

La infección productiva por Herpes Simplex Tipo 1 altera la biogénesis mitocondrial en células epiteliales humanas

Productive Herpes Simplex Type 1 infection alters mitochondrial biogenesis in human epithelial cells

Josefa Elmohrez Rosas¹; Benjamín Oporto Barría²; Cinthia Mella Robles³

¹ Alumno de medicina, Facultad de medicina Universidad Austral de Chile, campo clínico Osorno, Osorno.

² Interno de medicina, Facultad de medicina Universidad Austral de Chile, campo clínico Osorno, Osorno.

³ Viróloga, Instituto de Microbiología Clínica, Laboratorio de Virología Molecular, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

HISTORIA DEL ARTÍCULO

Recibido:

31/08/2024

Aceptado:

03/09/2024

Publicado online:

12/12/2024

CONFLICTOS DE INTERÉS

El autor declara no tener conflictos de interés.

CORRESPONDENCIA

Josefa Estefanía Elmohrez Rosas. Balmaceda 1333, Paillaco, Región de los Ríos, Chile.

Correo:

Josefa.elmohrez@gmail.com

PALABRAS CLAVE

HSV-1, Queratinocitos, Biogénesis de Organelos.

KEYWORDS

HSV-1, Keratinocytes, Organelle Biogenesis.

RESUMEN

Introducción. La infección por HSV-1 ha sido estudiada en neuronas, donde se ha observado una alteración de las vías de señalización celular durante la infección, utilizando vías energéticas, apoptóticas y de sobrevivencia celular.

Materiales y métodos. Se ejecutaron diversas técnicas como cultivo celular, inmunofluorescencia indirecta e infección viral. **Resultados.** La infección por HSV-1 generó una redistribución de las mitocondrias en la zona perinuclear, dada la inmunorreacción de ICP8 y TOM40 que mostró que hubo reactividad positiva, y que tiene efecto en la densidad mitocondrial. **Discusión.** Es importante estudiar el patrón perinuclear y la colocalización con otras estructuras de la proteína TOM40 respecto del control.

ABSTRACT

Introduction. HSV-1 infection has been studied in neurons, where an alteration of cell signaling pathways has been observed during infection, using energy, apoptotic and cell survival pathways. **Methods.** Various techniques such as cell culture, indirect immunofluorescence and viral infection were performed. **Results.** HSV-1 infection generated a redistribution of mitochondria in the perinuclear zone, given the immunoreaction of ICP8 and TOM40, which showed that there was positive reactivity, and that it has an effect on mitochondrial density. **Discussion.** It is important to study the perinuclear pattern and the colocalization with other structures of the TOM40 protein compared to the control.

INTRODUCCIÓN

Herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1) es un virus envuelto que pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*¹. Presenta tropismo por células neuronales y epiteliales de piel y mucosas. Su principal forma de transmisión es el contacto directo con las secreciones o lesiones conteniendo partículas virales en la zona facial y bucal de individuos con infección manifiesta² o de individuos presentando infección subclínica³. Afecta a un 65% de la población, causando manifestaciones clínicas en aproximadamente un 40% de las personas portadoras⁴. El tipo de infección que produce es de carácter persistente latente, permaneciendo de por vida en el individuo infectado, pudiendo sufrir reactivación viral posteriormente⁵.

La infección de HSV-1 ha sido estudiada en neuronas, donde se ha observado una alteración de las vías de señalización celular durante la infección, utilizando vías energéticas, apoptóticas y de sobrevivencia celular durante sus procesos de replicación⁶. Actualmente, hay reportes donde se ha demostrado que la infección por HSV-1 en neuronas, modula positivamente el marcador mitocondrial TFAM o factor de transcripción mitocondrial A, una proteína esencial en el metabolismo de ADN mitocondrial al cual se une siendo capaz de regular el número de copias de ADNmt que se producen⁷. Durante una infección neuronal con HSV-1, se ha observado que ocurre una concentración de TFAM en la zona perinuclear de neuronas infectadas, lo cual sugiere, que dicha distribución podría estar asociada al aumento en la biogénesis mitocondrial⁸.

Las mitocondrias son los principales compartimentos de la célula destinados a la producción de ATP, que con su propio genoma y maquinarias transcripcional y traduccional, se encuentran dispersas en todo el citoplasma. A pesar de esto, igualmente dependen del ADN nuclear para funcionar activamente⁹. Estos organelos son fundamentales para la supervivencia celular, ya que además de la síntesis energética y de metabolitos, están involucrados en procesos como apoptosis, y son las principales fuentes de radicales libres de oxígeno endógenos¹⁰.

Por lo que el daño producido por la infección sobre las mitocondrias es crítico para la célula. También cabe señalar que en neuronas se ha asociado este daño mitocondrial con la encefalitis inducida por HSV-1⁵. En este mismo estudio se encontró que post-infección las mitocondrias se reúnen alrededor del núcleo en un estado condensado acompañadas de proteínas del tegumento de HSV-1, donde los organelos presentan alta actividad respiratoria, lo cual es esencial para la morfogénesis de HSV-1, el cual que requiere un alto abastecimiento de ATP.

Las mitocondrias han sido descritas formando una red que se distribuye en la célula, con un dinamismo que se refleja en su constante cambio de forma, largo y movimientos a través del citoesqueleto. La homeostasis de estos organelos depende de los procesos de fisión y fusión, ambos cruciales para la mantención de un número apropiado de mitocondrias funcionales¹¹. La fusión permite el intercambio de ADN y metabolitos entre mitocondrias vecinas, mientras que la fisión de la red permite el transporte dentro o fuera de la célula hacia zonas de alta demanda energética.

Dado el panorama descrito, surge el interés por evaluar si durante una infección productiva de HSV-1 en células epiteliales, particularmente queratinocitos humanos (HaCaT), principal tipo de célula de estos epitelios y línea aneuploide inmortalizada espontáneamente que no puede sufrir diferenciación epidérmica terminal¹² también se inducen cambios en la localización y densidad de marcadores mitocondriales que pudieran indicar un aumento en la biogénesis mitocondrial concentrada en zonas consideradas de alta actividad replicativa. Si bien, HSV-1 es un virus neurotrópico, la célula epitelial representa el sitio de entrada del virus para realizar su proceso infeccioso a nivel fisiológico.

La importancia del queratinocito como objeto para este estudio es que opera como una defensa inicial durante infecciones cutáneas, utilizando los recursos de su red mitocondrial para llevar a cabo funciones defensivas, como reconocer agentes infecciosos e iniciar una respuesta inmune innata. Entonces, los virus han desarrollado como estrategia para lograr su replicación el aprovecharse esta red mitocondrial

en la célula huésped y así obtener la energía necesaria¹¹. Dicho esto, es conveniente señalar que aparte de la función como primera barrera de defensa y sitio de replicación inicial, poco se ha reportado sobre el queratinocito y el rol de su red mitocondrial durante una infección productiva de HSV-1.

Estudios previos realizados en células Vero⁹ queratinocitos¹¹ y neuronas¹³ muestran relocalización de las mitocondrias hacia los núcleos, así como la elongación de las mitocondrias durante la infección por HSV-1¹⁴, por lo que se considera la biogénesis de nuevas mitocondrias como mecanismo alternativo de obtención de recursos energéticos, aparte de la movilización de mitocondrias desde otros lugares de la célula. Uno de los estudios previos en queratinocitos¹³ mostró interacción de las partículas virales con la red mitocondrial cerca del núcleo celular. La red mitocondrial se vio organizada alrededor del núcleo e incluso se observó colocalización de partículas virales con mitocondrias. Además, la red estaba completamente fragmentada; en general, las mitocondrias formando red disminuyeron a la vez que los objetos mitocondriales individuales aumentaron a 24 horas post infección. Un estudio similar realizado en neuronas¹³ también describió la acumulación y colocalización de partículas virales con mitocondrias en el área perinuclear y fibras neuronales largas. Se pudo determinar que las mitocondrias estaban desorganizadas y desconectadas unas de otras y que además había un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno, lo cual es sugerente al asociar esta infección con procesos neurodegenerativos. Así es como este problema se vuelve relevante, tanto desde el punto de vista de los eventos replicativos iniciales como de la reactivación. También es importante destacar que los hallazgos podrían extrapolarse a otras células por las cuales HSV-1 tenga tropismo.

El enfoque de la investigación va hacia los cambios observables a nivel de mitocondrias durante una infección aguda *in vitro* utilizando como modelo las células HaCaT, mediante uso de herramientas y técnicas de laboratorio (IFI) para poner en evidencia el efecto de la infección productiva. El trabajo que se realizó se fundamenta en el uso de marcadores moleculares para evidenciar modificaciones en la

distribución y biogénesis mitocondrial por efecto de la infección productiva mediante uso de marcadores mitocondriales en células epiteliales, contando con el antecedente de los estudios previos realizados en neuronas y queratinocitos.

El objetivo general de la investigación es caracterizar los efectos de la infección productiva de HSV-1 sobre la biogénesis mitocondrial de las células HaCaT derivadas de queratinocitos humanos y los objetivos específicos son: Caracterizar la distribución subcelular de marcadores mitocondriales que, a este nivel, estén involucrados en la regulación de la biogénesis mitocondrial, respecto a su distribución subcelular durante una infección productiva de HSV-1 en células HaCaT. Y caracterizar el efecto de la infección productiva de HSV-1, sobre la densidad mitocondrial en células HaCaT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular: Se cultivaron queratinocitos humanos (línea celular HaCaT) donada por el Dr N. Fusenig (DKFZ, Heidelberg, Germany) mantenidas como monocapa en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1X (Life Technologies, Inc), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Life Technologies, Inc) y 1% (v/v) antibióticos penicilina/estreptomicina (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) (100 unid/ml) e incubadas a una atmósfera humidificada con una concentración de 5% CO₂ y 37°C. Para su siembra y pasaje las células crecieron hasta alcanzar una confluencia adecuada sobre la placa de cultivo y luego, se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS 0,1M para posteriormente adicionarles tripsina 0,25%, ser centrifugadas a 2000g/5min y resuspendidas en 2ml de DMEM para después ser contadas en el contador automático de células Luna II (Logos Biosystems) y sembradas a la confluencia requerida para cada tipo de experimento.

Inmunofluorescencia indirecta (de células mock e infectadas): Se realizó este procedimiento con la línea celular HaCaT, creciendo las células en monocapa sobre cubreobjetos redondos depositados al interior de placas de cultivo de 24 pocillos. Las células se fijaron en paraformaldehído 4% (PFA), permeabilizaron con 0,2% Tritón X-100 y bloquearon en solución de bloqueo

bloquearon en solución de bloqueo SUPERBLOCK (EDTA 0,5 M, fish gelatin (1%), BSA (1%), horse serum (1%) y H₂O₂ (0,3%) a 4°C. Luego, se incubaron con el anticuerpo primario para la marca mitocondrial (TOM-40) y anti-ICP8 a 37°C por 1 hora en una cámara húmeda, para luego ser lavados con PBS Ca²⁺ Mg²⁺ 1X. Seguidamente, los anticuerpos secundarios se conjugaron a fluoróforos Alexa (488 y 594) e incubaron a 37°C por 1 hora. Luego se realizó la incubación con DAPI a temperatura ambiente por 5 minutos. Los coverslips se montaron con DAKO Fluorescent mounting media (DAKO) y se analizaron en un microscopio de epifluorescencia Axiio Scope.A1 (Carl Zeiss). Las imágenes obtenidas se procesaron utilizando el programa Fiji (ImageJ). El gráfico y el análisis estadístico se realizó con el software Graphpad Prism.

Modelo de infección *in vitro* con HSV-1: Para llevar a cabo la infección de los cultivos celulares, se utilizó la cepa F de HSV-1 en condiciones de bioseguridad nivel 2, según el procedimiento descrito por Zambrano et al., (2008). Los cultivos celulares se infectaron a MOI 10 (10 partículas virales infecciosas por célula) por 1 hora a 37°C (etapa de adsorción viral). Como control de infección o Mock (M), se utilizó como inóculo solamente el vehículo del virus sin contener virus (medio DMEM 1X 10%SFB) para luego seguir el procedimiento de adsorción viral. Posterior a esto, se cambió el medio por medio fresco, y se incubó según la cinética de infección (4-8-24 hpi), tomándose como tiempo 0 post infección, el cambio de medio posterior a la incubación de 1 hora de adsorción, tanto para el Mock como para las diferentes cinéticas. Todos los procesos que involucraron manipulación de muestras contaminadas con virus vivos fueron puestos en bolsas autoclavables y autoclavados previos a su eliminación; procedimientos que se realizaron considerando las medidas de bioseguridad que dispone el “Manual de Normas de Bioseguridad”, editado por CONICYT en 1994. Los desechos contaminados se eliminaron de acuerdo con la Norma Institucional de Bioseguridad de la Universidad Austral de Chile.

Para calcular la cantidad de virus que se adicionó por pocillo para obtener un MOI 10 se debe considerar el número de células por placa, que en este caso es de $1,9 \times 10^5$ células. Luego, para conocer la cantidad de partículas virales necesarias se realizó el siguiente cálculo:

conocer la cantidad de partículas virales necesarias se realizó el siguiente cálculo:

$$\begin{aligned} 10\text{PFU} &\text{-----} > 1 \text{ célula} \\ X \text{ PFU} &\text{-----} > 1,9 \times 10^5 \text{ células} \\ &\text{aproximadamente} \\ X &= 1,9 \times 10^6 \text{ células} \end{aligned}$$

Posterior a conocer la concentración de virus y número de partículas virales necesarias para obtener un MOI 10 de infección se calculó el volumen necesario de virus que se debe agregar al medio de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} 2,11 \times 10^8 \text{ PFU} &\text{-----} > 1 \text{ mL} \\ 1,9 \times 10^6 \text{ PFU} &\text{-----} > X \text{ mL} \\ x &\approx 0,0095 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$0,00095 \text{ mL} \times 1000 \text{-----} > 9,5 \mu\text{l}$$

Por lo tanto, con **9,5 μl** del virus por pocillo se obtendrá un experimento con MOI 10.

RESULTADOS

A causa de la infección por el HSV-1 hubo una redistribución de las mitocondrias alrededor del núcleo de la célula. La inmunorreacción de ICP8 y TOM40 en cultivos de células de la línea HaCaT en los que se observó que, en todas las células infectadas, demostrada por la expresión del marcador viral ICP8 (señal verde), hubo una reactividad positiva de TOM40 (señal roja) ya que la proteína mostró una distribución perinuclear.

Como era de esperar, en células con infección simulada (MOCK), la señal de inmunorreacción ICP8 fue casi indetectable, lo que confirma niveles bajos de esta proteína en ausencia de infección viral. Esto puede correlacionarse con los datos expuestos en la gráfica de cuantificación de fluorescencia (Figura 1) donde puede verse que el promedio de las áreas de intensidad fluorescencia medidos aumentó, lo que indica que los niveles de los marcadores aumentaron conforme la infección por HSV-1 avanzó.

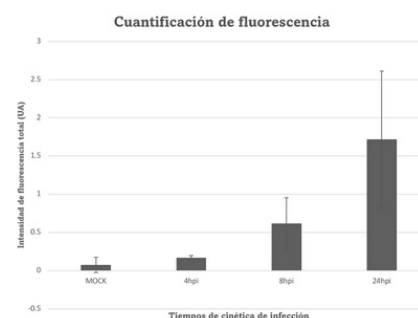


FIGURA 1. El gráfico muestra la concentración del anticuerpo viral de HSV-1 mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (UA). Los resultados son representativos del estudio de al menos 3 campos independientes. Los resultados se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism v.9. Los datos se expresaron como medias $\pm$ desviaciones estándar.

Además, la infección por HSV-1 tiene un efecto en la densidad mitocondrial, lo que puede observarse a partir de la intensidad de fluorescencia emitida, por ello, se puede distinguir que la intensidad de fluorescencia presente en las células infectadas por el virus es mucho mayor que las células con infección simulada. Esto puede complementarse con la información que entrega la Figura 2, que permite ver cómo hay una variación respecto de los promedios de intensidad medida en las muestras de células con infección simulada y en las células con infección por HSV-1 conforme van variando los tiempos de infección.

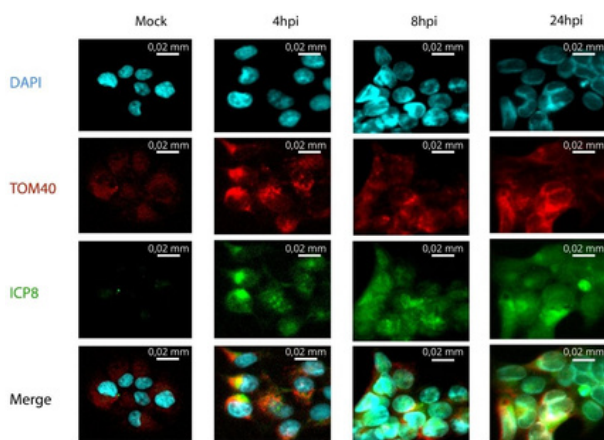


FIGURA 2. Distribución alterada de la proteína TOM40 durante la infección en queratinocitos humanos por HSV-1. Células de la línea HaCaT no tratadas (simuladas) e infectadas con HSV-1 (MOI = 10) durante 4, 8 o 24 hpi se tiñeron con anticuerpos específicos contra TOM40 e ICP8 seguidos de anticuerpos secundarios acoplados a los colorantes Alexa Fluor 594 y 488, respectivamente. El núcleo se tiñó con DAPI. La barra de escala corresponde a 0,02 mm. Ampliación 10×.

DISCUSIÓN

El metabolismo mitocondrial y las funciones antivirales tienen un papel esencial en el proceso de mantención homeostática de una reprogramación de la maquinaria celular para avanzar en la replicación viral y la lucha contra la infección viral¹². Nuestros resultados demuestran que la progresión de la infección por HSV-1 da lugar a una amplia remodelación de la estructura mitocondrial y de la información obtenida pueden extrapolarse que estas modificaciones de las estructuras mitocondriales son inducidas por el virus con el fin de aumentar el metabolismo energético en la célula y así facilitar la multiplicación de la progenie viral que puede viajar para asentarse en el ganglio trigeminal.

Durante la infección temprana por HSV-1 en células epiteliales, se requiere energía para la progresión gradual de la expresión génica viral¹⁴.

Demostramos que la progresión de la infección por VHS-1 en las células HaCat desde fases tempranas hasta fases posteriores resulta en un aumento del promedio de áreas de intensidad fluorescente de los marcadores mitocondriales (TOM40) conforme avanzaba el proceso.

De los valores expuestos en los resultados son extrapolables los niveles de proteínas en las muestras, pero idealmente debiera ser complementado con un inmunoblot. Es importante estudiar el patrón perinuclear y la colocalización con otras estructuras de la proteína TOM40 respecto del control, para ello deben estudiarse otros marcadores celulares para determinar la estructura con la cual la proteína interacciona.

Cabe recalcar que en este estudio solo se probó una proteína mitocondrial, por lo que resultados más concretos sobre la acción del HSV-1 en el proceso de biogénesis mitocondrial pueden establecerse haciendo pruebas con otras proteínas involucradas en este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Honor en Investigación en Medicina (PHIM UACH) por ofrecer la experiencia e instancias de desarrollo científico que enriquecen nuestra formación médica y que llevaron a la realización de este proyecto. Además, agradecemos al laboratorio de Virología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile por su apoyo con la infraestructura para realizar los experimentos y por la facilitación de materiales de trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Roizman B, Whitley RJ. An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. *Annu Rev Microbiol*. 2013 Sep;67:355–74.
- [2] Maggs DJ, Chang E, Nasisse MP, Mitchell WJ. Persistence of Herpes Simplex Virus Type 1 DNA in Chronic Conjunctival and Eyelid Lesions of Mice. *J Virol*. 1998 Nov 1;72(11):9166–72.
- [3] Otth C, Acuña-Hinrichsen F, Leyton L, Martin C, Concha MI. Herpes Simplex Virus Type 1 at the Central Nervous System. In: *Herpesviridae*. InTech; 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/64130>
- [4] Miranda-Saksena M, Denes C, Diefenbach R, Cunningham A. Infection and Transport of Herpes Simplex Virus Type 1 in Neurons: Role of the Cytoskeleton. *Viruses*. 2018 Feb 23;10(2):92.
- [5] Banerjee A, Kulkarni S, Mukherjee A. Herpes Simplex Virus: The Hostile Guest That Takes Over Your Home. *Front Microbiol*. 2020 May 7;11.
- [6] Leyton L. La infección por herpes simplex virus tipo 1 sobre línea celular hipocámpal de ratón tiene un efecto modulador sobre la proteína quinasa activada por AMP [tesis]. [Valdivia]: [Universidad Austral de Chile]; 2014.
- [7] Kang I, Chu CT, Kaufman BA. The mitochondrial transcription factor <sc>TFAM</sc> in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms. *FEBS Lett*. 2018 Mar 15;592(5):793–811.
- [8] Martin C, Leyton L, Arancibia Y, Cuevas A, Zambrano A, Concha MI, et al. Modulation of the AMPK/Sirt1 Axis During Neuronal Infection by Herpes Simplex Virus Type 1. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2014 Aug 11;42(1):301–12.
- [9] Murata T, Goshima F, Daikoku T, Inagaki-Ohara K, Takakuwa H, Kato K, et al. Mitochondrial distribution and function in herpes simplex virus-infected cells. *Microbiology (N Y)*. 2000 Feb 1;81(2):401–6.
- [10] Su B, Wang X, Zheñg L, Perry G, Smith MA, Zhu X. Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2010 Jan;1802(1):135–42.
- [11] Chodkowski M, Serafińska I, Brzezicka J, Golke A, Słowska A, Krzyżowska M, et al. Human herpesvirus type 1 and type 2 disrupt mitochondrial dynamics in human keratinocytes. *Arch Virol*. 2018 Oct 5;163(10):2663–73.
- [12] Kite J, Russell T, Jones J, Elliott G. Cell-to-cell transmission of HSV1 in human keratinocytes in the absence of the major entry receptor, nectin1. *PLOS Pathog*. 2021;17(9):e1009631. doi:10.1371/journal.ppat.1009631.
- [13] Cymerys J, Chodkowski M, Słowska A, Krzyżowska M, Bańbura MW. Disturbances of mitochondrial dynamics in cultured neurons infected with human herpesvirus type 1 and type 2. *J Neurovirol*. 2019 Dec 3;25(6):765–82.
- [14] Leclerc S, Gupta A, Ruokolainen V, Chen J-H, Kunnas K, Ekman AA, et al. Progression of herpesvirus infection remodels mitochondrial organization and metabolism. *PLoS Pathog*. 2024;20(4):E1011829. doi:10.1371/journal.ppat.1011829.