

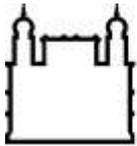
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

Estudo da participação de proteínas quinases e de reguladores da transcrição na atividade inibitória de VIP e PACAP sobre o HIV-1

Jairo Ramos Temerozo

Rio de Janeiro
2018



Ministério da Saúde

FIUCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Jairo Ramos Temerozo

Estudo da participação de proteínas quinases e de reguladores da transcrição na atividade inibitória de VIP e PACAP sobre o HIV-1.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dumith Chequer Bou-Habib

RIO DE JANEIRO

2018

Temerozo, Jairo Ramos.

Estudo da participação de proteínas quinases e de reguladores da transcrição na atividade inibitória de VIP e PACAP sobre o HIV-1 / Jairo Ramos Temerozo. - Rio de Janeiro, 2018.

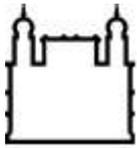
109 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Dumith Chequer Bou-Habib.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Neuropeptídeos. 2. VIP. 3. PACAP. 4. Macrófagos. 5. HIV-1. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Jairo Ramos Temerozo

Estudo da participação de proteínas quinases e de reguladores da transcrição na atividade inibitória de VIP e PACAP sobre o HIV-1.

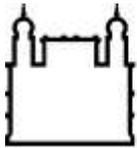
ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

Aprovada em: 17/01/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Julio Scharfstein - **Presidente**
Prof. Dr. Clarissa Maya-Monteiro
Prof. Dr. Luciana Silveira
Prof. Dr. Adriana Ribeiro
Prof. Dr. Rodrigo Figueiredo

Rio de Janeiro, 05 de Janeiro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

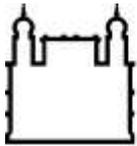
Estudo da participação de proteínas quinases e de reguladores da transcrição na atividade inibitória de VIP e PACAP sobre o HIV-1.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Jairo Ramos Temerozo

VIP e PACAP são neuropeptídeos altamente similares presentes em vários tecidos, dotados de funções imunorreguladoras e outros efeitos sistêmicos. Anteriormente relatamos que ambos os neuropeptídeos inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos primários, através de β -quimiocinas e IL-10, e agora descrevemos mecanismos moleculares envolvidos nessa atividade. A replicação viral foi inibida em macrófagos expostos a VIP ou PACAP antes da infecção, comparável ao tratamento após a infecção. Tratamentos múltiplos com doses subótimas de VIP ou PACAP resultaram em uma inibição similar à promovida por uma única dose ótima. A produção de AMPc e a ativação de proteínas quinases A e C foram componentes críticos dos efeitos anti-HIV-1 de VIP e PACAP. VIP e PACAP induziram ativação de CREB, inibiram NF- κ B e reduziram os níveis de Ciclina D1 em células infectadas com HIV-1. VIP e PACAP promoveram mutações no provírus do HIV-1 e a infectividade viral reduzida. Em conclusão, nossas descobertas fortalecem o potencial anti-HIV-1 de VIP e PACAP e apontam para novas abordagens terapêuticas para controlar a progressão da infecção pelo HIV-1.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Study of the participation of protein kinases and transcription regulators in the inhibitory activity of VIP and PACAP on HIV-1.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Jairo Ramos Temerozo

VIP and PACAP are highly similar neuropeptides present in various tissues, endowed with immunoregulatory functions and other systemic effects. We have previously reported that both neuropeptides inhibit HIV-1 replication in primary macrophages via β -chemokines and IL-10, and now we describe the molecular mechanisms involved in this activity. Viral replication was inhibited in macrophages exposed to VIP or PACAP prior to infection, comparable to post-infection treatment. Multiple treatments with suboptimal doses of VIP or PACAP resulted in similar inhibition to that promoted by a single optimum dose. Production of cAMP and activation of protein kinases A and C were critical components of the anti-HIV-1 effects of VIP and PACAP. VIP and PACAP induced CREB activation, inhibited NF- κ B and reduced Cyclin D1 levels in HIV-1 infected cells. VIP and PACAP promoted mutations in the HIV-1 provirus and reduced viral infectivity. In conclusion, our findings strengthen the anti-HIV-1 potential of VIP and PACAP, and point to new therapeutic approaches to control the progression of HIV-1 infection.

Índice

Resumo.....	2
Abstract.....	3
1. Introdução	10
1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)	10
1.1.1. O HIV.....	10
1.1.2. Aspectos genômicos e estruturais do HIV-1.....	14
1.1.3. Ciclo replicativo e a infecção pelo HIV-1	22
1.1.4. Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1.....	27
1.1.5. Reservatórios virais	29
1.1.6. Resposta imune à infecção pelo HIV-1.....	31
1.1.7. Imunomodulação da replicação do HIV-1.....	34
1.2. O Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) e o Peptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária (PACAP)	39
1.2.1. Caracterização, receptores e vias de sinalização.....	39
1.2.2. Funções biológicas.....	40
1.2.3. VIP e PACAP no sistema imune.....	48
1.2.4. VIP, PACAP e a infecção pelo HIV-1.....	50
2. Racional e hipótese	50
3. Objetivos	51
3.1. Objetivo geral	51
3.2. Objetivos específicos	51
4. Metodologia.....	52
4.1. Declaração de ética.....	52
4.2. Isolados de HIV-1, reagentes e kits de ELISA.....	53
4.3. Células primárias e linhagens celulares.....	53

4.4.	Ensaio de citotoxicidade	54
4.5.	Infecção pelo HIV-1	55
4.6.	Avaliação dos efeitos dos neuropeptídeos na replicação do HIV-1.....	55
4.7.	Expressão celular dos receptores CD4, CCR5 e dos receptores de VIP e PACAP	56
4.8.	Ensaio de medição cAMP, NF-kB, CREB e Cyclin D1	57
4.9.	Detecção da ativação de PKA e PKC.....	57
4.10.	Ensaio de Luciferase	58
4.11.	Análises da sequência LTR do HIV-1	59
4.12.	Ensaio de infectividade	60
4.13.	Análise estatística	60
5.	Resultados.....	61
5.1.	VIP e PACAP mantêm o efeito anti-HIV-1 em diversos protocolos de adição aos macrófagos.....	61
5.2.	VIP e PACAP não alteram a expressão de CD4 e CCR5 em macrófagos.....	63
5.3.	VIP e PACAP não modulam a expressão de seus próprios receptores em macrófagos infectados com HIV-1.	65
5.4.	A ativação da sinalização de cAMP contribui para a inibição de HIV-1 induzida por VIP e PACAP em macrófagos.	68
5.5.	O efeito de VIP e PACAP na replicação de HIV-1 depende da ativação de PKA e PKC.....	71
5.6.	VIP e PACAP inibem a fosforilação de NF-kBp65 em macrófagos infectados com HIV-1.....	75
5.7.	VIP e PACAP promovem a fosforilação de CREB em macrófagos infectados com HIV-1.....	78
5.8.	VIP e PACAP reduzem os níveis de Ciclina D1 em macrófagos infectados com HIV-1.....	80
5.9.	VIP e PACAP promovem mutações no genoma do HIV-1.....	82
5.10.	VIP e PACAP reduzem a infectividade do HIV-1.....	86
6.	Discussão	87
7.	Conclusões.....	92

8. Perspectivas.....	94
9. Referências Bibliográficas.....	95
10. Anexos.....	108

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Número estimado de pessoas infectadas pelo HIV no mundo.	11
Figura 1.2 – Mapa global de distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1.	13
Figura 1.3 - Estrutura do vírion do HIV-1.....	16
Figura 1.4 - Representação esquemática da organização genômica do HIV-1.	18
Figura 1.5 – Ciclo replicativo do HIV-1.	21
Figura 1.6 - Curso clínico típico da infecção pelo HIV-1.....	23
Figura 1.7 - Gene e peptídeo precursor de VIP e PACAP.	36
Figura 1.8 – Sinalização clássica ativada por VIP e PACAP.....	38
Figura 1.9 - Efeitos de VIP e PACAP sobre células do sistema imune.....	44
Figura 1.10 - Efeitos de VIP e PACAP sobre macrófagos ativados.	46
Figura 5.1 - VIP e PACAP mantêm o efeito anti-HIV-1 em diversas formas de adição aos macrófagos.	62
Figura 5.2 - VIP e PACAP não alteram a expressão de CD4, CCR5 e CD68 em macrófagos.....	64
Figura 5.3 - VIP e PACAP não modulam a expressão de seus próprios receptores em macrófagos infectados com HIV-1.	67
Figura 5.4 - A ativação da sinalização de cAMP contribui para a inibição de HIV-1 induzida por VIP e PACAP em macrófagos.	70
Figura 5.5 - O efeito de VIP e PACAP na replicação do HIV-1 é dependente de PKA e PKC.	72
Figura 5.6 - VIP e PACAP inibem a fosforilação de NF-kBp65 em macrófagos infectados com HIV-1.....	77
Figura 5.7 - VIP e PACAP promovem a fosforilação de CREB em macrófagos infectados com HIV-1.....	79
Figura 5.8 - VIP e PACAP reduzem os níveis de Ciclina D1 em macrófagos infectados com HIV-1.....	81
Figura 5.9 - VIP e PACAP promovem mutações no genoma do HIV-1.	83
Figura 5.10 - VIP e PACAP reduzem a infectividade do HIV-1.....	87
Figura 7 - Modelo dos resultados obtidos.....	93

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Distância genética média entre as sequencias provirais nos diferentes tratamentos comparados ao dia 0.	85
Tabela 2 - Comparação do número de mutações totais e específicas G para A identificadas nos genomas analisados.	85

Lista de abreviaturas

Aids: síndrome da imunodeficiência adquirida

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

AUC: área sob a curva

PBMC: células mononucleares de sangue periférico

CBP: proteína de ligação à CREB

CDK: cinase dependente de ciclina

CKI: proteína inibidora de CDK

CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta à AMPc

HIV-1: vírus da imunodeficiência humana-1

IFN: interferon

IL: interleucina

LTR: terminal longo de repetição

NF-κB: fator nuclear kappa b

PKA: proteína cinase A

PKC: proteína cinase C

PTX: toxina pertussis

TLR: receptor do tipo "toll"

TNF: fator de necrose tumoral

1. Introdução

1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

1.1.1. O HIV

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a qual é caracterizada por uma profunda imunossupressão associada às infecções oportunistas, tumores malignos e degeneração do sistema nervoso central (1). A AIDS consiste em uma pandemia, que é hoje considerada uma preocupação global que tem exigido esforços conjuntos da comunidade científica, dos governos e da sociedade em geral, para a sua efetiva prevenção e controle. De acordo com dados do Programa das Nações Unidas para HIV e AIDS (Figura 1.1), estima-se que 34 milhões (31,6 – 35,2 milhões) de indivíduos estejam infectados pelo HIV em todo o globo terrestre (2). No Brasil, o Ministério da Saúde informou que os novos números de AIDS, atualizados até junho de 2011, contabilizam 608.230 casos registrados desde 1980. Em relação à disseminação, a taxa de incidência oscila em torno de 17,9 casos de AIDS por 100 mil habitantes, e em 2009, foram notificados 34.218 casos da doença.

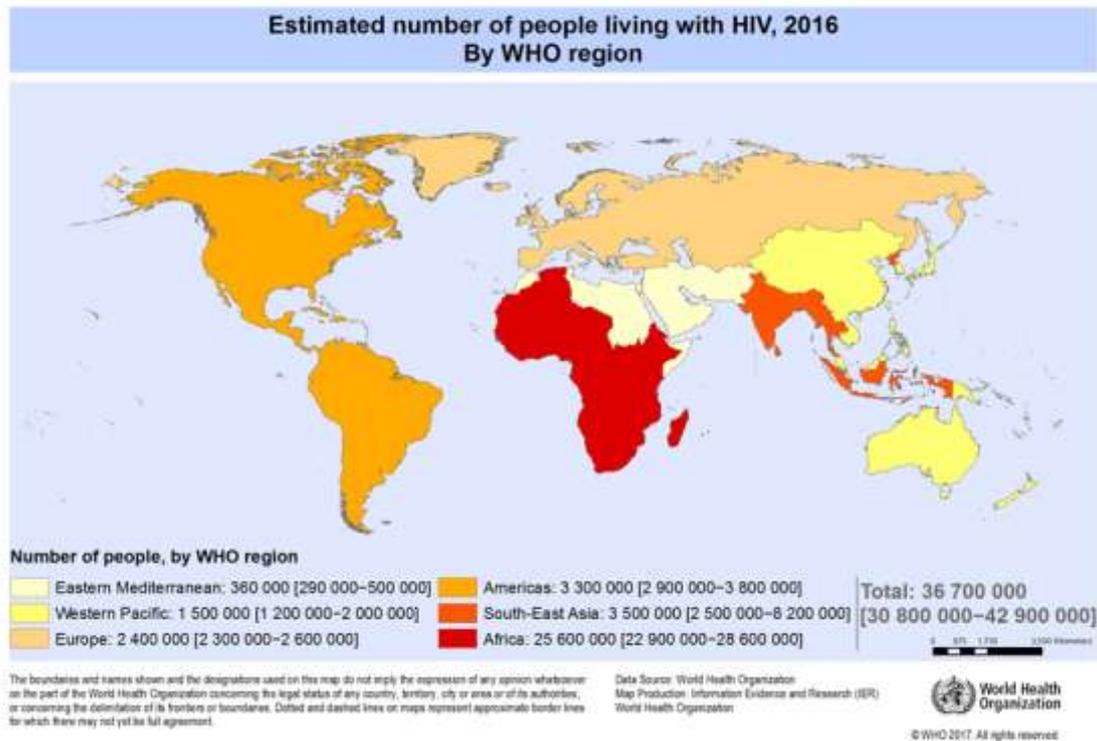


Figura 1.1 – Número estimado de pessoas infectadas pelo HIV no mundo.

Modificada de “Global epidemic (Powerpoint slides)”
http://www.who.int/gho/hiv/epidemic_status/cases_all/en/

Mesmo com todos os esforços para controle e prevenção, o HIV-1 continua se disseminando pelo mundo, principalmente pela África, sendo um grave problema de saúde pública. Mundialmente os números de pessoas infectadas mostram uma tendência a estabilização, porém nas populações mais jovens, isoladamente, existe a preocupação de aumento na disseminação, sendo esta população alvo de políticas de conscientização e prevenção.

Dois tipos de HIV são hoje identificados, o tipo 1 e o tipo 2 (HIV-1 e HIV-2), que são classificados em grupos e subtipos, com distribuição geográfica distinta, de acordo com suas origens (3). O HIV-1 foi isolado por primeira vez em 1983 (4) e sua distribuição é irrestrita pelo mundo. O HIV-2 foi isolado por primeira vez em 1986 (5) na África Ocidental.

Após o isolamento, clonagem molecular, e a classificação inicial do HIV-1, foram descobertos vários *Lentivirus* geneticamente diferentes que infectavam primatas, e foram determinadas suas relações filogenéticas com o HIV-1. A inoculação de espécies de macacos asiáticos (por exemplo, os macacos rhesus) com estes agentes recém descobertos induziu uma doença semelhante à AIDS (6), deste modo esses vírus foram nomeados vírus da imunodeficiência símia (SIV) para distingui-los dos vírus humanos, o HIV-1 e HIV-2. Filogeneticamente o HIV-2 é mais estreitamente relacionado com o SIV_{sm} (vírus selvagem isolado de macacos sooty mangabey) do que o HIV-1 (7). Do mesmo modo o HIV-1 é mais estreitamente relacionado com o SIV_{cpz} (vírus selvagem isolado de chimpanzé) (8, 9). Devido ao contato próximo entre humanos e macacos, que eram caçados para alimentação ou mantidos como animais de estimação na África Ocidental, pensa-se atualmente que o HIV representa uma transmissão zoonótica de SIV aos seres humanos (10).

As primeiras análises filogenéticas de isolados do HIV-1 foram realizadas em amostras provenientes da Europa, América do Norte e África. A partir destas foram definidos grupos genéticos ou “clades” do HIV-1, os quais podem ser classificados em: M (*major*); O (*outlier*), N (não-M, não-O) e P (*putative*). O grupo M do HIV-1, que inclui mais dos 95% dos vírus isolados, consiste em pelo menos nove subtipos ou subgrupos distintos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e 51 formas recombinantes circulantes (CRF), as quais possuem segmentos genômicos derivados de mais de um subtipo de HIV-1 (Figura 1.2) (11).

O subtipo C do HIV-1 é o subtipo viral mais prevalente em países com altas taxas de infecção, como a Índia, China e África sub-saariana, sendo responsável por mais de 50% dos casos de infecção no mundo. Os subtipos A, B, D e G são responsáveis por 12%, 11%, 2% e 5%, respectivamente, das infecções mundiais, enquanto que os subtipos F,H, J e K juntos causam menos de 1% das infecções (Figura 1.2) (11).

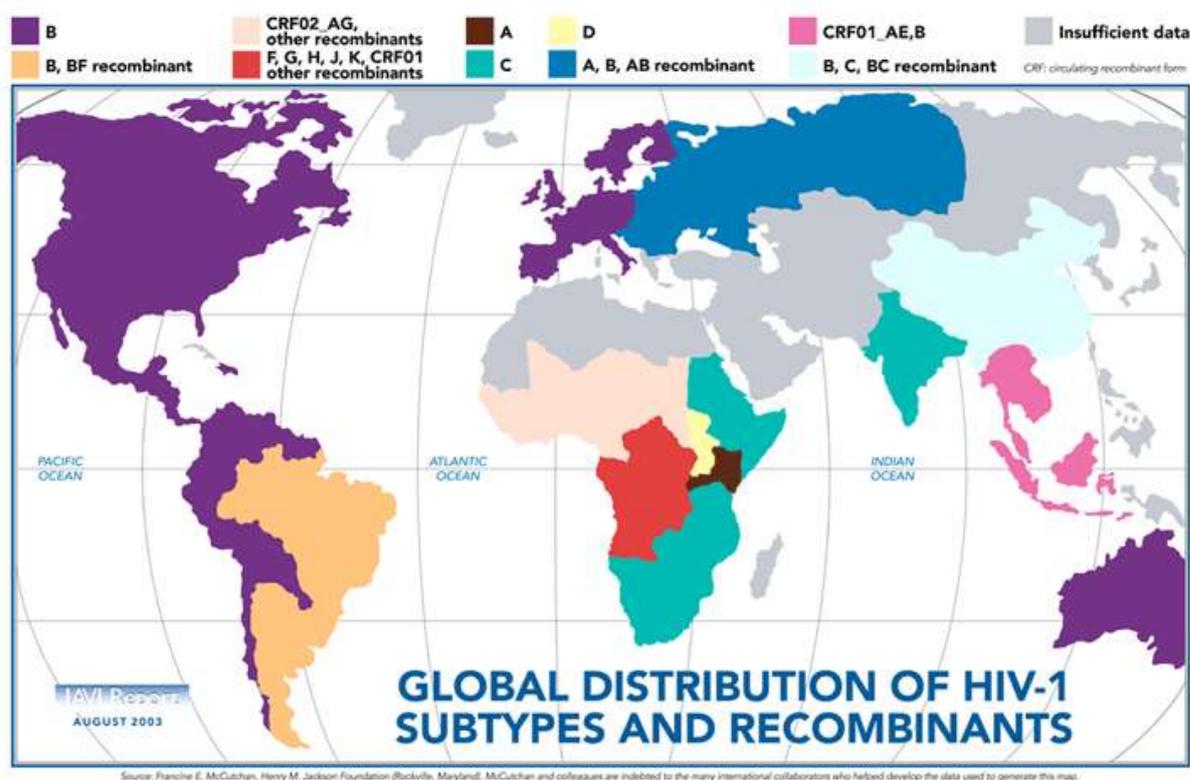


Figura 1.2 – Mapa global de distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1.

Extraída do portal IAVI Report – International AIDS Vaccine Initiative (<http://www.iavireport.org>)

O HIV-1 está distribuído mundialmente, porém alguns subtipos genômicos predominam em determinadas regiões. Devido ao caráter mutacional e a capacidade de vários subtipos

coexistirem em indivíduos infectados, o HIV-1 apresenta diversas formas recombinantes, sendo algumas tão predominantes quanto os subtipos “puros”.

Vários fatores contribuem para a heterogeneidade genética extraordinária do HIV-1: (a) a síntese do cDNA viral é propensa a erros durante a transcrição reversa, (b) altas taxas de recombinação, a qual acontece durante a transcrição reversa e integração (c) os elevados níveis de produção de vírus *in vivo* (10^9 partículas/dia, 150 a 300 ciclos de replicação/ano), e (d) um grande número de indivíduos infectados (12-14), o permite que os eventos probabilísticos de mutação ocorram com maior facilidade. Estima-se que em uma pessoa infectada pelo HIV-1 a diversidade genética viral aumenta 1% por ano a partir da cepa do primeiro vírus, durante a fase sintomática da infecção, na ausência de tratamento (15).

1.1.2. Aspectos genômicos e estruturais do HIV-1

O HIV é um vírus pertencente à família *Retroviridae* do gênero Lentivirus. Os Retrovírus se distinguem por apresentar uma ou mais fitas simples de ácido ribonucleico (RNA) de senso positivo como material genético e uma enzima DNA (ácido desoxirribonucleico) polimerase dependente de RNA conhecida como Transcriptase reversa (16, 17). Essa enzima é a responsável por converter o RNA de fita simples em cDNA de fita dupla para a integração do genoma viral ao da célula hospedeira. Os Lentivirus são principalmente caracterizados por apresentarem longos períodos de incubação, podendo manter-se “silenciosos” por anos na célula infectada antes de iniciarem o processo de replicação propriamente dito (17).

O vírion do HIV é constituído por um envelope lipoprotéico, um nucleocapsídeo proteico que carrega o genoma viral e proteínas acessórias (Figura 1.3). O envelope lipoprotéico é formado por uma bicamada fosfolipídica na qual ficam inseridas as proteínas do envelope (gp120 e gp41) responsáveis pela ligação do vírus com a célula-alvo. O envelope viral é derivado da própria membrana da célula na qual o vírion foi gerado, levando inclusive consigo proteínas celulares tais como antígenos leucocitários humanos de classe 1 e 2. Internamente se encontra uma matriz proteica constituída pela proteína viral p17. O núcleo capsídeo, uma estrutura cônica proteica formada pela proteína p24, contém duas cópias de RNA fita simples e proteínas não estruturais; Protease, Transcriptase reversa e Integrase (17).

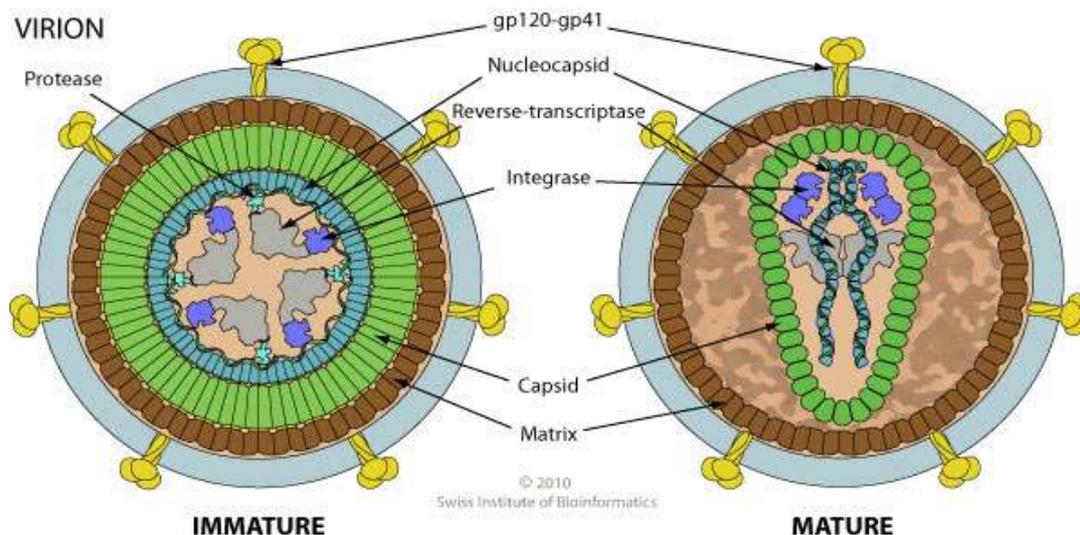


Figura 1.3 - Estrutura do vírion do HIV-1.

Extraída do Portal ViralZone do SIB Swiss Institute of Bioinformatics

(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/7.html).

O vírion maduro do HIV-1 consiste em uma estrutura icosaédrica, formada por uma membrana oriunda da célula infectada, na qual estão inseridas as proteínas de entrada (gp120 e gp41). Internamente, as proteínas de matriz estabilizam e conectam o capsídeo assimétrico a membrana, enquanto o capsídeo estabiliza o nucleocapsídeo associado as proteínas Transcriptase reversa, Integrase e Protease.

O genoma do HIV-1 possui três fases de leitura que codificam nove genes, i.e. *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*. Os genes *gag*, *pol* e *env* codificam proteínas estruturais do vírion, são os maiores genes do genoma do HIV e são compartilhados com os outros membros da família *Retroviridae*. *Gag* (antígeno específico do grupo) codifica uma proteína precursora, p55, que após o processamento pela protease viral dá origem às proteínas do capsídeo: p17 (matriz), p24 (Capsídeo), p7 (núcleo capsídeo), p6. *Pol* é a região genômica que codifica para as enzimas virais Protease, Transcriptase reversa e Integrase. Essas enzimas são produzidas pela proteína precursora Gag-Pol

que é processada pela protease viral. Env codifica as glicoproteínas do envelope viral gp120 e gp41, a partir de um precursor gp160 que é clivado por proteases celulares. As glicoproteínas são encontradas no envelope viral derivado da membrana celular. Elas estão ligadas não covalentemente e se arrumam de maneira a formar trímeros que são as estruturas que se ligam ao CD4 celular e aos co-receptores para promover a fusão e entrada do vírion na célula. Os outros seis genes codificam proteínas com propriedades regulatórias que controlam a habilidade do HIV de infectar as células, estimulam a replicação e combatem fatores endógenos que inibem a produção de novos vírions. Outro elemento importante dentro do genoma proviral integrado são os LTRs (repetições terminais longas) que flanqueiam o genoma e possuem regiões regulatórias, especialmente controlando a iniciação da transcrição e a poliadenilação (Figura 1.4).

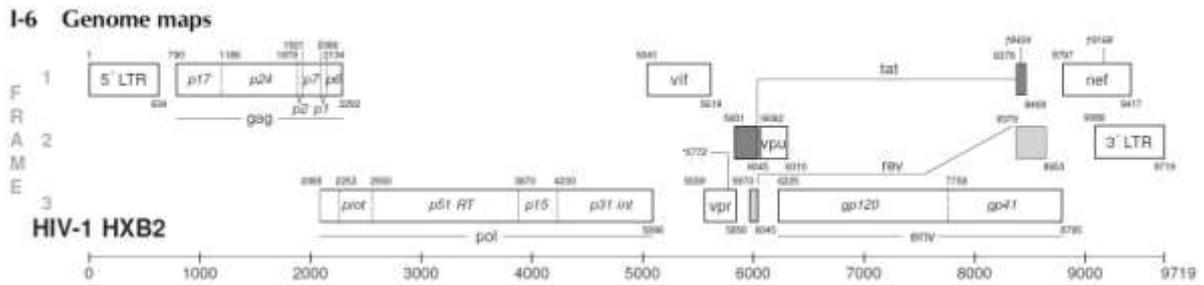


Figura 1.4 - Representação esquemática da organização genômica do HIV-

1.

Extraída do portal HIV Databases

(<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2011/frontmatter.pdf>)

O genoma do HIV-1 é composto pelos genes estruturais gag, env, e pol, e os genes acessórios, tat, rev, nef, vpu, vpr e vif. Os genes estruturais dão origem a proteínas precursoras que são clivadas originando as proteínas do capsídeo e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease. Os genes acessórios se encontram principalmente entre pol e env, com nef situado após env, e tat e rev sendo compostos por segmentos inseridos na sequência de env.

1.1.3. Ciclo replicativo e a infecção pelo HIV-1

O HIV-1 infecta linfócitos T CD4+, macrófagos, células dendríticas e, no sistema nervoso central, a microglia (18, 19), células que expressam a glicoproteína CD4 que serve como receptor do HIV-1 e HIV-2. Essa via clássica começa com a adsorção das glicoproteínas de sua superfície com o receptor na membrana das células alvo e a receptores de quimiocinas; CCR5 e CXCR4. Como primeiro passo, a gp120 se liga ao receptor CD4, essa ligação promove uma mudança conformacional na gp120 que permite que ela então se ligue os co-receptores (CCR5 e CXCR4). Essa segunda ligação desencadeia uma maior mudança conformacional, que expõe a porção chamada *heptad repeat 1*

(HR1) da gp41 que penetra na membrana. Posteriormente, a porção *heptad repeat 2* passa pelo último rearranjo estrutural formando uma estrutura semelhante a um grampo, que aproxima o envelope da membrana forçando a fusão e permitindo a passagem do capsídeo para o citoplasma (20, 21).

Após a entrada, o material genético e as enzimas virais são liberados do capsídeo, e se dá o processo de transcrição reversa. Esse consiste da ligação da enzima viral transcriptase reversa à fita simples positiva de RNA (genoma viral), que transcreve reversamente uma fita complementar de DNA (cDNA). A transcriptase reversa possui também atividade de ribonuclease, degradando o RNA original durante a síntese do cDNA, e atividade DNA polimerase dependente de DNA, que promove a criação da fita senso a partir do cDNA antisenso. Ambas as fitas se ligam formando um cDNA dupla fita viral que é transportado até o núcleo da célula onde será incorporado ao genoma celular por meio da atividade da enzima viral integrase. O cDNA viral integrado passa a ser chamado então de provírus (22).

Durante a transcrição do HIV-1, a proteína Tat recruta o *fator positivo b de alongação da transcrição* P-TEFb (CDK9/Ciclina T1), e os complexos CDK7/Ciclina H e CDK2/Ciclina E, que permitem a transcrição produtiva do genoma do HIV-1. Os níveis de P-TEFb são baixos em células T CD4 + em repouso e monócitos, mas são dramaticamente elevados após a ativação. O aumento dos seus níveis de expressão também ocorre após a diferenciação de monócitos para macrófagos. Além disso, em macrófagos, a proteólise da Ciclina T1 mediada pelo proteassoma limita a expressão desta molécula, regulando os níveis disponíveis e a sua atividade, e estudos demonstraram que

a infecção pelo HIV-1 promove o aumento dos níveis de Ciclina T1 e que a inibição ou degradação deste fator é capaz de reduzir amplamente replicação viral.

O provírus pode permanecer silencioso durante a fase latente da infecção. Para ser ativado, o provírus necessita da participação de certos fatores de transcrição da célula, sendo o NF- κ B o mais importante, que em linfócitos ativados, macrófagos e células dendríticas diferenciadas encontra-se regulado positivamente, sendo este um dos motivos pelos quais a infecção pelo HIV-1 só é produtiva (isto é, o ciclo de replicação viral ocorre completamente, originando novas partículas virais) nestes tipos celulares. Esse fator se liga à região promotora do LTR viral induzindo a transcrição do provírus em RNA mensageiro (mRNA), que passa pelo processo de “splicing” que o edita em fragmentos menores. Esses fragmentos são transportados para o citoplasma e produzem as proteínas regulatórias Tat (que amplifica regulando positivamente a replicação) e Rev. As partículas de Rev então se acumulam no núcleo onde se ligam ao mRNA não editado promovendo sua saída do núcleo, de onde eles não sairiam até serem editados. Nesse ponto, as proteínas estruturais Gag e Env são traduzidas no citoplasma a partir desses mRNAs não editados. Essas fitas são, na verdade, o RNA genômico integral que vai se associar à proteína Gag para ser empacotado nas novas partículas virais (22-24).

A formação de novas partículas virais ocorre na membrana celular através de uma organização autônoma das poliproteínas estruturais precursoras Gag e Gag/Pol (Pr55 gag, Pr155 Gag-Pol) junto com o RNA genômico. Após a formação desta ribonucleoproteína (RNP) os novos vírions

ainda imaturos são liberados da célula. Essas partículas ainda passam por uma maturação morfológica e funcional, consequência da clivagem protéica das proteínas precursoras. Essa clivagem ocorre durante a montagem do vírion ou logo após a liberação da partícula imatura (Figura 1.5).

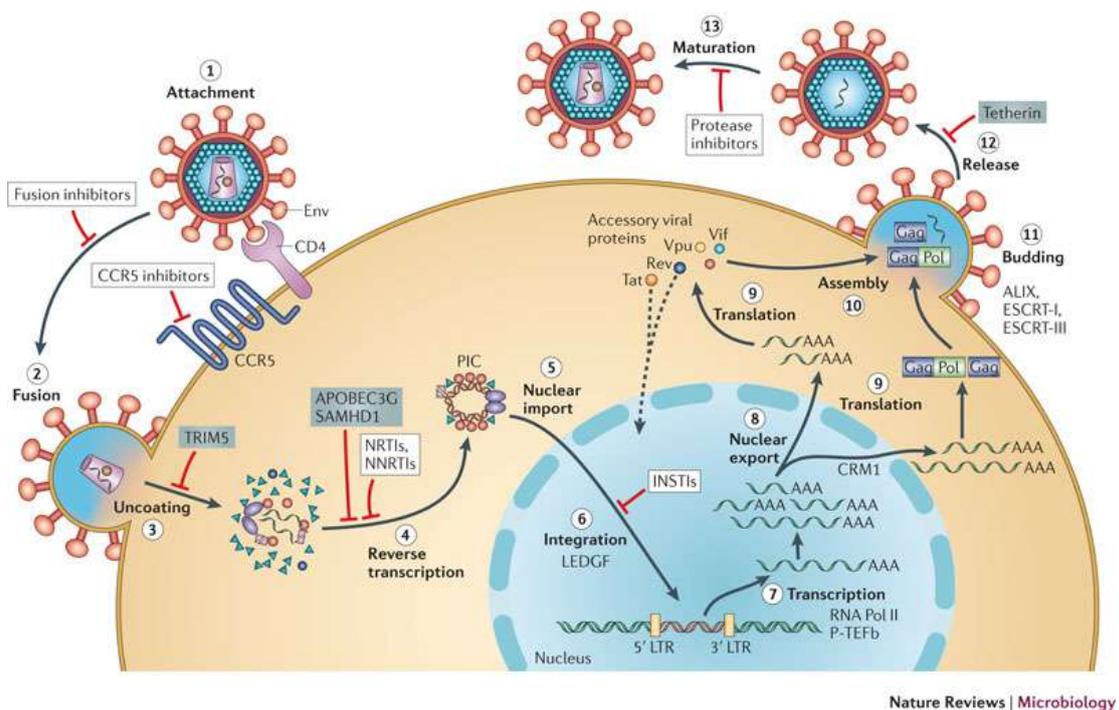


Figura 1.5 – Ciclo replicativo do HIV-1.

Extraído de Alan Engelman & Peter Cherepanov, 2012 – Nature Reviews Microbiology.

A infecção se inicia começa quando a glicoproteína do envelope (Env) interage com o receptor CD4 e o receptor de quimiocina CCR5 (CCR5) (passo 1), levando à fusão das membranas viral e celular e à entrada da partícula na célula (passo 2). O descompactamento parcial do nucleocapsídeo (passo 3) facilita a transcrição reversa (etapa 4), que por sua vez leva a formação do complexo de pré-integração (PIC). Após a importação para o núcleo da célula (passo 5), a integrase associada ao PIC orquestra a integração do provírus ao genoma celular, auxiliada pelo fator LEDGF (passo 6). A transcrição proviral (passo 7), é então mediada pela RNA polimerase II do hospedeiro (RNA Pol II) e pelo fator b de alongamento positivo da transcrição (P-TEFb), produzindo mRNAs virais de diferentes tamanhos, sendo que os maiores requerem exportação dependente de energia para deixar o núcleo através da proteína

hospedeira CRM1 (passo 8). Os mRNAs servem como modelos para a produção de proteína (passo 9) e o RNA contendo todo o genoma viral é incorporado em partículas virais junto com as proteínas estruturais (passo 10). O brotamento da partícula viral (etapa 11) e a liberação (etapa 12) da célula são mediados pelos complexos ESCRT e ALIX e durante e após esse processo ocorre a maturação da partícula viral, mediada pela protease (passo 13), assim gerando uma nova partícula viral infecciosa. Cada passo no ciclo de vida do HIV-1 é um alvo potencial para a intervenção antiviral; sendo indicados os locais de ação de inibidores farmacológicos clínicos (caixas brancas) e de fatores de restrição celular (caixas azuis). INSTI, inibidor de transferência de cadeia de integrase; LTR, Long-terminal repeat; NNRTI, inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa; NRTI, inibidor nucleosídico da transcriptase reversa.

1.1.4. Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1

A infecção aguda ou primária é definida como o período inicial da infecção, determinada entre a detecção do RNA viral no plasma de pacientes infectados pelo HIV, até a formação de anticorpos específicos para o HIV, 3 a 4 semanas após a infecção. Quando a infecção pelo HIV ocorre por transmissão sexual, existe uma fase inicial, antes da detecção de RNA viral no plasma do paciente, que se caracteriza pela replicação do HIV no tecido linfóide associado à mucosa vaginal ou retal (25).

Durante a infecção primária, a viremia aumenta atingindo seu ponto máximo após 21-28 dias de infecção, juntamente com diminuição do número de células T CD4⁺ (Figura 1.6). Embora a quantidade de células T circulantes retorne a um valor próximo ao normal, o número de células T CD4⁺ no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) permanece reduzido (26). Essa perda é em grande parte irreversível e tem importantes consequências imunológicas, como falha do sistema imune e progressão para a AIDS durante o transcurso da infecção (27). No momento do pico da viremia, os pacientes desenvolvem

sintomas gerais, incluindo síndrome semelhante à gripe, com febre, dor de garganta, linfadenopatias e exantema (28).

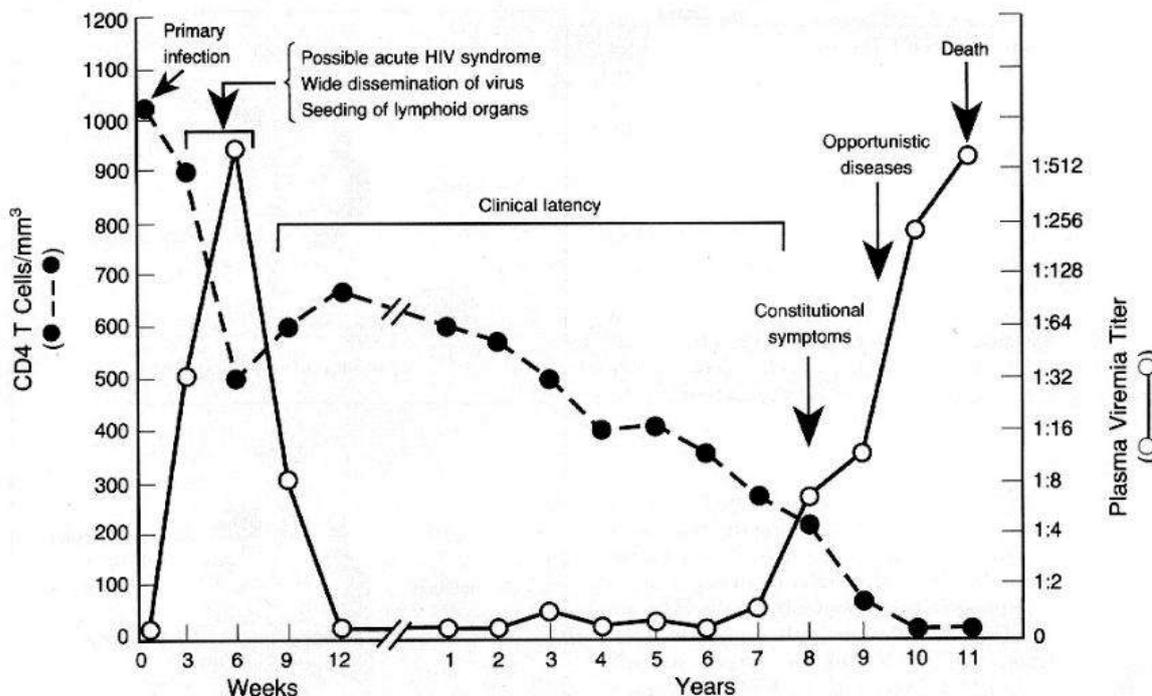


Figura 1.6 - Curso clínico típico da infecção pelo HIV-1.

Extraído de Pantaleo G, 1993 – New England Journal of Medicine.

A infecção se inicia com a chamada fase aguda, na qual a viremia alcança níveis muito elevados, associado com uma abrupta queda nos níveis de células T CD4. Nessa fase ocorre a disseminação do vírus pelo corpo e o estabelecimento dos sítios de replicação e de reservatórios virais. Após algumas semanas, ocorre a queda da viremia e se inicia a fase de latência, que pode durar por anos. Nessa fase, poucos ou nenhum sintomas se manifestam, e a contagem de células T CD4 se mantém estável inicialmente, com uma leve queda que prediz o avanço para a fase crônica. A fase crônica se inicia com a queda abrupta da contagem T CD4 e aumento descontrolado da viremia. Nesta fase os sintomas clássicos da infecção pelo HIV-1 se manifestam, caracterizando o estágio de AIDS.

Durante a fase crônica da infecção pelo HIV-1, respostas imunes celulares e humorais são desencadeadas, mas podem não ser suficientes para conter a propagação viral e o estabelecimento, mais tarde, do quadro de

imunossupressão. Esta fase crônica da infecção também se associa com uma grande depleção de células T CD4⁺ no tecido linfóide associado às mucosas (MALT), principalmente as células T CD4⁺CCR5⁺ que residem na lâmina própria. A homeostase das células T CD4⁺ de memória efetoras residentes nas mucosas depende da proliferação e migração de novas células. Deste modo, uma diminuição a nível sistêmico das células T CD4⁺ de memória central resulta no déficit de células T de memória efetoras; este processo está associado à progressão para a AIDS (29).

A ativação crônica do sistema imune em pacientes infectados pelo HIV-1 é uma característica da progressão para AIDS. Neste contexto é observado um “turnover” aumentado de células T, um maior número de células T ativadas, e níveis elevados de quimiocinas e citocinas próinflamatórias no soro (30). O grau de ativação do sistema imune é considerado por vários pesquisadores como melhor preditor da progressão da doença (31, 32).

A ativação imune na infecção pelo HIV-1 pode resultar em efeitos benéficos ou nocivos para o paciente. Podemos mencionar algumas consequências benéficas, como a restituição parcial (principalmente nas mucosas) do pool de células T CD4⁺ de memória depletado e restabelecimento transitório da competência imune (33, 34). Porém, a longo prazo, a ativação imune é deletéria. Alguns dos efeitos nocivos incluem a perpetuação da replicação do HIV, e conseqüente destruição da arquitetura dos linfonodos e fibrose (35, 36), retenção de células T efetoras nos linfonodos, perda da função tímica, drenagem de células virgens para a circulação (31, 37, 38).

A ativação imune causa depleção de células T CD4⁺ durante a infecção pelo HIV, e contribui com a morbidade relacionada à infecção, determinando a progressão para AIDS (39, 40). A ativação imune pode estar diretamente relacionada à replicação viral ou não, no entanto se presume que um dos principais responsáveis pela ativação imune é o próprio vírus (41-44). A Terapia Anti-Retroviral Altamente Ativa (HAART) diminui a carga viral e a ativação do sistema imune (26, 45). Também contribui para a persistente ativação do sistema imune a passagem de produtos microbianos do lúmen do intestino para a circulação, processo conhecido como translocação microbiana, que ocorre durante o curso clínico da infecção (31, 46).

O aumento dos níveis séricos de citocinas próinflamatórias, liberadas pelo sistema imune quando ativado pelas proteínas virais, ou pelo próprio vírion, é tanto uma causa quanto uma consequência do processo da ativação imune crônica (47). Além disso, a infecção das células T CD4⁺ reguladoras leva à sua própria depleção e pode agravar o estado de ativação imune (48, 49). À exceção destes efeitos relacionados diretamente com o vírus, também existem causas indiretas como, por exemplo, a acentuada destruição do tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT), a qual induz uma translocação aumentada da flora intestinal para a circulação e uma subsequente ativação imune (31, 46, 50).

Estudos recentes mostram as consequências imunológicas da infecção pelo HIV-1 e SIV nos tecidos linfóides associados às mucosas, os quais foram realizados principalmente em macacos rhesus infectados com SIV. A principal conclusão destes estudos é que a infecção aguda pelo HIV ou SIV é associada

a uma rápida, pronunciada e irreversível depleção de células T de memória na mucosa, principalmente aquelas que expressam o coreceptor viral CCR5. Assim, a grande população de células T de memória/ativadas CD4⁺ CCR5⁺ que residem nas mucosas (principalmente na lâmina própria) representa um alvo importante para a replicação viral. Este fenômeno não é observado no sangue periférico nem nos linfonodos, onde as células T residentes são majoritariamente negativas para o coreceptor CCR5, com fenótipo de células em repouso, *nãive* ou de memória central. A depleção de células T CD4⁺ do trato gastrointestinal é um processo multifatorial, tendo em conta que a perda inicial de células T (após alguns dias de infecção) é provocada diretamente pela infecção viral, e a subsequente perda das células T é causada pela morte induzida pela própria resposta celular citotóxica do indivíduo (29).

Um fator adicional para a amplificação da replicação do HIV-1 e manutenção de carga viral elevada é a alta taxa de expressão membranar do receptor de morte programada (PD-1). Tais receptores, quando ativados pela ligação com o seu ligante PD-L1, induzem diminuição da função celular, relacionada ao declínio da atividade citotóxica, baixa capacidade de proliferar e de produzir citocinas (51). Assim, viu-se, em pacientes infectados pelo HIV-1, que a expressão do receptor PD-1 está elevada em células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para este vírus, e que este aumento está associado com o deficiente funcionamento destas células, alta carga viral, baixo número de células T CD4⁺, e mais rápido progresso para AIDS (52). Este mesmo grupo verificou que a expressão do marcador CTLA-4, uma molécula com propriedades inibitórias sobre a resposta imune, está elevada em células T

CD4+ específicas para o HIV-1, e que este aumento também se correlaciona com o funcionamento celular deficiente e acelerado progresso da doença (53).

1.1.5. Reservatórios virais

Nos últimos anos, a importância de células T, macrófagos e DCs na patogênese da infecção pelo HIV-1 ganhou destaque com a descoberta de que estas células funcionam como importantes reservatórios virais (Revisado por 23). Em células T ativadas a replicação viral é rápida e eficiente, já que o LTR (“long terminal repeat”) viral possui sítios de ligação para fatores celulares que regulam de forma positiva a transcrição do HIV-1 como, o fator de transcrição NF-κB. Além disso, a proteína viral Tat aumenta a própria expressão gênica do HIV (83-85). A infecção pelo HIV-1 em células T ativadas tem efeito citopático (86). Contudo, células T de memória central são capazes de manter infecção viral mesmo em pacientes sob tratamento antirretroviral. Fatores como: longo tempo de vida na circulação; baixos níveis de ativação e consequente replicação viral; além de serem capazes de se proliferarem homeostaticamente, se somam favorecendo a capacidade dessas células de serem reservatórios virais (87).

As células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e DCs são reservatórios celulares para o HIV-1 e é mediante a permanência dentro destas que o vírus consegue escapar do reconhecimento pelo sistema imune. A infecção dos macrófagos pelo HIV-1 ocorre através do receptor celular CD4 e do coreceptor CCR5 principalmente (23, 88). Estudos em macacos rhesus infectados com “Simian Immunodeficiency Virus / HIV type 1” (SHIV), que é um vírus quimérico que contém os genes do envelope viral de um vírus HIV-1

duplotrópico inserido no genoma do SIV, demonstram a importância da infecção dos macrófagos *in vivo*, os quais são responsáveis pela manutenção da viremia após a depleção de células T característica da infecção pelo HIV-1 (89). Estes autores viram que a alta carga viral nestes animais era resultado da maciça infecção de macrófagos nos tecidos linfóides, os quais estavam depletados de linfócitos T CD4+.

Em macrófagos, a produção de vírions maduros ocorre principalmente em corpos multivesiculares, os quais são compartimentos citoplasmáticos ricos em moléculas MHC de tipo II. Os vírions nos corpos multivesiculares podem ser liberados da célula se ocorre fusão destes corpos com a membrana citoplasmática ou, de forma alternativa degradados nos lisossomos (90). Os macrófagos também são responsáveis pela disseminação do vírus para as células T CD4+ quando acontece a sinapse imunológica (Revisado por 23).

O terceiro tipo de reservatório do HIV são as DCs, as quais podem ser infectadas diretamente e têm a capacidade de liberar vírions em baixas quantidades (91). Os vírions que se ligam ao receptor celular DC-SIGN podem ser endocitados e degradados em compartimentos ácidos. No entanto, alguns vírions entram em compartimentos não ácidos evitando assim serem degradados. Estes últimos podem infectar células T CD4+ em trans logo após a fusão dos endossomos que contêm os vírions com a membrana plasmática da própria CD (92).

Em relação ao GALT, os reservatórios do HIV-1 compreendem principalmente células T CD4+ de memória, com macrófagos representando uma pequena parcela do reservatório total (em torno de 4%) (93). Essa

proporção, porém, não é estática, e no decorrer da progressão clínica da infecção, macrófagos gradativamente passam a compor uma parcela elevada do reservatório de HIV-1 no GALT (94, 95). Devido à gradual morte dos linfócitos infectados em decorrência da replicação produtiva do HIV-1, por infecção direta ou pela reativação de provírus latentes, a população de macrófagos infectados se torna responsável pela manutenção da carga viral tecidual do GALT na fase crônica da infecção do HIV-1 e, contribui para o "rebound" de produção viral detectado no plasma durante interrupções na HAART (96-98).

1.1.6. Resposta imune à infecção pelo HIV-1

A resposta imune contra o HIV-1 envolve diferentes mecanismos efetores, entre estes a produção de anticorpos neutralizantes e a resposta mediada por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) (41, 54). A resposta imune humoral tem um papel fundamental em muitas infecções virais, porém não é sempre capaz de eliminar definitivamente o vírus. Foi observado que os anticorpos presentes no soro de pacientes infectados pelo HIV-1 têm uma capacidade de neutralização (*in vitro*) insuficiente para isolados primários de HIV-1 (55-58). Os primeiros anticorpos neutralizantes encontrados em indivíduos infectados pelo HIV-1 são específicos para a região hipervariável V3 da glicoproteína gp120 do envelope viral ("V3 loop") (59). Diversos estudos sugerem que em pacientes nos quais a infecção está bem estabelecida os anticorpos neutralizantes têm uma contribuição mínima no controle da replicação do HIV-1, pois são dirigidos principalmente para epítomos que não são expostos na partícula viral (55, 56, 60).

Em relação à resposta imune celular, reconhece-se a participação fundamental dos linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (LTCs) no controle da replicação do HIV-1 (61). Tanto nos pacientes infectados pelo HIV-1 quanto em macacos infectados pelo SIV demonstrou-se a existência de LTCs em número variado e em diversos compartimentos anatômicos, como por exemplo, no sangue, espaço brônquio-alveolar, linfonodos, baço, pele, fluido cerebrospinal, sêmen e tecidos de mucosa vaginal e gastrointestinal (54).

Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (LTCs) inibem a replicação do HIV-1 *in vitro*, e muitos mecanismos, tanto citotóxicos como não citotóxicos, têm sido associados com este efeito antiviral (61-63). Os LTCs lisam as células infectadas pelo HIV-1 *in vitro* bloqueando assim a propagação da infecção (64). Do mesmo modo estas células efetoras também produzem fatores solúveis como, por exemplo, as β -quimiocinas CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES) que medeiam esse efeito (65-67). Durante os primeiros dias após a infecção pelo HIV-1 há um controle da replicação viral que se correlaciona com o aparecimento de uma resposta de LTCs específicos contra o HIV-1 (41). Este fenômeno foi demonstrado pela associação entre o aparecimento de populações celulares efetoras capazes de lisar células-alvo que expressam proteínas virais, e a diminuição do RNA viral plasmático numa infecção primária pelo HIV-1 (64, 68).

Apesar das respostas imunes celulares e humorais serem induzidas após a infecção pelo HIV-1, a replicação viral não é contida como um todo, e como consequência, é observada uma progressiva supressão do sistema imune. Uma das causas do chamado “escape imune” são as mutações nos

epítomos virais, que são alvos das repostas celulares e humorais (69). Dentre os mecanismos de escape para evadir a resposta humoral pode ser mencionada a mudança nos carboidratos do envelope viral que protegem os sítios de ligação dos anticorpos, que ocorrem com o curso da infecção (70). Um dos mecanismos de escape para evadir a resposta dos LTCs são mutações de epítomos em sítios essenciais para o reconhecimento do MHC de classe I ou do receptor da célula T (TCR), ou mutações nas regiões que as flanqueiam, afetando o processamento antigênico (69, 71). Além disso, a própria replicação viral favorece o escape imune, por ocasionar a destruição e exaustão dos linfócitos T CD4⁺ que poderiam responder à infecção.

1.1.7. Imunomodulação da replicação do HIV-1

Os principais alvos da infecção do HIV-1 são as células que expressam moléculas de CD4 em suas membranas. Essas células também expressam os co-receptores para a entrada do HIV-1, receptores de quimiocinas. Em 1995, Cocchi e colaboradores identificaram as quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 como fatores supressores do HIV-1, esse fato foi sucedido de uma série de publicações que demonstravam que essas quimiocinas eram antagonistas do HIV-1 R5 trópico que competiam pelo seu co-receptor CCR5 (19). Em 1996, Bleul e colaboradores demonstraram que CXCL12, ligante de CXCR4, bloqueava a entrada de uma variante T-trópica de HIV-1 (72). Desde então o papel inibitório dessas quimiocinas sobre a entrada do HIV-1 em suas células alvo foi bem estabelecido, contudo, outros estudos vieram a demonstrar que as quimiocinas ligantes também podem atuar em macrófagos e monócitos infectados induzindo um aumento da replicação viral. Este fenômeno está

relacionado a ativação da proteína G associada ao CCR5 que induz mecanismos intracelulares que estão relacionados com a ativação celular e acabam por aumentar a replicação viral (73).

Assim como as quimiocinas, as citocinas também possuem uma ampla influência sobre a modulação da replicação do HIV-1. Seus efeitos podem ser inibitórios, estimulatórios ou ambos (73). Dentre as citocinas capazes de favorecer a replicação do HIV-1 encontram-se: M-CSF, que estimula um aumento da expressão de CD4 e CCR5 em macrófagos favorecendo sua infecção pelo HIV-1 (74); TNF- α , que estimula a transcrição de mRNA viral, efeito parcialmente mediado por IFN- γ (75); IL-1, induz aumento da replicação viral mesmo em células cronicamente infectadas (76); IL-6, potencializa o efeito do TNF- α sobre a replicação do HIV por estimular a indução de NF- κ B (77). As citocinas classicamente descritas por inibirem a replicação do HIV-1 são: interferons do tipo 1, IFN- α e IFN- β , que possuem uma grande atividade inibitória da replicação viral, IFN- α é capaz de inibir a transcrição reversa assim como a transcrição de provirus integrados (78, 79), e IFN- β , se inibido com anticorpos neutralizantes em células infectadas permite um aumento da produção de p24 (80); IL-10, inibe a replicação viral mesmo em estágios precoces da infecção, inibe a expressão de mRNA viral, e tem seu efeito relacionado a sua capacidade de modular negativamente IL-6 e TNF- α (81-83); IL-13, possui efeito anti-HIV relacionado a diminuição da expressão de CD4, CCR5 e CXCR4 (84); IL-16, é um ligante natural de CD4 que compete pela ligação do receptor viral impedindo a entrada do HIV (85).

Vários fatores celulares de restrição ao HIV-1, induzidos por Interferon, já foram descritos atuando em diferentes etapas do processo de replicação viral, como o APOBEC3G/3F (*“Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like”*), BST2/CD317 (*“tetherin/bone marrow stromal cell antigen 2”*), TRIM5- α (*“tripartite-motif-containing 5 α ”*), e outros mais recentes (86-88). A proteína BST-2 restringe o brotamento das partículas maduras do HIV-1 mediante a retenção das mesmas na superfície da célula infectada, efeito este que é contra-balanceado pela proteína viral Vpu (86). TRIM5 α é uma proteína que, mediante a formação de multímeros, tem a capacidade tanto de bloquear o acúmulo de cDNA na célula infectada, como de impedir o transporte de cDNA ao núcleo da mesma (87, 89). Vários membros da família de enzimas citidinas-deaminases, APOBEC3G, APOBEC3F, APOBEC3A, têm sido descritos como potentes inibidores da replicação do HIV-1. As proteínas APOBEC3G/3F são incorporadas à partícula viral em brotamento, e provocam um grande número de mutações hiper-somáticas no DNA pró-viral durante o processo de transcrição reversa, através da desaminação da desoxi-citosina, com consequente formação da desoxi-uracila. Este acúmulo de mutações G \rightarrow A gera vírions não-infectivos, impedindo com isso novos ciclos de infecção. A proteína viral Vif possibilita ao HIV-1 o escape deste mecanismo celular, marcando a APOBEC3A, 3F e 3G para a degradação nos proteassomas via ubiquitinação (87, 90).

Além da ação de fatores de restrição viral, a replicação do HIV-1 no hospedeiro pode ser modulada por diversas moléculas do próprio hospedeiro, por depender do estado metabólico e de ativação celular. A ação de citocinas, hormônios e outras proteínas sobre a replicação do HIV-1 é alvo de estudos e

fonte de descoberta de novas interações entre o vírus e o hospedeiro, contribuindo assim para o melhor entendimento dos mecanismos de infecção e controle da replicação do HIV-1.

1.2. O Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) e o Peptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária (PACAP)

1.2.1. Caracterização, receptores e vias de sinalização

O neuropeptídeo VIP (do inglês “Vasoactive Intestinal Peptide”; Peptídeo Intestinal Vasoativo) (Figura 7) foi isolado de células do intestino delgado de suínos por Said e Mutt em 1970 (91), e caracterizado por estes estudiosos como uma molécula de 28 aminoácidos da família secretina/glucagon dotada de potentes e distintos efeitos biológicos, capaz de provocar vasodilatação sistêmica, aumento do débito cardíaco, hipotensão, estimulação respiratória e hiperglicemia. Desde este estudo pioneiro, inúmeras outras propriedades desta molécula foram relatadas, e hoje se sabe que este peptídeo está amplamente distribuído pelo organismo, e que atua como neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico, como um agente anti-inflamatório endógeno, e como modulador de ações do sistema imunológico (92).

O neuropeptídeo PACAP (do inglês “Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide”; Polipeptídeo Ativador da Adenilato-ciclase Pituitária) (Figura 1.7) foi isolado e identificado inicialmente no hipotálamo de ovinos por Miyata e colegas, em 1989, e recebeu este nome em função da sua

capacidade de ativar a enzima Adenilato Ciclase e induzir a formação de AMP cíclico em células da pituitária anterior de ratos (93). Estes autores também observaram que o PACAP aumenta a liberação dos Hormônios do Crescimento e Luteinizante, Prolactina e Corticotrofina por estas mesmas células em doses muito baixas (93). No estudo original, os autores descreveram que PACAP apresenta 68% de homologia na seqüência de aminoácidos com o peptídeo VIP, e que a sua capacidade de ativar a enzima Adenilato Ciclase é 1000 vezes maior que a de VIP (93). Um trabalho posterior identificou duas isoformas de PACAP, uma de 38 aminoácidos (PACAP-38), e outra com 27 aminoácidos (PACAP-27) (Figura 1.7) (94). A isoforma PACAP-38 é a mais frequente nos tecidos, (95, 96), e ambas apresentam as mesmas atividades biológicas. Atualmente se sabe que o polipeptídeo PACAP está amplamente expresso no sistema nervoso central e em tecidos periféricos, e é capaz de exercer um elevado número de efeitos biológicos, como, entre outras, atividade de neurotransmissão e de modulação do sistema imunológico (97).

Em relação à evolução dessas moléculas, ambos são bem conservados entre diversos filos, fato que sugere uma forte pressão seletiva na manutenção das seqüências destas moléculas, ressaltando a importância biológica destes peptídeos nos organismos (98).

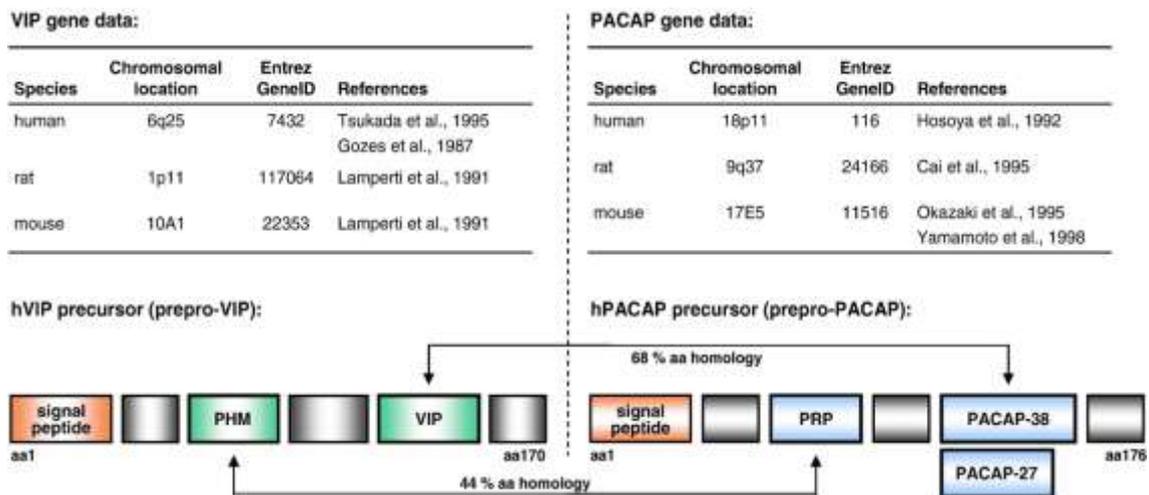


Figura 1.7 - Gene e peptídeo precursor de VIP e PACAP.

Extraída de Dickson L & Finlayson K, 2009 - Pharmacology & Therapeutics.

VIP e PACAP apresentam forte homologia em suas sequências peptídicas, e se originam de forma semelhante. Ambos são expressos inicialmente inseridos em um precursor que dá origem a eles e outros peptídeos. Seguida a clivagem e processamento, VIP e PACAP passam a existir em suas formas maduras, PACAP podendo existir como um peptídeo com 38 aminoácidos (forma majoritária) ou com 27 aminoácidos.

Os receptores de VIP e PACAP foram designados como VPAC1, VPAC2 e PAC1 pela União Internacional de Farmacologia (IUP) de acordo com a afinidade relativa pelos respectivos ligantes (99). Com a clonagem de outros receptores de peptídeos da família Secretina/Glucagon, uma nova subfamília de GPCRs foi descoberta, e a partir daí, denominada de classe B de GPCR, ou classe II de GPCR, ou também família de receptores “secretin-like” (100), família da qual os receptores de VIP e PACAP fazem parte. Os receptores membros da subfamília B de GPCRs apresentam entre 25 e 50% de homologia no nível de aminoácidos e pouca homologia de sequência primária com membros de outras classes de GPCRs, porém, como membros do grupo de

receptores acoplados a proteína G, compartilham a conformação típica de sete domínios transmembrana (denominadas TM I até TM VII), interconectadas por alças intra e extracelulares (100).

Dois desses receptores, VPAC1 e VPAC2, reconhecem PACAP e VIP com igual afinidade; o terceiro, PAC1, reconhece PACAP com maior afinidade (101-103). O mRNA de PAC1 é alvo de “splicing” alternativo, e por isso diferentes variantes existem no organismo e recrutam diferentes segundos mensageiros. São descritas cinco variantes resultantes do processo de “splicing” na região codificante para a terceira alça intracelular do receptor PAC1 em ratos (104). Algumas dessas variantes foram caracterizadas pela ausência (*short variant*, S), ou pela presença de um ou dois cassetes de 28 aminoácidos (*hip* ou *hop1 variant*), ou 27 aminoácidos (*hop2 variant*) (104). A presença do cassete hip diminui a ativação da adenilato ciclase e impede a ativação da fosfolipase C (PLC) (104). A quarta variante apresenta uma deleção de 21 aminoácidos no domínio N-terminal (extracelular), que resulta em diferente seletividade para as isoformas PACAP27 e PACAP38 (105). A quinta variante foi caracterizada por apresentar diferenças no quarto domínio transmembrana (TM4) e foi clonada a partir do cerebelo de ratos (106).

Cada um desses GPCRs é acoplado a sistemas de segundos mensageiros, sendo o principal via proteína G heterotrimérica (G_{αs}) e Adenilato Ciclase para produção de AMP cíclico e ativação da via de PKA (Figura 1.8) (100). Estes receptores podem também ativar outros sistemas de mensageiros intracelulares em paralelo ou ao invés do descrito acima (Figura 8). Entre as vias já descritas estão: via de óxido nítrico (107), Ativação de PLC via G_{αq} ou

G_q, levando ao aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ e ativação da via de PKC, por conseguinte (104), via de PI3K (108), via de src (109), via de MAPKs (110, 111), via de Jak/STAT e NF-κB (112, 113). Ampla capacidade dos receptores em ativar diversas vias celulares, dependentes ou não de proteínas G, é condizente com os diversos efeitos biológicos já descritos para VIP e PACAP.

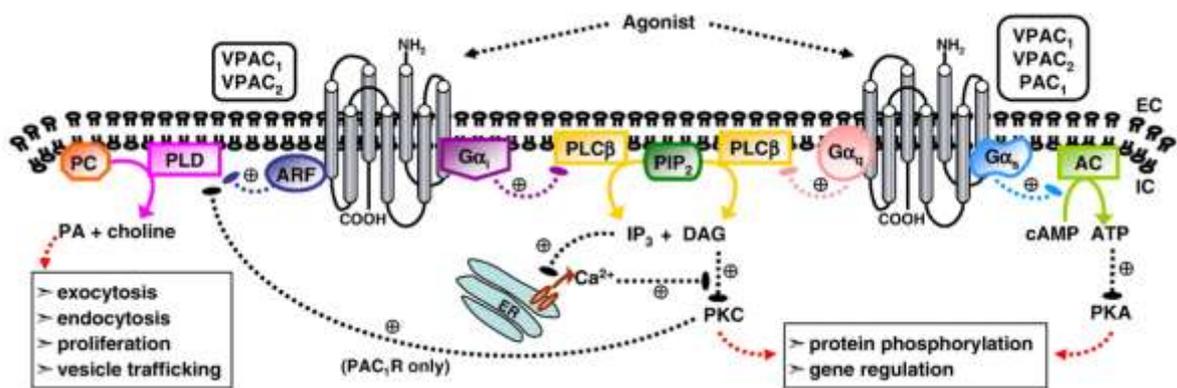


Figura 1.8 – Sinalização clássica ativada por VIP e PACAP.

Extraída de Dickson L & Finlayson K, 2009 - Pharmacology & Therapeutics.

A ativação de VPAC1 e VPAC2 é capaz de promover a ativação de 3 tipos de proteína G, dependendo da célula-alvo, a ativação de G_s leva a ativação da adenilato ciclase, aumentando assim os níveis de AMP cíclico e ativando a sinalização via PKA. A ativação de G_q promove a iniciação da via de cálcio, ativando em última instância a sinalização via PKC. A ativação de G_i inibe a produção de AMP cíclico, diminuindo a sinalização via PKA, ao mesmo tempo favorecendo a ativação da via de PKC. Além disso, VPAC1 e VPAC2 também se associam a proteína ARF, modulando a sinalização via ácido fosfatídico e colina. A sinalização modulada por PAC1 compreende principalmente as ações promovidas por G_s e G_q. VIP e PACAP dessa forma regulam a excitose, endocitose, tráfego de vesículas, proliferação, e a expressão de vários genes.

De fato alguns trabalhos demonstram que os receptores de VIP e PACAP são capazes de interagir com outras proteínas acessórias (proteínas outras que não G) e transduzir um sinal intracelular (114). Das proteínas desse

grupo já foi descrito que VPAC1, porém não VPAC2, é capaz de interagir com RAMPs (115, 116). E particularmente, por interagir com RAMP2, VPAC1 induz a produção de inositol trifosfato e eleva a concentração intracelular de Ca^{2+} , sem afetar o seu acoplamento com a Adenilato Ciclase (115). Outra proteína acessória já descrita é a S-SCAM, que foi identificada ligando o C-terminal de VPAC1 através de seu domínio PDZ, o que implica no recrutamento potencial de VPAC1 para os terminais sinápticos (117), e, além disso, foi demonstrado que nessa condição ocorre inibição da produção de AMP cíclico via VPAC1, e inibição da internalização do receptor após estímulo com VIP (117). Além dessas proteínas acessórias, VPAC1 é capaz também de interagir diretamente com a Calmodulina, porém a consequência dessa interação ainda é desconhecida (118). E além da capacidade interagir com “proteínas acessórias não-G” VPAC1 é capaz de dimerizar com VPAC2 e com os receptores de Secretina, sendo que a significância dessa interação ainda não é conhecida (119).

1.2.2. Funções biológicas

VIP e PACAP, assim como os seus receptores são produzidos e estão expressos no tecido nervoso central e em tecidos periféricos, os quais podem apresentar, simultaneamente, tanto os peptídeos quanto os seus receptores. As principais fontes de VIP e PACAP são os nervos periféricos e células do sistema imune, como células de Langerhans, monócitos/macrófagos, e linfócitos T CD4+ do tipo Th2 (97, 120). Considerável progresso no entendimento das atividades funcionais de VIP e PACAP foram obtidos nos últimos anos com a realização de estudos em animais nocauteados para os

seus receptores (121). Assim, a partir destes estudos depreende-se que estes peptídeos regulam atividades metabólicas e endócrinas, exercem efeitos sobre o tecido gastrointestinal, são agentes imunomoduladores e anti-inflamatórios, participam do desenvolvimento neural e apresentam efeitos neuroprotetores. De forma resumida, pode-se dizer que VIP e PACAP estimulam a secreção de Insulina e de Glucagon pelas células β do pâncreas; regulam o metabolismo de lipídeos, apetite e o peso corporal, e estimulam a motilidade gastrointestinal (peristaltismo intestinal) (97, 121). Efeitos neuroprotetores de VIP e PACAP foram também definidos a partir de investigações realizadas em diversos modelos experimentais, que mostraram que ambos os peptídeos protegem células do tecido nervoso de lesões provocadas por agentes neurotóxicos, incluindo etanol, peróxido de hidrogênio e a glicoproteína 120 (gp120) do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e reduziram o dano tecidual resultante de isquemia cerebral (122-126). VIP e PACAP podem também reduzir os danos teciduais decorrentes de doenças neurodegenerativas, como Doenças de Parkinson e de Alzheimer (127, 128).

1.2.3. VIP e PACAP no sistema imune

VIP e PACAP participam de uma variedade de funções do sistema imune e uma das suas principais funções imunomodulatórias é atuar como uma citocina anti-inflamatória. VIP e PACAP são produzidos por células T do tipo Th2, células T CD8+ e macrófagos, principalmente (mas não somente) em condições inflamatórias (97, 129). O efeito anti-inflamatório de VIP e PACAP está bem estabelecido, do ponto de vista experimental, em diversas condições patológicas, como em doenças autoimunes (artrite reumatoide, diabetes tipo 1,

uveíte e encefalite autoimunes, síndrome de Sjögren, doença inflamatória do intestino), e infecciosas (choque séptico), assim como na prevenção da síndrome do enxerto versus hospedeiro (130-134). Nestas condições, o efeito anti-inflamatório destes peptídeos é marcante, e ocorre de acordo com a sua capacidade de modular a síntese e produção de diversos mediadores pró ou anti-inflamatórios, como descrito acima. Os efeitos anti-inflamatórios de VIP também podem ser exercidos através da sua capacidade de diminuir a expressão celular dos receptores do tipo Toll (TLRs). VIP promove a redução da expressão de TLR-2 e TLR-4 em células T CD4+ de animais portadores de colite experimental, e também em células sinoviais obtidas de pacientes com artrite reumatoide, efeitos que possuem potencial terapêutico. VIP também reduz a expressão destes receptores em macrófagos humanos ativados pelos próprios agonistas de TLRs, evidência adicional do seu papel imunoregulador e anti-inflamatório (135-139).

VIP e PACAP, junto com seus receptores, possuem papel importante em muitos outros campos da resposta imune dependente de células T, como controle de infecções, doenças auto-imunes e rejeição de transplantes. Em linfócitos T CD4 em repouso, VPAC1 é expresso constitutivamente, e após ativação (por anticorpos anti-CD3 e anti-CD28) tem sua expressão diminuída enquanto a expressão de VPAC2 é induzida (140). De forma curiosa, mesmo com a diferenciação dos linfócitos T para os fenótipos "Th" sendo dependente principalmente da interação com células apresentadoras de antígeno, alguns estudos mostram que VIP e PACAP são capazes, em alguns casos, de induzir respostas Th2 diretamente, via recrutamento de fatores de transcrição e indução de citocinas específicos desse fenótipo, tais como IL-4, IL-5 e IL10

(141-143). Os receptores VPAC1 e VPAC2 aparentam estar envolvidos nessas ações, como por exemplo, em linfócitos T CD4 ativados VPAC2 é expresso durante a diferenciação para Th2, indicando sua possível participação no processo (140). Paralelo a isso, a ativação de VPAC1 por VIP e PACAP diminui a produção, *in vitro* e *in vivo*, de CXCL10 e aumentam a produção de CCL22, quimiocinas específicas, respectivamente, do perfil Th1 e Th2 (144). Tais ações poderiam levar o recrutamento preferencial de células T com perfil Th2 para os sítios de inflamação.

As células apresentadoras de antígenos regulam a diferenciação e proliferação de linfócitos T, através de moléculas co-estimulatórias e citocinas específicas. Através dessa interação, os linfócitos T diferenciam-se, após encontro com antígenos, em quatro principais subtipos, denominados Th1, Th2, Th17 e Treg (145). Dentro desse contexto, estudos *in vitro* demonstraram que VIP e PACAP são capazes de alterar, via VPAC1, a expressão de das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em APCs (Figura 9) (146). VIP e PACAP também aparentam regular a capacidade das células dendríticas em ativar linfócitos T (Figura 9) (143). Em células dendríticas derivadas da medula óssea, estes neuropeptídeos promovem o aumento, via VPAC1, de CD86, e por conseguinte permitindo proliferação e diferenciação de linfócitos com o perfil Th2, *in vitro* e *in vivo* (Figura 9) (143). Em contraste, VIP/PACAP diminuem a expressão de CD80 e CD86 em macrófagos estimulados com LPS e dessa forma, reduzindo a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T e também de liberar citocinas do perfil Th1 e Th2 (Figura 9) (147). Em paralelo a essas funções, células dendríticas tanto murinas quanto humanas diferenciadas *in vitro* na presença de VIP exibem um perfil “tolerogênico”,

caracterizado pelo fenótipo CD11c^{low} CD45RB^{high} com ausência de expressão de CD80, CD86 e CD40 e capacidade de liberar grandes quantidades de IL-10 após estímulo (Figura 9) (130). Estas células dendríticas diferenciadas na presença VIP se mostram capazes de promover a diferenciação de linfócitos em Tregs tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (148, 149).

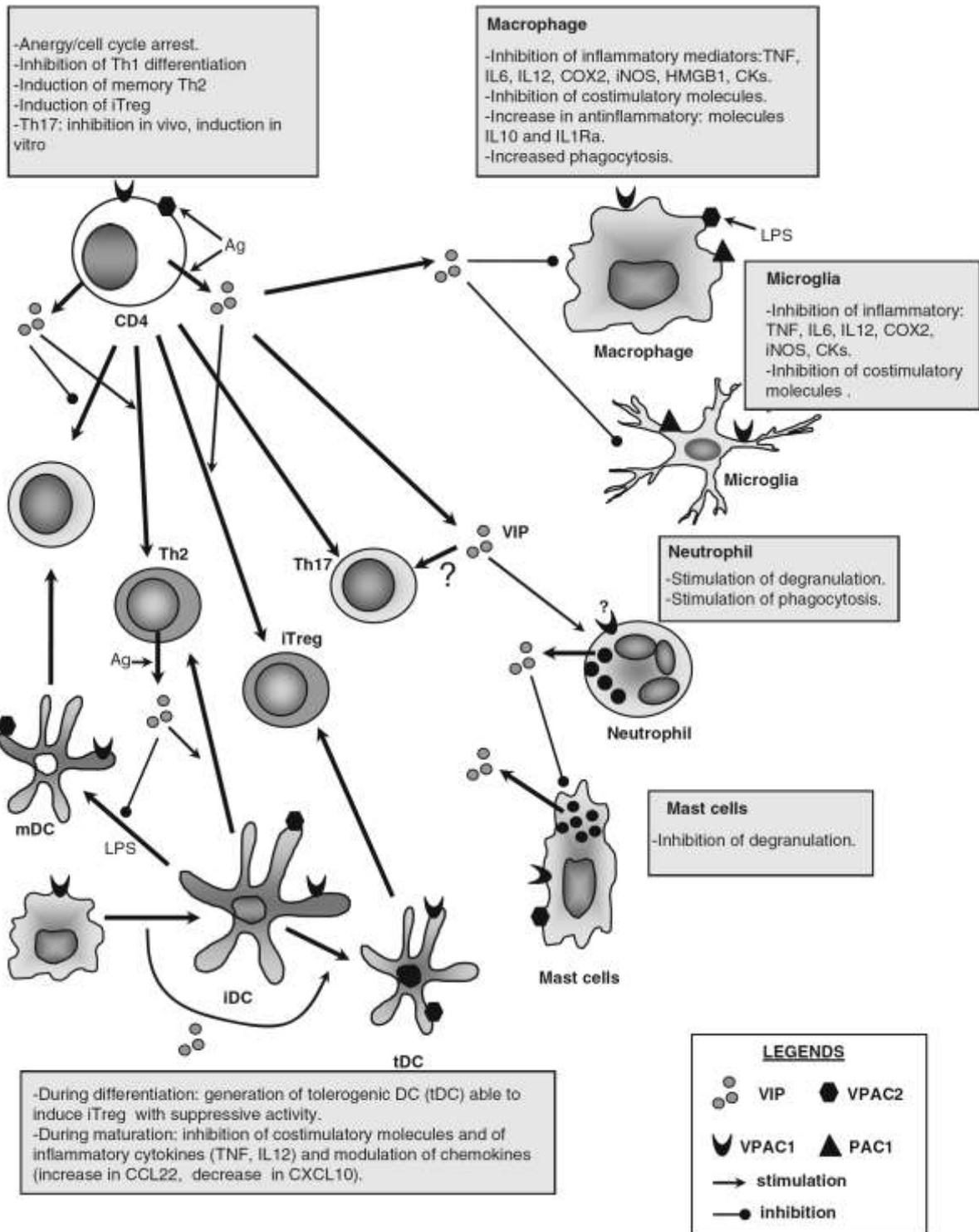


Figura 1.9 - Efeitos de VIP e PACAP sobre células do sistema imune.

Extraída de Ganea D & Delgado M, 2011 – Amino Acids.

VIP é liberado no contexto de uma resposta imune por linfócitos CD4, CD8 e por mastócitos e neutrófilos. Várias células imunes expressam diferencialmente os três receptores de VIP (VPAC1, VPAC2 e PAC1), cuja expressão é modulada por estímulos antigênicos e inflamatórios. VIP atua sobre macrófagos e a microglia inibindo a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas (CK), lipídios (PGE2 por inibição da ciclooxigenase 2, COX2) e radicais livres (óxido nítrico por inibição da forma indutível de NO sintase, iNOS), e estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-1Ra). Além disso, VIP reduz a expressão de moléculas coestimuladoras em macrófagos e células dendríticas maduras (mDCs), limitando a expansão clonal das células Th1 em condições inflamatórias. VIP modula a resposta adaptativa de diferentes maneiras. Primeiro, VIP inibe a diferenciação de células Th1 e favorece a expansão das células Th2 através de vários mecanismos não-exclusivos que envolvem a regulação das funções DC, fatores de diferenciação Th1, quimiocinas e apoptose. Em segundo lugar, o VIP induz o surgimento de células Treg (iTreg) através de efeitos diretos sobre células T naíves e indiretamente através da geração de DCs tolerantes (DCP). VIP reduz a degranulação dos mastócitos, enquanto que as funções antimicrobianas dos neutrófilos parecem ser estimuladas por VIP.

Os macrófagos constituem a principal fonte de quimiocinas e moléculas pró-inflamatórias envolvidas em respostas inflamatórias e constituem a maior parcela de células que migram para o tecido inflamado. Eles expressam constitutivamente VPAC1 e PAC1, e quando expostos a estímulos inflamatórios passam a expressar também VPAC2 (Figura 1.9 e 1.10) (147, 150). As principais ações de VIP e PACAP sobre macrófagos são bem documentadas por diversos autores; em macrófagos não estimulados, VIP e PACAP induzem a produção de IL-6 através da ativação de PKA e PKC (Figura 9 e 10) (151, 152). Em contraste, em macrófagos estimulados (com LPS), VIP e PACAP inibem a produção das citocinas inflamatórias TNF-alfa, IL-6 e IL-12 (Figura 1.9 e 1.10) (152-154). O efeito inibidor sobre a produção de TNF-alfa e outros fatores inflamatórios produzidos por macrófagos aparenta ser mediado

primariamente por VPAC1, sendo que VPAC2 (induzido após estímulo) também poderia participar (155). VIP e PACAP também se mostram capazes de induzir a síntese e liberação de moléculas anti-inflamatórias, tais como a IL-10 e o antagonista endógeno do receptor de IL-1 (IL-1Ra), promovendo assim a supressão de respostas inflamatórias (Figura 1.9 e 1.10) (156). Além disso, a produção de diversas quimiocinas pode ser alterada por VIP e PACAP. Em macrófagos e na micróglia estimulados com LPS, VIP e PACAP inibem a produção de MIP-2, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 e RANTES (157-159).

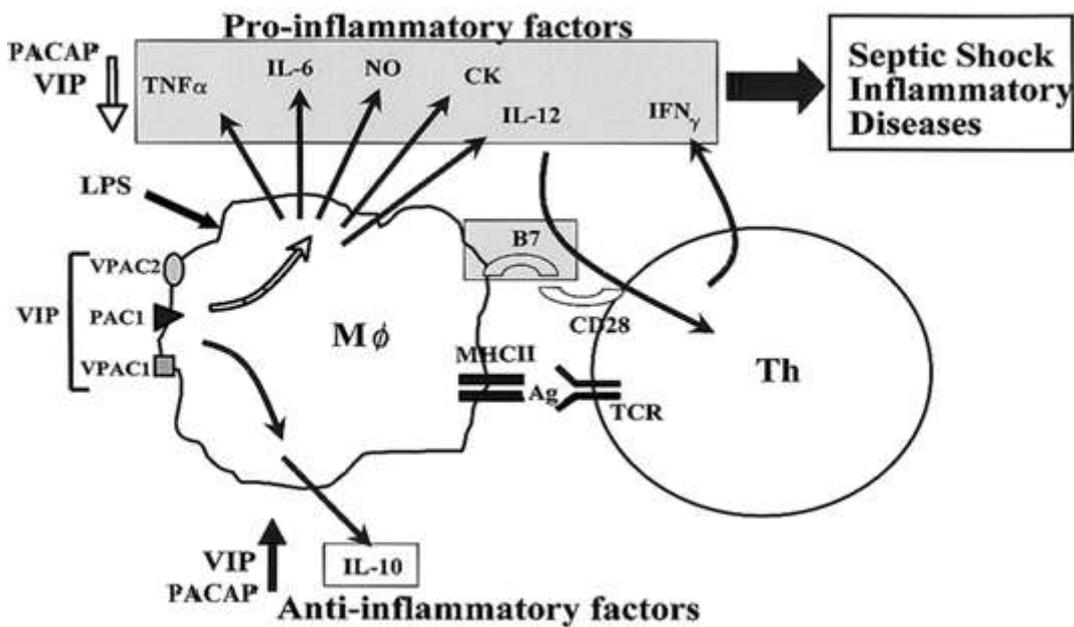


Figura 1.10 - Efeitos de VIP e PACAP sobre macrófagos ativados.

Extraída de Ganea D & Delgado M, 2002.

VIP ou PACAP liberados na proximidade de macrófagos ativados se ligam a receptores específicos (VPAC1, VPAC2, PAC1) e inibem a expressão e produção de agentes pró-inflamatórios (TNF, IL-6, óxido nítrico [NO], quimiocinas [CK] e IL-12) e, indiretamente, através da IL-12, VIP e PACAP inibem o IFN- γ por células Th estimuladas por antígeno. Em contraste, VIP e PACAP regulam a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. VIP e PACAP também inibem a expressão das moléculas coestimuladoras B7.1 e B7.2, e a subsequente indução da proliferação de células T. Moléculas derivadas de macrófagos inibidas por

VIP/PACAP são descritas nas áreas sombreadas, enquanto que as induzidas por VIP/PACAP estão descritas nas áreas claras.

Muitas das citocinas pró-inflamatórias e proteínas co-estimulantes afetadas por VIP e PACAP são conhecidas por serem reguladas por NF- κ B (160). VIP e o PACAP inibem a translocação nuclear de NF- κ B e a sua ligação à vários promotores em macrófagos murinos e células T (153, 161, 162). Em células de mamíferos, a família Rel inclui NF- κ B1 (p50), RelA (p65), c-Rel, RelB e NF- κ B2 (p50B, p52) (163). NF- κ B consiste principalmente de heterodímeros p50/p65, que no citoplasma são mantidos inativos via interação com o inibidor I κ B em células não-estimuladas. Estímulos, como o LPS e citocinas pró-inflamatórias, induzem a fosforilação de I κ B, seguido da liberação e translocação nuclear subsequente dos heterodímeros p50/p65, que se ligam às sequências reguladoras em uma variedade de genes alvo (163).

Além de NF- κ B, VIP e PACAP também modulam CREB, fator de transcrição clássico da via AMPc/PKA e de quinases dependentes de Ca²⁺, induzida por vários GPCRs (164). CREB e NF- κ B compartilham a proteína de ligação de CREB/p300 (proteína CBP/p300) como cofator, e a ativação de CREB pode resultar na inibição de NF- κ B, regulando assim a resposta inflamatória (165, 166). A relação entre as vias de sinalização dependentes de AMPc e independentes de AMPc para o efeito inibidor de VIP/PACAP na expressão de TNF α e o efeito sobre NF- κ B e CREB varia conforme o tipo celular estudado. VIP e PACAP são capazes de modular ambos via PKA e PKC, direta e indiretamente (164, 165, 166). A ligação de VIP e PACAP a VPAC1 inibe a produção de TNF α a nível transcricional em macrófagos Raw 264.7 estimulados por LPS através de duas vias intracelulares, uma via

dependente de AMPc que preferencialmente ativa CREB e uma via independente de AMPc que inibe a ativação de NF- κ B (167). VIP e PACAP também diminuem a atividade transcricional dependente de NF- κ B na linhagem celular monocítica humana THP-1 estimulada por LPS, sendo este efeito exercido em vários níveis (168). Os neuropeptídeos inibem a translocação nuclear de NF- κ B e a ligação ao DNA inibindo a fosforilação/degradação de I κ B mediada por I κ B (IKK) (168, 169). Além disso, VIP e PACAP inibem seletivamente a interação de NF- κ Bp65 com CBP, enquanto aumentam as interações entre CBP e CREB (168, 169). O receptor específico VPAC1 medeia os efeitos de VIP/PACAP na translocação nuclear de NF- κ Bp65 e a formação de complexos p65/CBP (168, 169). No entanto, enquanto que uma via independente de cAMP é principalmente responsável pelos efeitos na translocação p65, a via cAMP/PKA medeia os efeitos na disponibilidade e / ou ativação do CBP e TBP dos coativadores.

Em contraste, o aumento no AMPc por VIP e PACAP não parece afetar diretamente a inibição de NF- κ B, e a inibição de PKA modula apenas parcialmente o efeito inibitório do VIP (169). A inibição da atividade transcricional de NF- κ B pode resultar de maiores quantidades de CREB ligadas a CRE que competem com NF- κ B para limitar quantidades do coativador CBP, podendo este ser um dos mecanismos relacionados a ação inibitória de VIP e PACAP sobre NF- κ B (170).

1.1.4. VIP, PACAP e a infecção pelo HIV-1

Em 2002, Branch e colaboradores descreveram que a ativação de VPAC1 (um dos receptores de VIP) com um ligante específico, induz um evento de sinalização que aumenta a replicação da infecção pelo HIV-1 em linfócitos. Este estudo mostra que a ativação específica de VPAC1 eleva a produtividade da infecção pelo HIV-1 em células primárias humanas infectadas *in vitro* (171), mas não elucida os mecanismos envolvidos nesta facilitação da infecção do HIV-1 mediada por este receptor.

Depois do trabalho de Branch e colaboradores (2002), outros estudos foram realizados com destaque para o executado por Bokaei e colaboradores (2007), demonstrando que a estimulação com agonistas específicos de outro receptor de VIP e PACAP, VPAC2, resulta na inibição da integração do HIV-1 ao genoma de linfócitos, inibindo a infecção produtiva do HIV-1 (172), embora sem definir os mecanismos responsáveis pela inibição da integração viral. Estes resultados, portanto, demonstram uma interessante consequência da estimulação do receptor VPAC2, resultando em um efeito inibitório na infecção por HIV-1. Este fenômeno mostrou-se contrário ao mostrado por Branch (2002), sugerindo que o VPAC1 e VPAC2 desempenhariam funções opostas.

Estes achados despertam o interesse o efeito dos neuropeptídeos ligantes destes receptores, VIP e PACAP na patogênese da infecção pelo HIV-1; mesmo assim, são poucos os trabalhos disponíveis na literatura relacionados com o papel de VIP ou PACAP na infecção pelo HIV-1. Assim, com base nestes estudos, em 2013, nosso grupo demonstrou que VIP e PACAP inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos, e essa inibição pode ser

obtida com o uso combinado de ambos os neuropeptídeos em doses baixas, ou mesmo isoladamente, quando em exposição repetida. A ação de VIP ocorre através dos receptores VPAC1 e VPAC2, enquanto a de PACAP ocorre primariamente via o receptor PAC1. Isoladamente, VPAC1 promove o aumento da replicação viral, enquanto VPAC2 e PAC1 isolados atuam inibindo a produção de HIV-1. A exposição a VIP e PACAP resulta na produção de β -quimiocinas e de IL-10 por macrófagos, e estas moléculas participam da inibição promovida por VIP e PACAP, correspondendo à parte do mecanismo inibitório do HIV-1 por estes neuropeptídeos.

2. Racional e hipótese

Os neuropeptídeos VIP e PACAP são membros da família de peptídeos Secretina/Glucagon e são distribuídos sistemicamente, agindo através de três receptores expressos em diversos tipos celulares (VPAC1, VPAC2 e PAC1) (97, 129). Ambos os neuropeptídeos apresentam diversas funções reguladoras no sistema neuro-imune-endócrino, e suas ações descritas envolvem principalmente o controle da produção de citocinas, ativação e diferenciação celular (97, 129). A sinalização de VIP e PACAP depende de quais dos seus receptores são ativados, e envolve vias complexas. As principais proteínas envolvidas nos estágios iniciais do sinal são a PKA, PKC e PI3K, as quais respondem pelas funções modulatórias destes neuropeptídeos, participando na modulação de fatores de transcrição e de proteínas do ciclo celular (97, 129). São apontados por vários autores como potenciais alvos de abordagens terapêuticas em patologias auto-imunes, devido ao potencial anti-inflamatório que possuem. Em relação à infecção pelo HIV-1, alguns autores demonstraram

que a ativação específica de dois dos seus receptores (VPAC1 e VPAC2) por ligantes não-naturais altera a replicação viral em PBMCs e em linhagens linfocíticas. Junto a isso, nosso grupo demonstrou que VIP e PACAP são capazes de inibir a replicação do HIV-1 em macrófagos primários (Temerozo et al, 2013).

Sabe-se que VIP e PACAP inibem a atividade dos complexos CDK9/Ciclina T1 e CDK2/Ciclina E, através do aumento da produção dos inibidores desses complexos, p27 e p57, membros da família KIP/CIP de inibidores de CDKs (173-175). Além disso, APOBEC3G foi descrito também como um alvo de fosforilação por PKA, e que a atividade de outros membros da família APOBEC pode também ser regulada por PKC, duas proteínas cinases envolvidas na sinalização de VIP e PACAP (176, 177).

Portanto, é possível que no contexto da infecção pelo HIV-1, VIP e PACAP possam modular etapas vinculadas ao fenômeno de latência/transcrição do HIV-1 em células infectadas, regulando a disponibilidade de componentes necessários para o estabelecimento da infecção produtiva.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Identificar os mecanismos moleculares envolvidos na inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos pelos neuropeptídeos VIP e PACAP.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Verificar se VIP e PACAP inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos expostos a estes neuropeptídeos antes da infecção.
- 2) Verificar se VIP e PACAP modulam a expressão dos receptores de entrada do HIV-1 na célula (CD4, CXCR4 e CCR5).
- 3) Analisar a expressão dos receptores de VIP e PACAP (VPAC1, VPAC2 e PAC1) em macrófagos infectados pelo HIV-1.
- 4) Analisar a atividade de componentes da via de sinalização inicial de VIP e PACAP (PKA, PKC) em macrófagos infectados e tratados com os neuropeptídeos, correlacionando a atividade dessas proteínas com a ação inibitória sobre o HIV-1.
- 5) Verificar se a atividade de VIP e PACAP sobre proteínas do ciclo celular e ativadoras da transcrição está envolvida na inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos.
- 6) Analisar se o genoma viral integrado em macrófagos infectados e expostos a VIP e PACAP apresentam mutações G→A, típicas da atividade antiviral de proteínas da família APOBEC.
- 7) Avaliar se vírus obtidos de macrófagos infectados e expostos à VIP e PACAP apresentam alterações na sua infectividade.

4. Metodologia

4.1. Declaração de ética

Todos os procedimentos experimentais envolvendo células humanas foram realizados com amostras obtidas após consentimento informado por escrito e foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz / FIOCRUZ (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sob o número 397-07.

4.2. Isolados de HIV-1, reagentes e kits de ELISA

Os ensaios de infecção celular foram realizados com o isolado Ba-L monocitotrópico e dependente de CCR5, doado para nós pelo NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Divisão de AIDS, NIAID, NIH, MD, EUA). Este isolado foi expandido em células mononucleares de sangue periférico ativadas por fitohemaglutinina (PBMCs) de doadores saudáveis, como descrito (67). VIP e PACAP recombinante humano e os inibidores farmacológicos (PKA: H89; PKC: Go6383 e o inibidor de PKA/PKC/PKG: H7) foram adquiridos da Tocris, EUA. Os kits ELISA p24 de HIV-1 foram adquiridos da Sino Biologicals, EUA.

4.3. Células primárias e linhagens celulares.

Os macrófagos derivados de monócitos humanos foram obtidos a partir de PBMCs isolados por centrifugação em gradiente de densidade (Ficoll-Paque PREMIUM, GE Healthcare Life Sciences, EUA) a partir de preparações de *buffy-coat* de sangue de doadores saudáveis, e diferenciados através da aderência em placas de plástico. Resumidamente, 10^6 PBMCs/poço foram

distribuídos em placas de 96 poços (Costar, EUA) em DMEM com baixa glicose (DMEM, LGC Bio, Brasil) contendo 10% de soro humano (Millipore, EUA) e penicilina-estreptomicina (Gibco, EUA). As células foram mantidas a 37°C em 5% de CO₂ durante 7-8 dias para diferenciação de monócitos em macrófagos. As células não aderentes foram lavadas e a camada de macrófagos restante foi mantida em DMEM com 5% de soro humano. A pureza da cultura se manteve em torno de 90%, conforme determinado por análise de citometria de fluxo usando anticorpos monoclonais anti-CD3 (BD Bioscience, EUA) e anti-CD68 (BD Bioscience, EUA). Para alguns ensaios (ver abaixo), os macrófagos foram preparados em garrafas plásticas de cultura de 25 cm², seguindo o mesmo protocolo, mas dispensando 4 x 10⁷ PBMCs/5 mL de meio/frasco, ou em placas de 6 poços com 10⁷ PBMCs/3 mL. A linhagem celular de leucemia monocítica humana THP-1 (ATCC: TIB202TM) foi mantida em meio DMEM com baixa glicose (LGC Bio, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Cultilab, Brasil) e penicilina-estreptomicina. As células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos tratando-as com 40 ng/mL de PMA durante 3 dias. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e incubadas com meio fresco por mais 3 dias. As células TZM-bl (obtidas através do NIH AIDS Reagent Program, Dr. John C. Kappes, Dr. Xiaoyun Wu e Tranzyme Inc) foram mantidas com DMEM com baixa glicose com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e penicilina-estreptomicina.

4.4. Ensaio de citotoxicidade

Para testar a segurança dos inibidores farmacológicos em macrófagos humanos, estas células foram expostas aos compostos nas suas

concentrações de uso durante 72 horas, em placas de 96 poços. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de uma solução com 1 mg/mL de XTT (Sigma, EUA) e 15 ng/ml de PMS (Sigma, EUA) dissolvidos em DMEM sem soro, foram adicionados à cultura celular. Após 3-4 horas, a densidade óptica (OD) foi medida usando um leitor de placas automático com comprimentos de onda em 450 nm para avaliação e de onda de referência de 690 nm.

4.5. Infecção pelo HIV-1

Os macrófagos foram infectados com HIV-1, expondo-os durante a noite a suspensões virais contendo 10 ng/mL de antígeno p24. Em seguida, os vírus não internalizados foram removidos por lavagem e monocamadas de células foram reabastecidas com meio fresco. A replicação de HIV-1 foi quantificada em sobrenadantes de células celulares após 10-12 dias de infecção por um kit ELISA comercial (Sino Biological, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.6. Avaliação dos efeitos dos neuropeptídeos na replicação do HIV-1

Os macrófagos infectados com HIV-1 foram tratados com VIP ou PACAP imediatamente após a infecção. As células foram mantidas em cultura por diferentes tempos, e a replicação de HIV-1 foi medida como descrito acima. Alternativamente, para medir o impacto de alguns inibidores farmacológicos sobre os efeitos do neuropeptídeo na replicação do HIV-1, os macrófagos infectados com HIV-1 foram tratados com o inibidor apropriado 30 min antes da adição de neuropeptídeos.

4.7. Expressão celular dos receptores CD4, CCR5 e dos receptores de VIP e PACAP

Os macrófagos cultivados em placas de 6 poços foram lavados em PBS gelado, separados de placa de cultura usando raspador celular e depois incubados durante 15 minutos em solução bloqueadora contendo 10% de soro humano e de camundongo e solução Fc Block a 1% (eBiosciences, EUA) em PBS. As células foram coradas com anti-CD4-PE e anti-CCR5-APC-Cy7, oriundos de camundongo (BD Bioscience, EUA), suspensas em tampão de bloqueio durante 20 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, permeabilizadas (Conjunto de tampão de fixação e permeabilização intracelular; Thermo Fisher, EUA). Em seguida, as células foram coradas com anti-CD68-Alexa 647 feito em camundongo, lavadas e fixadas. Para análise de receptores VIP e PACAP, os macrófagos foram permeabilizados após o bloqueio e expostos a anticorpos monoclonais anti-VPAC1, anti-VPAC2 ou anti-PAC1, oriundos de coelhos (Abcam, EUA) por 20 minutos. Após a lavagem, as células foram coradas com anti-coelho-Alexa 546, oriundo de cabra e anti-CD68-Alexa 647, oriundo de camundongo durante 20 minutos, lavadas e fixadas. Os dados foram adquiridos com um citômetro de fluxo BD Canto II usando o software BD FACSDiva (BD Bioscience, EUA). A compensação automática foi realizada no início de cada experimento, e os dados foram analisados usando o programa FlowJo v10 (TreeStar Software, EUA).

4.8. Ensaios de medição cAMP, NF-kB, CREB e Ciclina D1

Para a quantificação de AMPc, os macrófagos foram tratados com 500 nM de IBMX (um inibidor competitivo de fosfodiesterase não seletivo) e, após 15 minutos, com VIP ou PACAP (10 nM), para diferentes pontos de tempo. Os sobrenadantes de cultura foram removidos, as células foram lisadas com HCl 0,1 M e os níveis de AMPc intracelular foram determinados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical, EUA). Para as análises de quantificação de NF-kB, CREB e Ciclina D1, os macrófagos infectados ou não com HIV-1 foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM), seguindo diferentes configurações de protocolo (ver Resultados) e os ensaios de ELISA foram realizados de acordo com as instruções do fabricante: NFkBp65 (Total/Phospho) InstantOne™ e CREB (Total/Phospho) Multispecies InstantOne™ ELISA Kits (Thermo Fisher, EUA) e PathScan® Total Cyclin D1 Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling, EUA).

4.9. Detecção da ativação de PKA e PKC

A capacidade de VIP e PACAP para ativar as quinases PKA e PKC foi avaliada por imunoblotting. Assim, macrófagos humanos cultivados em frascos de 25 cm² foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) em diferentes tempos. Em seguida, as proteínas celulares foram extraídas utilizando o tampão RIPA (Thermo Fischer, EUA) com Protease Inhibitor Cocktail Set III e Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II (Merck, EUA). O lisado foi centrifugado a 13.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e as proteínas foram quantificadas utilizando o kit de ensaio de proteína Qubit 2.0 (Thermo Fisher, EUA). Quantidades iguais da amostra (40 µg/poço) foram separadas por SDS-

PAGE usando géis de poliacrilamida e as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, EUA). A ligação não específica foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado em TTBS durante 1 h, seguido de incubação com anti-phosphoPKA policlonal de coelho, anti-PKA monoclonal de rato, anti-fosfo-PKC policlonal de coelho, anti-PKC monoclonal de rato, ou anticorpo monoclonal anti- β -actina de rato (Abcam, EUA) durante a noite a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados com HRP (R&D Systems, EUA) ou anticorpos secundários IRDye (LI-COR Corporate, EUA) durante 1 h à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em TTBS e a expressão da proteína foi detectada usando quimioluminescência avançada (SuperSignal West Dura, Thermo Fisher, EUA) ou fluorescência usando o Odyssey Image System (LI-COR Corporate). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria (Image-Pro® Plus Media Cybernetics, EUA).

4.10. Ensaio de Luciferase

Para investigar a atividade transcricional dependente de NF- κ B, as células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos em uma placa de 96 poços (4×10^4 células/poço) e depois transfectadas usando o reagente de transfecção PolyFect (Quiagen, EUA). Para as transfecções, foram utilizados 100 ng de p6kB-LUC (gentilmente fornecidos pelo Dr. Ulisses G Lopes) e 2 ng de pRL-CMV (Promega, EUA). As células transfectadas foram tratadas com TNF- α (10 ng/ml) e, 1 hora depois, expostas com VIP ou PACAP (10 nM). Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS, lisadas de acordo com o protocolo do

ensaio de luciferase dupla (Promega, EUA), e a ativação de NF-κB foi analisada em um luminômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, EUA).

4.11. Análises da sequência LTR do HIV-1

Os macrófagos cultivados em frascos de 25 cm² foram infectados com HIV-1, tratados com meio (não tratado), VIP (10 nM), PACAP (10 nM) ou IFN-α (10³ U/mL) usado como controle para a indução de mutações no genoma do HIV-1. Após 12 dias, o DNA total foi extraído usando o kit de extração de DNA QIAamp (Qiagen Inc., EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado com base no valor verificado no comprimento de onda 260 nm, medido por um instrumento Nanodrop 1000 (Thermo Fisher, EUA). A região 5'LTR foi amplificada por um protocolo de PCR “nested” e sequenciada diretamente como descrito anteriormente (68). Os cromatogramas foram montados em contigs usando o software SeqMan v7.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI). As seqüências de nucleotídeos foram alinhadas usando ClustalW implementadas no programa MEGA 7 (69) e depois editadas manualmente, produzindo um alinhamento final que cobre as posições 57-580 em relação ao genoma de referência HXB2. As árvores filogenéticas de “neighbor-joining” (NJ) foram reconstruídas sob o modelo de substituição de nucleotídeos Tamura-Nei (70) usando o programa Mega v7. A confiança filogenética foi avaliada por bootstrap com 1.000 repetições. As distâncias genéticas em pares foram estimadas sob o modelo de substituição de nucleotídeos Tamura-Nei usando o programa Mega v7.

4.12. Ensaio de infectividade

Os macrófagos cultivados em placas de 6 poços foram infectados pelo HIV-1 e tratados com VIP, PACAP (10 nM) ou IFN- α (10^3 U/mL) e, após 12 dias, os sobrenadantes da cultura foram coletados, centrifugados a 3.000xg e filtrados em filtros com tamanho de poro de 0.45 μ m. Os sobrenadantes foram então centrifugados em dispositivos de filtro Centricon com membranas YM-100 (Millipore, EUA) para concentrar as partículas de vírus. Em seguida, a quantidade de vírus foi quantificada por ELISA para o antígeno p24 e células TZM-bl foram infectadas em placas de 96 poços (10^5 células/poço) com a 10 ng/ml de p24 normalizado e na presença de DEAE-Dextran (15 μ g/ mL). Após 48 horas de infecção, o conteúdo de luciferase foi analisado com o reagente Bright-Glo, seguindo as instruções do fabricante (Promega, EUA).

4.13. Análise estatística

Os testes estatísticos utilizados para análise são indicados nas legendas de cada figura. Os dados estão representados como média associada ao desvio padrão, e todos os testes foram realizados utilizando o software Prism 6 (GraphPad Software, EUA).

5. Resultados

5.1. VIP e PACAP mantêm o efeito anti-HIV-1 em diversos protocolos de adição aos macrófagos.

Após nossos estudos anteriores sobre os efeitos de VIP e PACAP na replicação do HIV-1 em macrófagos (30), examinamos aqui se ambos os neuropeptídeos poderiam tornar os macrófagos não infectados menos suscetíveis à infecção pelo HIV-1. Para fazer isso, as células foram tratadas com os neuropeptídeos durante 48 ou 24 horas e depois infectadas com HIV-1. Descobrimos que a pré-exposição a VIP e PACAP (10 nM) promove a inibição a longo prazo da replicação do HIV-1, embora em menor medida quando comparado ao tratamento pós-infecção (Figura 5.1A). A inibição induzida em diferentes pontos de tempo sugere que VIP e PACAP podem promover mudanças significativas no perfil celular, aumentando a possibilidade de que mecanismos mais complexos estejam relacionados ao efeito inibitório no ciclo replicativo do HIV-1. Considerando que VIP e PACAP foram capazes de induzir um perfil de resistência à replicação de HIV-1 em macrófagos não infectados (Figura 5.1A), analisamos se seu potencial inibidor poderia ser amplificado em células já infectadas. Assim, comparamos dois protocolos de tratamento, um único tratamento pós-infecção (dia 1) utilizando concentrações ótimas e subótimas de VIP e PACAP (relativo à inibição da replicação do HIV-1) (Figura 5.1B) ou um tratamento consecutivo com três doses de cada neuropeptídeo (dia 1, dia 5 e dia 10) em ambos os níveis de concentração (Figura 5.1C). Aplicando a análise da área sob curva (AUC), observamos que, quando os macrófagos infectados foram expostos a três doses não funcionais de VIP ou

PACAP, a replicação do HIV-1 foi reduzida em um nível similar da inibição obtida com o tratamento único usando doses funcionais (Figura 5.1D).

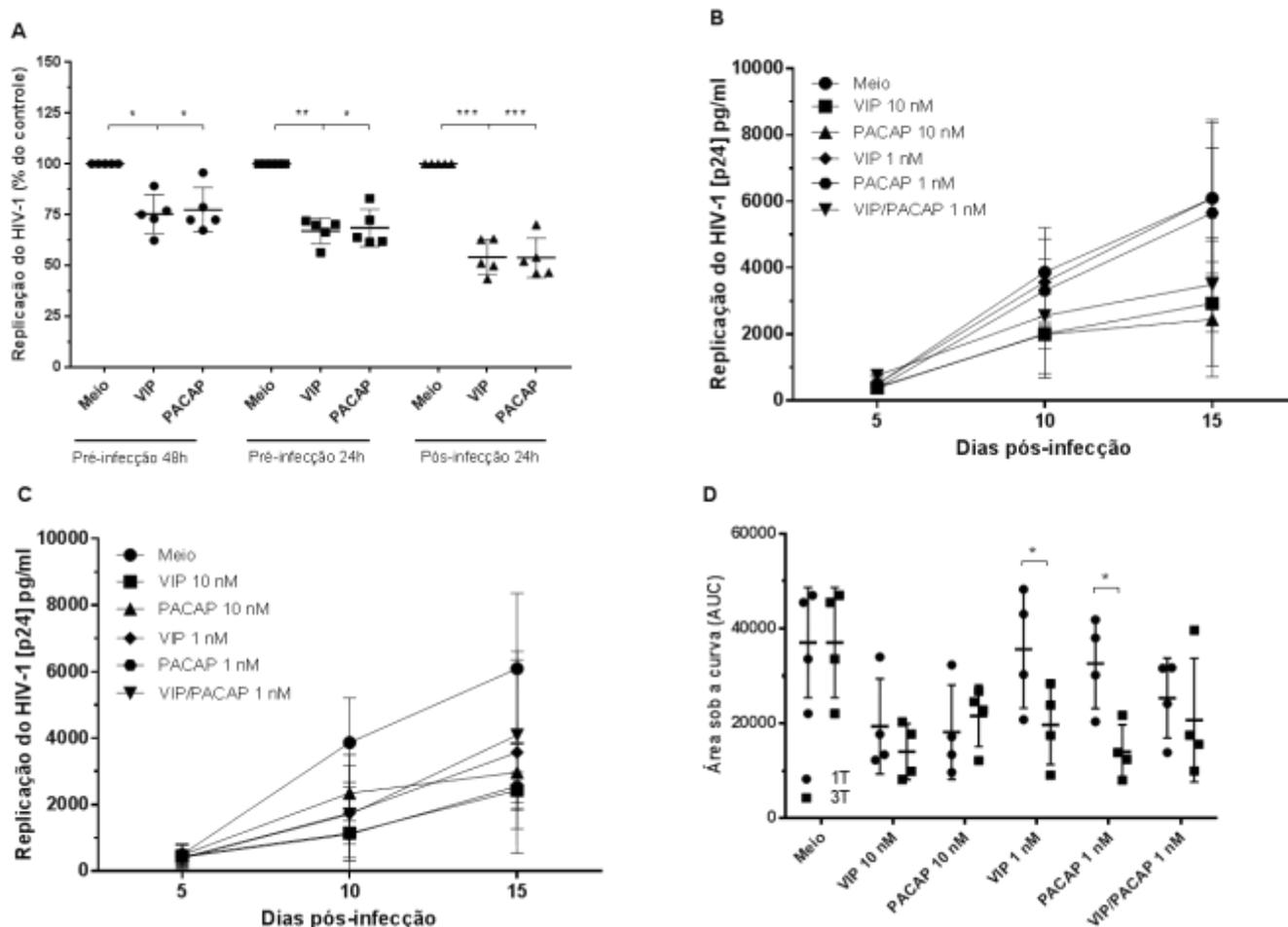


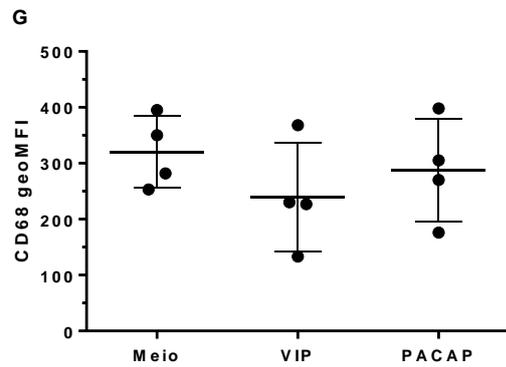
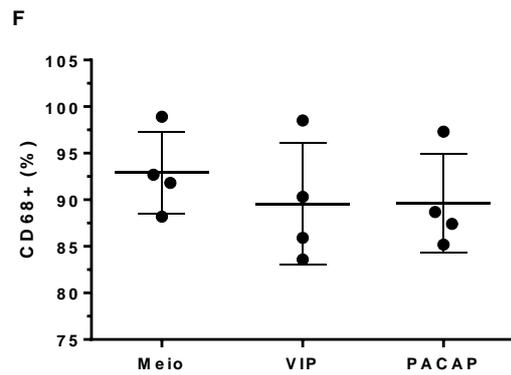
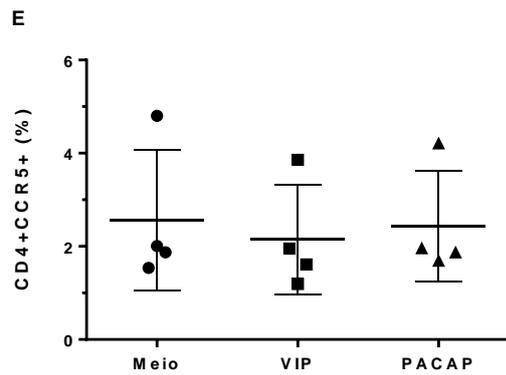
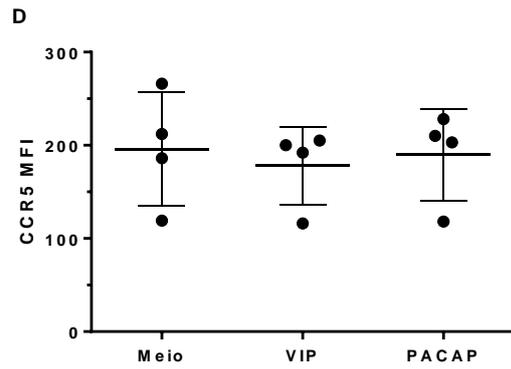
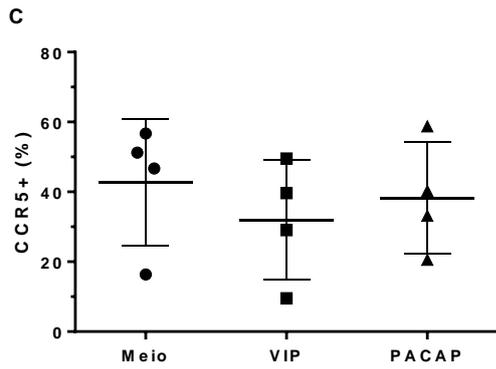
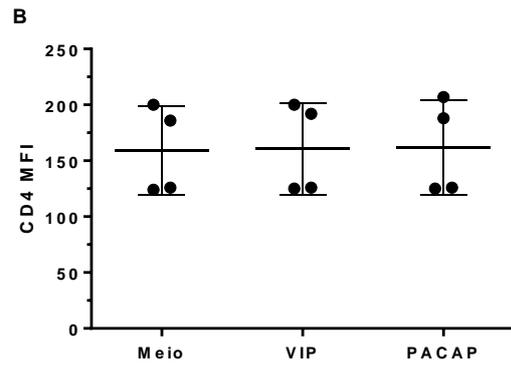
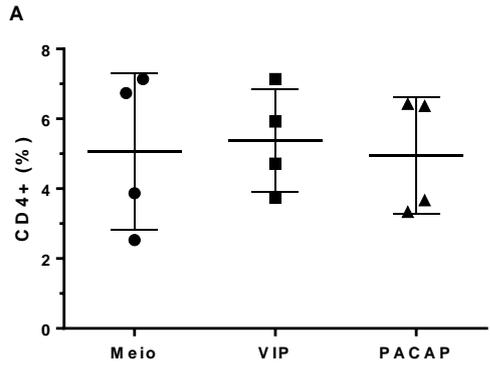
Figura 5.1 - VIP e PACAP mantêm o efeito anti-HIV-1 em diversas formas de adição aos macrófagos.

(A) Os macrófagos foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) 24h ou 48h antes, ou 24h após a infecção. Após 14 dias de infecção, os sobrenadantes foram coletados e a replicação viral foi medida (n = 5). Os macrófagos foram infectados e tratados com diferentes concentrações de VIP ou PACAP em um regime de uma dose no dia 1 (B, 1T) ou três doses no dia 1, 5 e 10 (C, 3T). Os sobrenadantes foram coletados 5, 10 e 15 dias após a infecção. (D) Área sob

análise de curva dos painéis B e C (n = 4). *, p <0,05; **, p <0,01; ANOVA “two-way”, com pós-teste Tukey.

5.2. VIP e PACAP não alteram a expressão de CD4 e CCR5 em macrófagos.

Em vista do mecanismo clássico de entrada celular dos isolados R5-trópicos de HIV-1, através da interação da proteína de envelope viral gp120 com os receptores celulares CD4 e CCR5 (31) e de nosso trabalho anterior (30) em que descrevemos que a inibição do HIV-1 por VIP e PACAP é parcialmente dependente de β -quimiocinas, analisamos se esses neuropeptídeos poderiam modular diretamente a expressão de CD4 e CCR5 em macrófagos. Observamos por citometria de fluxo que os níveis de expressão em macrófagos de CD4 e CCR5 não foram alterados após a exposição aos neuropeptídeos durante 24 horas (Figura 5.2, A, B, C, D, E e H), excluindo assim a redução da expressão de receptores celulares do HIV-1 como mecanismo de inibição do HIV-1 promovida pelo VIP ou PACAP. Além disso, o tratamento com VIP e PACAP não alterou a expressão do marcador de macrófagos CD68 (Figura 5.2, F e G).



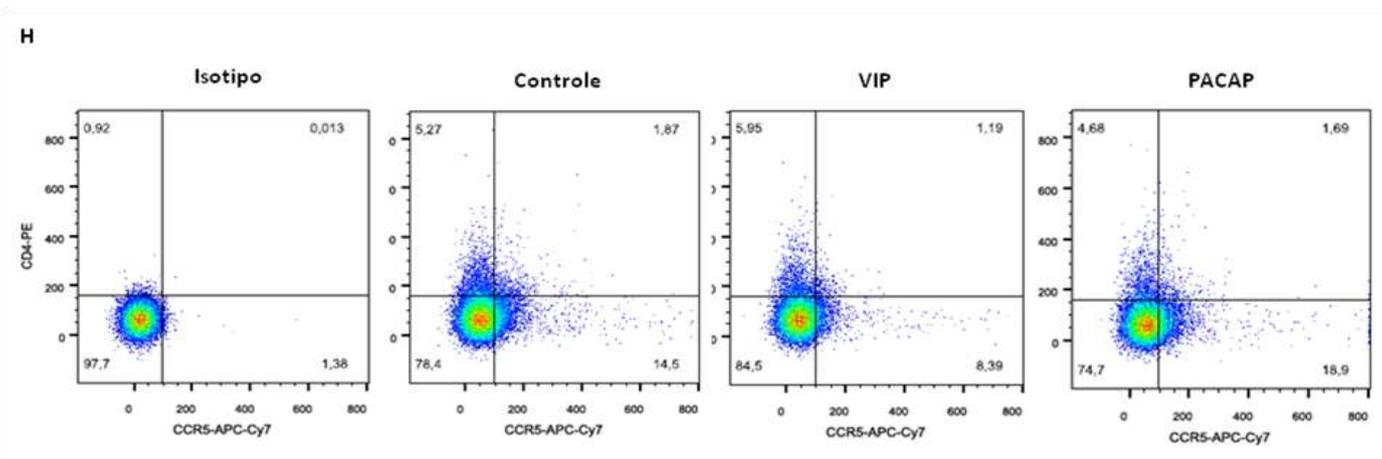


Figura 5.2 - VIP e PACAP não alteram a expressão de CD4, CCR5 e CD68 em macrófagos.

Os macrófagos foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) e a expressão de CD4, CCR5 e CD68 foi analisada por citometria de fluxo 24 horas depois. (A, C, E e F), Análise da frequência das populações de células indicadas; (B e D), análise de média ou (G) intensidade média de fluorescência geométrica (n = 4). (H) Imagem representativa dos resultados apresentados a partir de A-E.

5.3. VIP e PACAP não modulam a expressão de seus próprios receptores em macrófagos infectados com HIV-1.

Nós previamente demonstramos que, além de VIP e PACAP, os ligantes específicos para os receptores VPAC1, VPAC2 e PAC1 também modulam a produção de HIV-1 em macrófagos (30), indicando assim que esses receptores estão presentes em nosso modelo de cultura. No entanto, ainda não detectamos e quantificamos diretamente a presença e os níveis desses receptores em nosso modelo. Agora, analisamos a expressão de VPAC1,

VPAC2 e PAC1 em macrófagos infectados com HIV-1, e também examinamos se VIP e PACAP poderiam modular os níveis de seus próprios receptores nessas células, após 24 horas de tratamento. Como esperado, macrófagos expressam os três receptores, e VIP e PACAP não alteraram significativamente seus níveis; No entanto, detectamos que VPAC1 e PAC1 são expressos em apenas 20% e VPAC2 em quase 30% das células, sem diferenças significativas no MFI em relação às condições basais e de tratamento (Figura 5.3, A, B e C).

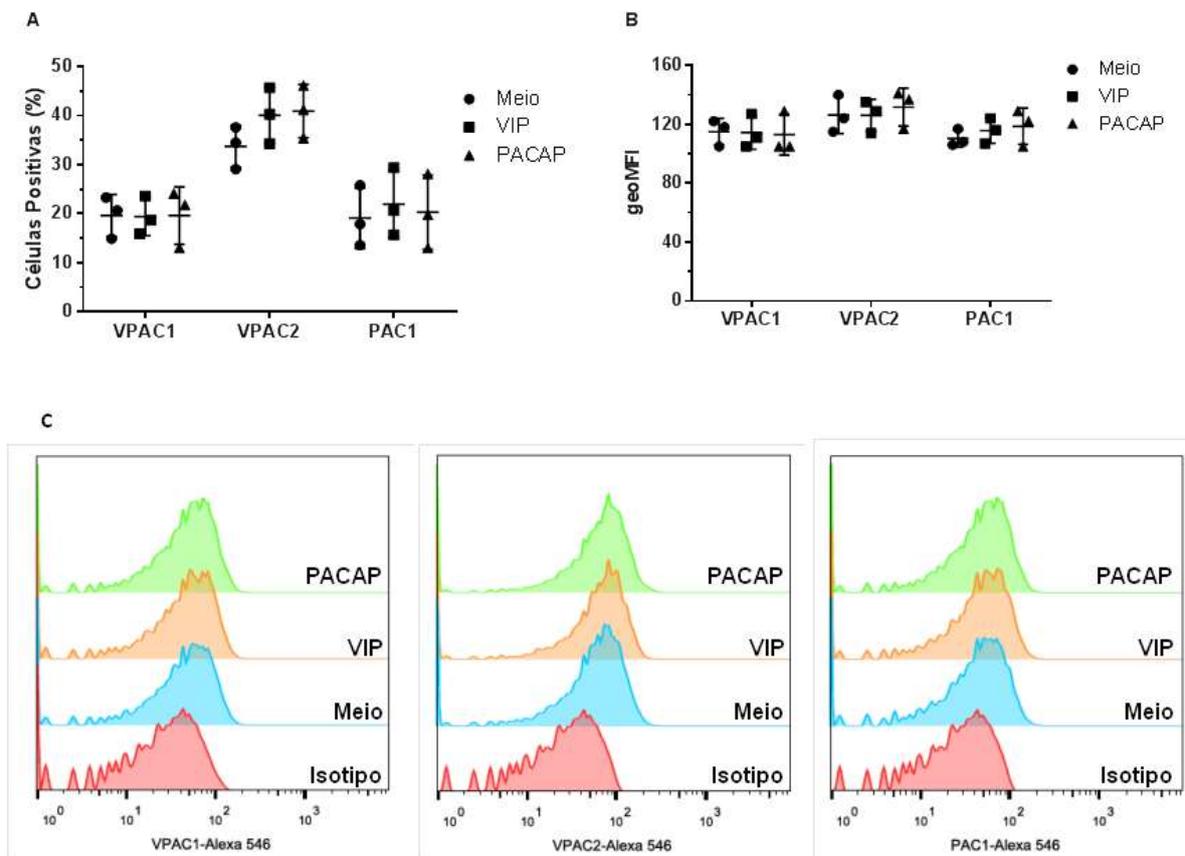


Figura 5.3 - VIP e PACAP não modulam a expressão de seus próprios receptores em macrófagos infectados com HIV-1.

Os macrófagos infectados foram tratados com VIP ou PACAP (10nM) e a expressão de VPAC1, VPAC2 e PAC1 foi analisada por citometria de fluxo 24h mais tarde. (A), análise da frequência de células positivas; (B), Análise da intensidade de fluorescência média geométrica (n = 3). (C), Histograma representativo dos resultados apresentados em B.

5.4. A ativação da sinalização de cAMP contribui para a inibição de HIV-1 induzida por VIP e PACAP em macrófagos.

As vias de sinalização VIP e PACAP foram definidas por vários autores (20-23), com modelos diferentes mostrando resultados diversos, mas a ativação da sinalização de AMPc foi detectada na maioria dos estudos de sinalização celular para ambos os neuropeptídeos. Analisamos o grau de produção de AMPc por VIP e PACAP em nosso modelo e a dependência da indução e controle de AMPc no efeito inibitório do HIV-1 promovido por ambos os neuropeptídeos. Identificamos que VIP e PACAP elevam os níveis de AMPc em macrófagos, com o maior nível alcançado após 15 minutos de estímulo (Figura 5.4A). Com o uso da toxina Pertussis (PTX), avaliamos se o bloqueio da proteína Gi (levando a uma subsequente amplificação adicional dos níveis de AMPc) poderia alterar o efeito inibitório VIP e PACAP na infecção pelo HIV-1, apontando a ativação da via de AMPc como um componente da sinalização celular envolvida nos efeitos dos neuropeptídeos na modulação de HIV-1 em macrófagos. Considerando o potente efeito inibidor de PTX na replicação do HIV-1, que é principalmente dependente do seu oligômero B (178, 179), reduzimos a concentração de PTX para 25 pg/ml, com a qual a inibição do HIV-1 foi insignificante (Figura 5.4B e 5.4C). Na presença de PTX, detectamos um incremento de efeito com as doses subótimas de 1 nM e 5 nM de VIP e a perda completa da função com a sua dose ideal de 10 nM (Figura 5.4D). No que diz respeito ao PACAP, observamos a mesma alteração nas doses subótimas, mas apenas uma redução parcial de efeito com a dose ideal de 10 nM, uma vez que a inibição do HIV-1 resultante da combinação PACAP mais PTX foi

menor em comparação com a replicação viral na presença apenas do neuropeptídeo (Figura 5.4E). Esses resultados sugerem que a sinalização de AMPc difere em importância em relação a VIP e PACAP, no contexto da inibição da replicação do HIV-1.

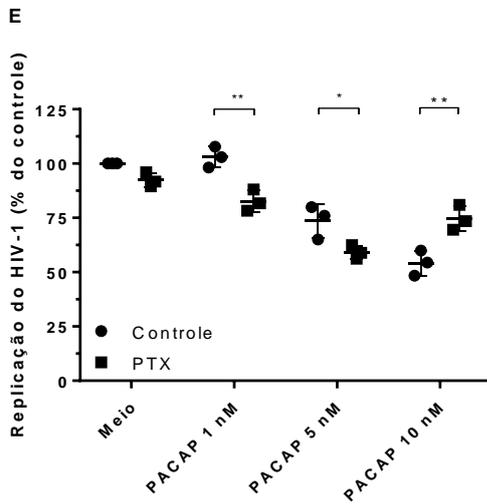
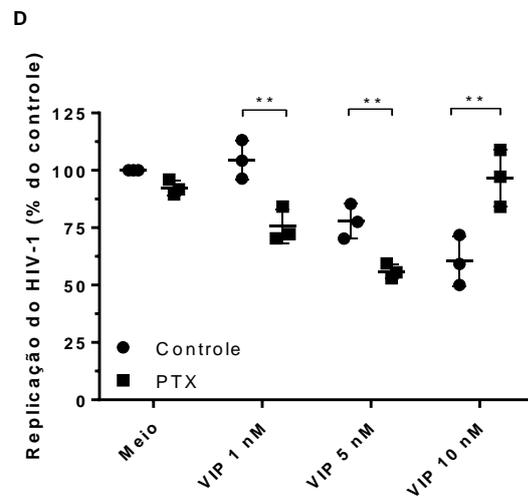
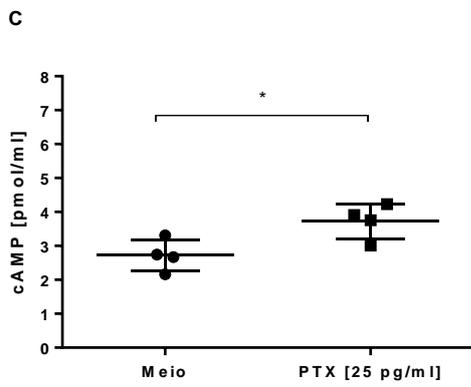
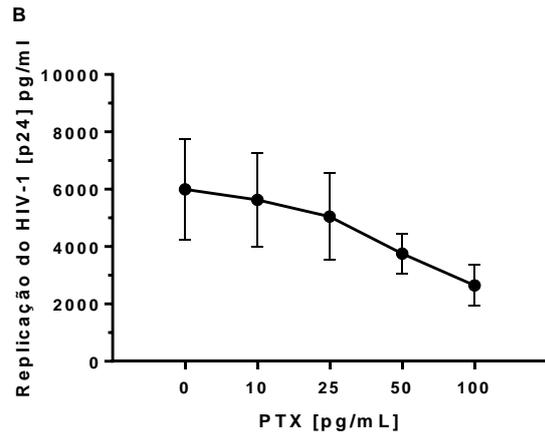
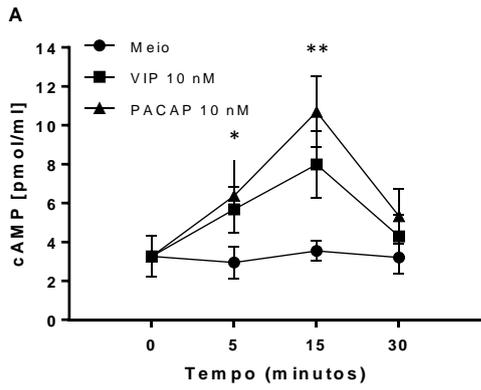


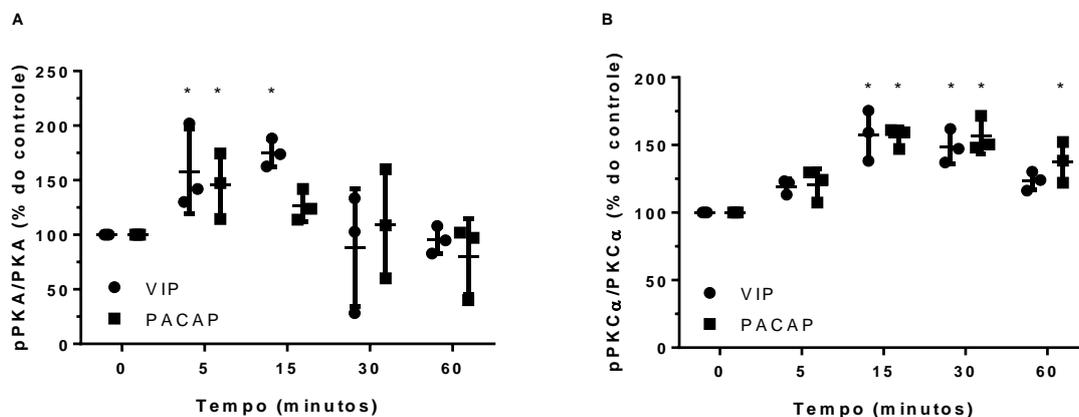
Figura 5.4 - A ativação da sinalização de cAMP contribui para a inibição de HIV-1 induzida por VIP e PACAP em macrófagos.

(A) Os macrófagos não infectados foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) e os níveis de cAMP intracelular foram analisados por ELISA em diferentes pontos de tempo. (n = 3) (B) Macrófagos infectados com HIV-1 foram expostos a diferentes concentrações de PTX; Após 3 horas, as células foram lavadas e mantidas em cultura durante 12 dias, quando os sobrenadantes foram recolhidos e a replicação viral foi medida (n = 3). (C) Macrófagos não infectados foram tratados com PTX (25 ng/ml) na presença de 500 nM de IBMX (um inibidor competitivo não competitivo de fosfodiesterase). Após 3 horas, os níveis intracelulares de cAMP foram analisados por ELISA (n = 4). (D, E) Os macrófagos infectados com HIV-1 foram expostos a PTX (25 pg/ml) e, 3 horas depois, as células foram lavadas e tratadas com VIP ou PACAP em diferentes concentrações. Os sobrenadantes foram coletados após 12 dias e a replicação viral foi medida. (n = 3). *, p <0,05; **, p <0,01; ns, não significativo; ANOVA de dois sentidos, com pós-teste Tukey.

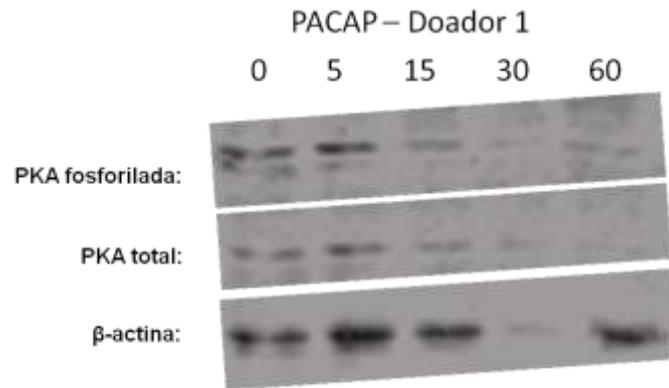
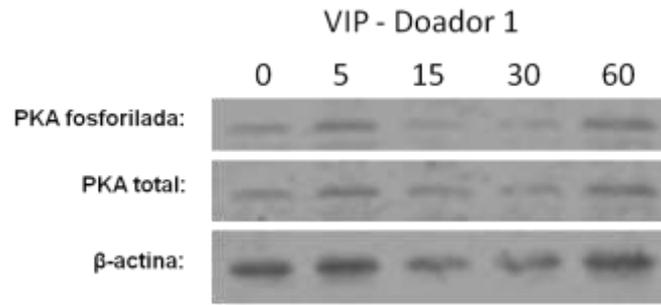
5.5. O efeito de VIP e PACAP na replicação de HIV-1 depende da ativação de PKA e PKC.

Apesar das diferenças existentes entre modelos celulares, PKA e PKC representam as principais proteínas responsáveis pelas ações fisiológicas de VIP e PACAP (125, 180-184). Com base nisso, e também em nossos resultados descritos acima, analisamos a ativação de PKA e PKC por VIP e

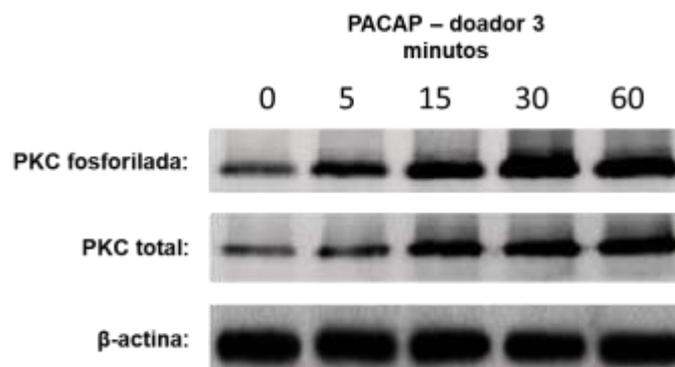
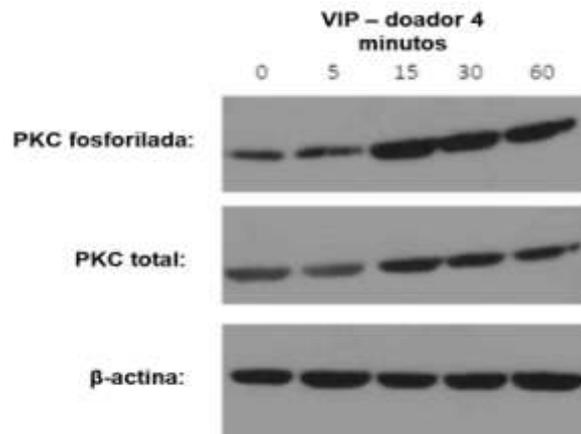
PACAP em nosso modelo e analisamos também se o efeito inibidor de HIV-1 promovido por esses neuropeptídeos depende da ativação de ambas as quinases. Verificamos que VIP e PACAP ativam PKA e PKC, como esperado, sendo de curta duração a ativação da PKA (Figura 5.5A), e PKC apresentando uma ativação mais duradoura, de fato, excedendo o cronograma de análise para PACAP (Figura 5.5B). Ao analisar a replicação do HIV-1, observamos que o bloqueio da ativação de PKA ou PKC reduziu o efeito anti-HIV-1 de VIP e PACAP (Figura 5.5E e 5.5F, respectivamente), enquanto que apenas o bloqueio duplo (iPKAi + iPKC), ou o uso de um pan-inibidor (PKA/PKC/PKG) anulou a inibição do HIV-1 promovida por ambos os neuropeptídeos (Figura 5.5E e 5.5F). Todos os inibidores farmacológicos foram testados quanto à citotoxicidade celular (Figura 5.5G), portanto, excluindo a alteração da viabilidade como fator modulador da replicação do HIV-1.



C



D



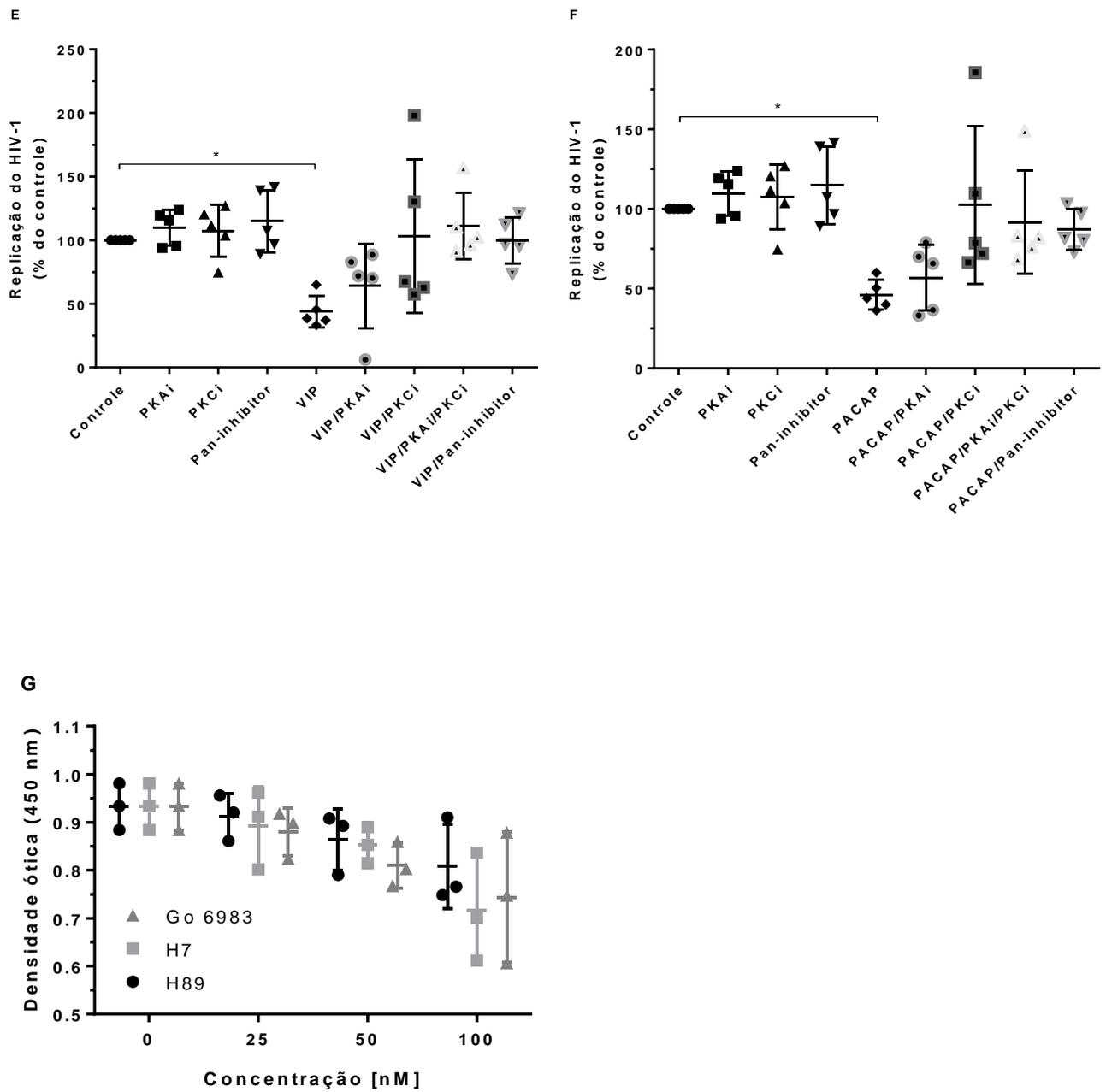


Figura 5.5 - O efeito de VIP e PACAP na replicação do HIV-1 é dependente de PKA e PKC.

(A, B) Os macrófagos não infectados foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) e os níveis de PKA e pPKA (A), PKC α e pPKC α (B) foram analisados por western blot em diferentes pontos de tempo e a figura mostra a densitometria de banda normalizada com base na intensidade da β -actina (n = 3). (C, D) Blot

representativo de PKA e PKC. (E, F) Os macrófagos infectados foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) na presença ou não de inibidores de sinalização (PKAi, H89; PKCi, Gö 6983; Inibidor de pan-proteína quinase, H7, 50 nM cada um, 30 minutos antes de neuropeptídeos). Os sobrenadantes foram coletados após 12 dias e a replicação viral foi medida (n = 5). (G) Análise da viabilidade celular pelo método XTT na presença de diferentes concentrações dos inibidores utilizados. *, p <0,05; **, p <0,01; One-way ANOVA, com pós-teste Dunnett.

5.6. VIP e PACAP inibem a fosforilação de NF-kBp65 em macrófagos infectados com HIV-1.

A família NF-kB consiste em 5 proteínas diferentes, que se associam em homo ou heterodímeros e podem atuar como fatores de transcrição ou repressores de expressão gênica. Entre eles, o heterodímero NF-kB p50/65 é um dos principais responsáveis pela atividade transcricional da família NF-kB (185). A ativação de NF-kB é um componente intrínseco do ciclo replicativo do HIV-1 e sua inibição diminui a produção viral e promove a latência de provírus em células infectadas (186, 187). VIP e PACAP foram descritos como inibidores da atividade de NF-kB (167), ressaltando que, em nosso modelo, essa atividade poderia contribuir para a redução da replicação de HIV-1 induzida por VIP e PACAP. Assim, avaliamos a atividade de NF-kB em macrófagos expostos aos neuropeptídeos através da detecção da subunidade NF-kBp65 total e fosforilada. Inicialmente, verificamos se VIP e PACAP

reduziriam a atividade de NF-kBp65 em macrófagos não infectados. Para melhor acessar o fenótipo de inibição, primeiro tratamos macrófagos com TNF- α por 1 hora, e depois adicionamos VIP ou PACAP e avaliamos os níveis de pNF-kBp65 1 hora depois. Observamos que ambos os neuropeptídeos reduziram a ativação mediada por TNF- α de NF-kBp65 em níveis comparáveis às células controle não expostas a essa citocina, demonstrando a atividade anti-NF-kBp65 de VIP e PACAP (Figura 5.6A). Analisamos também a ativação de NF-kB usando um gene repórter de luciferase em macrófagos THP-1 não infectados. A construção do repórter NF-kB foi induzida após a exposição ao TNF- α , mas esta indução foi bloqueada quando VIP ou PACAP foram adicionados após TNF- α (Figura 5.6B). Em seguida, verificamos se VIP e PACAP também poderiam inibir NF-kB em macrófagos infectados com HIV-1. Realizamos esses ensaios usando macrófagos infectados por 7 dias, para conseguir uma melhor distribuição de infecção ao longo da cultura, permitindo assim o incremento da atividade basal NF-kB pela própria infecção pelo HIV-1 (Figura 5.6C) (188-190). Ambos os neuropeptídeos reduziram a fosforilação de NF-kBp65 após uma hora de tratamento (Fig. 5.6D e 5.6E), uma ação que provavelmente pode contribuir para a resistência à replicação do HIV-1 em macrófagos tratados com VIP e PACAP, como já descrevemos (191). Notavelmente, o bloqueio de PKA ou PKC impediu a inibição da ativação de NF-kB por VIP (Fig. 5.6D), enquanto que apenas o bloqueio de PKC perturbou o efeito modulador de PACAP sobre esse fator de transcrição (Fig. 5.6E).

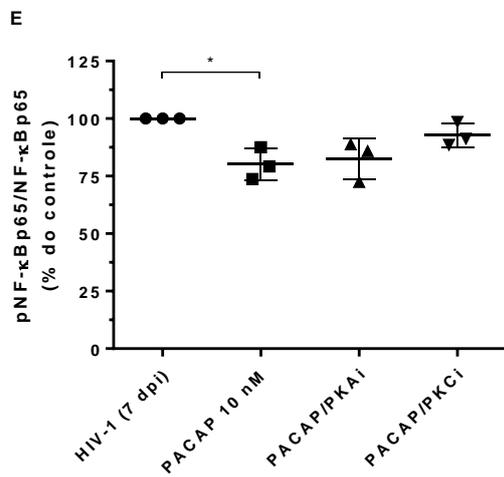
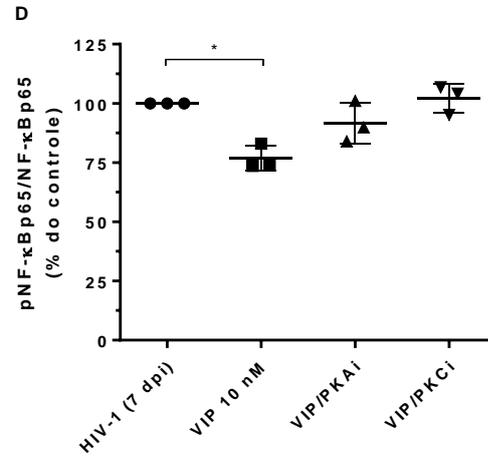
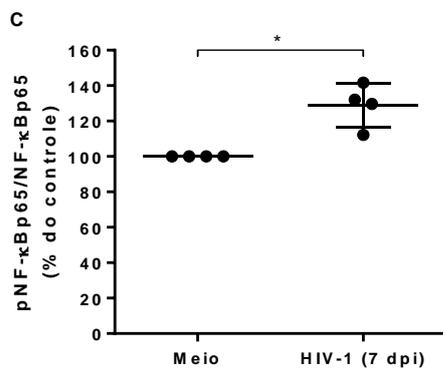
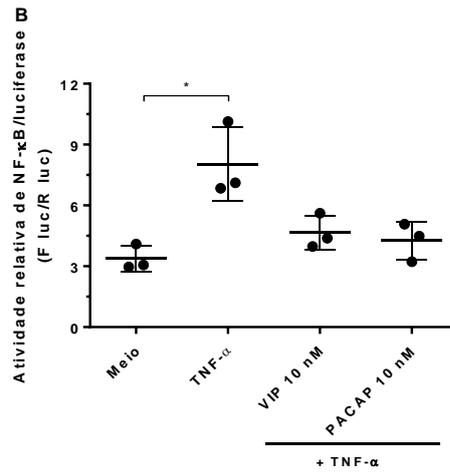
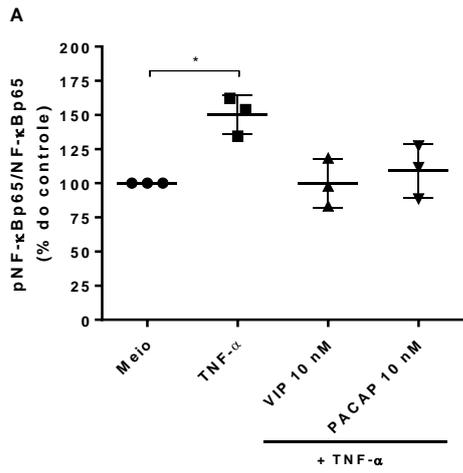


Figura 5.6 - VIP e PACAP inibem a fosforilação de NF-kBp65 em macrófagos infectados com HIV-1.

(A) Macrófagos primários não infectados ou (B) Macrófagos THP-1 transfectados de forma transitória com o vetor de consenso de 6kB-Luciferase foram tratados com TNF- α (10 ng/ml) e, após 1 hora, foram expostos a VIP ou PACAP (10 nM). Após 1 h, a relação entre NF-kBp65/fosfoNF-kBp65 foi quantificada por ELISA (A) e a atividade de transcricional NF-kB foi avaliada pelo ensaio Luciferase/Renilla (B). (C) Macrófagos foram infectados com HIV-1 e 7 dias depois, os níveis de NF-kBp65/fosfoNF-kBp65 foram analisados por ELISA (n = 4). (D, E) Macrófagos primários foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) 7 dias após a infecção pelo HIV-1 (7 dpi), na presença ou não de um inibidor de PKA ou inibidores de PKC (PKAi, H89; PKCi, Gö 6983; 50 nM cada, 30 minutos antes dos neuropeptídeos). Após 1h, os níveis de NF-kBp65 foram analisados por ELISA. (n = 3) *, p <0,05; One-way ANOVA, com pós-teste Dunnett.

5.7. VIP e PACAP promovem a fosforilação de CREB em macrófagos infectados com HIV-1.

Considerando a capacidade de VIP e PACAP em inibir a ativação de NF-kBp65, nos questionamos quais processos poderiam responder por esse fenômeno. Um dos possíveis fatores seria a ativação da proteína de ligação ao elemento de resposta a AMPc (CREB), fator de transcrição clássico da via AMPc/PKA e de quinases dependentes de Ca²⁺, induzida por vários GPCRs

(164). CREB e NF- κ B compartilham a proteína de ligação de CREB/p300 (proteína CBP/p300) como cofator, e a ativação de CREB resulta na inibição de NF- κ B, regulando assim a resposta inflamatória (165, 166). Como a ativação do CREB por VIP e PACAP já foi descrita (192-194), verificamos a capacidade desses neuropeptídeos em ativar o fator CREB em macrófagos não infectados. Observamos que VIP e PACAP promovem a fosforilação de CREB de forma duradoura, excedendo novamente o período de análise (Figura 5.7A). Em seguida, avaliamos a participação de PKA e PKC na ativação de CREB por VIP e PACAP em macrófagos infectados com HIV-1 (7 dias de infecção) e, de forma semelhante ao que encontramos para NF- κ B, a inibição de PKA ou PKC diminuiu a fosforilação de CREB por VIP, enquanto o efeito de PACAP na ativação de CREB foi reduzido apenas com a inibição de PKC (Figura 5.7B).

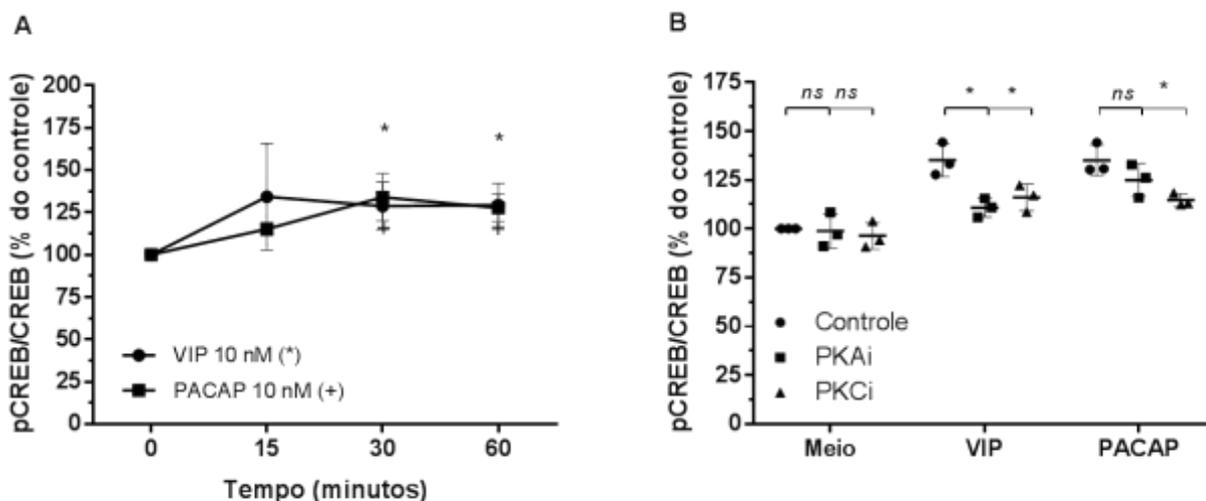


Figura 5.7 - VIP e PACAP promovem a fosforilação de CREB em macrófagos infectados com HIV-1.

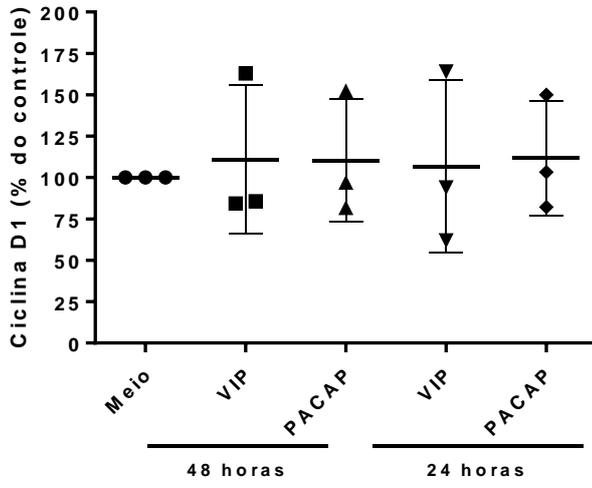
(A) Macrófagos não infectados foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) e os níveis de CREB e fosfo-S133 CREB foram analisados por ELISA em

diferentes pontos de tempo. (n = 3) (B) Macrófagos infectados foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) na presença ou não de um inibidor de PKA ou inibidores de PKC (PKAi, H89; PKCi, Gö 6983; 50 nM cada um, 30 minutos antes dos neuropeptídeos), e a ativação de CREB foi analisada 30 minutos após a exposição aos neuropeptídeos (n = 3). *, p <0,05; ns, não significativo; ANOVA “two-way”, com pós-teste Tukey.

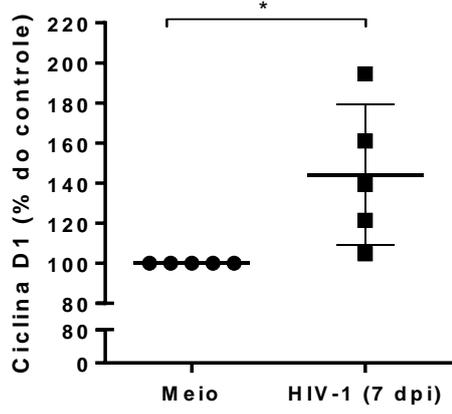
5.8. VIP e PACAP reduzem os níveis de Ciclina D1 em macrófagos infectados com HIV-1.

Juntamente com a análise dos fatores de transcrição NF-kB e CREB, avaliamos se VIP e PACAP podem diminuir os níveis de Ciclina D1, uma das proteínas que são recrutadas para o complexo de transcrição do HIV-1 e participa do processo de latência viral (195-197). Inicialmente, detectamos que ambos os neuropeptídeos não modularam os níveis de ciclina D1 em macrófagos não infectados (Figura 5.8A). Em seguida, verificamos se a infecção pelo HIV-1 poderia aumentar a expressão de Ciclina D1 e observamos que, após 7 dias, macrófagos infectados apresentaram maior expressão desta proteína (Figura 5.8B). Em seguida, avaliamos se VIP e PACAP regulariam o aumento da expressão de Ciclina D1 em macrófagos infectados e detectamos que ambos os neuropeptídeos impediram o aumento dos níveis totais de Ciclina D1 em células infectadas por 7 dias e que os efeitos de VIP e PACAP sobre a expressão de Ciclina D1 foram reduzidos quando a ativação de PKA e PKC foi bloqueada (Figura 5.8C).

A



B



C

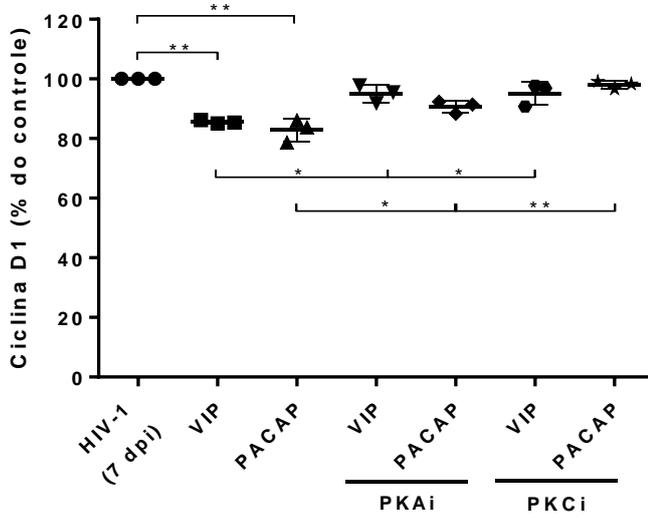


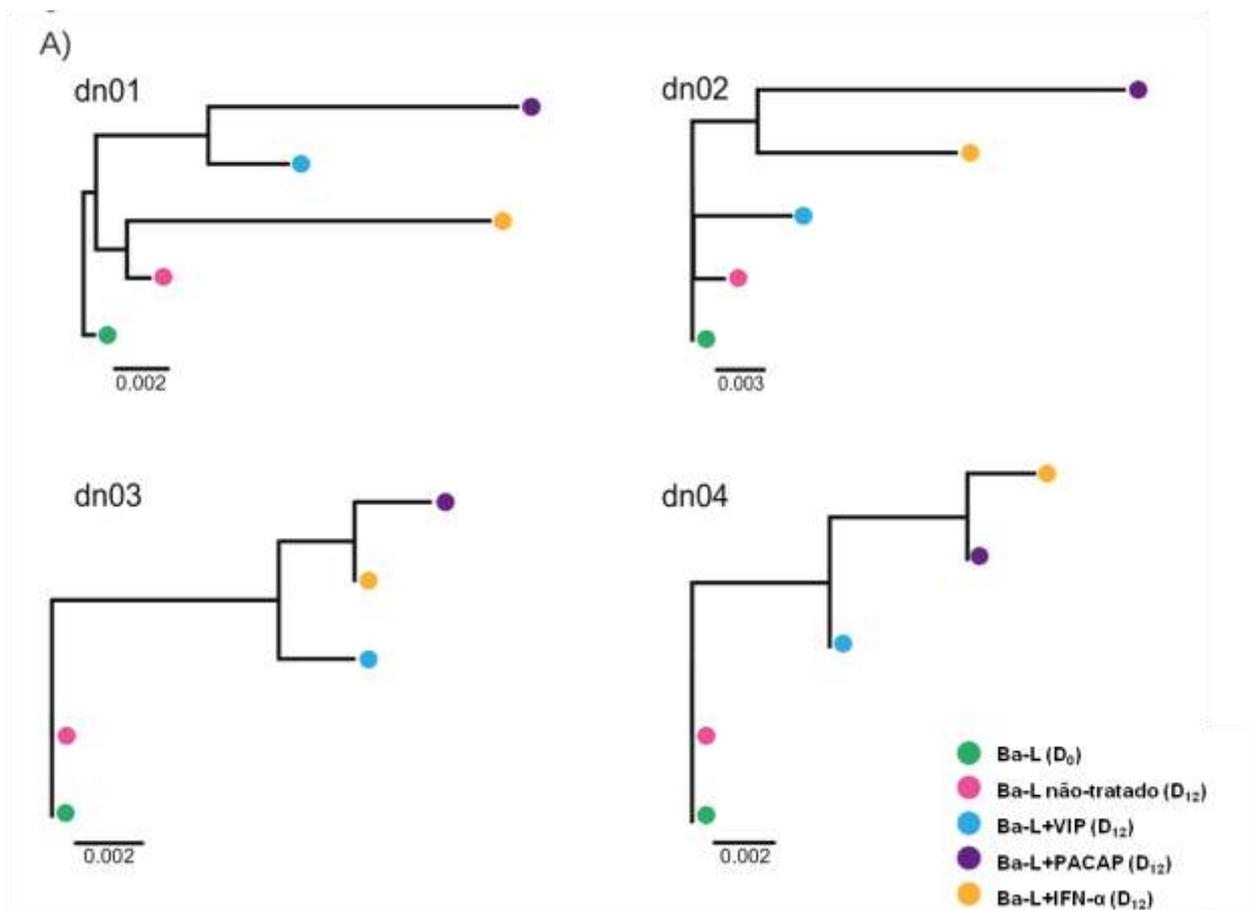
Figura 5.8 - Figura 18: VIP e PACAP reduzem os níveis de Ciclina D1 em macrófagos infectados com HIV-1.

(A) Macrófagos não infectados foram expostos a VIP ou PACAP (10 nM) e os níveis de Ciclina D1 total foram quantificados por ELISA 24h ou 48h mais tarde (n = 3). (B) Macrófagos foram infectados com HIV-1 e 7 dias depois, os níveis de Ciclina D1 foram analisados por ELISA (n=5). (C) Os macrófagos foram tratados com VIP ou PACAP (10 nM) 7 dias após a infecção pelo HIV-1 (7 dpi), na presença ou não de um inibidor de PKA ou inibidores de PKC (PKAi, H89; PKCi, Gö 6983; 50 nM cada um, 30 minutos antes dos neuropeptídeos) e os níveis de Ciclina D1 foram quantificados por ELISA 24 horas mais tarde (n = 3). *, p <0,05; **, p <0,01; One-way ANOVA, com pós-teste Dunnett.

5.9. VIP e PACAP promovem mutações no genoma do HIV-1.

Tendo em conta a capacidade VIP e PACAP de inibir a replicação do HIV-1 em macrófagos e as sugestões da literatura de que alguns fatores de restrição anti-HIV-1 com ação mutagênica no genoma viral, como membros da família APOBEC, podem ser alvo de proteínas quinases relacionadas à sinalização desses neuropeptídeos (176, 177, 198, 199), é possível que, em nosso modelo, esse fenômeno ocorra e participe da inibição viral promovida por VIP e PACAP. Para testar esta hipótese, macrófagos de quatro doadores foram infectados com o isolado HIV-1 Ba-L, tratados com VIP, PACAP ou IFN- α e, após 12 dias, os perfis de mutação na região LTR do provírus integrado foram analisados. Observamos que os provirus Ba-L + VIP e Ba-L + PACAP apresentaram maior distância genética para o isolado Ba-L original (Ba-L [D0]) do que os provírus

de macrófagos não tratados (Ba-L [D12]) (Figura 5.9A e Tabela 1). Os provirus Ba-L + PACAP acumularam um número significativamente maior de mutações do que os provirus Ba-L + VIP e Ba-L (D12) e comparáveis aos Ba-L + IFN- α (Figura 5.9B e Tabela 2). Notavelmente, uma proporção significativa de mutações detectadas em Ba-L + VIP (15%), Ba-L + PACAP (27%) e Ba-L + IFN- α (42%) correspondem a substituições de guanina (G) para adenina (A), consistentes com a atividade de membros da família APOBEC de fatores de restrição viral (Tabela 2). O número de substituições de G para A detectadas em Ba-L + VIP, Ba-L + PACAP e Ba-L + IFN- α foi duas vezes, oito vezes e dez vezes maior do que as detectadas nos provirus de Ba-L não tratado (D12), respectivamente (Tabela 2).



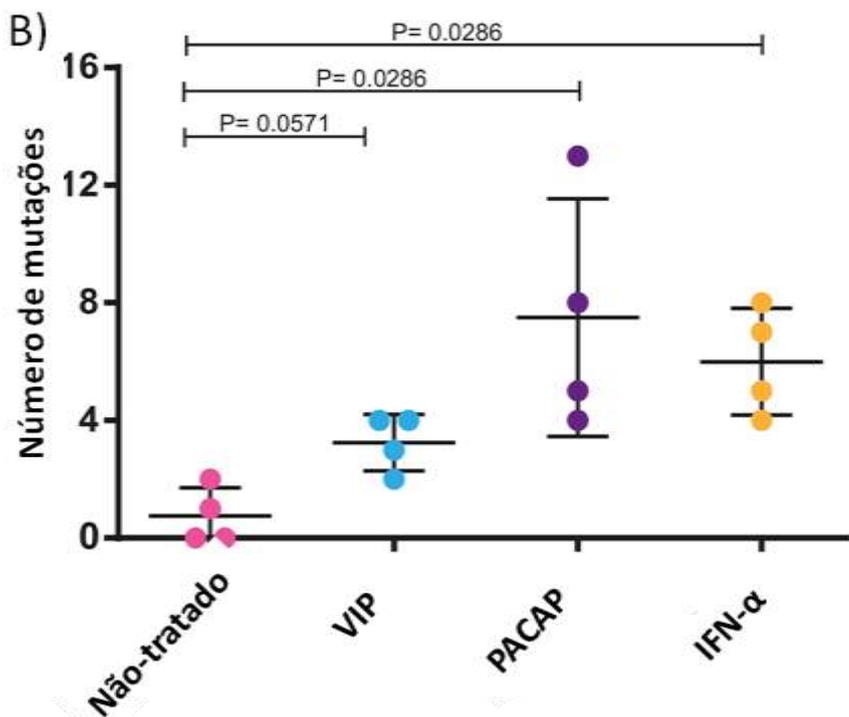


Figura 5.9 - VIP e PACAP promovem mutações no genoma do HIV-1.

Macrófagos de quatro doadores (dn1 a dn4) foram infectados com o isolado Ba-L de HIV-1 (Ba-L [D0]) e incubados por 12 dias com meio (Ba-L [D12]), VIP (10 nM; Ba -L + VIP), PACAP (10 nM; Ba-L + PACAP) ou IFN- α (103 U / mL; Ba-L + IFN- α). Depois disso, o DNA genômico de macrófagos foi extraído e as sequências LTR foram obtidas. (A) árvore filogenética de NJ de sequências de LTR proviral derivadas recuperadas de macrófagos não tratados e tratados. As árvores filogenéticas foram enraizadas usando a sequência LTR do isolado Ba-L (D0). (B) Número de mutações em relação à sequência Ba-L LTR original acumulada em genomas provirais recuperados de macrófagos sob diferentes condições de tratamento. As linhas horizontais indicam os desvios médios e padrão. Os valores de P foram calculados utilizando o teste de Mann-Whitney.

Tabela 1 - Distância genética média entre as sequencias provirais nos diferentes tratamentos comparados ao dia 0.

Tabela 1

Doador	Tratamento	Distância genética média para Ba-L
dn01	Nenhum	0.7%
	VIP	1.0%
	PACAP	1.7%
	INF α	2.4%
dn02	Nenhum	0.2%
	VIP	0.6%
	PACAP	2.7%
	INF α	1.7%
dn03	Nenhum	0%
	VIP	0.9%
	PACAP	1.1%
	INF α	0.9%
dn04	Nenhum	0%
	VIP	0.5%
	PACAP	0.9%
	INF α	1.2%

Tabela 2 - Comparação do número de mutações totais e específicas G para A identificadas nos genomas analisados.

Tabela 2

Tratamento	Doador	Número de mutações em relação a Ba-L	Número de mutações G → A em relação a Ba-L
Nenhum	dn01	2	1
	dn02	1	0
	dn03	0	0
	dn04	0	0
	Média	0.75 ± 0.96	0.25 ± 0.50
VIP	dn01	4	0
	dn02	3	0
	dn03	4	1
	dn04	2	1
	Média	3.25 ± 0.96	0.50 ± 0.58
PACAP	dn01	8	2
	dn02	13	4
	dn03	5	1
	dn04	4	1
	Média	7.50 ± 4.04	2.00 ± 1.41
INF α	dn01	7	5
	dn02	8	3
	dn03	4	1
	dn04	5	1
	Média	6.00 ± 1.83	2.50 ± 1.92

5.10. VIP e PACAP reduzem a infectividade do HIV-1.

Considerando a detecção da assinatura clássica de fatores de restrição APOBEC3, analisamos o nível de infectividade de vírus obtidos de macrófagos infectados com HIV-1 tratados com VIP ou PACAP (bem como com IFN- α como controle positivo) para avaliar o impacto destas mutações sobre a replicação viral. Assim, sobrenadantes de cultura foram coletados 12 dias após a infecção, centrifugados, clarificados e as partículas do vírus foram concentradas e tituladas por quantidades de p24 (os mesmos quatro doadores da Fig. 5.9, mais um extra). Para avaliar que se o índice de concentração foi equivalente em todas as variáveis, os níveis de p24 foram quantificados antes e após a concentração do sobrenadante. As células repórter de replicação do HIV-1 TZM-bl foram então expostas a quantidades normalizadas de vírus para avaliação da infectividade. Observamos que o tratamento com VIP não alterou significativamente a infectividade do HIV-1, enquanto que os vírus oriundos de células infectadas com HIV-1 tratados com PACAP ou IFN- α perderam significativamente a sua infectividade (Fig. 5.10, A e B). Assim, podemos inferir que as mutações de assinatura APOBEC introduzidas no genoma do HIV-1 estão relacionadas à capacidade de PACAP em reduzir a replicação do HIV-1 e, conseqüentemente, diminuir a propagação viral em cultura.

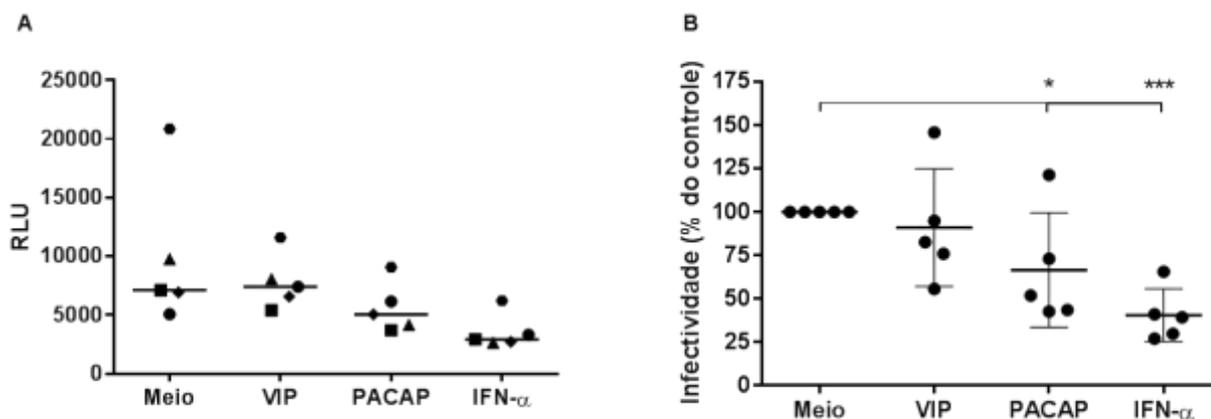


Figura 5.10 - VIP e PACAP reduzem a infectividade do HIV-1.

As células TZM-bl foram expostas a entrada infecciosa HIV-1 normalizada, obtida a partir de macrófagos infectados por 12 dias tratados com VIP ou PACAP (10 nM). Após 48 horas, as células TZM-bl foram lisadas e a atividade da luciferase foi medida. (A) Unidades de luminescência relativa, as barras representam a mediana de cada tratamento; (B) Representação dos dados normalizados de (A) (n = 5). *, p <0,05; ***, p <0,001; One-way ANOVA, com pós-teste Dunnett.

6. Discussão

VIP e PACAP são peptídeos que, juntamente com outros agentes moléculas, regulam o sistema neuro-imune-endócrino e participam de diversos processos, tais como embriogênese, memória e aprendizado, produção hormonal e respostas imunes. Embora ambos os neuropeptídeos tenham sido amplamente estudados em muitos campos, os dados sobre suas ações em tipos celulares específicos e influência em processos infecciosos ainda são escassos. Nesse sentido, descrevemos anteriormente a capacidade de VIP e

PACAP para limitar a replicação do HIV-1 nos macrófagos e identificou alguns dos mecanismos envolvidos nesta atividade. No presente trabalho, procuramos aprofundar o conhecimento sobre a interação de VIP e PACAP com macrófagos primários humanos e buscar mecanismos adicionais que contribuam para a atividade anti-HIV-1 de ambos os neuropeptídeos.

Identificamos que macrófagos tratados com cada neuropeptídeo antes da infecção pelo HIV-1 apresentaram menor produção viral e que as concentrações não inibitórias de VIP e PACAP tornaram-se capazes de controlar a replicação do HIV-1 quando adicionadas às células infectadas após um regime de tratamento múltiplo. A variedade de maneiras de alcançar o resultado da inibição do HIV-1 por esses peptídeos sugere que múltiplos mecanismos inter-relacionados ou não podem estar envolvidos neste fenômeno. Assim, além da produção de β -quimiocinas e IL-10, que foram identificadas em nosso trabalho anterior (191), mecanismos mais complexos, como modulação de fatores de transcrição e agentes de restrição viral, e ativação de receptores ou enzimas relacionadas ao ciclo replicativo do HIV-1, pode contribuir para o fenótipo inibitório. Tais mecanismos podem agir separadamente ou em conjunto, precedendo aqueles já observados por nós ou até mesmo redundantes, compensando a ausência de qualquer outro em virtude do tipo de estímulo ou estado celular no momento da interação com VIP e PACAP. Também detectamos que os receptores de VIP e PACAP são expressos em macrófagos infectados ou não pelo HIV-1, corroborando os achados do nosso trabalho anterior, nos quais agonistas específicos para cada um dos três receptores têm efeitos quantificáveis sobre a replicação do HIV-1 (191).

Encontramos aqui que VIP e PACAP provocam síntese de AMPc de macrófagos e ativação de PKA e PKC, embora a atividade de PKC pareça ser predominante em relação à ativação de PKA após o tratamento com PACAP. O resultado diferencial visto com o PACAP pode ser explicado pelo fato de que o receptor PAC1 se associa principalmente às subunidades de proteína Gs e Gq (200). Assim, em concentrações subótimas, o estímulo de Gs também é subótimo e a inibição da subunidade Gi por PTX não promove níveis saturados de AMPc. No entanto, com a dose ideal de PACAP, o bloqueio de Gi poderia levar a níveis excessivos de AMPc, considerando que com o estímulo mais forte de Gs nesta dose, os níveis de AMPc podem estar mais próximos do pico para uma atividade ótima e um aumento poderia promover a dessensibilização dos receptores, conforme descrito (35). Esse fato é bastante interessante, considerando que estudos com outros tipos de células mostraram que o PACAP é um forte ativador da PKA, juntamente com a PKC (201-203). No entanto, é possível que o receptor de PACAP, PAC1, que é um receptor acoplado a proteína G, possa desencadear ações distintas dependendo do tipo de célula alvo, com base na sua capacidade de interagir com diferentes subunidades de proteínas G, induzindo diferentes vias de sinalização. Por exemplo, associações de PAC1 com subunidades Gas, Gai e Gaq foram relatadas, o que pode desencadear ativação de PKA, inibição de PKA e ativação de PKC, respectivamente (100, 204). Além disso, o próprio receptor de PAC1 apresenta várias isoformas, com diferenças na afinidade de ligação e atividade de sinalização (97). Além disso, em vários modelos, as ações do PACAP estão relacionadas à ativação do fator "Exchange Factor directly Activated by cAMP" (EPAC), que se liga diretamente ao AMPc e promove

ativação do fator Rap1, uma proteína da classe “small GTPases” (205, 206). Portanto, também é possível que, com relação aos nossos resultados, a indução de AMPc por PACAP possa levar à ativação de EPAC, promovendo as diferenças observadas nos experimentos de NF-kB e CREB. O potencial desencadeamento dessas vias alternativas de sinalização aumenta a possibilidade de que, embora a inibição de HIV-1 por VIP e PACAP dependa da ativação de PKA e PKC, alguns outros mecanismos inibitórios possíveis podem ser modulados de forma diferente, dependendo do neuropeptídeo em questão.

Em relação à análise de fatores nucleares e componentes finais das vias de sinalização, observamos que VIP e PACAP promoveram a ativação de CREB e a inibição de NF-kBp65. A investigação dos efeitos dos neuropeptídeos sobre esses dois alvos foi baseada no fato de que o NF-kB é um fator crucial para a transcrição do HIV-1 (186), e nos trabalhos que mostram que VIP é capaz de inibir a atividade desse fator em diferentes modelos celulares (155, 157, 167). Em relação ao CREB, ele é um dos componentes finais na sinalização promovida pelos GPCRs que ativam PKA e PKC (164). CREB pode atuar como um regulador negativo do NF-kB, uma vez que ambos os fatores compartilham a proteína acessória CBP/p300, que participa do complexo transcricional formado por CREB e NF-kB (165, 166). Os dados obtidos até agora favorecem a hipótese sobre a regulação negativa do NF-kB por CREB, mas não podemos excluir que a regulação mediada por VIP e PACAP de ambos os fatores de transcrição possa não ser interconectada. Associado à regulação dos fatores de transcrição, o efeito modulador de VIP e PACAP dos níveis da proteína Ciclina D1 indica que esses neuropeptídeos têm grande potencial para

modificar a replicação viral diretamente nos núcleos celulares, através da interferência na transcrição de proteínas virais e duplicação do genoma viral para formar novas partículas virais. Além disso, esses dados nos permitem considerar que outros membros do grupo ciclina, incluindo quinases dependentes de ciclinas (CDK), que se associam e são ativados por ciclinas para formar complexos funcionais, e também seus inibidores, as proteínas CKI também podem ser alvos de regulação por VIP e PACAP em nosso modelo. Entre os vários alvos possíveis, destacamos a Ciclina L2, Ciclina D3, CDK2 e CDK6, que promovem a degradação e inibição do fator de restrição de HIV-1 SAMHD1, favorecendo a replicação viral em macrófagos (207-211).

Além da modulação dos fatores de transcrição críticos para a replicação ótima do HIV-1, observamos que PACAP foi capaz de induzir mutações no LTR do HIV-1, em níveis comparáveis ao IFN- α . Além disso, algumas dessas mutações possuem a assinatura APOBEC de G para A e os virions de culturas expostas ao PACAP apresentaram diminuição da infectividade também comparável ao IFN- α . Assim, com esses resultados combinados, é possível supor que a perda de infectividade possa ser uma consequência de mutações induzidas pelo PACAP. O mecanismo responsável por este fenômeno poderia ser consequência direta da sinalização PACAP, pois PKA e PKC podem regular a expressão e atividade dos membros da família APOBEC e fatores acessórios (176, 177, 198, 199). A dicotomia entre VIP e PACAP em promover mutações pode estar relacionada a pequenas diferenças nas vias de sinalização ativadas por cada neuropeptídeo e/ou a indução diferencial de fatores solúveis por VIP ou PACAP, como o próprio IFN- α ou moléculas relacionadas.

7. Conclusões

O conjunto de dados apresentados corrobora e ajuda a entender o efeito inibitório VIP e PACAP na replicação do HIV-1 em macrófagos, identificando as vias de sinalização desencadeadas e a capacidade de induzir um fenótipo de "resistência" de macrófagos à infecção pelo HIV-1. Em vista desses resultados, VIP e o PACAP demonstram um grande potencial sobre a regulação da replicação do HIV-1, regulando, através de ativação de PKA e PKC, fatores nucleares relacionados ao HIV-1 (NF-kB, CREB e Ciclina D1), e possivelmente, os fatores de restrição viral (APOBEC3G), dificultando a transcrição do provírus HIV-1.

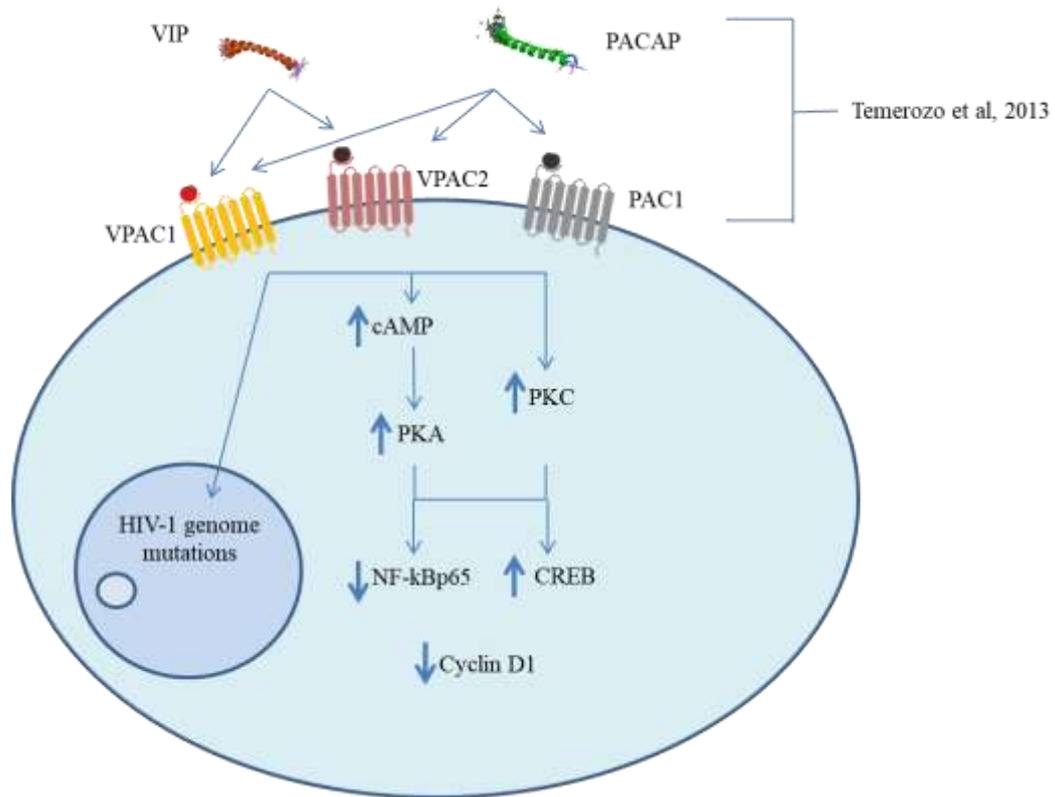


Figura 7: Modelo dos resultados obtidos

VIP e PACAP após interagirem com os seus receptores no macrófago, promovem a elevação dos níveis de AMPc seguido da ativação de PKA e PKC, que participam na indução de CREB e inibição de NF-kB e Ciclina D1. Além disso, a exposição de macrófagos infectados pelo HIV-1 aos neuropeptídeos VIP e PACAP promove mutações no LTR do provirus integrado.

8. Perspectivas

Em virtude dos resultados encontrados podemos propor como forma de dar continuidade ao estudo, os seguintes tópicos:

1. Análise da ativação da via de EPAC por VIP e PACAP, de forma a verificar a participação desta via nos efeitos inibitórios sobre o HIV-1;
2. Avaliar a expressão gênica das diversas ciclinas e CDKs, além das proteínas inibitórias CKI, em macrófagos expostos à VIP e PACAP, comparando assim os perfis de expressão no contexto da infecção pelo HIV-1;
3. Avaliar a expressão gênica de APOBEC3G em macrófagos expostos a VIP e PACAP;
4. Verificar se VIP e PACAP modulam a expressão do fator de restrição viral SAMHD1 em macrófagos;
5. Avaliar os níveis de VIP e PACAP no plasma de indivíduos infectados pelo HIV-1, correlacionando com a carga viral.

9. Referências Bibliográficas

1. Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annual review of immunology*. 1995;13:487-512.
2. UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. Geneva: World Health Organization (WHO); 2012. Contract No.: ISBN 978-92-9173-996-7.
3. Essex M. Human immunodeficiency viruses in the developing world. *Advances in virus research*. 1999;53:71-88.
4. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-71.
5. Clavel F, Brun-Vezinet F, Guetard D, Chamaret S, Laurent A, Rouzioux C, et al. [LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie*. 1986;302(13):485-8.
6. Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunt RD, et al. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science*. 1985;228(4704):1201-4.
7. Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*. 1989;339(6223):389-92.
8. Peeters M, Honore C, Huet T, Bedjabaga L, Ossari S, Bussi P, et al. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS*. 1989;3(10):625-30.
9. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*. 1990;345(6273):356-9.
10. Sharp PM, Hahn BH. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2010;365(1552):2487-94.
11. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*. 2011;25(5):679-89.
12. Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 1988;242(4882):1168-71.
13. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 1996;271(5255):1582-6.
14. Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *Journal of virology*. 2000;74(3):1234-40.
15. Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, et al. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology*. 1999;73(12):10489-502.
16. Chiu IM, Yaniv A, Dahlberg JE, Gazit A, Skuntz SF, Tronick SR, et al. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature*. 1985;317(6035):366-8.

17. Vogt PK. Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY)1997.
18. Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Betts RF, Popovic M. Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1986;256(17):2365-71.
19. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nature medicine*. 2003;9(7):853-60.
20. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell*. 1998;93(5):681-4.
21. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 1998;280(5371):1884-8.
22. Zheng YH, Lovsin N, Peterlin BM. Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunology letters*. 2005;97(2):225-34.
23. Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology*. 1998;52:491-532.
24. Hiscott J, Kwon H, Genin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(2):143-51.
25. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(1):11-23.
26. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2003;77(21):11708-17.
27. Picker LJ, Watkins DI. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol*. 6. United States2005. p. 430-2.
28. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1998;339(1):33-9.
29. Paiardini M, Frank I, Pandrea I, Apetrei C, Silvestri G. Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis. *AIDS Rev*. 2008;10(1):36-46.
30. Brenchley JM, Hill BJ, Ambrozak DR, Price DA, Guenaga FJ, Casazza JP, et al. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol*. 2004;78(3):1160-8.
31. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol*. 2006;7(3):235-9.
32. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12(12):1365-71.
33. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med*. 2002;8(4):319-23.
34. Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, et al. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol*. 2001;167(11):6663-8.
35. Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C, et al. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1133-9.
36. Estes J, Baker JV, Brenchley JM, Khoruts A, Barthold JL, Bantle A, et al. Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut. *J Infect Dis*. 2008;198(4):456-64.

37. Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, et al. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med.* 1999;5(1):83-9.
38. Dion ML, Poulin JF, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, et al. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity.* 2004;21(6):757-68.
39. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis.* 1999;179(4):859-70.
40. Moanna A, Dunham R, Paiardini M, Silvestri G. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: killed by friendly fire? *Curr HIV/AIDS Rep.* 2005;2(1):16-23.
41. Alter G, Teigen N, Ahern R, Streeck H, Meier A, Rosenberg ES, et al. Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2007;195(10):1452-60.
42. Meier A, Alter G, Frahm N, Sidhu H, Li B, Bagchi A, et al. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J Virol.* 2007;81(15):8180-91.
43. Alter G, Suscovich TJ, Teigen N, Meier A, Streeck H, Brander C, et al. Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells. *J Immunol.* 2007;178(12):7658-66.
44. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000852.
45. Benito JM, Lopez M, Martin JC, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, et al. Differences in cellular activation and apoptosis in HIV-infected patients receiving protease inhibitors or nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002;18(18):1379-88.
46. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis.* 2009;199(8):1177-85.
47. Chang JJ, Altfeld M. Innate immune activation in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2010;202 Suppl 2:S297-301.
48. Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol.* 2005;174(7):4407-14.
49. Moreno-Fernandez ME, Zapata W, Blackard JT, Franchini G, Chougnet CA. Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. *J Virol.* 2009;83(24):12925-33.
50. Brenchley JM, Douek DC. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS.* 2008;3(3):356-61.
51. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006;439(7077):682-7.
52. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443(7109):350-4.

53. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol.* 2007;8(11):1246-54.
54. Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med.* 2003;9(7):861-6.
55. Bou-Habib DC, Roderiquez G, Oravec T, Berman PW, Lusso P, Norcross MA. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virol.* 1994;68(9):6006-13.
56. Moore JP, Trkola A, Korber B, Boots LJ, Kessler JA, 2nd, McCutchan FE, et al. A human monoclonal antibody to a complex epitope in the V3 region of gp120 of human immunodeficiency virus type 1 has broad reactivity within and outside clade B. *J Virol.* 1995;69(1):122-30.
57. Moog C, Fleury HJ, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol.* 1997;71(5):3734-41.
58. Moog C, Spenlehauer C, Fleury H, Heshmati F, Saragosti S, Letourneur F, et al. Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates: a study of parameters implicated in neutralization in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997;13(1):19-27 "[
59. Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, et al. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(17):6768-72.
60. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):4144-9.
61. Saksena NK, Wu JQ, Potter SJ, Wilkinson J, Wang B. Human immunodeficiency virus interactions with CD8+ T lymphocytes. *Curr HIV Res.* 2008;6(1):1-9.
62. Walker CM, Thomson-Honniebier GA, Hsueh FC, Erickson AL, Pan LZ, Levy JA. CD8+ T cells from HIV-1-infected individuals inhibit acute infection by human and primate immunodeficiency viruses. *Cell Immunol.* 1991;137(2):420-8.
63. Killian MS, Johnson C, Teque F, Fujimura S, Levy JA. Natural suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated by transitional memory CD8+ T cells. *J Virol.* 2011;85(4):1696-705.
64. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* 1994;68(7):4650-5.
65. Verani A, Scarlatti G, Comar M, Tresoldi E, Polo S, Giacca M, et al. C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J Exp Med.* 1997;185(5):805-16.
66. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995;270(5243):1811-5.
67. Nasr N, Maddocks S, Turville SG, Harman AN, Woolger N, Helbig KJ, et al. HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production. *Blood.* 2012;120(4):778-88.

68. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1994;68(9):6103-10.
69. Lee JK, Stewart-Jones G, Dong T, Harlos K, Di Gleria K, Dorrell L, et al. T cell cross-reactivity and conformational changes during TCR engagement. *J Exp Med.* 2004;200(11):1455-66.
70. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.* 2003;422(6929):307-12.
71. Brackenridge S, Evans EJ, Toebes M, Goonetilleke N, Liu MK, di Gleria K, et al. An early HIV mutation within an HLA-B*57-restricted T cell epitope abrogates binding to the killer inhibitory receptor 3DL1. *J Virol.* 2011;85(11):5415-22.
72. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature.* 1996;382(6594):829-33.
73. Kedzierska K, Crowe SM, Turville S, Cunningham AL. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Reviews in medical virology.* 2003;13(1):39-56.
74. Wang J, Roderiquez G, Oravecz T, Norcross MA. Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *Journal of virology.* 1998;72(9):7642-7.
75. Griffin GE, Leung K, Folks TM, Kunkel S, Nabel GJ. Induction of NF-kappa B during monocyte differentiation is associated with activation of HIV-gene expression. *Research in virology.* 1991;142(2-3):233-8.
76. Poli G, Kinter AL, Fauci AS. Interleukin 1 induces expression of the human immunodeficiency virus alone and in synergy with interleukin 6 in chronically infected U1 cells: inhibition of inductive effects by the interleukin 1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91(1):108-12.
77. Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh E, Timmer WC, Rabson A, et al. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *The Journal of experimental medicine.* 1990;172(1):151-8.
78. Shirazi Y, Pitha PM. Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *Journal of virology.* 1992;66(3):1321-8.
79. Poli G, Biswas P, Fauci AS. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral research.* 1994;24(2-3):221-33.
80. Gessani S, Puddu P, Varano B, Borghi P, Conti L, Fantuzzi L, et al. Role of endogenous interferon-beta in the restriction of HIV replication in human monocyte/macrophages. *Journal of leukocyte biology.* 1994;56(3):358-61.
81. Weissman D, Poli G, Fauci AS. Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. *AIDS research and human retroviruses.* 1994;10(10):1199-206.
82. Montaner LJ, Griffin P, Gordon S. Interleukin-10 inhibits initial reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and mediates a virostatic latent state in primary blood-derived human macrophages in vitro. *The Journal of general virology.* 1994;75 (Pt 12):3393-400.
83. Naif HM, Chang J, Ho-Shon M, Li S, Cunningham AL. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in differentiating monocytes by interleukin 10

- occurs in parallel with inhibition of cellular RNA expression. *AIDS research and human retroviruses*. 1996;12(13):1237-45.
84. Bailer RT, Lee B, Montaner LJ. IL-13 and TNF-alpha inhibit dual-tropic HIV-1 in primary macrophages by reduction of surface expression of CD4, chemokine receptors CCR5, CXCR4 and post-entry viral gene expression. *European journal of immunology*. 2000;30(5):1340-9.
85. Truong MJ, Darcissac EC, Hermann E, Dewulf J, Capron A, Bahr GM. Interleukin-16 inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in macrophages and in dendritic cells. *Journal of virology*. 1999;73(8):7008-13.
86. Neil S, Bieniasz P. Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(9):569-80.
87. Strebel K, Luban J, Jeang KT. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med*. 2009;7:48.
88. Goujon C, Moncorge O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T, et al. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 2013;502(7472):559-62.
89. Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha. *Rev Med Virol*. 2010;20(2):77-92.
90. Romani B, Engelbrecht S, Glashoff RH. Antiviral roles of APOBEC proteins against HIV-1 and suppression by Vif. *Arch Virol*. 2009;154(10):1579-88.
91. Said SI, Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*. 1970;169(3951):1217-8.
92. Gonzalez-Rey E, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide and regulatory T-cell induction: a new mechanism and therapeutic potential for immune homeostasis. *Trends Mol Med*. 2007;13(6):241-51.
93. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164(1):567-74.
94. Miyata A, Jiang L, Dahl RD, Kitada C, Kubo K, Fujino M, et al. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;170(2):643-8.
95. Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology*. 1991;129(5):2787-9.
96. Gaytan F, Martinez-Fuentes AJ, Garcia-Navarro F, Vaudry H, Aguilar E. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) immunolocalization in lymphoid tissues of the rat. *Cell Tissue Res*. 1994;276(2):223-7.
97. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years the discovery. *Pharmacol Rev*. 2009;61(3):283-357.
98. McRory J, Sherwood NM. Two protochordate genes encode pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related family members. *Endocrinology*. 1997;138(6):2380-90.
99. Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, et al. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev*. 1998;50(2):265-70.

100. Laburthe M, Couvineau A, Tan V. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides*. 2007;28(9):1631-9.
101. Pisegna JR, Wank SA. Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(13):6345-9.
102. Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron*. 1992;8(4):811-9.
103. Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmar AJ. The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett*. 1993;334(1):3-8.
104. Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, et al. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature*. 1993;365(6442):170-5.
105. Dautzenberg FM, Mevenkamp G, Wille S, Hauger RL. N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *J Neuroendocrinol*. 1999;11(12):941-9.
106. Chatterjee TK, Sharma RV, Fisher RA. Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels. *J Biol Chem*. 1996;271(50):32226-32.
107. Murthy KS, Zhang KM, Jin JG, Grider JR, Makhlof GM. VIP-mediated G protein-coupled Ca²⁺ influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. *Am J Physiol*. 1993;265(4 Pt 1):G660-71.
108. Straub SG, Sharp GW. A wortmannin-sensitive signal transduction pathway is involved in the stimulation of insulin release by vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J Biol Chem*. 1996;271(3):1660-8.
109. Koh SW. Signal transduction through the vasoactive intestinal peptide receptor stimulates phosphorylation of the tyrosine kinase pp60c-src. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;174(2):452-8.
110. Barrie AP, Clohessy AM, Buensuceso CS, Rogers MV, Allen JM. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide stimulates extracellular signal-regulated kinase 1 or 2 (ERK1/2) activity in a Ras-independent, mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase 1 or 2-dependent manner in PC12 cells. *J Biol Chem*. 1997;272(32):19666-71.
111. Villalba M, Bockaert J, Journot L. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci*. 1997;17(1):83-90.
112. Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit interleukin-12 transcription by regulating nuclear factor kappaB and Ets activation. *J Biol Chem*. 1999;274(45):31930-40.
113. Delgado M, Ganea D. Inhibition of IFN-gamma-induced janus kinase-1-STAT1 activation in macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J Immunol*. 2000;165(6):3051-7.
114. Sun C, Song D, Davis-Taber RA, Barrett LW, Scott VE, Richardson PL, et al. Solution structure and mutational analysis of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide binding to the extracellular domain of PAC1-RS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(19):7875-80.

115. Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, et al. Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem*. 2003;278(5):3293-7.
116. Sexton PM, Poyner DR, Simms J, Christopoulos A, Hay DL. Modulating receptor function through RAMPs: can they represent drug targets in themselves? *Drug Discov Today*. 2009;14(7-8):413-9.
117. Gee HY, Kim YW, Jo MJ, Namkung W, Kim JY, Park HW, et al. Synaptic scaffolding molecule binds to and regulates vasoactive intestinal polypeptide type-1 receptor in epithelial cells. *Gastroenterology*. 2009;137(2):607-17, 17.e1-4.
118. Mahon MJ, Shimada M. Calmodulin interacts with the cytoplasmic tails of the parathyroid hormone 1 receptor and a sub-set of class b G-protein coupled receptors. *FEBS Lett*. 2005;579(3):803-7.
119. Harikumar KG, Morfis MM, Lisenbee CS, Sexton PM, Miller LJ. Constitutive formation of oligomeric complexes between family B G protein-coupled vasoactive intestinal polypeptide and secretin receptors. *Mol Pharmacol*. 2006;69(1):363-73.
120. Dickson L, Aramori I, McCulloch J, Sharkey J, Finlayson K. A systematic comparison of intracellular cyclic AMP and calcium signalling highlights complexities in human VPAC/PAC receptor pharmacology. *Neuropharmacology*. 2006;51(6):1086-98.
121. Moody TW, Ito T, Osefo N, Jensen RT. VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18(1):61-7.
122. Brenneman DE, Hauser J, Spong CY, Phillips TM, Pert CB, Ruff M. VIP and D-ala-peptide T-amide release chemokines which prevent HIV-1 GP120-induced neuronal death. *Brain Res*. 1999;838(1-2):27-36.
123. Brenneman DE, Hauser JM, Spong C, Phillips TM. Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides*. 2002;36(4):271-80.
124. Botia B, Jolivel V, Burel D, Le Joncour V, Roy V, Naassila M, et al. Neuroprotective effects of PACAP against ethanol-induced toxicity in the developing rat cerebellum. *Neurotox Res*. 2011;19(3):423-34.
125. Fabian E, Reglodi D, Mester L, Szabo A, Szabadfi K, Tamas A, et al. Effects of PACAP on intracellular signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells exposed to oxidative stress. *J Mol Neurosci*. 2012;48(3):493-500.
126. Masmoudi-Kouki O, Douiri S, Hamdi Y, Kaddour H, Bahdoudi S, Vaudry D, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects astroglial cells against oxidative stress-induced apoptosis. *J Neurochem*. 2011;117(3):403-11.
127. Reglodi D, Kiss P, Lubics A, Tamas A. Review on the protective effects of PACAP in models of neurodegenerative diseases in vitro and in vivo. *Curr Pharm Des*. 2011;17(10):962-72.
128. Morell M, Souza-Moreira L, Gonzalez-Rey E. VIP in neurological diseases: more than a neuropeptide. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012;12(4):323-32.
129. Dickson L, Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther*. 2009;121(3):294-316.
130. Delgado M, Chorny A, Ganea D, Gonzalez-Rey E. Vasoactive intestinal polypeptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft versus host disease and leukemia relapse after bone marrow transplantation. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1070:226-32.

131. Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids*. 2011.
132. Sanlioglu AD, Karacay B, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(3):R157-67.
133. Yadav M, Huang MC, Goetzl EJ. VPAC1 (vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 1) G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis. *Cell Immunol*. 2011;267(2):124-32.
134. Kojima M, Ito T, Oono T, Hisano T, Igarashi H, Arita Y, et al. VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production. *Pancreas*. 2005;30(1):62-70.
135. Foster N, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. Pivotal advance: vasoactive intestinal peptide inhibits up-regulation of human monocyte TLR2 and TLR4 by LPS and differentiation of monocytes to macrophages. *J Leukoc Biol*. 2007;81(4):893-903.
136. Gutierrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martinez C, Galindo M, et al. VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(5):527-32.
137. Jiang X, McClellan SA, Barrett RP, Zhang Y, Hazlett LD. Vasoactive intestinal peptide downregulates proinflammatory TLRs while upregulating anti-inflammatory TLRs in the infected cornea. *J Immunol*. 2012;189(1):269-78.
138. Arranz A, Abad C, Juarranz Y, Torroba M, Rosignoli F, Leceta J, et al. Effect of VIP on TLR2 and TLR4 expression in lymph node immune cells during TNBS-induced colitis. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1070:129-34.
139. Gomariz RP, Gutierrez-Canas I, Arranz A, Carrion M, Juarranz Y, Leceta J, et al. Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics. *Curr Pharm Des*. 2010;16(9):1063-80.
140. Lara-Marquez M, O'Dorisio M, O'Dorisio T, Shah M, Karacay B. Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal peptide receptor type 1 and type 2 in human T cells. *J Immunol*. 2001;166(4):2522-30.
141. Voice J, Donnelly S, Dorsam G, Dolganov G, Paul S, Goetzl EJ. c-Maf and JunB mediation of Th2 differentiation induced by the type 2 G protein-coupled receptor (VPAC2) for vasoactive intestinal peptide. *J Immunol*. 2004;172(12):7289-96.
142. Delgado M, Leceta J, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promote in vivo generation of memory Th2 cells. *Faseb j*. 2002;16(13):1844-6.
143. Delgado M, Gonzalez-Rey E, Ganea D. VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells. *Faseb j*. 2004;18(12):1453-5.
144. Jiang X, Jing H, Ganea D. VIP and PACAP down-regulate CXCL10 (IP-10) and up-regulate CCL22 (MDC) in spleen cells. *J Neuroimmunol*. 2002;133(1-2):81-94.
145. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.
146. Delgado M, Reduta A, Sharma V, Ganea D. VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells. *J Leukoc Biol*. 2004;75(6):1122-30.
147. Ganea D, Delgado M. Neuropeptides as modulators of macrophage functions. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2001;49(2):101-10.
148. Pozo D, Gonzalez-Rey E, Chorny A, Anderson P, Varela N, Delgado M. Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: a new therapeutic approach for immune disorders. *Peptides*. 2007;28(9):1833-46.

149. Gonzalez-Rey E, Delgado-Maroto V, Souza Moreira L, Delgado M. Neuropeptides as Therapeutic Approach to Autoimmune Diseases. *Curr Pharm Des.* 2010;16(28):3158-72.
150. Delgado M, Pozo D, Martinez C, Garrido E, Leceta J, Calvo JR, et al. Characterization of gene expression of VIP and VIP1-receptor in rat peritoneal lymphocytes and macrophages. *Regul Pept.* 1996;62(2-3):161-6.
151. Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol.* 1998;63(5):591-601.
152. Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, et al. VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels in resting peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Neuroimmunol.* 1998;85(2):155-67.
153. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Subsequent effect on IFN γ synthesis by T cells. *J Neuroimmunol.* 1999;96(2):167-81.
154. Delgado M, Pozo D, Martinez C, Leceta J, Calvo JR, Ganea D, et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF- α production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol.* 1999;162(4):2358-67.
155. Delgado M, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J. Anti-inflammatory properties of the type 1 and type 2 vasoactive intestinal peptide receptors: role in lethal endotoxic shock. *Eur J Immunol.* 2000;30(11):3236-46.
156. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol.* 1999;162(3):1707-16.
157. Delgado M, Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2001;167(2):966-75.
158. Delgado M, Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo. *Arch Physiol Biochem.* 2001;109(4):377-82.
159. Delgado M, Jonakait GM, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia.* 2002;39(2):148-61.
160. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med.* 2010;10(4):369-73.
161. Ganea D, Delgado M. The neuropeptides VIP/PACAP and T cells: inhibitors or activators? *Curr Pharm Des.* 2003;9(12):997-1004.
162. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Martinez C, Gomariz RP, Ganea D. VIP and PACAP38 modulate cytokine and nitric oxide production in peritoneal macrophages and macrophage cell lines. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;897:401-14.
163. Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, Arias D, Rolfo C, Trinh XB, et al. The role of Nuclear Factor- κ B signaling in human cervical cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;120:141-50.
164. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:821-61.

165. Shenkar R, Yum HK, Arcaroli J, Kupfner J, Abraham E. Interactions between CBP, NF-kappaB, and CREB in the lungs after hemorrhage and endotoxemia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(2):L418-26.
166. Matt T. Transcriptional control of the inflammatory response: a role for the CREB-binding protein (CBP). *Acta Med Austriaca.* 2002;29(3):77-9.
167. Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Ganea D, Delgado M. Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;921:92-102.
168. Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit nuclear factor-kappa B-dependent gene activation at multiple levels in the human monocytic cell line THP-1. *J Biol Chem.* 2001;276(1):369-80.
169. Delgado M. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit CBP-NF-kappaB interaction in activated microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(5):1181-5.
170. Mukherjee SP, Behar M, Birnbaum HA, Hoffmann A, Wright PE, Ghosh G. Analysis of the RelA:CBP/p300 interaction reveals its involvement in NF-kappaB-driven transcription. *PLoS Biol.* 2013;11(9):e1001647.
171. Branch DR, Valenta LJ, Yousefi S, Sakac D, Singla R, Bali M, et al. VPAC1 is a cellular neuroendocrine receptor expressed on T cells that actively facilitates productive HIV-1 infection. *Aids.* 2002;16(3):309-19.
172. Bokaei PB, Ma XZ, Sakac D, Branch DR. HIV-1 integration is inhibited by stimulation of the VPAC2 neuroendocrine receptor. *Virology.* 2007;362(1):38-49.
173. Carey RG, Li B, DiCicco-Bloom E. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Anti-Mitogenic Signaling in Cerebral Cortical Progenitors Is Regulated by p57Kip2- Dependent CDK2 Activity. *J Neurosci.* 2002;22(5):1583-91.
174. Njaine B, Martins RA, Santiago MF, Linden R, Silveira MS. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide controls the proliferation of retinal progenitor cells through downregulation of cyclin D1. *Eur J Neurosci.* 2010;32(3):311-21.
175. Anderson P, Gonzalez-Rey E. Vasoactive intestinal peptide induces cell cycle arrest and regulatory functions in human T cells at multiple levels. *Mol Cell Biol.* 2010;30(10):2537-51.
176. Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Yokoyama M, Izumi T, Matsui M, Io K, et al. Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15(11):1184-91.
177. Lehmann DM, Galloway CA, MacElrevey C, Sowden MP, Wedekind JE, Smith HC. Functional characterization of APOBEC-1 complementation factor phosphorylation sites. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(3):408-18.
178. Jajoo S, Mukherjee D, Brewer GJ, Ramkumar V. Pertussis toxin B-oligomer suppresses human immunodeficiency virus-1 Tat-induced neuronal apoptosis through feedback inhibition of phospholipase C-beta by protein kinase C. *Neuroscience.* 2008;151(2):525-32.
179. Hu Q, Younson J, Griffin GE, Kelly C, Shattock RJ. Pertussis toxin and its binding unit inhibit HIV-1 infection of human cervical tissue and macrophages involving a CD14 pathway. *J Infect Dis.* 2006;194(11):1547-56.
180. Georg B, Falktoft B, Fahrenkrug J. PKA, novel PKC isoforms, and ERK is mediating PACAP auto-regulation via PAC1R in human neuroblastoma NB-1 cells. *Neuropeptides.* 2016;60:83-9.
181. Juhasz T, Helgadottir SL, Tamas A, Reglodi D, Zakany R. PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides.* 2015;66:51-7.

182. Niewiadomski P, Zhujiang A, Youssef M, Waschek JA. Interaction of PACAP with Sonic hedgehog reveals complex regulation of the hedgehog pathway by PKA. *Cell Signal*. 2013;25(11):2222-30.
183. Yang K, Lei G, Jackson MF, Macdonald JF. The involvement of PACAP/VIP system in the synaptic transmission in the hippocampus. *J Mol Neurosci*. 2010;42(3):319-26.
184. Falktoft B, Georg B, Fahrenkrug J. Signaling pathways in PACAP regulation of VIP gene expression in human neuroblastoma cells. *Neuropeptides*. 2009;43(5):387-96.
185. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkappaB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(3):227-41.
186. Hiscott J, Kwon H, Genin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest*. 2001;107(2):143-51.
187. Nekhai S, Jeang KT. Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future Microbiol*. 2006;1(4):417-26.
188. DeLuca C, Roulston A, Koromilas A, Wainberg MA, Hiscott J. Chronic human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid cells disrupts the autoregulatory control of the NF-kappaB/Rel pathway via enhanced IkappaBalpha degradation. *J Virol*. 1996;70(8):5183-93.
189. Choe W, Volsky DJ, Potash MJ. Activation of NF-kappaB by R5 and X4 human immunodeficiency virus type 1 induces macrophage inflammatory protein 1alpha and tumor necrosis factor alpha in macrophages. *J Virol*. 2002;76(10):5274-7.
190. Noursadeghi M, Tsang J, Miller RF, Straschewski S, Kellam P, Chain BM, et al. Genome-wide innate immune responses in HIV-1 infected macrophages are preserved despite attenuation of the NF-kB activation pathway. *J Immunol*. 2009;182(1):319-28.
191. Temerozo JR, Joaquim R, Regis EG, Savino W, Bou-Habib DC. Macrophage Resistance to HIV-1 Infection Is Enhanced by the Neuropeptides VIP and PACAP. *PLoS One*. 2013;8(6):e67701.
192. Racz B, Tamas A, Kiss P, Toth G, Gasz B, Borsiczky B, et al. Involvement of ERK and CREB signaling pathways in the protective effect of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1070:507-11.
193. Yuan XH, Yao C, Oh JH, Park CH, Tian YD, Han M, et al. Vasoactive intestinal peptide stimulates melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells via CREB/MITF/tyrosinase signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;477(3):336-42.
194. Schomerus C, Maronde E, Laedtke E, Korf HW. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induce phosphorylation of the transcription factor CREB in subpopulations of rat pinealocytes: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Cell Tissue Res*. 1996;286(3):305-13.
195. Nelson PJ, Sunamoto M, Husain M, Gelman IH. HIV-1 expression induces cyclin D1 expression and pRb phosphorylation in infected podocytes: cell-cycle mechanisms contributing to the proliferative phenotype in HIV-associated nephropathy. *BMC Microbiol*. 2002;2:26.
196. Neumeister P, Pixley FJ, Xiong Y, Xie H, Wu K, Ashton A, et al. Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages. *Mol Biol Cell*. 2003;14(5):2005-15.
197. Dey A, Li W. Cell cycle-independent induction of D1 and D2 cyclin expression, but not cyclin-Cdk complex formation or Rb phosphorylation, by IFNgamma in macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1497(1):135-47.

198. Rose KM, Marin M, Kozak SL, Kabat D. Transcriptional regulation of APOBEC3G, a cytidine deaminase that hypermutates human immunodeficiency virus. *J Biol Chem.* 2004;279(40):41744-9.
199. Chen H, Zhang R, Luo RH, Yang LM, Wang RR, Hao XJ, et al. Anti-HIV Activities and Mechanism of 12-O-Tricosanoylphorbol-20-acetate, a Novel Phorbol Ester from *Ostodes katharinae*. *Molecules.* 2017;22(9).
200. Kanasaki H, Oride A, Hara T, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Kyo S. Interactions between Two Different G Protein-Coupled Receptors in Reproductive Hormone-Producing Cells: The Role of PACAP and Its Receptor PAC1R. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10).
201. Choi HJ, Park SY, Hwang O. Differential involvement of PKA and PKC in regulation of catecholamine enzyme genes by PACAP. *Peptides.* 1999;20(7):817-22.
202. Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Vaudry D, Fournier A, Patte-Mensah C, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes via a PKA-dependent mechanism. *Faseb j.* 2003;17(1):17-27.
203. Chik CL, Li B, Ogiwara T, Ho AK, Karpinski E. PACAP modulates L-type Ca²⁺ channel currents in vascular smooth muscle cells: involvement of PKC and PKA. *Faseb j.* 1996;10(11):1310-17.
204. Laburthe M, Couvineau A, Marie JC. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels.* 2002;8(3-4):137-53.
205. Ster J, de Bock F, Bertaso F, Abitbol K, Daniel H, Bockaert J, et al. Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus. *J Physiol.* 2009;587(1):101-13.
206. Emery AC, Eiden LE. Signaling through the neuropeptide GPCR PAC(1) induces neuritogenesis via a single linear cAMP- and ERK-dependent pathway using a novel cAMP sensor. *Faseb j.* 2012;26(8):3199-211.
207. Kyei GB, Cheng X, Ramani R, Ratner L. Cyclin L2 is a critical HIV dependency factor in macrophages that controls SAMHD1 abundance. *Cell Host Microbe.* 2015;17(1):98-106.
208. Pauls E, Ruiz A, Badia R, Permanyer M, Gubern A, Riveira-Munoz E, et al. Cell cycle control and HIV-1 susceptibility are linked by CDK6-dependent CDK2 phosphorylation of SAMHD1 in myeloid and lymphoid cells. *J Immunol.* 2014;193(4):1988-97.
209. Ruiz A, Pauls E, Badia R, Torres-Torronteras J, Riveira-Munoz E, Clotet B, et al. Cyclin D3-dependent control of the dNTP pool and HIV-1 replication in human macrophages. *Cell Cycle.* 2015;14(11):1657-65.
210. Badia R, Pujantell M, Riveira-Munoz E, Puig T, Torres-Torronteras J, Marti R, et al. The G1/S Specific Cyclin D2 Is a Regulator of HIV-1 Restriction in Non-proliferating Cells. *PLoS Pathog.* 2016;12(8):e1005829.
211. Breuer D, Kotelkin A, Ammosova T, Kumari N, Ivanov A, Ilatovskiy AV, et al. CDK2 regulates HIV-1 transcription by phosphorylation of CDK9 on serine 90. *Retrovirology.* 2012;9:94.

10. Anexos

10.1. Publicações durante o período da tese

1. The effects of neurotrophins and the neuropeptides VIP and PACAP on HIV-1 infection: histories with opposite ends. Souza TM, **Temerozo JR**, Giestal-de-Araujo E, Bou-Habib DC. Neuroimmunomodulation. 2014;21(5):268-82. doi: 10.1159/000357434.
2. HIV-1 and its gp120 inhibits the influenza A(H1N1)pdm09 life cycle in an IFITM3-dependent fashion. Mesquita M1, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Abrantes JL, Costa E, **Temerozo JR**, Siqueira MM, Bou-Habib DC, Souza TM. PLoS One. 2014 Jun 30;9(6):e101056. doi: 10.1371/journal.pone.0101056.
3. HIV-1 Tat protein enhances the intracellular growth of Leishmania amazonensis via the ds-RNA induced protein PKR. Vivarini Áde C, Pereira Rde M, Barreto-de-Souza V, **Temerozo JR**, Soares DC, Saraiva EM, Saliba AM, Bou-Habib DC, Lopes UG. Sci Rep. 2015 Nov 26;5:16777. doi: 10.1038/srep16777.
4. Protective effect of gedunin on TLR-mediated inflammation by modulation of inflammasome activation and cytokine production: Evidence of a multitarget compound. Borges PV, Moret KH, Raghavendra NM, Maramaldo Costa TE, Monteiro AP, Carneiro AB, Pacheco P, **Temerozo JR**, Bou-Habib DC, das Graças Henriques M, Penido C. Pharmacol Res. 2017 Jan;115:65-77. doi: 10.1016/j.phrs.2016.09.015. Epub 2016 Sep 15.

10.2. Manuscrito submetido para publicação