</i> , 1979
132	13**	ni	ni	Roseto <i>et al.</i> , 1979
132	13**	20 o 21	***	Presente trabajo

ni = No informado

* Dato obtenido del número de agujeros observado en el virión

** Icosadeltaedro oblícuo

*** No es posible calcular el índice n en el modelo oblícuo

Arquitectónicamente los rotavirus corresponden a estructuras icosadeltaédricas oblícuas, con un índice de triangulación de 13 en tal forma que el virión está integrado por 32 capsómeros, de los cuales 12 son pentámeros y 120 hexámeros. Esos capsómeros están formados por arreglos de 5 ó 6 unidades estructurales, dispuestas alrededor de un agujero y esas unidades estructurales son compartidas por los capsómeros vecinos, formando dímeros rombales; así el virión está integrado por 260 unidades estructurales, las que presentan un carácter trimérico, de manera que el virión tiene 760

subunidades, tal como corresponde al análisis matemático de una estructura icosadeltaédrica de $T = 13$ (Caspar y Klug, 1962).

Como conclusión, el empleo conjunto de varios métodos de análisis ultraestructural de virus, aplicados a la microscopía electrónica, como son: tinción negativa, rotación de Markham, difracción óptica y réplicas de platino, permitió confirmar uno de los patrones ultraestructurales propuestos para rotavirus, y a la vez discernir los posibles errores que indujeron los resultados conflictivos de otras investigaciones.

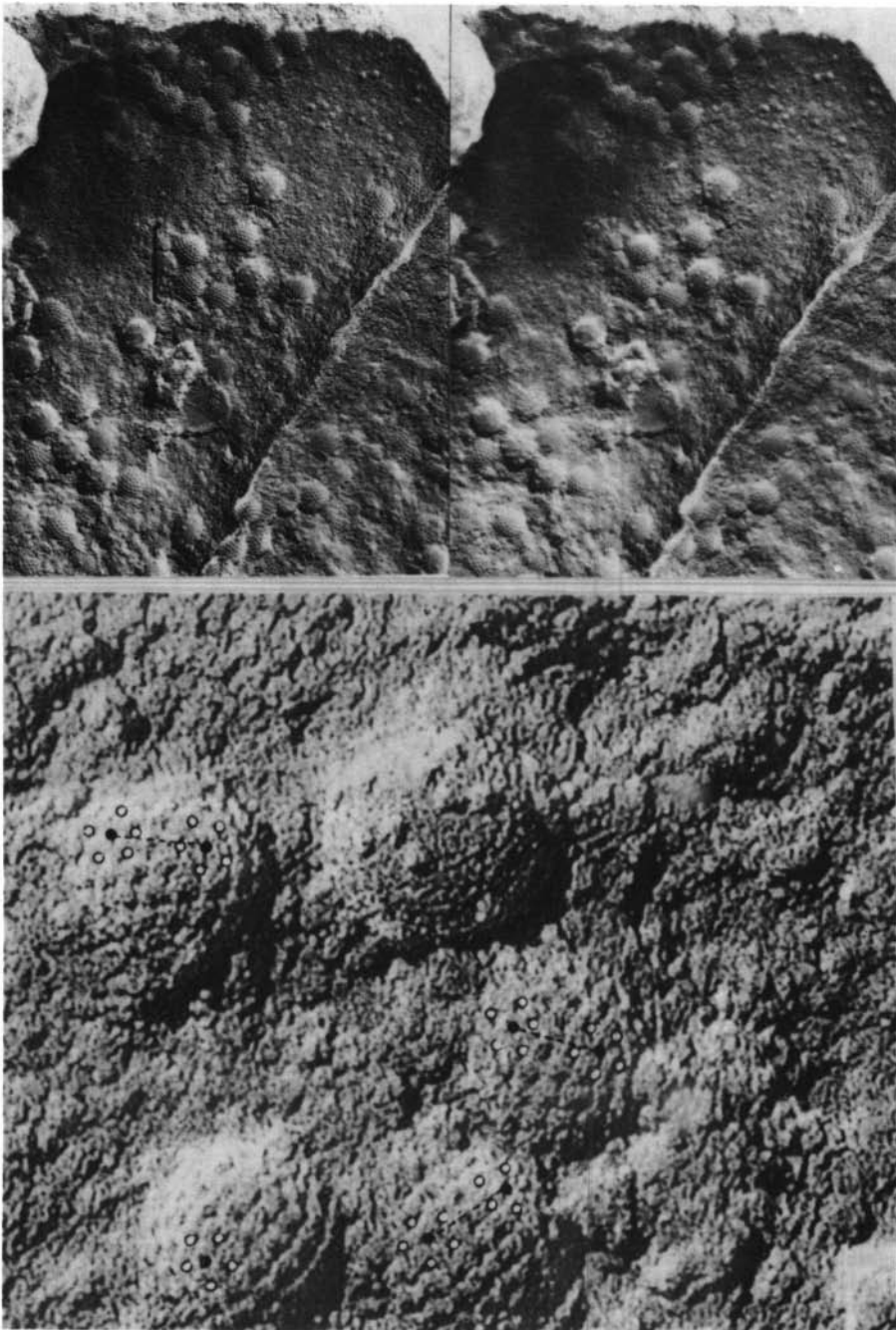


Fig. 4. Réplicas de platino. Las dos micrográficas superiores fueron fotografiadas inclinando la preparación $-5 + 5$ grados, constituyendo un par estereoscópico. Su observación a través de un antejo estéreo permitirá apreciar los viriones tridimensionales, pudiendo deducirse fácilmente su patrón estructural.

La fotografía inferior corresponde al grupo de viriones señalado. Se han indicado los pentámeros identificados en esas partículas, señalando con un círculo negro la unidad (agujero) central de cada pentámero. La línea interrumpida indica el borde del icosaedro, nótese que los hexámeros (círculos blancos) están desplazados de ese eje, por lo que no es posible calcular el índice n en este virus.

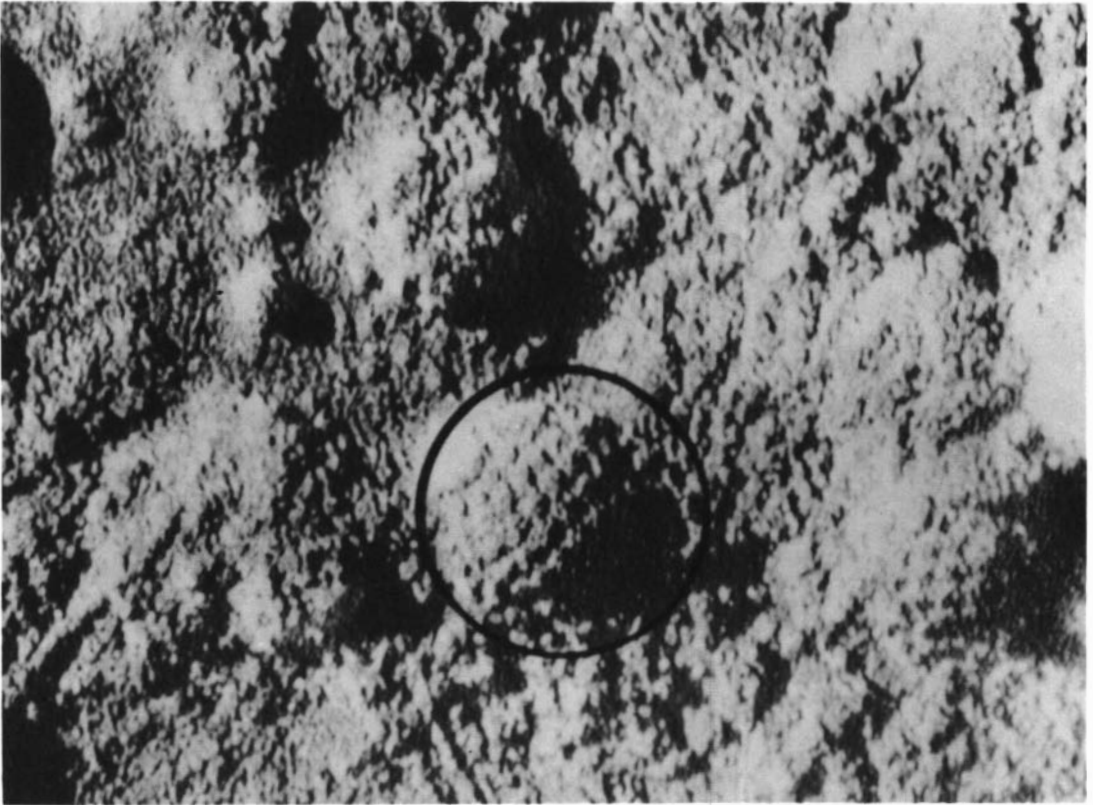


Fig. 5. Réplicas de platino. En el virión encerrado en un círculo se pueden apreciar fácilmente las formas rombales delimitadas por los agujeros de la cápsida. Esas formas corresponden a dímeros de unidades estructurales. (Para más detalle ver el texto).

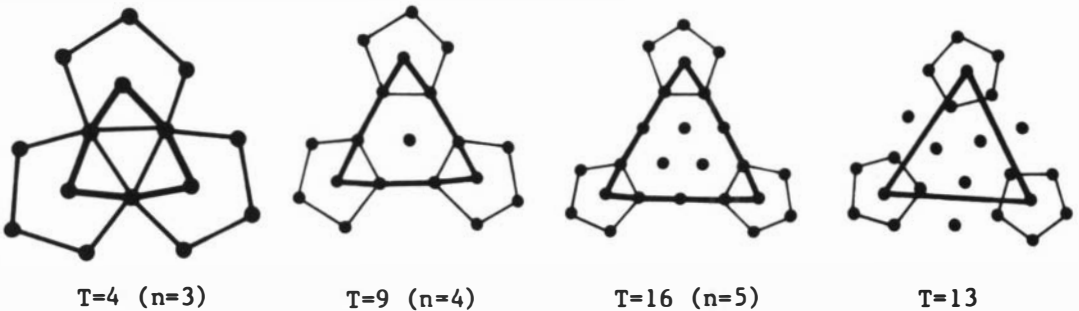


Fig. 6. Esquema de una de las caras triangulares de un icosaedro $T=4$, $T=9$, $T=16$ y $T=13$. En los tres primeros es posible indicar el índice n (número de capsómeros localizado entre dos pentámeros), que representa el número de unidades en cada borde del modelo icosaedrico; lo que no es posible calcular en el modelo $T=13$ debido a la localización desfasada de los hexámeros respecto al eje que une dos pentámeros. También, es posible notar como a medida que aumenta el índice T , las caras triangulares de un icosaedro se acercan más a una estructura de triángulo equilátero; en tanto, para índices de triangulación muy bajos ($T=4$) corresponden a triángulos esféricos, de donde el modelo viral sería más una esfera geodésica que un icosaedro.

RESUMEN

Los rotavirus humanos corresponden ultraestructuralmente a un modelo icosaedrico, con un patrón de simetría característico de un número de triangulación (T) de 13,

oblicuo. La capa interna del virus tiene 132 unidades morfológicas, integradas por 260 unidades estructurales de carácter trimérico. Es posible que la capa interna corresponda a un domo geodésico liso.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), que permitieron la presentación de este informe en el VI Congreso Latinoamericano de Microscopía Electrónica (Maracaibo, Venezuela, diciembre de 1984). Además, agradecemos el aporte técnico del personal de la Unidad de Microscopía Electrónica y del Centro de Investigación Celular y Molecular. También agradecemos muy especialmente a José Esparza del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por la revisión y comentarios sobre este trabajo.

REFERENCIAS

- Caspar, D. L. D. & A. Klug. 1962. Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor Symp. 27: 1-24.
- Crick, D. H. C. & J. D. Watson. 1956. Structure of small viruses. Nature, 1977: 473-475.
- Esparza, J. & F. Gil. 1978. A study on the ultrastructure of human rotavirus. Virology, 91: 141-150.
- Horne, R. W. 1974. Virus Structure. Academic Press. New York pp IV + 52.
- Horne, R. W., & I. P. Ronchetti. 1974. A negative staining-carbon film technique for studying viruses in the electron microscope. J. Ultrastruct. Res. 47: 361-383.
- Horne, R. W., & P. Wildy. 1961. Symmetry in virus architecture. Virology, 15: 348-373.
- Klug, A., & J. E. Berger. 1964. An optical method for the analysis of periodicities in electron micrographs and some observations on the mechanisms of negative staining. J. Mol. Biol. 10: 565-569.
- Klug, A., & D. J. Rosier. 1966. Optical filtering of electron micrographs: reconstructions of one side images. Nature, 212: 29-32.
- Kogasaka, R.; M. Akihara; K. Rorima; S. Chiba & T. Nakao, 1979. A morphological study of human rotavirus. Arch. Virol. 61: 41-48.
- Markham, R., S. Frey, & G. J. Hills. 1963. Methods for the enhancement of image detail and accentuation of structure in electron microscopy. Virology, 20: 88-102.
- Martin, M. L.; El L. Palmer & P. J. Middleton. 1975. Ultrastructure on infantile gastroenteritis virus. Virology, 68: 146-153.
- Oster, G. 1968. Las imágenes de muaré. Endeavour, 27: 60-64.
- Roseto, A.; J. Escaig; E. Delain; J. Cohen; R. Scherrer. 1979. Structure of rotaviruses as studied by the freeze drying technique. Virology, 98: 471-475.
- Soley, J.; F. Fernández; J. Brenes & J. Brenes. 1983. La difracción óptica aplicada a la virología: I Descripción de un difractor óptico. Cienc. Technol. 7: 69-96.
- Stannard, L. M., & B.D. Schoub. 1977. Observations on the morphology of two rotaviruses. J. Gen. Virol., 37: 345-439.
- Yanagida, M. 1977. Molecular organization of the shell of t-even bacteriophage head. II Arrangement of subunits in the head shells of giant phages. J. Mol. Biol. 109, 515-537.