

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Estudo dos efeitos dos neuropeptídeos VIP e PACAP sobre a replicação do
HIV-1 em macrófagos primários humanos.

JAIRO RAMOS TEMEROZO

Rio de Janeiro
2013

Temerozo, Jairo Ramos.

Estudo dos efeitos dos neuropeptídeos VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos primários humanos / Jairo Ramos Temerozo. - Rio de janeiro, 2013.

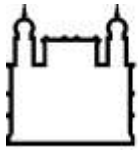
53 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Orientador: Dumith Chequer Bou-Habib.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Jairo Ramos Temerozo

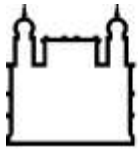
Estudo dos efeitos dos neuropeptídeos VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos primários humanos.

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

Orientador: Prof. Dumith Chequer Bou-Habib

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: JAIRO RAMOS TEMEROZO

**ESTUDO DOS EFEITOS DOS NEUROPEPTÍDEOS VIP E PACAP SOBRE A
REPLICAÇÃO DO HIV-1 EM MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS HUMANOS.**

ORIENTADOR: Prof. Dumith Chequer Bou-Habib

Aprovada em: 26/11/2013

EXAMINADORES:

Prof. Vinícius de Frias Carvalho (Presidente)

Prof. Marcelo Alves Soares (Titular)

Prof. Pedro Muanis Persechini (Titular)

Prof. Thiago Moreno Lopes e Souza (Revisor/Suplente)

Prof. Daniella Arêas Mendes da Cruz (Suplente)

Rio de Janeiro, Novembro de 2013

AGRADECIMENTOS

Ao longo do período do mestrado, muitas pessoas passaram por minha vida, deixando marcas e lições para toda ela, proporcionando-me alegrias, conhecimento e crescimento pessoal. Neste momento gostaria de agradecê-las, pois de forma direta ou indireta, contribuíram para a conclusão desta etapa.

Aos meus grandes amigos Pedro Ferreira e Bruno Cister, que sempre estiveram presentes e me ajudaram de diversas formas, e com os quais sempre dou boas risadas.

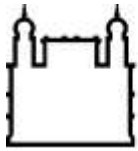
À Eduardo Régis (Edu), que iniciou os estudos com estes neuropeptídeos, e participou da minha orientação durante a minha Iniciação Científica. Tenho seus conselhos, orientações e apoio como parte da minha formação científica e pessoal.

Um especial agradecimento aos colegas e pesquisadores do LPT que sempre estiveram dispostos a ajudar e discutir ciência durante esses anos.

Agradeço muito ao meu orientador, professor Dumith Chequer Bou-Habib, que tenho como colega e amigo; sempre disposto a discutir e acrescentar, me encorajando e dando espaço para exposição de opiniões. Minha formação é grande parte dependente dessa vivência que me ensina muito.

Ao Instituto Oswaldo Cruz e a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo auxílio financeiro e apoio para participação de eventos.

Finalmente e principalmente, agradeço a minha família, que são minha inspiração de caráter, responsabilidade e carinho, e que sempre me apoiaram e me aconselharam em todos os momentos.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

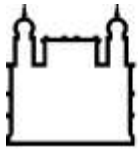
Estudo dos efeitos dos neuropeptídeos VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos primários humanos.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jairo Ramos Temerozo

O Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) e o Peptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária (PACAP) regulam diversas funções fisiológicas por meio de três receptores acoplados a proteína G (VPAC1, VPAC2 e PAC1). Tanto os receptores, quanto os ligantes, possuem ampla distribuição orgânica, e no contexto do sistema imune são expressos por células T e macrófagos. Trabalhos recentes descreveram que a ativação específica de receptores de VIP e PACAP resulta em efeitos opostos sobre a replicação do HIV-1. Neste estudo avaliamos a ação destes neuropeptídeos sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos, conhecidos reservatórios virais durante a infecção do HIV-1. Utilizamos macrófagos obtidos a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), infectados *in vitro* com HIV-1 e tratados com VIP ou PACAP e/ou agonistas ou antagonistas dos seus receptores. Verificamos que ambos os neuropeptídeos inibem a replicação viral, podendo atuar de forma sinérgica ou aditiva, dependente da concentração empregada. A inibição por VIP depende da ligação a VPAC1/2, e a inibição induzida por PACAP ocorre preferencialmente por PAC1, podendo ocorrer também através dos receptores VPAC. A ativação isolada de VPAC2 e PAC1 é capaz de inibir a replicação, e o estímulo de VPAC1 amplia a produção viral. A associação dos agonistas de VPAC1 e VPAC2 mimetiza a ação de VIP, e a ação de PACAP pode ser reproduzida pelo agonista de PAC1, da mesma forma que a associação de ambos os três agonistas reproduz o efeito inibitório sobre o HIV-1 quando os dois neuropeptídeos estão presentes. Ambos neuropeptídeos induzem β -quimiocinas e a citocina IL-10, como parte da resposta destes neuropeptídeos sobre o HIV-1. Em suma, nossos resultados elucidam parte do mecanismo de inibição VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos, contribuindo para a compreensão do papel destes neuropeptídeos e seus receptores na infecção pelo HIV-1.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Study of the effects of the neuropeptides VIP and PACAP on HIV-1 replication in human primary macrophages.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION

Jairo Ramos Temerozo

The Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and the Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide (PACAP) regulate various physiological functions through three G protein-coupled receptors (VPAC1 and VPAC2, PAC1). Both receptors and ligands have wide organic distribution, and, in the immune system are expressed by T cells and macrophages. Recent works described that activation of VIP and PACAP receptors resulted in opposite effects on the replication of HIV-1. Here, we evaluated the action of these neuropeptides on HIV-1 replication in macrophages, cells that act as viral reservoirs during infection. Macrophages were obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors, infected with HIV-1 *in vitro* and treated with VIP and/or PACAP or with agonists or antagonists of their receptors. We found that both neuropeptides inhibit viral replication, and that both molecules can act in a concentration-dependent synergistic or additive fashion. Inhibition by VIP is dependent of engagement of VPAC1/2, and PACAP-induced inhibition occurs preferentially via PAC1. Isolated activation of VPAC2 or PAC1 inhibits HIV-1 replication, whereas the sole stimulation of VPAC1 induces viral production. Association of VPAC1 and VPAC2 agonists mimics the inhibitory action of VIP, and inhibition mediated by PACAP can be reproduced by PAC1 agonist, likewise, association of the three agonists reproduces the neuropeptide inhibitory effect on HIV-1 replication. Both neuropeptides induce β -chemokines and IL-10 production, and these mediators are implicated on the inhibitory effect of these neuropeptides on HIV-1 replication. In summary, our results demonstrate that VIP and PACAP increase macrophages resistance to HIV-1 replication, through induction of β -chemokine and IL-10 production thus contributing to the understanding of the role of these neuropeptides and their receptors on HIV-1 infection.

ÍNDICE

<i>AUTOR: Jairo Ramos Temerozo</i>	II
AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
Índice VI	
1 Introdução	8
1.1 O HIV	8
1.1.1 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).	8
1.1.2 Aspectos genômicos e estruturais do HIV-1.....	11
1.1.3 Ciclo replicativo e a infecção do HIV-1	14
1.1.4 Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1.....	15
1.1.5 Resposta imune à infecção pelo HIV-1	19
1.1.6 Imunomodulação da replicação do HIV-1	20
1.2 O Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) e o Peptídeo Ativador da Adenilato Ciclase Pituitária (PACAP)	22
1.2.1 Caracterização, receptores e vias de sinalização.	22
1.2.2 Funções biológicas.....	25
1.2.3 VIP e PACAP no sistema imune	25
1.3 VIP, PACAP e a Infecção pelo HIV-1	30
2 Justificativa e Hipótese	31
3 Objetivos	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 Metodologia e Resultados	33
4.1 Efeito individual e associado de VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em função do tempo de tratamento	34
5 Discussão	36
6 Conclusões	41
7 Perspectivas	42
8 Referências Bibliográficas	43
9 Apêndice	53

Índice de Figuras

Figura 1 - Pessoas infectadas pelo HIV no mundo e prevalência em adultos.....	9
Figura 2 – Mapa global de distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1.	11
Figura 3 - Estrutura do vírion do HIV-1.	12
Figura 4 - Representação esquemática da organização genômica do HIV-1.....	13
Figura 5 – Ciclo replicativo do HIV-1.	15
Figura 6 - Curso clínico típico da infecção pelo HIV-1.....	16
Figura 7 - Gene e peptídeo precursor de VIP e PACAP.	23
Figura 8 – Sinalização clássica ativada por VIP e PACAP.	24
Figura 9 - Efeitos de VIP e PACAP sobre células do sistema imune.	28
Figura 10 - Efeitos de VIP e PACAP sobre macrófagos ativados.....	29
Figura 11 - Efeito individual e associado de VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em função do tempo de tratamento.	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 O HIV

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

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 a 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), 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 a 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.

Número estimado de adultos e crianças infectados pelo HIV-1 | 2011



Figura 1 - Pessoas infectadas pelo HIV no mundo e prevalência em adultos. Modificada de “Global epidemic (Powerpoint slides)” (<http://www.who.int/hiv/data/en/>) em outubro de 2013.

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_{smm} (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 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 2) (11).

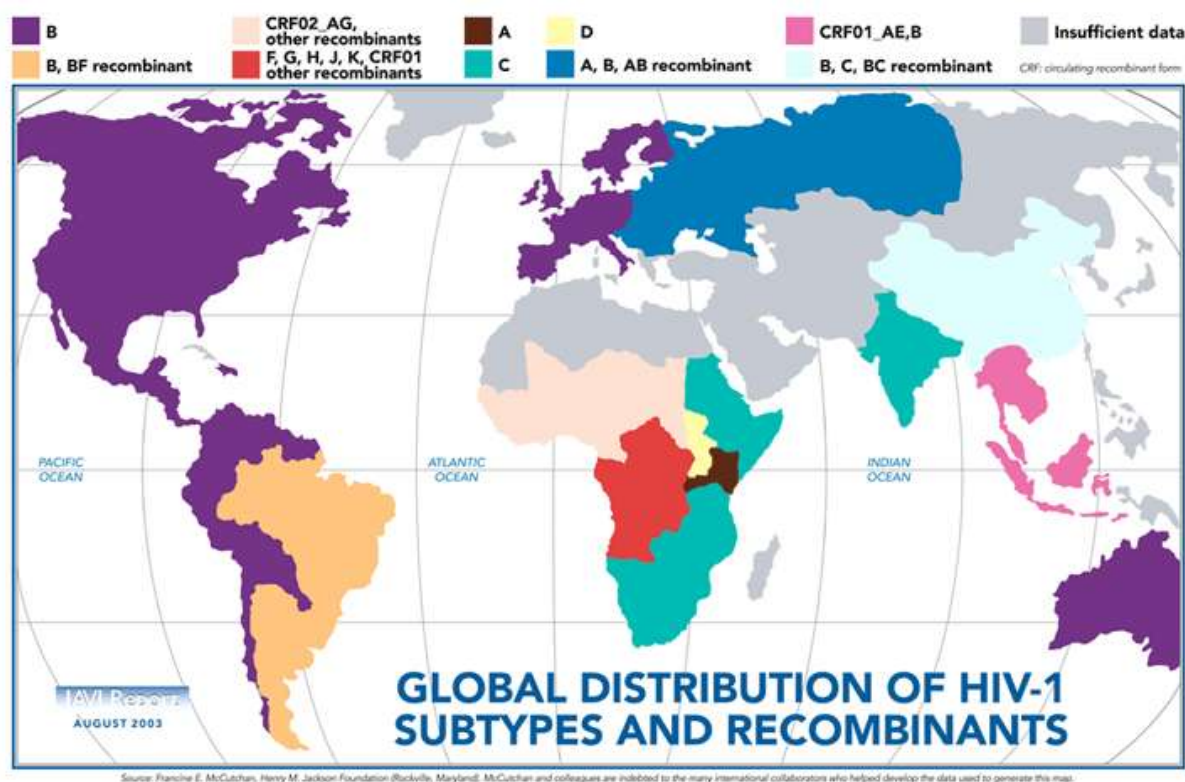


Figura 2 – Mapa global de distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1. Extraída do portal IAVI Report – International AIDS Vaccine Initiative (<http://www.iavireport.org>)

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 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).

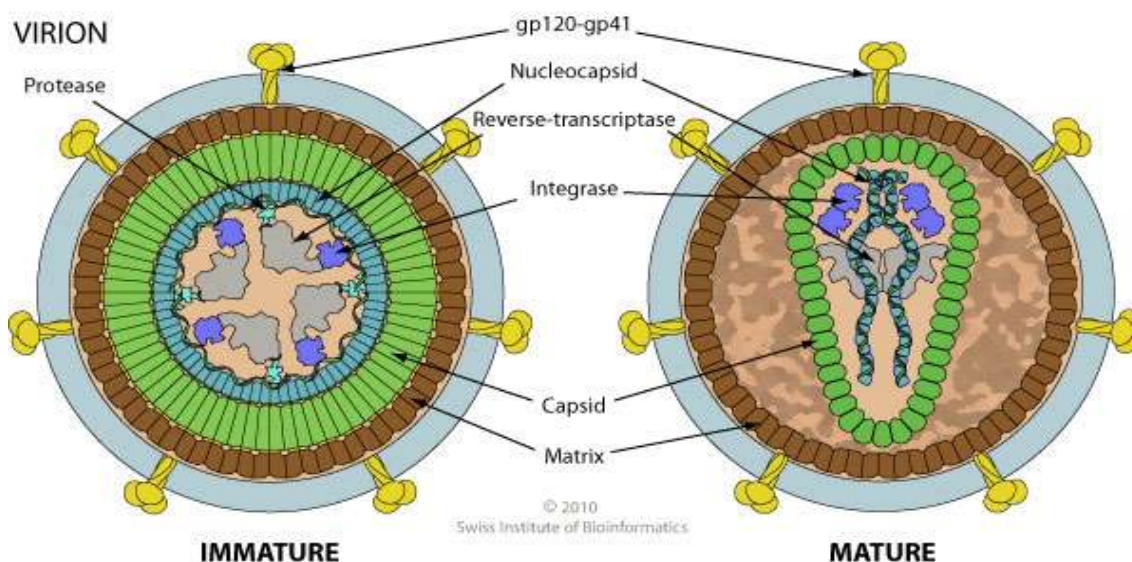


Figura 3 - Estrutura do vírion do HIV-1. Extraída do Portal ViralZone do SIB Swiss Institute of Bioinformatics (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/7.html) em outubro de 2013.

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 as 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 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 4).

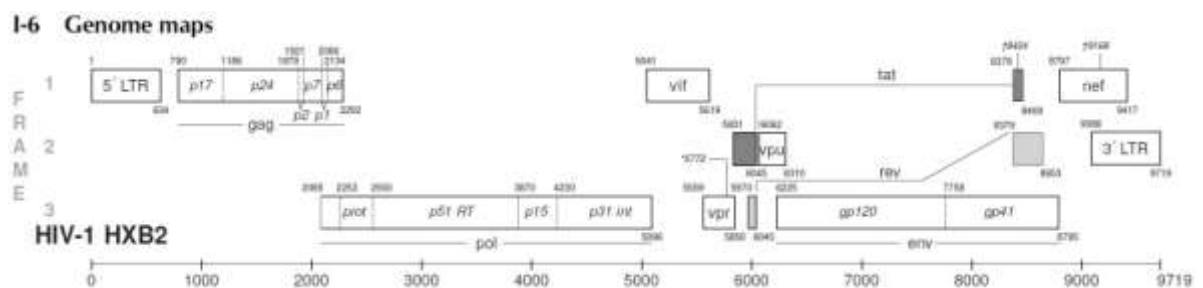


Figura 4 - Representação esquemática da organização genômica do HIV-1.
 Extraída do portal HIV Databases (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2011/frontmatter.pdf>)

1.1.3 Ciclo replicativo e a infecção do 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 mudança conformacional ainda mais profunda 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 vai transcrever 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 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).

O provírus pode permanecer silencioso durante a fase latente da infecção. Para ser ativado, o pró-vírus necessita do auxílio de certos fatores de transcrição da célula, o mais importante é o NF- κ B, que se é regulado positivamente em células ativadas. Esse fator se liga a 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 regula 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 5).

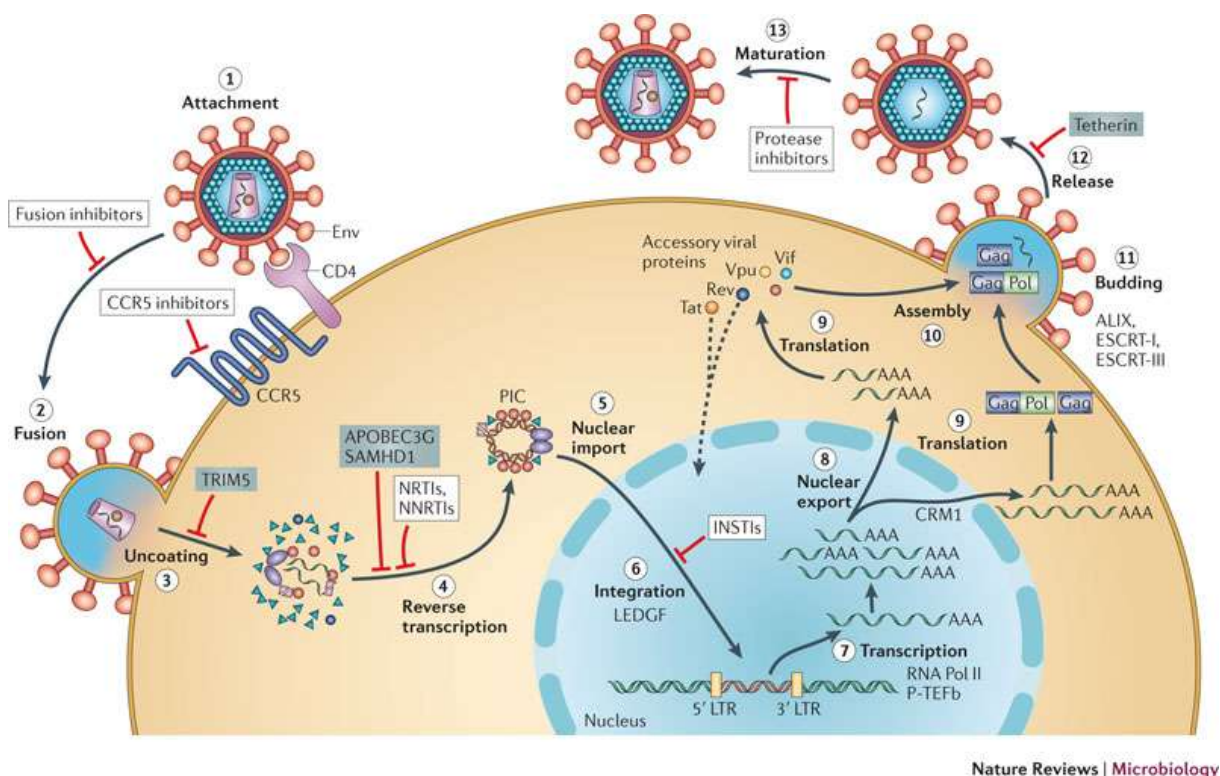


Figura 5 – Ciclo replicativo do HIV-1. Extraído de Alan Engelman & Peter Cherepanov, 2012 – Nature Reviews Microbiology.

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 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).

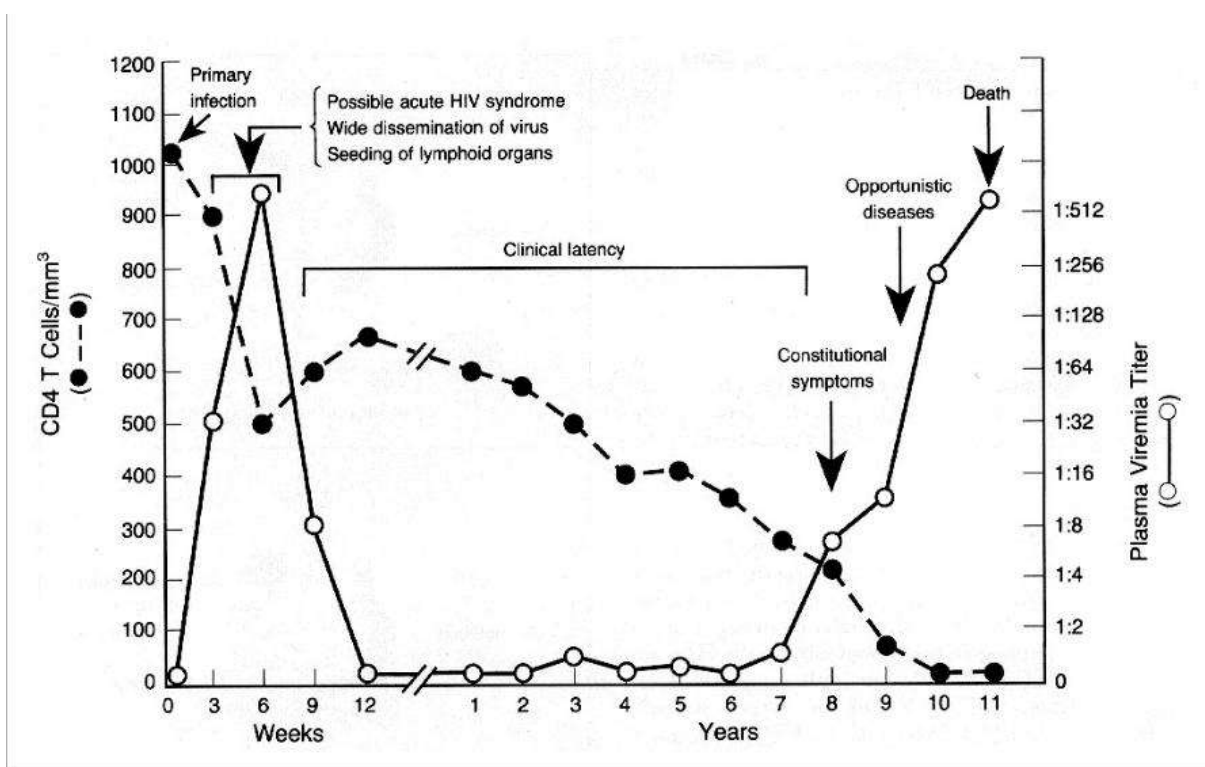


Figura 6 - Curso clínico típico da infecção pelo HIV-1. Extraído de Pantaleo G, 1993 – New England Journal of Medicine.

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 severa depleção de células T CD4⁺ no tecido linfóide associado a 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 consequente 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, *náive* 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 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 cefalorraquidiano, 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 a infecção.

1.1.6 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 proteossomas via ubiquitinação (87, 90).

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 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 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 a 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).

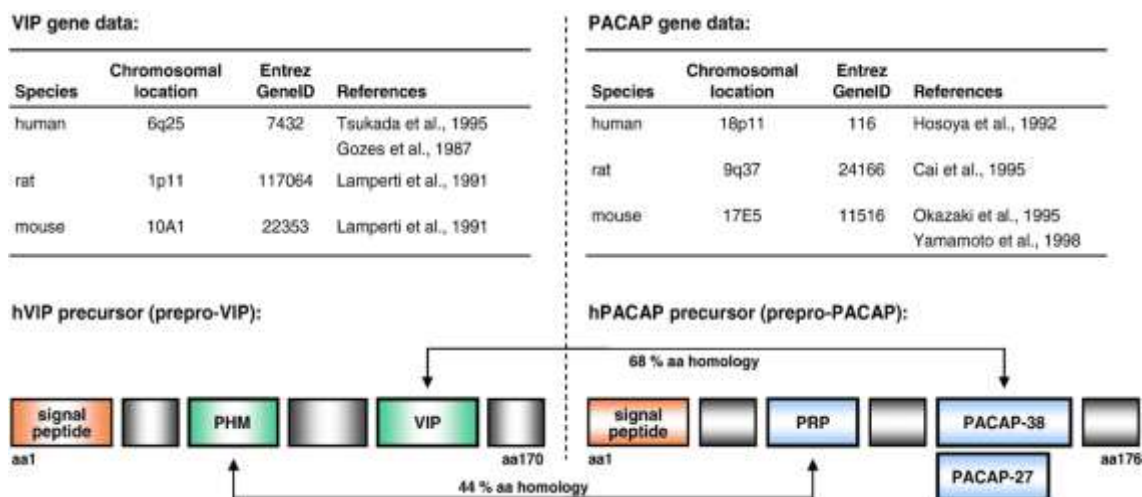


Figura 7 - Gene e peptídeo precursor de VIP e PACAP. Extraída de Dickson L & Finlayson K, 2009 - Pharmacology & Therapeutics.

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). 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 ($G_{\alpha s}$) e Adenilato Ciclase para produção de AMP cíclico e ativação da via de PKA (Figura 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 $G_{\alpha q}$ ou $G_{\alpha i}$, levando ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} 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.

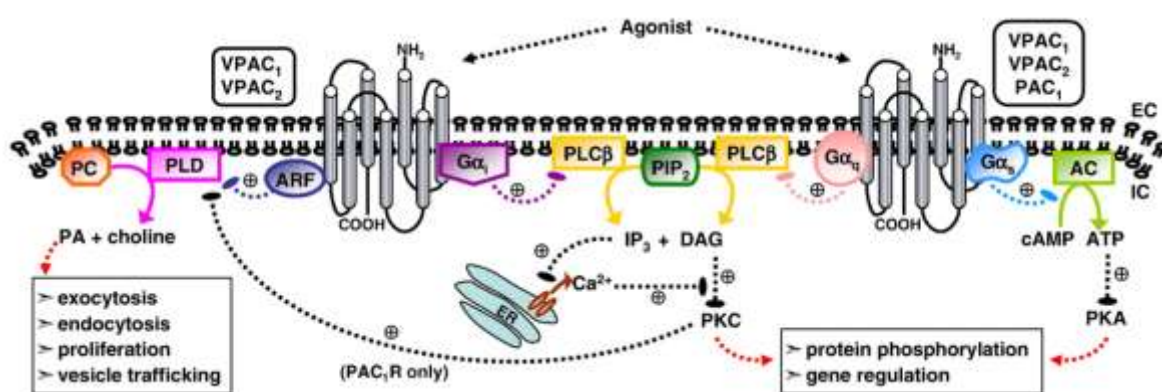


Figura 8 – Sinalização clássica ativada por VIP e PACAP. Extraída de Dickson L & Finlayson K, 2009 - Pharmacology & Therapeutics.

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 (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 (Figura9) (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).

expostos a estímulos inflamatórios passam a expressar também VPAC2 (Figura 9 e 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 9 e 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 9 e 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).

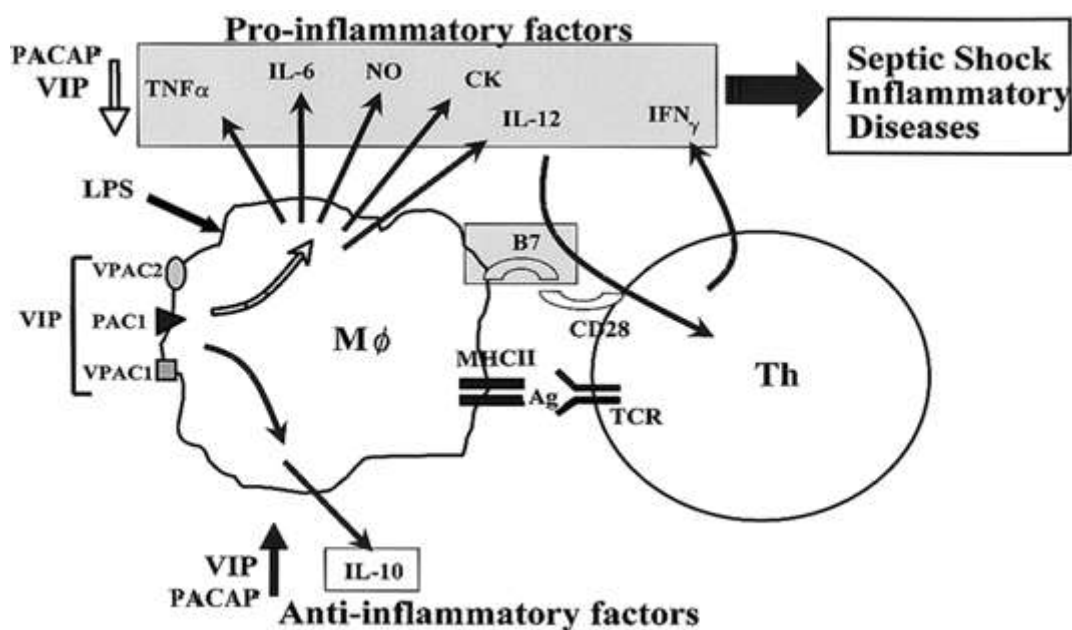


Figura 10 - Efeitos de VIP e PACAP sobre macrófagos ativados. Extraída de Ganea D & Delgado M, 2002.

1.3 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* (160), mas não elucidou 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 (161), 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 mostra-se contrário ao mostrado por Branch (2002), sugerindo que o VPAC1 e VPAC2 desempenham 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.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Os neuropeptídeos VIP e PACAP agem através de receptores acoplados a proteína G (VPAC1, VPAC2 e PAC1), que, no contexto imune, são expressos por macrófagos e células T (140, 150, 162-164). VIP e PACAP participam de uma variedade de funções do sistema imune e uma das suas principais funções imunomodulatórias é atuarem como uma citocina anti-inflamatória. Por conta das características imunomodulatórias VIP e PACAP têm sido apontados como promissores alvos de estratégias terapêuticas em diversas patologias (165).

Em 2002, Branch e colaboradores descreveram que a ativação de VPAC1 com um ligante específico, induz um evento de sinalização que aumenta a replicação do 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* (160), mas não elucidou os mecanismos envolvidos nesta facilitação da infecção do HIV-1 mediada por este receptor.

Outro estudo, realizado por Bokaei e colaboradores (2007), demonstrou que a estimulação de VPAC2 com agonistas específicos, resulta na inibição da integração do HIV-1 ao genoma de linfócitos, inibindo a infecção produtiva do HIV-1, embora sem definir os mecanismos responsáveis pela inibição da integração viral. Este fenômeno mostra-se contrário ao mostrado por Branch (2002), sugerindo que o VPAC1 e VPAC2 desempenham funções opostas.

Estes achados despertam o interesse no 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. Considerando essa questão, nos propusemos a analisar a ação destas moléculas sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos, células quais que expressam os receptores de VIP e PACAP, que são alvos primários do HIV-1, e que durante a infecção constituem um importante reservatório viral no hospedeiro. Assim, neste estudo avaliamos a capacidade inibitória dos neuropeptídeos VIP e PACAP sobre o HIV-1 em macrófagos, com a intenção de descrever o fenômeno e identificar os receptores envolvidos nesta ação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação dos neuropeptídeos VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em macrófagos, focando no entendimento da participação dos receptores VPAC1, VPAC2 e PAC1 nessa ação, e buscando mecanismos que respondam pelo fenômeno.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o perfil de replicação do HIV-1 em macrófagos expostos a diferentes doses de VIP e PACAP.
- Analisar se VIP e PACAP poderiam atuar de forma sinérgica ou aditiva para promover a inibição do HIV-1.
- Definir a contribuição individual dos receptores de VIP e PACAP no fenômeno inibitório da replicação do HIV-1.
- Verificar se VIP e PACAP modulariam a produção de β -quimiocinas e IL-10 em macrófagos e se elas participariam do fenômeno de inibição da replicação do HIV-1 induzido por VIP e PACAP.

4 METODOLOGIA E RESULTADOS

A seção de metodologia e resultados está inserida no artigo anexado “Macrophage Resistance to HIV-1 Infection Is Enhanced by the Neuropeptides VIP and PACAP”, cujo conteúdo representa os objetivos citados na seção anterior dessa dissertação, a exceção de um resultado obtido após a publicação deste artigo. O resultado citado está descrito na sub-seção 4.1, sob o título “Efeito individual e associado de VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em função do tempo de tratamento”.

Referência completa do artigo anexado:

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.

4.1 Efeito individual e associado de VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em função do tempo de tratamento

Considerando que a concentração de 10 nM de VIP e PACAP isolados promove a inibição da replicação do HIV-1 em macrófagos, e que a combinação de ambos em doses que quando isolados eram não-funcionais (1 nM), promove o mesmo efeito inibitório, nos perguntamos se poderíamos reproduzir a inibição da replicação do HIV-1 com essas doses não-funcionais isoladas utilizando um protocolo de tratamento consecutivo; e se, com o mesmo protocolo, poderíamos também observar uma maior inibição quando utilizando a concentração ótima de VIP e PACAP (10 nM). Com base nessa hipótese, expusemos culturas de macrófagos infectados pelo HIV-1 aos neuropeptídeos VIP e PACAP combinados e isolados, nas suas doses ótimas e nas suas doses não-funcionais, para avaliar a inibição da replicação do HIV-1; comparando o tratamento único e um protocolo de tratamento repetido em dias não-consecutivos. Para melhor compreensão dos resultados, calculamos a área sob as curvas de replicação oriundas das variáveis de tratamento (método descrito em Temerozo *et al*, 2013, anexado a dissertação). Como mostra a Figura 11C, o protocolo de tratamento com três exposições dos macrófagos aos neuropeptídeos (isolados, e na dose inicialmente não-funcional de 1 nM), resultou na inibição da replicação do HIV-1 após 15 dias de infecção, quando comparado com o tratamento em tempo único e de forma comparável com o tratamento padrão de 10 nM e o tratamento combinado (ambos neuropeptídeos, 1 nM cada) no mesmo protocolo. Em relação a possível ampliação do efeito inibitório de VIP e PACAP quando em 10 nM e submetidos a esse protocolo de tratamento, não observamos incremento na ação sobre o HIV-1, como também pode ser observado na Figura 11C. Assim, evidenciamos que a inibição da replicação do HIV-1 pelos neuropeptídeos VIP e PACAP pode ser obtida com o uso isolado dos mesmos em doses baixas; e que, no que tange ao nosso modelo, existe a princípio, um platô máximo para a inibição da replicação do HIV-1 obtida com o uso de VIP e PACAP.

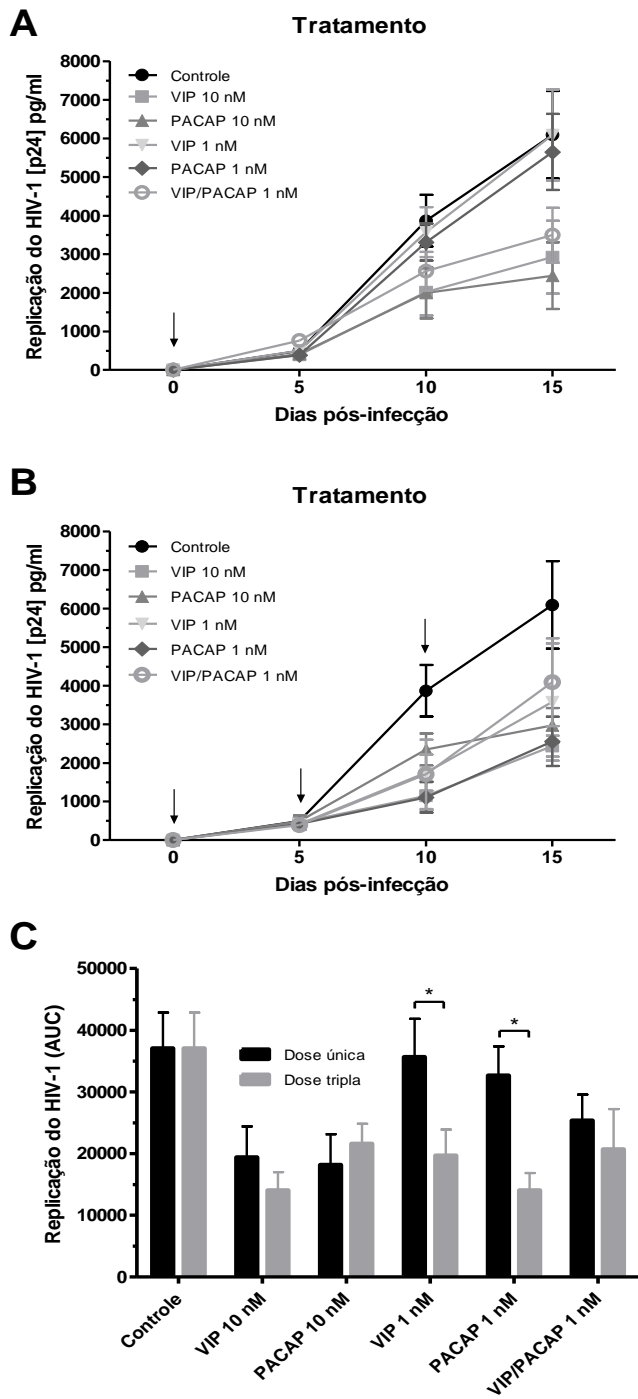


Figura 11 - Efeito individual e associado de VIP e PACAP sobre a replicação do HIV-1 em função do tempo de tratamento. (A, B, C) Macrófagos foram infectados com o isolado Ba-L (HIV-1 Subtipo B, CCR5 trópico) e tratados com diferentes concentrações de VIP e PACAP no regime de dose única (Figura 10A, dia 0, seta indicativa) ou dose tripla (Figura 10B, dias 0, 5 e 10, seta indicativa). Foram colhidas amostras de sobrenadantes após 5, 10 e 15 dias de infecção, e a replicação viral foi avaliada por ELISA para o antígeno p24 do capsídeo do HIV-1. (n=4) **, p<0.01

Macrophage Resistance to HIV-1 Infection Is Enhanced by the Neuropeptides VIP and PACAP

Jairo R. Temerozo¹, Rafael Joaquim², Eduardo G. Regis¹, Wilson Savino¹, Dumith Chequer Bou-Habib^{1*}

1 Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratory of Microbiology, Central Hospital of Maputo, Maputo, Mozambique

Abstract

It is well established that host factors can modulate HIV-1 replication in macrophages, critical cells in the pathogenesis of HIV-1 infection due to their ability to continuously produce virus. The neuropeptides VIP and PACAP induce well-characterized effects on macrophages through binding to the G protein-coupled receptors VPAC1, VPAC2 and PAC1, but their influence on HIV-1 production by these cells has not been established. Here, we describe that VIP and PACAP reduce macrophage production of HIV-1, acting in a synergistic or additive manner to decrease viral growth. Using receptor antagonists, we detected that the HIV-1 inhibition promoted by VIP is dependent on its ligation to VPAC1/2, whereas PACAP decreases HIV-1 growth via activation of the VPAC1/2 and PAC1 receptors. Specific agonists of VPAC2 or PAC1 decrease macrophage production of HIV-1, whereas sole activation of VPAC1 enhances viral growth. However, the combination of specific agonists mimicking the receptor preference of the natural neuropeptides reproduces the ability of VIP and PACAP to increase macrophage resistance to HIV-1 replication. VIP and PACAP up-regulated macrophage secretion of the β -chemokines CCL3 and CCL5 and the cytokine IL-10, whose neutralization reversed the neuropeptide-induced inhibition of HIV-1 replication. Our results suggest that VIP and PACAP and the receptors VPAC2 and PAC1 could be used as targets for developing alternative therapeutic strategies for HIV-1 infection.

Citation: Temerozo JR, Joaquim R, Regis EG, Savino W, Bou-Habib DC (2013) Macrophage Resistance to HIV-1 Infection Is Enhanced by the Neuropeptides VIP and PACAP. *PLoS ONE* 8(6): e67701. doi:10.1371/journal.pone.0067701

Editor: Jialin Charles Zheng, University of Nebraska Medical Center, United States of America

Received: December 6, 2012; **Accepted:** May 22, 2013; **Published:** June 20, 2013

Copyright: © 2013 Temerozo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant # 475958/2011-0) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj; grant # E-26/102755/2008). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: dumith@ioc.fiocruz.br

Introduction

The neuropeptides Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Pituitary Adenylate Cyclase-activating Peptide (PACAP) belong to the secretin/glucagon family of peptides and were initially discovered due to their vasodilatation properties on the gastrointestinal tract and ability to activate rat pituitary adenylate cyclase, respectively [1,2]. VIP and PACAP present a 68% homology in their amino acid sequences, and share many biological properties [3,4] through their interaction with the G protein-coupled receptors VPAC1, VPAC2 and PAC1. PACAP binds to all three receptors, with higher affinity to PAC1, while VIP interacts preferentially with VPAC1 and VPAC2 [5–8]. VIP and PACAP are produced by Th2 CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and their receptors are expressed by a variety of cell types, including T cells, macrophages and dendritic cells [4].

VIP and PACAP have well-characterized effects on the immune system and anti-inflammatory properties, including inhibition of macrophage adherence and down-regulation of inflammatory cytokines and reactive oxygen species [9,10–14]. Moreover, they can induce production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [12,14]. Due to their immunomodulatory properties, both neuropeptides have been considered as promising therapeutic agents for a range of pathologies [15–17].

Macrophages play a central role in the pathogenesis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection due to their ability to resist HIV-1-mediated cytopathic effects and to

continuously produce virus even in the presence of antiretrovirals [18–20]. They function as an HIV-1 reservoir and contribute in HIV-1 transmission to CD4⁺ T cells and virus propagation in lymphoid tissues [21,22]. Considering that HIV-1 replication in macrophages can be modulated by a variety of inflammatory mediators and cytokines [23–25], identifying factors that influence HIV-1 growth in these cells is essential to understand the immunopathogenesis of HIV-1 infection and to design novel strategies to control HIV-1 propagation. We recently reported that the neuroimmunomodulatory molecule Nerve Growth Factor (NGF) stimulates HIV-1 replication in primary monocyte-derived macrophages [26], and we now address whether the immunosuppressive neuropeptides VIP and PACAP, which also regulate the functioning of the neuro-immune-endocrine system, could also affect HIV-1 production in those cells.

Few studies have addressed the biological effects of VIP and PACAP during HIV-1 infection, which have mainly focused on the repercussion of VIP and PACAP receptor ligation on HIV-1 production, describing that VPAC1 facilitates productive HIV-1 infection in CD4⁺ T cell lines [27], and that VPAC2 stimulation diminishes HIV-1 production in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in CD4⁺ T cell lines [28]. These findings suggest that the sole activation of VPAC1 or VPAC2 receptors can lead to opposite effects on HIV-1 replication, but the consequence of the simultaneous ligation of these receptors and PAC1 by their natural ligands on viral production is unknown. Therefore, because the existent data regarding the influence of VIP and

PACAP receptors on HIV-1 infection were obtained in T cells using selective receptor agonists, we analyzed whether these neuropeptides could directly modulate the viral production in HIV-1-infected monocyte-derived macrophages, a possibility that has not been pursued thus far. We found that VIP and PACAP increased macrophage resistance to HIV-1 replication by inducing the synthesis of β -chemokines and IL-10 following preferential activation of the receptors VPAC2 and PAC1.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experimental procedures involving human cells were performed with samples obtained after written informed consent and were approved by the Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation/Fiocruz (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) under the number 397-07.

HIV-1 isolates and reagents

The CCR5-dependent isolate HIV-1_{Ba-L} was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program (NIH, Bethesda, MD). The neuropeptides VIP and PACAP and the VIP antagonist, which blocks both the VPAC1 and VPAC2 receptors, were from Anaspec (USA). The recombinant protein Maxadilan (PAC1 agonist) and its truncated form Maxadilan Δ 65 (M65; PAC1 antagonist) were kindly donated by Dr. Ethan A. Lerner (Department of Dermatology, Massachusetts General Hospital, MA, USA). The VPAC1 and VPAC2 agonists Ala^{11,22,28}-VIP and Bay 55-9837, respectively, were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK). The neutralizing antibodies to CCL3, CCL4 and CCL5 and to the IL-10 receptor were obtained from Peptotech (NJ, USA) and Abcam (MA, USA), respectively. The endotoxin levels in the VIP and PACAP preparations were below the lower limit of detection (0.1 EU/mL), as measured by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay (Lonza).

Cells

Human monocyte-derived macrophages were obtained from PBMCs that had been isolated by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Premium 1.077; GE Healthcare Biosciences, PA, USA) from buffy coat preparations of blood from healthy donors, through adherence onto plastic plates. Briefly, $1.5 - 2.0 \times 10^6$ PBMCs were plated onto 48-well plates (Corning, MA, USA) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; LGC Bio, SP, Brazil) containing 10% normal human serum (EMD Millipore, MA, USA) and penicillin-streptomycin (LGC Bio, SP, Brazil). Cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ for 6–7 days for monocyte differentiation into macrophages. Non-adherent cells were washed out, and the remaining macrophage layer was maintained in DMEM with 5% human serum. Macrophage purity was > 90%, as determined by flow cytometry (FACScan; Becton Dickinson, NJ, USA) analysis using anti-CD3 (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA) and anti-CD68 (Southern Biotech, AL, USA) monoclonal antibodies.

Macrophage production of β -chemokines and IL-10

Uninfected macrophages were treated with VIP or PACAP (10 nM), and concentrations of the β -chemokines CCL3 and CCL5 and of the cytokine IL-10 in the culture supernatants were measured using specific ELISA kits (R&D Systems, MN, USA, and eBioscience Inc, CA, USA, respectively). The results are shown as mass/volume and also by the area under curve (AUC) transformation, which allows a global analysis of the induced production of the mediators.

HIV-1 infection

Macrophages were exposed for 16–18 h to viral suspensions containing 5–10 ng/mL of HIV-1 p24 antigen, as previously described [29]. The infected cells were then washed, replenished with fresh medium and maintained under standard culture conditions. HIV-1 replication was evaluated in cell culture supernatants after 12–14 days using an ELISA kit for HIV-1 p24 antigen (ZeptoMetrix Corp, NY, USA). Due to the common donor-to-donor variation of HIV-1 replication in primary cells [30], some HIV-1 inhibition results are presented normalized to viral production by macrophages maintained only in culture medium, with the absolute values shown in the legend of the figure.

Effect of VIP and PACAP on HIV-1 replication

HIV-1-infected macrophages were treated either with VIP or PACAP immediately after cell infection, and viral production was measured as described above. After establishing that VIP and PACAP decreased viral replication, we addressed the relative contributions of the VIP and PACAP receptors using two different approaches. Initially, acutely HIV-1-infected cells were exposed to receptor antagonists for 15 min followed by the addition of VIP and PACAP to cell preparations. In later experiments, infected macrophages were treated with specific pharmacological agonists of the VIP and PACAP receptors (as listed above). In another set of experiments, HIV-1-infected macrophages were treated with either neuropeptide five days after infection together with neutralizing antibodies to the IL-10 receptor (1 μ g/mL) or to the β -chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 (1 μ g/mL each). HIV-1 replication was evaluated as previously described.

Statistical Analysis

All results presented in this study were prepared using GraphPad Prism 5.0 software (CA, USA). Statistical analysis calculation was performed using one-way ANOVA and the Tukey-Kramer tests. The results are shown as the mean \pm SEM (standard error of the mean), and the comparisons between values were considered significantly different when the *p* value was less than 0.05 (*p* \leq .05 = *; *p* \leq .01 = **; *p* \leq .001 = ***).

Results

VIP and PACAP treatment inhibited HIV-1 production in macrophages

Because activation of the receptors VPAC1 and VPAC2 has previously resulted in opposite effects during HIV-1 infection [27,28], we initially investigated whether the neuropeptides VIP and PACAP, the natural ligands of those receptors, would also affect HIV-1 replication. To test this hypothesis, HIV-1-infected monocyte-derived macrophages were treated with VIP or PACAP. We first observed that both neuropeptides induced a significant reduction in virus replication (Fig. 1). VIP and PACAP were each individually able to decrease HIV-1 replication, achieving 33% and 38% of viral inhibition at 5 nM and 62% and 58% at 10 nM concentrations for VIP and PACAP, respectively. These results suggest that both neuropeptides were similarly effective in their ability to reduce HIV-1 production in macrophages. Higher concentrations of VIP or PACAP did not inhibit virus production and actually enhanced it (VIP at 100 nM), possibly due to receptor desensitization or an inverse agonist effect, as discussed later. Therefore, the next experiments were performed using the optimal inhibitory concentration of 10 nM for both neuropeptides.

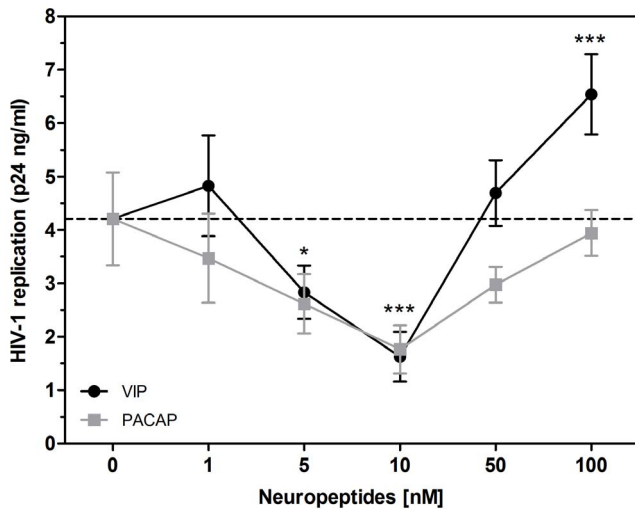


Figure 1. VIP and PACAP inhibit HIV-1 replication. Macrophages were infected with an R5-tropic HIV-1 isolate (Ba-L) and treated once with different concentrations of the neuropeptides, as indicated. Virus replication was measured in the culture supernatants by an HIV-1 p24 ELISA 12–14 days after infection. Data represent means \pm SEM of five independent experiments for each peptide. * $p \leq .05$; *** $p \leq .001$. doi:10.1371/journal.pone.0067701.g001

VIP and PACAP present synergistic and additive effects on HIV-1 inhibition

As VIP and PACAP share receptors, we analyzed whether these neuropeptides could cooperatively modulate HIV-1 replication by exposing infected macrophages to combinations of sub-optimal or optimal viral inhibitory concentrations of VIP and PACAP. Combinations of 1 nM and 5 nM significantly potentiated inhibition relative to their individual activities, while no increment of HIV-1 inhibition occurred when both peptides were combined at a concentration of 10 nM (Fig. 2). To accurately classify the nature of this finding, we calculated the interaction coefficient of VIP and PACAP at those concentrations by dividing the inhibition percentages found when the peptides were associated by the sum of the inhibition of each isolated peptide (Fig. 2D; an interaction coefficient on the order of 1 indicates an additive phenomenon, whereas values greater than 1 indicate a synergistic effect). Therefore, VIP and PACAP synergize at 1 nM and act in an additive manner on viral production at 5 nM. These results suggest that combinations of small concentrations of VIP and PACAP could result in potent pharmacological activity, which could be physiologically relevant in situations where both peptides are simultaneously present in the tissue microenvironment.

Receptor engagement in the VIP and PACAP modulation of HIV-1 replication

Because VIP preferentially activates the VPAC1 and VPAC2 receptors and PACAP binds the three receptors with high affinity [5–8], we analyzed the neuropeptide dependence of these receptors to inhibit HIV-1 production using two distinct assays. Initially, we added specific antagonists of PAC1 or VPAC1/2 to HIV-1-infected cells before treating them with VIP or PACAP. As shown in Fig 3A, VIP-induced HIV-1 inhibition is largely dependent on VPAC1/2, since blockade of both receptors abrogated the VIP-mediated inhibition of HIV-1 production with no significant changes following PAC1 blockade. We also observed that PACAP could inhibit HIV-1 replication via activation of all three receptors, as its ability to decrease viral growth was

maintained when VPAC1/2 or PAC1 was antagonized separately but was abolished when all three receptors were blocked together (Fig 3B).

We further studied the role of the individual receptors in the VIP- and PACAP-mediated regulation of HIV-1 replication by using specific agonists to VPAC1, VPAC2 and PAC1 (ALA-VIP, Bay 55 and Maxadilan, respectively). We found that the VPAC1 agonist at 5 nM increased HIV-1 production by 48%, whereas the VPAC2 agonist at 5 nM and 10 nM reduced viral growth by 31% and 35%, respectively. The PAC1 agonist at 5 nM and 10 nM decreased HIV-1 replication by 56% and 46%, respectively (Fig 4). Of note, the optimal concentrations of the receptor agonists that significantly modulated viral production were similar to those of the natural receptor ligands VIP and PACAP.

Due to the opposing effects of VPAC1 and VPAC2 or PAC1 engagement, we analyzed the outcome of agonist combinations on viral production. For these assays we used the agonists at sub-optimal concentrations to allow for comparison with non-saturating doses of the natural ligands VIP and PACAP. Combination treatment with VPAC1 and VPAC2 agonists decreased HIV-1 replication by 48%, similar to the effect observed with sub-optimal doses of VIP. Their combined usage with a PAC1 agonist reduced viral growth by 68%, similar to the additive effects observed during co-treatment with VIP and PACAP (Fig. 5). These results showed that combination treatment with agonists of the different receptors mimicked the receptor preference of both natural peptides in reproducing the individual or additive effects of VIP and PACAP treatment on HIV-1 replication. Of note, simultaneous activation of VPAC1 and PAC1 slightly increased HIV-1 replication, whereas binding of VPAC2 plus PAC1 did not change HIV-1 replication (data not shown). In conclusion, VIP depended on the ligation of VPAC1/2 to increase macrophage resistance to HIV-1 growth, and PACAP promoted the same phenomenon either by activating PAC1 only or through activating VPAC1/2 plus PAC1.

VIP and PACAP increase β -chemokine production by macrophages

VIP and PACAP can induce the production of the β -chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 in microglial cells, an effect associated with the prevention of HIV-1 gp120-induced apoptosis [31,32]. Because β -chemokines are potent inhibitors of HIV-1 infection [33,34], we evaluated whether VIP and PACAP could also induce macrophage secretion of these molecules. Indeed, both neuropeptides enhanced macrophage release of CCL3 and CCL5, with CCL3 production peaking 96 h after stimulation with either peptide (Fig. S1A) and the maximum production of CCL5 occurring 24 h and 48 h after VIP or PACAP stimulation, respectively (Fig. S1B). VIP and PACAP more than doubled CCL3 and CCL5 production relative to untreated cells based on measuring chemokine production by the area under the curve (AUC) (Figs. 6A and 6B). Moreover, because the differences in chemokine production induced by VIP or PACAP were not significantly different (based on AUC), we can postulate that the ability of either peptide to induce chemokine production is similar.

VIP and PACAP increase IL-10 production by macrophages

The immunomodulatory activities of VIP and PACAP are at least partially dependent of IL-10 [9], an anti-inflammatory cytokine able to inhibit the HIV-1 replication [35,36]. We also detected that VIP and PACAP increase macrophage production of IL-10 (Fig. S1C), which peaked 48 h after the stimuli. Based on

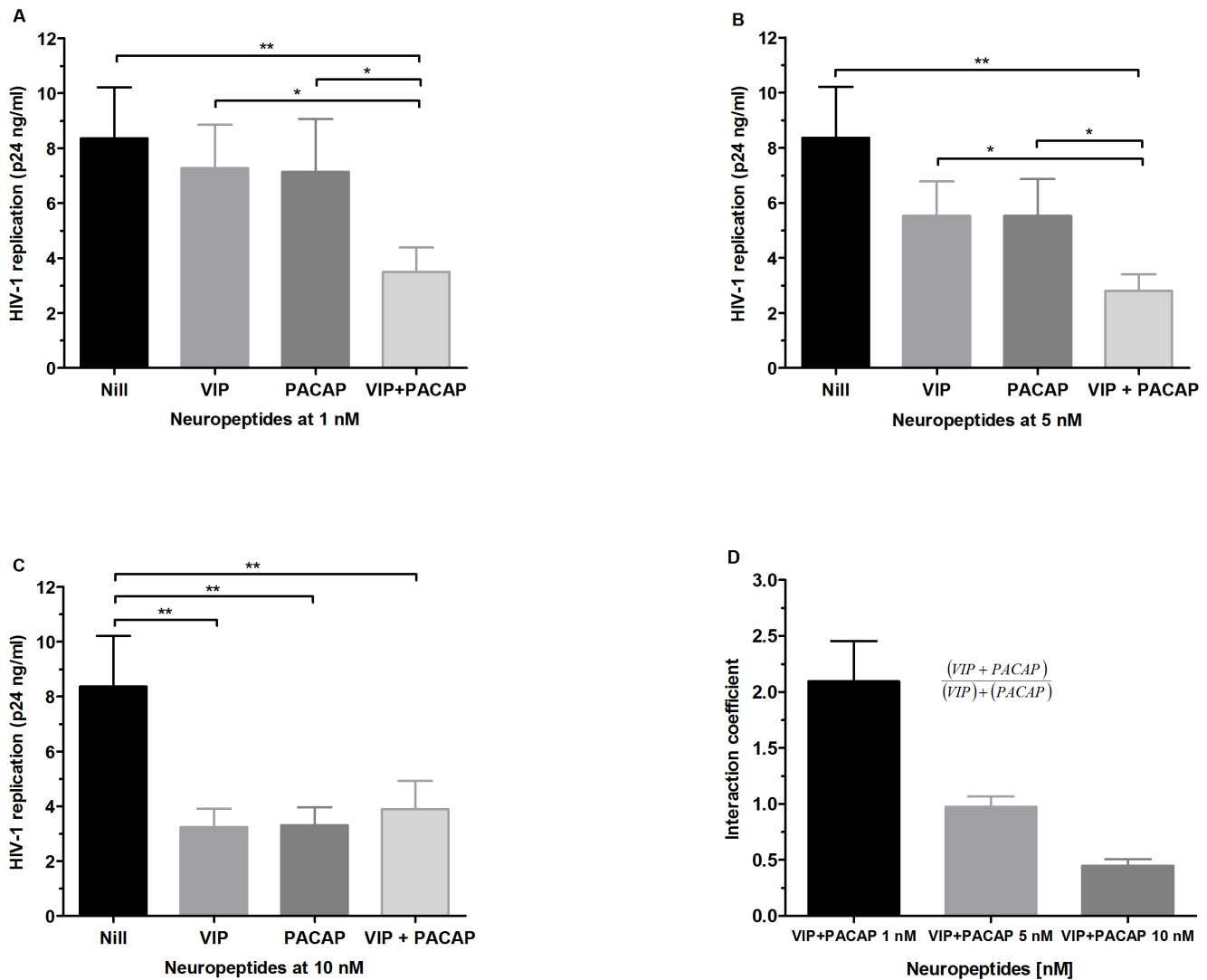


Figure 2. Effects of combined VIP and PACAP treatment on HIV replication. HIV-1-infected macrophages were simultaneously treated with 1 nM, 5 nM or 10 nM of VIP and PACAP (A, B and C, respectively), and virus replication was measured as above. Data represent means \pm SEM of three independent experiments. (D) Equation used to calculate the interaction coefficient of VIP and PACAP at the indicated concentrations, based on the levels of HIV-1 inhibition shown in A, B and C. * $p \leq .05$; ** $p \leq .01$; *** $p \leq .001$. doi:10.1371/journal.pone.0067701.g002

AUC analyses (Fig. 6C), VIP treatment doubled IL-10 production, whereas PACAP treatment tripled macrophage release of this cytokine.

Contribution of β -chemokines and IL-10 to the VIP- and PACAP- mediated inhibition of HIV-1 replication

We next evaluated whether these mediators were implicated in the ability of VIP and PACAP to reduce HIV-1 growth by adding the neuropeptides to infected macrophages together with neutralizing antibodies to CCL3, CCL4 and CCL5, or to the IL-10 receptor. This experiment was conducted five days after infection because this is the approximate time when the infection becomes productive, thus allowing the antibodies to neutralize the anti-HIV-1 effector molecules when new rounds of infections were occurring. Indeed, neutralization of those three β -chemokines and blocking of the IL-10 receptor significantly reduced the inhibitory effects of VIP and PACAP on HIV-1 replication (Fig. 7), showing

that CCL3, CCL4 and CCL5 and IL-10 are implicated in neuropeptide-mediated inhibition of HIV-1 growth.

Discussion

VIP and PACAP are pleiotropic factors associated with a number of physiological processes, such as endocrine, metabolic and gastrointestinal effects, also including modulatory effects on the immune system. The receptors for VIP and PACAP, the G coupled-receptors VPAC1, VPAC2 and PAC1, are widely distributed, a feature that allows VIP and PACAP to exert their large range of effects. Here, we show that VIP and PACAP treatment increased resistance to HIV-1 replication in primary macrophages by inducing the production of the β -chemokines CCL3 and CCL5 and the cytokine IL-10, molecules that are able to reduce HIV-1 growth in vitro. Our study focused, for the first time, on the ability of the natural peptides VIP and PACAP to modulate HIV-1 infection in a primary target cell, in addition to defining the relative contribution of each of their receptors to this

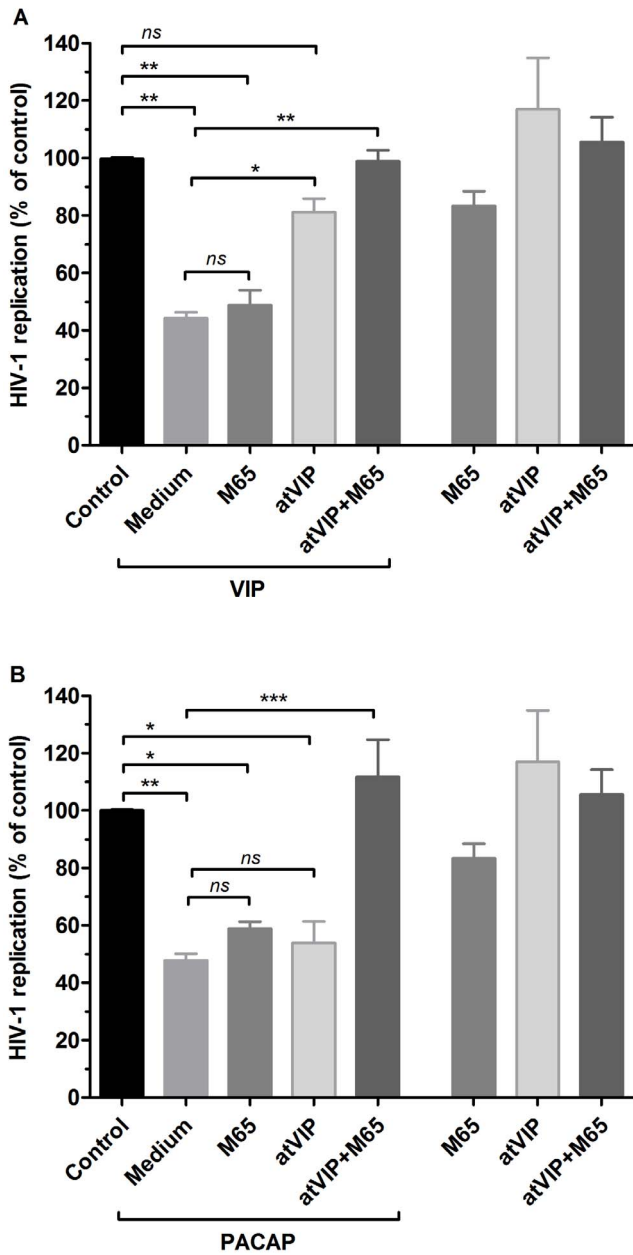


Figure 3. Contribution of VIP and PACAP receptors for the neuropeptide-induced inhibition of HIV-1 replication. Macrophages were infected with an R5-tropic HIV-1 isolate (Ba-L) and treated with culture medium (*Medium*) or with an antagonist of PAC1 (*M65*, 50 nM), VPAC1 and VPAC2 (*atVIP*, 100 nM) or with both antagonists (*M65+atVIP*) 15 minutes before the addition of VIP (A) or PACAP (B) at 10 nM. Viral replication was measured in the culture supernatants using an HIV-1 p24 ELISA 12-14 days after infection. Data represent means \pm SEM of five independent experiments. Virus production in the positive control (HIV-1-infected cells cultured only with medium): 5.8 ± 1.9 ng/mL p24 Ag. The three bars on the right show the virus replication by macrophages exposed only to the antagonists. * $p \leq .05$; ** $p \leq .01$; *** $p \leq .001$. doi:10.1371/journal.pone.0067701.g003

phenomenon. These findings have clear implications in the understanding of the role of VIP and PACAP in the pathogenesis of HIV-1 infection.

Treating HIV-1-infected macrophages with these naturally occurring neuropeptides diminished viral production, and treat-

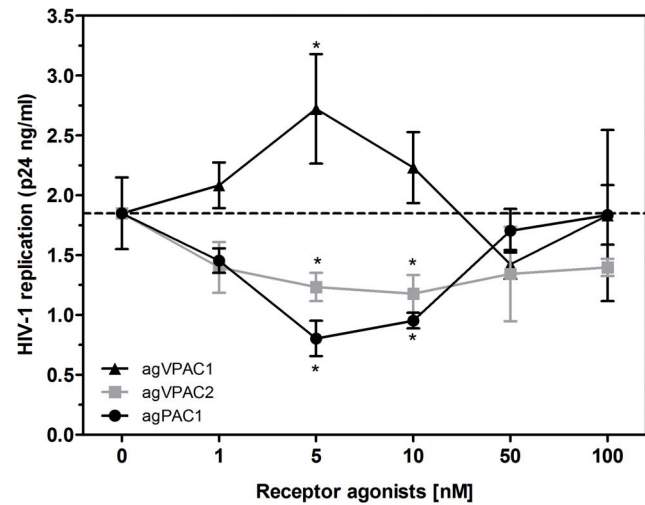


Figure 4. Specific activity of VIP and PACAP receptors on HIV-1 replication. Macrophages were infected with an R5-tropic HIV-1 isolate (Ba-L) and treated once with different concentrations of agonists for the VPAC1 (*agVPAC1*), VPAC2 (*agVPAC2*) or PAC1 (*agPAC1*) receptors, as indicated, and viral replication was measured in the culture supernatants using an HIV-1 p24 ELISA 12-14 days after infection. Data represent means \pm SEM of four independent experiments. * $p \leq .05$. doi:10.1371/journal.pone.0067701.g004

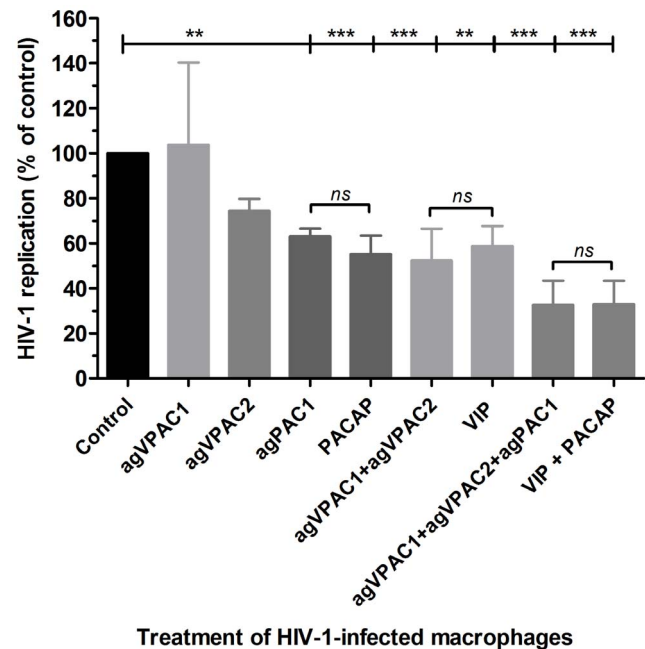


Figure 5. Combined use of receptor agonists reproduces VIP and PACAP effects on HIV-1 replication. Macrophages were infected with an R5-tropic HIV-1 isolate (Ba-L) and treated with agonists for the VPAC1 (*agVPAC1* 2.5 nM), VPAC2 (*agVPAC2* 2.5 nM) or PAC1 (*agPAC1*, 5 nM) receptors or with VIP (5 nM) and PACAP (5 nM), either alone or in combination, as indicated. Viral replication was measured in the culture supernatants using an HIV-1 p24 ELISA 12-14 days after infection. Viral production in the positive control (HIV-1-infected cells cultured only with medium): 3.0 ± 0.8 ng/mL p24 Ag. ** $p \leq .01$; *** $p \leq .001$. doi:10.1371/journal.pone.0067701.g005

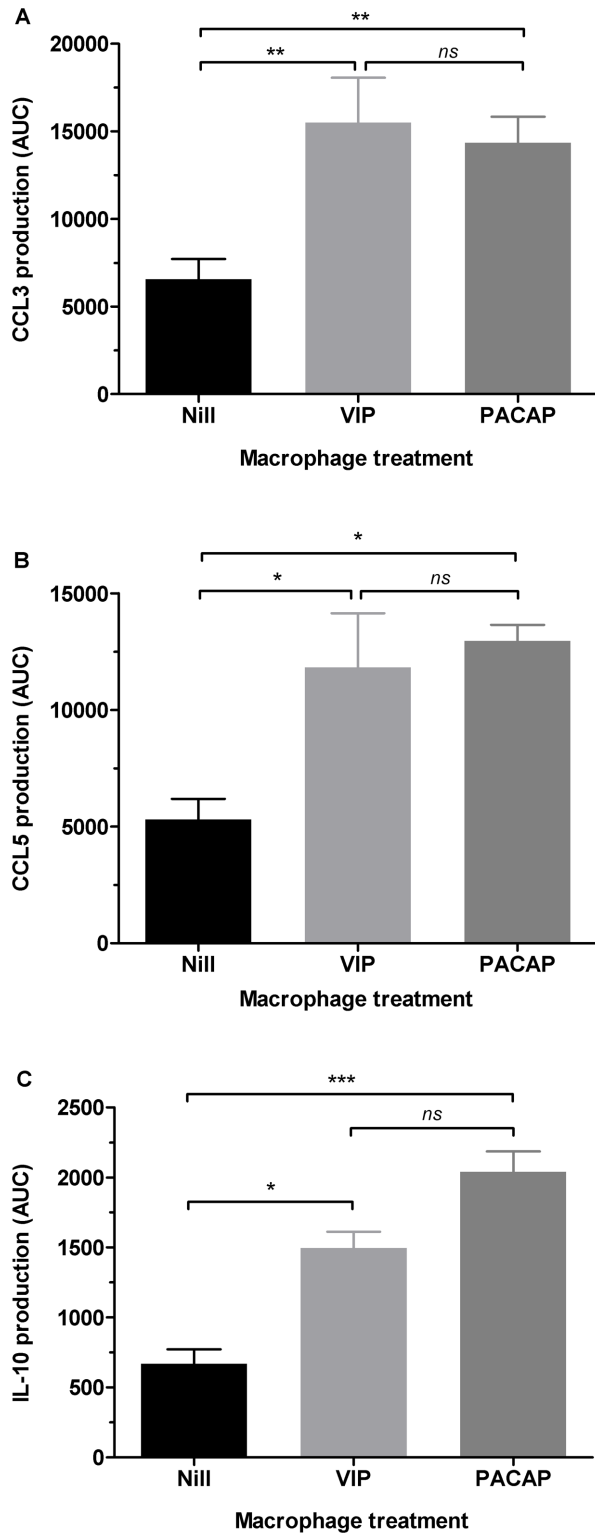


Figure 6. VIP and PACAP induce CCL3, CCL5 and IL-10 production in macrophages. Figure shows the production of CCL3 (A), CCL5 (B) and IL-10 (C) by area under the curve (AUC) analysis, which was calculated based on the respective concentrations measured by ELISA (See Figure S1). Data represent means \pm SEM of six (CCL3) and four (CCL5 and IL10) independent experiments. * $p \leq .05$; ** $p \leq .01$; *** $p \leq .001$. doi:10.1371/journal.pone.0067701.g006

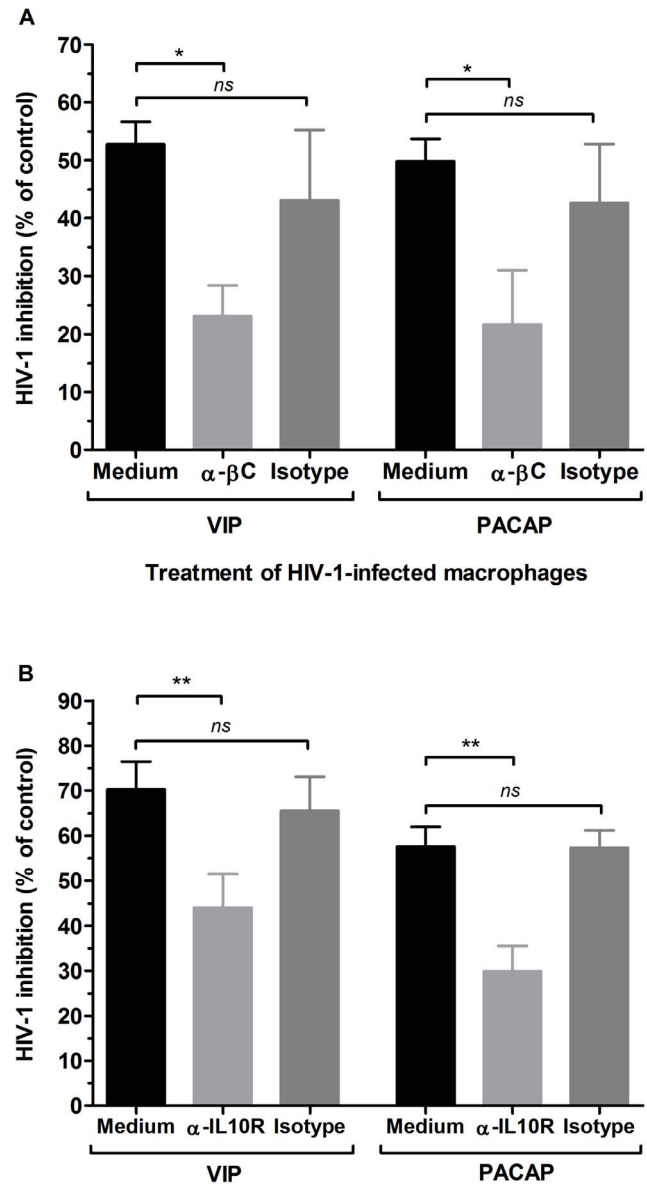


Figure 7. β -chemokines and IL-10 are implicated in the VIP- and PACAP-induced inhibition of HIV-1 replication. Macrophages were infected with an R5-tropic HIV-1 isolate (Ba-L), and after 5 days, were treated with VIP or PACAP plus anti-CCL3, CCL4 and CCL5 antibodies (α - β C) (A), anti-IL-10 receptor antibodies (α -IL10R), or isotype control antibodies. Viral replication was measured in the culture supernatants using an HIV-1 p24 ELISA 12–14 days after infection. Data represent means \pm SEM of five (A) or four (B) independent experiments. Virus production in the positive control (HIV-1-infected cells cultured only with medium): (A) 14.8 ± 9.0 ng/mL and (B) 14.5 ± 7.0 ng/mL p24 Ag. * $p \leq .05$; ** $p \leq .01$. doi:10.1371/journal.pone.0067701.g007

ment with specific agonists of the neuropeptide receptors VPAC2 and PAC1 showed similar effects. The inhibitory effect on viral replication was not dose-dependent within the range of tested concentrations of VIP and PACAP between 1 nM and 100 nM, with the optimal inhibitory concentration at 10 nM for both peptides. The finding that VIP treatment at a concentration 5-fold that of the optimal HIV-1 inhibitory concentration and PACAP treatment at a 10-fold ratio did not influence viral production may be explained by receptor desensitization. On the other hand, the

observed increase in HIV-1 production induced by 100 nM VIP could be explained by the property of inverse agonism that occurs for some ligands at saturating concentrations, a phenomenon that has already been described for a variety of G-coupled receptor ligands [37]. Alternatively, taking into account that the sole activation of VPAC1 facilitates HIV-1 infection in CD4⁺ T cell lines (27), one could explain the HIV-1 promoting effect by VIP at 100 nM due to a possible preferential engagement of VPAC1 at high VIP concentrations, although it has been described that the affinity of VIP for its receptors VPAC1 and VPAC2 is similar [4–7]. Importantly, the concentration of both neuropeptides that effectively inhibited HIV-1 production (10 nM) also possesses a variety of immunomodulatory roles [38–41], suggesting that the ability of these peptides to influence HIV-1 replication in macrophages is associated with their immunoregulatory activities on these cells.

The ability of VIP and PACAP to down-regulate HIV-1 production became even more evident in light of the experiment testing their additive and synergistic activity on infected macrophages. Both neuropeptides presented an additive effect at 5 nM concentration, and showed potent synergy at 1 nM concentration, and their combined effects at these concentrations were the same as those observed following treatment with each molecule individually at 10 nM concentration (Fig. 2). Furthermore, the addition of sub-optimal concentrations of the receptor agonists to HIV-1-infected macrophages restricted the viral growth in a similar manner to treatment with equivalent doses of VIP and PACAP (Fig. 5). Thus, even taking into account that the activation of the VPAC1 receptor may favor HIV-1 replication, we believe that the concomitant engagement of the three receptors by the native neuropeptides, as presumably occurs in lymphoid tissues, will indeed enhance the macrophage resistance to HIV-1 growth.

VIP promoted HIV-1 inhibition through stimulation of the receptors VPAC1 and VPAC2 but not through stimulation of PAC1. This effect likely occurred due to the high affinity of VIP for VPAC1 and VPAC2 and its low affinity for PAC1. The ability of PACAP to diminish HIV-1 replication, on the other hand, resulted from its ligation of all three receptors because its effect was only abrogated when all three receptors were blocked. Because the PACAP affinity for PAC1 is higher than its affinity for VPAC1 or VPAC2 [8], it is conceivable that it inhibits HIV-1 upon preferential binding to PAC1, but can also exert an inhibitory effect following ligation to VPAC1 and VPAC2 in the absence or hindrance of PAC1, or in a situation of excess PACAP concentration.

We defined the receptors preference for the HIV-1 inhibitory activity of VIP and PACAP using specific receptor agonists. The combination of these molecules not only mimicked the effects of the natural neuropeptides but also established the receptors VPAC2 and PAC1 as HIV-1 inhibitory mediators, and VPAC1 as an enhancer of HIV-1 production. Our findings are in agreement with previous studies that reported that VPAC1 facilitates productive HIV-1 infection in CD4⁺ tumor cell lines [27], and that VPAC2 activation inhibits HIV-1 integration and viral production in CD4⁺ tumor cell lines and PBMCs [28]. In addition, we defined the role of the PAC1 receptor during HIV-1 infection. Therefore, it is reasonable to assume that the simultaneous activation of these receptors by their natural ligands VIP and PACAP results in reduced HIV-1 replication in macrophages, even under conditions in which the receptor VPAC1 is present and activated, and that the HIV-1-enhancing activity of the sole activation of VPAC1 activation is overcome by

the concomitant recruitment of the inhibitory receptors VPAC2 and PAC1.

VIP and PACAP induced macrophage release of CCL3 and CCL5, which contributed to the HIV-1 inhibitory effect elicited by both neuropeptides as evidenced by immunoneutralization of both β -chemokines (and CCL4 as well). VIP and PACAP can inhibit β -chemokine production upon pro-inflammatory induction [40,42], but they are also able to stimulate the production of chemokines in different settings [31,32,43–45], pointing out their ability to regulate the chemokine axis. VIP and PACAP have been suggested to confer a protective role against HIV-1 in the central nervous system through CCL3 and CCL5 production [46], and our results now imply that these neuropeptides can offer a systemic protection against HIV-1 by boosting macrophage resistance to viral growth by augmenting the secretion of these mediators.

A concurrent mechanism implicated in HIV-1 inhibition by VIP and PACAP is their ability to induce macrophage secretion of IL-10, a cytokine that inhibits HIV-1 by interfering in the reverse transcription of viral RNA [35,47]. IL-10 is readily produced by human and murine cells stimulated by VIP and PACAP and is a critical mediator of the anti-inflammatory properties of these neuropeptides. Here, we found that IL-10 neutralization reduced the ability of VIP and PACAP to inhibit HIV-1 replication, indicating that IL-10, likewise the β -chemokines is required to increase macrophage resistance following treatment with these neuropeptides.

In conclusion, our study shows that VIP and PACAP, molecules endowed with a large spectrum of physiological activities on the neuro-immune-endocrine system, can increase macrophage resistance to HIV-1 replication. It is remarkable to observe the contrasting roles of neurotrophic molecules on the HIV-1 biology, as we recently showed that Nerve Growth Factor (NGF) favors viral replication in macrophages [26]. Our findings also open new possibilities for therapeutic strategies, in which HIV-1 replication could be controlled through activation of VPAC2 and PAC1 receptors through their natural ligands VIP and PACAP, or by their specific agonists, in association with the present available antiretroviral compounds.

Supporting Information

Figure S1 VIP and PACAP induce CCL3, CCL5 and IL-10 production in macrophages. Macrophages were left untreated (*Nil*) or treated with VIP or PACAP (10 nM), and supernatants were collected at different time-points. The concentrations of CCL3 (A), CCL5 (B) and IL-10 (C) were measured by ELISA. Data represent means \pm SEM of six (CCL3) and four (CCL5 and IL10) independent experiments. (TIF)

Acknowledgments

We thank the Hemotherapy Service of the Hospital Clementino Fraga Filho (Federal University of Rio de Janeiro, Brazil) for providing buffy-coats, and the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH, Bethesda, MD) for providing the HIV-1 isolate Ba-L. The recombinant protein Maxadilan and its truncated form Maxadilan Δ 65 (M65) were kindly donated to us by Dr. Ethan A. Lerner (Department of Dermatology, Massachusetts General Hospital, MA, USA).

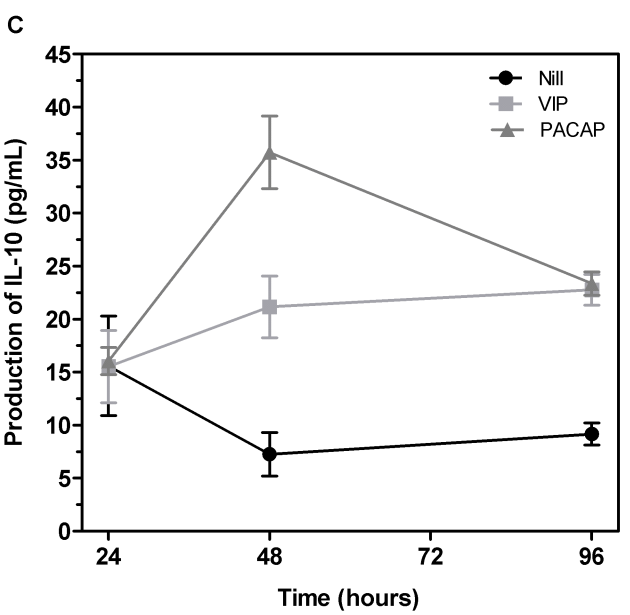
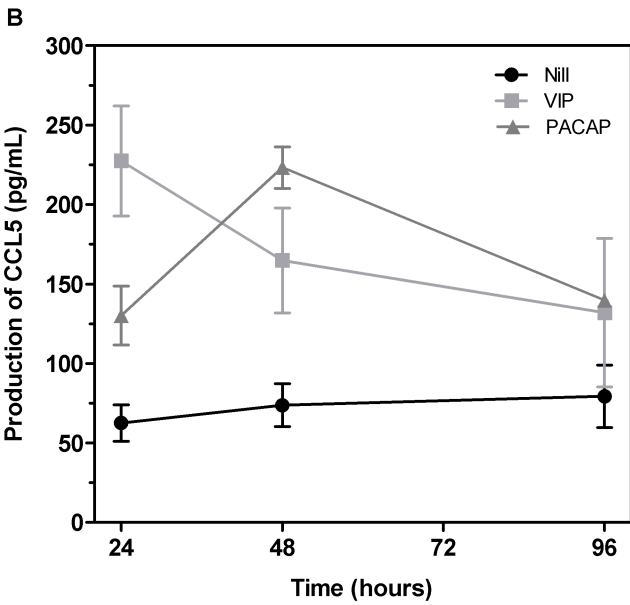
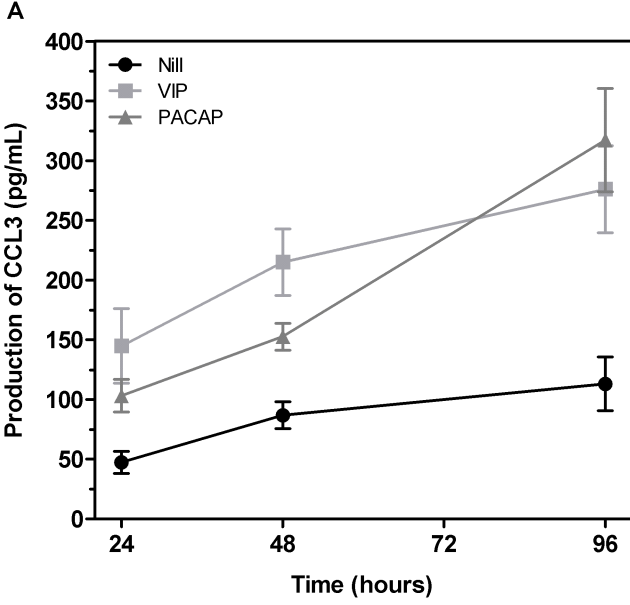
Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JRT EGR WS DCBH. Performed the experiments: JRT RJ EGR. Analyzed the data: JRT WS DCBH. Wrote the paper: JRT WS DCBH.

References

- Said SI, Mutt V. (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*; 169:1217–8.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, et al. (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 164:567–74.
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE. (2000) The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocr Rev*; 21:619–70.
- Dickson L, Finlayson K. (2009) VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther*; 121:294–316.
- Pisegna JR, Wank SA. (1993) Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:6345–9.
- Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. (1992) Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron*; 8:811–9.
- Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, et al. (1993) The VIP2 receptor: molecular characterization of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett*; 334:3–8.
- Langer I, Robberecht P. (2007) Molecular mechanisms involved in vasoactive intestinal peptide receptor activation and regulation: current knowledge, similarities to and differences from the A family of G-protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans*; 35:724–8.
- Ganea D, Delgado M. (2002) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med*; 13:229–37.
- Kim WK, Kan Y, Ganea D, Hart RP, Gozes I, et al. (2000) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor- α production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci*; 20:3622–30.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. (1999) VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Subsequent effect on IFN γ synthesis by T cells. *J Neuroimmunol*; 96:167–81.
- Larocca L, Calafat M, Roca V, Franchi AM, Leiros CP. (2007) VIP limits LPS-induced nitric oxide production through IL-10 in NOD mice macrophages. *Int Immunopharmacol*; 7:1343–9.
- Gonzalez-Rey E, Delgado M. (2008) Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia, and dendritic cells. *Brain Behav Immun*; 22:35–41.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Martinez C, Gomariz RP, Ganea D. (1999) VIP and PACAP38 modulate cytokine and nitric oxide production in peritoneal macrophages and macrophage cell lines. *Ann N Y Acad Sci*; 897:401–14.
- Abad C, Waschek JA. (2011) Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. *Curr Pharm Des*; 17:1025–35.
- Gonzalez-Rey E, Varela N, Chorny A, Delgado M. (2007) Therapeutic approaches of vasoactive intestinal peptide as a pleiotropic immunomodulator. *Curr Pharm Des*; 13:1113–39.
- Pozo D, Gonzalez-Rey E, Chorny A, Anderson P, Varela N, et al. (2007) Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: a new therapeutic approach for immune disorders. *Peptides*; 28:1833–46.
- Eisele E, Siliciano RF. (2012) Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity*; 37:377–88.
- Igarashi T, Brown CR, Endo Y, Buckler-White A, Plishka R, et al. (2001) Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98:658–63.
- Kedzierska K, Crowe SM. (2002) The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem*; 9:1893–903.
- Brown A, Zhang H, Lopez P, Pardo CA, Gartner S. (2006) In vitro modeling of the HIV-macrophage reservoir. *J Leukoc Biol*; 80:1127–35.
- Herbein G, Varin A. (2010) The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? *Retrovirology*; 7:33.
- Andreani G, Lodge R, Richard D, Tremblay MJ. (2012) Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV. *Curr Opin HIV AIDS*; 7:276–82.
- Pawlowski A, Jansson M, Skold M, Rottenberg ME, Kallenius G. (2012) Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathog*; 8:e1002464.
- Alfano M, Poli G. (2005) Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol*; 42:161–82.
- Souza TM, Rodrigues DQ, Passaes CP, Barreto-de-Souza V, Aguiar RS, et al. (2010) The nerve growth factor reduces APOBEC3G synthesis and enhances HIV-1 transcription and replication in human primary macrophages. *Blood*; 117:2944–52.
- Branch DR, Valenta LJ, Yousefi S, Sakac D, Singla R, et al. (2002) VPAC1 is a cellular neuroendocrine receptor expressed on T cells that actively facilitates productive HIV-1 infection. *AIDS*; 16:309–19.
- Bokaci PB, Ma XZ, Sakac D, Branch DR. (2007) HIV-1 integration is inhibited by stimulation of the VPAC2 neuroendocrine receptor. *Virology*; 362:38–49.
- Lima RG, Van Weyenbergh J, Saraiva EM, Barral-Netto M, Galvao-Castro B, et al. (2002) The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. *J Infect Dis* 185, 1561–6.
- Bol SM, van Remmerden Y, Sietzema JG, Kootstra NA, Schuitemaker H, et al. (2009) Donor variation in in vitro HIV-1 susceptibility of monocyte-derived macrophages. *Virology*; 390:205–11.
- Brenneman DE, Hauser J, Spong CY, Phillips TM, Pert CB, et al. (1999) VIP and D-ala-peptide T-amide release chemokines which prevent HIV-1 GP120-induced neuronal death. *Brain Res*; 838:27–36.
- Brenneman DE, Hauser JM, Spong C, Phillips TM. (2002) Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides*; 36:271–80.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol*; 17:657–700.
- Garzino-Demo A, DeVico AL, Conant KE, Gallo RC. (2000) The role of chemokines in human immunodeficiency virus infection. *Immunol Rev*; 177:79–87.
- Montaner LJ, Griffin P, Gordon S. (1994) 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. *J Gen Virol*; 75 (n12):3393–400.
- Weissman D, Poli G, Fauci AS. (1994) Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor α and interleukin 6 induction of virus. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 10:1199–206.
- Gether U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*; 21:90–113.
- Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, et al. (1998) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*; 63:591–601.
- Delgado M, Gonzalez-Rey E, Ganea D. (2004) VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells. *FASEB J*; 18:1453–5.
- Delgado M, Ganea D. (2001) Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo. *Arch Physiol Biochem*; 109:377–82.
- Chorny A, Gonzalez-Rey E, Delgado M. (2006) Regulation of dendritic cell differentiation by vasoactive intestinal peptide: therapeutic applications on autoimmunity and transplantation. *Ann N Y Acad Sci*; 1088:187–94.
- Delgado M, Ganea D. (2001) Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *J Immunol*; 167:966–75.
- Sanchez A, Tripathy D, Grammas P. (2009) RANTES release contributes to the protective action of PACAP38 against sodium nitroprusside in cortical neurons. *Neuropeptides*; 43:315–20.
- Dejda A, Sokolowska P, Nowak JZ. (2005) Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol Rep*; 57:307–20.
- Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC, Schleimer RP. (2008) Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*; 123:398–410.
- Brenneman DE. (2007) Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Peptides*; 28:1720–6.
- Naif HM, Chang J, Ho-Shon M, Li S, Cunningham AL. (1996) Inhibition of human immunodeficiency virus replication in differentiating monocytes by interleukin 10 occurs in parallel with inhibition of cellular RNA expression. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 12:1237–45.

Figure S1



5 DISCUSSÃO

VIP e PACAP atuam como fatores neuroprotetores e neuromoduladores, porém seus efeitos não são restritos ao sistema nervoso, estes neuropeptídeos são fatores pleiotrópicos associados com diversos processos fisiológicos, tais como, regulação metabólica e gastrointestinal, incluindo também, modulação do sistema imune. Suas funções são mediadas por três receptores acoplados a proteína G, VPAC1, VPAC2 e PAC1, que são amplamente distribuídos sistemicamente, incluindo em linfócitos e macrófagos, o que confere a VIP e PACAP tamanha quantidade de ações. Neste trabalho, damos continuidade a estudos prévios de nosso laboratório que mostram que VIP e PACAP aumentam a resistência de macrófagos a replicação do HIV-1, e induzem a produção de β -quimiocinas e da citocina IL-10, moléculas com capacidade de diminuir a replicação do HIV-1 *in vitro*. Demonstramos aqui que ambos fatores induzidos por VIP e PACAP participam ativamente do fenômeno inibitório promovido por estes neuropeptídeos, e também investigamos a participação e contribuição de cada um dos seus receptores nessa ação. Dessa forma acreditamos que nosso estudo agrega informações importantes para a melhor compreensão das interações vírus/hospedeiro que ocorrem e determinam a patogênese na infecção pelo HIV-1.

Os estudos de imunopatogênese da infecção pelo HIV-1 são dificultados pelo fato do HIV-1 só infectar células humanas, o que não permite o uso de modelos animais para estudos *in vivo*. No hospedeiro humano, a replicação do HIV-1 ocorre basicamente em linfócitos T CD4⁺ ativados e macrófagos presentes em tecidos linfóides. Embora linfócitos sejam os maiores produtores de HIV-1 no organismo humano (166), os macrófagos são células fundamentais na replicação do HIV-1. Ao contrário dos linfócitos, macrófagos são altamente resistentes aos efeitos citopáticos produzidos em decorrência da replicação viral (167, 168) e podem produzir vírus *in vitro* por até dois meses após infecção (167). *In vivo*, microglias podem permanecer infectadas por alguns anos, sugerindo que estas células podem funcionar como reservatórios virais (168). Além disso, Orenstein e colaboradores (1997) demonstraram que os macrófagos são os principais produtores de HIV-1 em linfonodos de pacientes co-infectados por *Mycobacterium avium* e HIV-1, ou co-infectados por *Pneumocystis carinii* e HIV-1 (169). Em 2001, Igarashi e colaboradores reforçaram a importância dos macrófagos como produtores e reservatórios contínuos de HIV-1 (170). Estes autores observaram que continuava ocorrendo produção do isolado viral SHIV (uma quimera de HIV-1 com vírus da imunodeficiência símia SIV) mesmo após a completa depleção de linfócitos T CD4⁺ dos animais infectados experimentalmente. Em face ao exposto, acreditamos que os estudos de

replicação do HIV-1 em macrófagos podem contribuir significativamente para o entendimento dos mecanismos de patogênese do HIV-1 nos hospedeiros humanos.

Os dados apresentados neste estudo mostram que os neuropeptídeos VIP e PACAP inibem significativamente a replicação do HIV-1 em macrófagos primários humanos *in vitro*. O efeito inibitório sugere uma curva dose não-dependente dentro do intervalo das concentrações testadas (1 a 100 nM), com máximo efeito inibitório observado na concentração de 10 nM tanto para VIP quanto para PACAP (Figura 1, artigo anexado). Como nenhuma das concentrações testadas de PACAP induziu a replicação viral nestes macrófagos, podemos sugerir a possibilidade de que seu efeito inibitório depende apenas de seu receptor com maior afinidade, PAC1. No caso do VIP, cabe ressaltar que na concentração de 1 nM, VIP apresenta uma tendência de aumento da replicação viral, e que na concentração de 100 nM promove o aumento da produção viral. Este é um fato interessante, pois indica a possibilidade do efeito de VIP sobre o HIV-1 ser antagônico dependendo do receptor ativado (VPAC1 ou VPAC2), tendo em vista que concentrações muito pequenas poderiam ativar apenas um receptor com maior afinidade e/ou com maior expressão, enquanto que nas maiores concentrações, por mais que o receptor com atividade inibitória seja ativado, o excedente de ligante poderia se ligar a um segundo receptor com atividade indutora da replicação. Já foi demonstrado que o estímulo de VPAC1 favorece a replicação do HIV-1 (160), ao passo que o estímulo de VPAC2 resulta numa forte inibição da infecção produtiva do HIV-1 independente do tropismo viral (161); porém não há trabalhos que mostram o efeito dos ligantes naturais desses receptores, no caso VIP e PACAP, sendo o nosso o primeiro estudo a mostrar efeito desta moléculas sobre a replicação HIV-1. Portanto, é possível especular que os efeitos de VIP e PACAP podem depender da concentração destes ligantes no tecido onde o vírus está replicando. Entretanto, observamos que a concentração de 10 nM, para ambos neuropeptídeos, reduz significativamente a produção viral, e que esta concentração possui atividades modulatórias no sistema imune, de acordo com investigações de Martinez (1996) e Delgado (1999) (171, 172). Logo, é possível imaginar que ocorra inibição da replicação do HIV-1 associada ao efeito regulador destes peptídeos sobre uma resposta imunológica no tecido infectado.

Na busca de mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-HIV-1 de VIP e PACAP, investigamos se estes neuropeptídeos induziriam a liberação de β -quimiocinas por macrófagos, e vimos que o tratamento com VIP e PACAP induziu a liberação de CCL3 e CCL5 por estas células. As β -quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5, ligantes naturais de CCR5, foram inicialmente descritas por Cocchi (1995) (66) como potentes agentes inibidores da

infecção pelo HIV-1, e alguns estudos associam níveis altos das β -quimiocinas com infecção assintomática pelo HIV-1, ilustrando a participação destas proteínas na resposta imune inata contra este vírus (173). Estudos sobre o mecanismo de inibição das β -quimiocinas mostram que estas substâncias afetam a entrada do HIV-1 através da modulação da expressão de CCR5, e também através da competição direta com o HIV-1 pela ligação ao receptor CCR5 (174, 175). Estudos anteriores demonstraram que VIP e PACAP induzem a liberação de CCL3 e CCL5, proteínas necessárias para a sobrevivência das células neurais em cultura e potentes inibidores de diversas variantes de gp120 do HIV-1 em células neurais, conferindo ao VIP e PACAP um papel protetor contra HIV-1 no sistema nervoso central (122, 123). Nossos resultados sugerem que as β -quimiocinas RANTES (CCL5) e MIP-1 α (CCL3) participam do efeito inibitório do VIP/PACAP na replicação do HIV-1, pois o bloqueio destes mediadores (por anticorpos neutralizantes) reverteu parcialmente a atividade anti-HIV-1 dos neuropeptídeos.

Outro possível mecanismo avaliado pelo qual VIP e PACAP inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos foi a análise da sua capacidade de estimular a produção de IL-10. Os nossos resultados mostram que o VIP e PACAP estimulam a produção de IL-10, achado que está de acordo com os de Delgado e colaboradores (1999), que mostraram que VIP e PACAP estimulam a produção de IL-10 em macrófagos murinos (156). IL-10 é uma citocina produzida por macrófagos e linfócitos T ativados, está implicada no controle da inflamação e na resposta imune frente a microorganismos patogênicos (176). Em relação aos efeitos da IL-10 na infecção por HIV-1, vários autores já demonstraram a atividade antiretroviral desta citocina (73), a qual reduz a replicação do HIV-1 nos estágios iniciais da infecção (82). E da mesma forma que demonstramos para as β -quimiocinas, verificamos que o bloqueio do receptor de IL-10 resultou num decréscimo do efeito inibitório desempenhado por VIP/PACAP na produção do HIV-1.

Nós detectamos previamente que VIP e PACAP induzem a produção de β -quimiocinas por macrófagos, e determinamos que elas participam do fenômeno inibitório do HIV-1 promovido por VIP e PACAP através dos ensaios de neutralização, que significativamente reduziu o grau de inibição da replicação viral promovido pelos neuropeptídeos. CCL3 e CCL5, junto com CCL4, inibem a infecção pelo HIV-1 por meio da competição pelo receptor CCR5, que é utilizado como co-receptor de entrada pelo HIV-1, podendo também inibir a infecção em virtude da diminuição da expressão membranar induzida após ligação ao receptor.

Outro mecanismo que demonstramos pelo qual VIP e PACAP inibem a replicação do HIV-1, corresponde a capacidade destes neuropeptídeos induzirem a produção de IL-10 por macrófagos. Conforme os experimentos de neutralização do receptor de IL-10 mostram, VIP e PACAP dependem da indução desta citocina para promover a inibição ótima do HIV-1. No contexto da infecção pelo HIV-1, a IL-10 é descrita como uma potente inibidora da replicação, agindo através da interferência na transcrição reversa do RNA viral do HIV-1.

Considerando a dependência de receptores para a indução do efeito inibitório sobre o HIV-1, observamos que a ação de VIP ocorre via estímulo dos seus receptores VPAC1 e VPAC2, porém não através de PAC1. Estes resultados certamente derivam da alta afinidade de VIP para VPAC1 e VPAC2, e de sua baixa afinidade para PAC1. A capacidade de PACAP em diminuir a replicação do HIV-1, por outro lado, pode ser dependente dos seus três receptores, desde que sua ação é anulada apenas quando os três receptores são bloqueados. Em virtude da afinidade de PACAP por PAC1 ser muito maior do que a afinidade por VPAC1 e VPAC2, acreditamos que PACAP liga-se preferencialmente a PAC1, interagindo com os outros receptores apenas em situações de ausência ou bloqueio do seu receptor primário, ou também quando em concentrações muito altas. A noção da ação inibitória de VIP e PACAP, dependente de receptores, sobre o HIV-1 foi consolidada com o uso de agonistas específicos. Caracterizamos VPAC2 e PAC1 como receptores inibitórios da replicação do HIV-1, enquanto que VPAC1 como um receptor favorável a replicação viral. Além disso, determinamos que a ativação simultânea desses receptores por agonistas específicos, ou pelos neuropeptídeos nativos, supera a ação pró-HIV-1 de VPAC1 quando ativado isoladamente. Em outras palavras, o resultado final da ligação simultânea desses três receptores em macrófagos infectados é a produção reduzida de partículas virais por estas células. A luz dos dados aqui expostos, este estudo acrescenta informações que ajudam a melhor entender como mecanismos de interações fisiológicas do hospedeiro podem participar e influenciar a patogenia da infecção pelo HIV-1, e o discernimento das funções dos receptores destes neuropeptídeos contribui para o possível desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas de controle da infecção pelo HIV-1, focando o hospedeiro.

A interação entre o HIV-1 e o hospedeiro é um mecanismo complexo e multifatorial, dependente da virulência e patogenicidade do vírus, assim como da resposta imunológica do hospedeiro frente a presença deste patógeno (177). Na ausência de tratamento antiretroviral, a infecção por HIV-1 resulta no comprometimento do sistema imune do hospedeiro, com progressiva depleção de linfócitos T CD4⁺ e o desenvolvimento da AIDS. Muitos mecanismos que contribuem para a patogênese constituem desafios para o seu esclarecimento;

portanto, a identificação e caracterização de fatores endógenos que modulam a replicação do HIV-1 contribuem de forma importante para uma melhor compreensão da infecção pelo HIV-1. Além disso, um entendimento dos mecanismos que alteram a produção do vírus no corpo humano permite a formulação de novas estratégias terapêuticas com vista ao controle da infecção por este patógeno. Nessa perspectiva muitos estudos procuram elucidar a participação dos diferentes fatores envolvidos na modulação da replicação viral no hospedeiro (178).

Assim, entendemos que os resultados apresentados e discutidos na presente dissertação possuem relevância dentro da linha de pesquisa de modulação da replicação do HIV-1 por fatores do hospedeiro, trazendo novas perspectivas e possibilidades de estudos complementares. Não podemos descartar efeitos diretos de VIP e PACAP sobre a transcrição e tradução do vírus, tais como ativação ou inibição de vias de sinalização que atuem sobre o HIV-1, incluindo tanto componentes citosólicos quanto fatores nucleares. A capacidade de VIP e PACAP de induzir a síntese de β -quimiocinas e de IL-10, moléculas reconhecidas por sua atividade antirretroviral, e a capacidade de inibir a replicação do HIV-1 em diferentes doses e abordagens de tratamento mostram que estes neuropeptídeos podem desempenhar um papel relevante na regulação da disseminação sistêmica e na multiplicação do HIV-1 principalmente nos macrófagos, considerados reservatórios virais e parcialmente refratários a drogas antirretrovirais (179).

6 CONCLUSÕES

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.

7 PERSPECTIVAS

Como objetivos futuros, pretendemos:

- Verificar a atividade de componentes da via de sinalização de VIP e PACAP em macrófagos infectados e tratados com estes neuropeptídeos.
- Avaliar a expressão gênica e proteica de membros da família APOBEC3 em macrófagos infectados pelo HIV-1 e expostos aos neuropeptídeos VIP e PACAP.
- Verificar se membros da família APOBEC3 são alvos de fosforilação por componentes da via de sinalização de VIP e PACAP em macrófagos infectados pelo HIV-1.
- Avaliar a atividade enzimática dos membros da família APOBEC3 em células infectadas por HIV-1 e tratadas com VIP e PACAP, com base na identificação de hipermutações características no provírus integrado.
- Averiguar se VIP e PACAP inibem a replicação do HIV-1 em macrófagos expostos a estes neuropeptídeos antes da infecção.
- Analisar a expressão gênica e proteica de fatores transcricionais e reguladores do ciclo celular relacionados aos processos de transcrição e latência do HIV-1 em macrófagos tratados com VIP e PACAP antes e após a infecção.

8 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 States 2005. 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-Honnobier 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, Oravec 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, Makhoul 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-alanine 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. 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.
161. 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.
162. Delgado M, Martinez C, Johnson MC, Gomariz RP, Ganea D. Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 1996;68(1-2):27-38.
163. Johnson MC, McCormack RJ, Delgado M, Martinez C, Ganea D. Murine T-lymphocytes express vasoactive intestinal peptide receptor 1 (VIP-R1) mRNA. *J Neuroimmunol*. 1996;68(1-2):109-19.

164. Lara-Marquez ML, O'Dorisio MS, Karacay B. Vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 2 (VPAC2) is the predominant receptor expressed in human thymocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;921:45-54.
165. Gonzalez-Rey E, Varela N, Chorny A, Delgado M. Therapeutical approaches of vasoactive intestinal peptide as a pleiotropic immunomodulator. *Curr Pharm Des.* 2007;13(11):1113-39.
166. Cossarizza A. Apoptosis and HIV infection: about molecules and genes. *Curr Pharm Des.* 2008;14(3):237-44.
167. Brown A, Zhang H, Lopez P, Pardo CA, Gartner S. In vitro modeling of the HIV-macrophage reservoir. *J Leukoc Biol.* 2006;80(5):1127-35.
168. Cassol E, Alfano M, Biswas P, Poli G. Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence. *J Leukoc Biol.* 2006;80(5):1018-30.
169. Orenstein JM, Fox C, Wahl SM. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science.* 1997;276(5320):1857-61.
170. Igarashi T, Brown CR, Endo Y, Buckler-White A, Plishka R, Bischofberger N, et al. Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(2):658-63.
171. Delgado M, Garrido E, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAP27) and PACAP38) protect CD4+CD8+ thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. *Blood.* 1996;87(12):5152-61.
172. 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.
173. Garzino-Demo A, DeVico AL, Conant KE, Gallo RC. The role of chemokines in human immunodeficiency virus infection. *Immunol Rev.* 2000;177:79-87.
174. Moriuchi H, Moriuchi M, Combadiere C, Murphy PM, Fauci AS. CD8+ T-cell-derived soluble factor(s), but not beta-chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15341-5.
175. Lehner T, Wang Y, Doyle C, Tao L, Bergmeier LA, Mitchell E, et al. CD8+ T-cell-derived soluble factor(s), but not beta-chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. *Eur J Immunol.* 1999;29(8):2427-35.
176. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008;180(9):5771-7.
177. Wahl SM, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, Moutsopoulos N, Orenstein JM. Permissive factors for HIV-1 infection of macrophages. *J Leukoc Biol.* 2000;68(3):303-10.
178. Wahl SM, Greenwell-Wild T, Peng G, Ma G, Orenstein JM, Vazquez N. Viral and host cofactors facilitate HIV-1 replication in macrophages. *J Leukoc Biol.* 2003;74(5):726-35.
179. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med.* 2002;53:557-93.

9 APÊNDICE

Participação em eventos e cursos durante o período de mestrado:

- XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology – Campos do Jordão/SP – 2012
- VIII Curso Avançado de Patogênese do HIV – São Paulo/SP - 2013
- XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology/ 11th World Congress on Inflammation – Natal/RN – 2013 (Honorable Mention of the SBI Abstract Award on the category of Postgraduate (Master), IAIS/SBI)

Outras produções durante o período do mestrado:

- Victoria S*, Temerozo JR*, Gobbo L, Pimenta-Inada HK, Bou-Habib DC. Activation of Toll-like receptor 2 increases macrophage resistance to HIV-1 infection. *Immunobiology*. 2013 Dec;218(12):1529-36.
- Souza TM*, Temerozo JR*, Araujo EG, Bou-Habib DC. The effects of neurotrophins and the neuropeptides VIP and PACAP on HIV-1 infection: histories with opposite ends. *Neuroimmunomodulation*. (Revisão aceita para publicação)

*Contribuição igualitária