

VARIANTES DA PROTEÍNA VIRAL R (Vpr) DE HIV-1 E PROGRESSÃO DA SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (SIDA). IMPACTO DE POLIMORFISMOS ASSOCIADOS A RECETORES PARA FUNGOS

Rui Duarte Armindo¹, Rui Soares^{1,2}, Teresa Gonçalves^{1,2}

¹Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal;

²Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Portugal

Correspondência: ruimigueldarmindo@gmail.com

Resumo

Introdução. Dectina-1 é um recetor membranar das células do sistema imunitário inato responsável pelo reconhecimento de elementos da parede de fungos. Alterações no gene que codifica para esta proteína estão relacionadas com aumento da suscetibilidade a infeções oportunistas, em particular em indivíduos HIV-positivos, podendo correlacionar-se com a progressão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

Materiais e Métodos. Otimizou-se e implementou-se um protocolo que, em amostras de doentes portadores de HIV-1, utilizando uma técnica de PCR convencional, permite estudar a sequência de uma zona do gene da dectina-1, onde se podem encontrar polimorfismos descritos como determinantes para a suscetibilidade a infeções fúngicas. Aplicámos esse protocolo a três amostras de doentes considerados como “Long Term Non-Progressors” (LTNPs).

Resultados. O protocolo mostrou-se adequado e eficaz, tendo sido possível analisar as sequências nucleotídicas alvo nos três casos selecionados. A análise revelou que os três indivíduos são homozigotos para o exão 6 do gene da dectina-1 sem polimorfismos.

Discussão. O estudo de polimorfismos de dectina-1 em três indivíduos HIV positivos classificados como LTNPs, sem infecções oportunistas diagnosticadas, revelou a inexistência de polimorfismos no exão 6 do gene da dectina-1, estando assim de acordo com os dados científicos referidos na literatura relacionada.

Conclusões. O protocolo desenvolvido pode ser uma importante ferramenta com vista à melhor caracterização genética dos portadores de HIV e poderá indicar uma correlação entre a presença de mutações em genes da imunidade inata e a progressão da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

Palavras-Chave

SIDA; dectina-1; polimorfismo (Genética); *Candida albicans*; Proteína Viral R

Abstract

Background. Dectin-1 is a transmembrane receptor present in innate immunity cells responsible for the recognition of cell wall elements of fungi. Dectin-1 gene mutations are related with increased susceptibility to opportunistic infections particularly in HIV-positive individuals and may correlate with the progression of Acquired Immunodeficiency Syndrome.

Materials & Methods. We optimized and implemented a protocol based on a convectional PCR technique for blood samples from HIV carries that allows the study of part of the dectin-1 gene sequence where polymorphisms of interest can be found. We applied this protocol to three samples from individuals defined as Long-Term Non-Progressors (LTNPs).

Results. The protocol was adequate and effective. It was possible to analyze the target sequences of the three samples selected. It revealed three homozygotes for the wild type exon 6 of the dectin-1 gene.

Discussion. Analysis of dectin-1 polymorphisms in three HIV carriers classified as LTNPs without opportunistic infections diagnosed showed no polymorphisms on the exon 6 of the dectin-1 gene. The results are, therefore, consistent with the related literature scientific data.

Conclusions. The protocol designed may become an important tool for genetic characterization of HIV carriers and may indicate a correlation between the presence of innate immunity genetic mutations and the progression of Acquired Immunodeficiency Syndrome.

Keywords

AIDS; dectin-1; polymorphism (Genetics); *Candida albicans*; Viral Protein R

Introdução

A progressão da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em doentes portadores do Vírus da Imunodeficiência Adquirida-1 (HIV-1) poderá ser condicionada por alteração de determinadas funções biológicas associadas a entidades moleculares reconhecedoras de organismos patogénicos.¹ Ainda que o tempo médio de evolução entre o momento de infeção e o estabelecimento clínico da SIDA seja, em doentes não tratados, de aproximadamente 10 anos, este período tem uma variação inter-individual muito alargada. Esta heterogeneidade resultou desde cedo numa divisão em vários grupos dos portadores de HIV, entre os quais se destacam os “Long-Term Non-Progressors” (LTNPs): indivíduos infetados com o HIV há um período superior a dez anos que mantêm níveis normais de linfócitos T CD4⁺ e que permanecem clinicamente estáveis, por exemplo, sem infeções oportunistas diagnosticadas.²

A Proteína Viral R (Vpr) é uma proteína acessória codificada no genoma do HIV, cujas funções biológicas em doentes portadores do HIV-1 estão relacionadas com a replicação e patogénese do vírus. Esta proteína pode apresentar-se com diferentes variantes, tendo isso um impacto sobre a progressão da doença em doentes infetados com HIV-1.^{6,20}

Muitos fatores genéticos do vírus ou do hospedeiro têm sido ponderados como causadores desta variabilidade³⁻⁵ e o grupo de trabalho em que decorreu o presente estudo tem realizado estudos de pesquisa da variabilidade da Proteína Viral R (Vpr) em portadores de HIV-1 com diferente progressão clínica da doença.⁶

Recentemente, alguns estudos foram feitos na procura de polimorfismos da imunidade inata que, em indivíduos por alguma razão mais frágeis a nível imunitário, podem correlacionar-se com degradação da função imunitária.^{7,8}

Entre os agentes de infeção oportunista em doentes HIV positivos, os fungos são dos mais frequentes e a grande dificuldade com que este tipo de infeção é diagnosticada e tratada tem permitido que estejam também entre as principais causas de morte entre doentes com SIDA⁹.

Entre este grupo de agentes infecciosos, *Candida albicans* é o mais prevalente.^{10,11}

Até há bem pouco tempo, pouco se sabia sobre os mecanismos inatos de reconhecimento e resposta imunitária a infeções fúngicas. No entanto, a identificação dos “Pattern Recognition Receptors” (PRRs) com especificidade para o reconhecimento de elementos fúngicos, veio incrementar a área do reconhecimento e da resposta imunitária à presença do fungo.¹²

A dectina-1 é um destes recetores transmembranares, expresso especialmente nas células da linha mieloide e capaz de reconhecer beta-glucanos, constituintes da parede do fungo em causa, sendo especificamente sensível aos β -(1,3)-glucanos.¹³ Através da interação com a via de sinalização intracelular mediada por Syk (“Spleen tyrosine kinase”) e por CARD9 (“Caspase Recruitment Domain Family, Member 9”), a dectina-1 vai desencadear a produção e libertação de moléculas sinalizadoras solúveis – citocinas, quimiocinas e lipídios inflamatórios – que darão início às respostas inflamatória e imunitária do hospedeiro.¹⁴

Estudos posteriores à sua descoberta indicaram que a deficiência neste recetor está associada a um aumento da suscetibilidade a infeções fúngicas mucocutâneas.¹⁵ Foi também sugerido que a existência de polimorfismos ou outras variantes na codificação genética da dectina-1 pode estar associada a aspergilose invasiva¹⁶ e a aspergilose pulmonar.¹⁷ No entanto, parece não haver relação entre estes polimorfismos e a candidíase vulvo-vaginal em mulheres saudáveis.¹⁸

No gene que codifica para a dectina-1, o exão 6 foi aquele em que mais variações foram encontradas e parece haver relação entre alguns destes SNPs (“Single Nucleotide Polymorphism”), associados aos aminoácidos 223 e 238 (I223S e Y238X), e uma diminuição da capacidade de produção de citocinas em hetero ou homozigotia.^{15, 16, 19} O caso concreto do polimorfismo Y238X é importante, pois leva à formação de um codão STOP prematuro que causa a perda de dez aminoácidos pertencentes ao domínio responsável pelo reconhecimento de carboidratos da parede dos fungos pela dectina-1.

Com o objectivo de estudar a presença de polimorfismos associados a recetores para fungos e o impacto destes na progressão da SIDA, este projeto pretende testar um protocolo que permita investigar a ocorrência desses polimorfismos em portadores de HIV-1 em que foram também estudadas as variantes da Vpr.

Pretende-se avaliar o resultado funcional dessa variabilidade genética, correlacionando com os dados clínicos associados a cada doente.

Materiais e Métodos

1. Seleção de doentes, colheita e processamento de amostras.

a. Colheita de amostras e obtenção da fase leucocitária. Efetuaram-se colheitas de sangue em indivíduos infetados com o vírus HIV-1, provenientes da consulta externa/internamento

do serviço de Doenças Infecciosas do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Para este trabalho foram selecionados doentes classificados como LTNPs, sem infeções oportunistas registadas, clinicamente estáveis e não medicados.

De seguida, procede-se à extração de leucócitos. Para tal, verte-se o sangue recolhido num tubo Falcon[®] e perfaz-se o seu volume até 6 mL com soro fisiológico. De seguida, adiciona-se muito lentamente, para que não haja mistura, a solução a 4 mL de ficol, que tem por função separar os componentes constituintes do sangue. Após uma centrifugação a 18°C, 2500 rpm, durante 20 minutos, é possível observar, no tubo, 4 fases diferentes que correspondem supero-inferiormente a: plasma, leucócitos, ficol e eritrócitos. A fase correspondente aos leucócitos é retirada com cuidado e centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante é desprezado e o precipitado é ressuscitado em 2 mL de PBS. Centrifuga-se novamente a solução durante 10 minutos, a 2000 rpm. Rejeita-se, igualmente, o sobrenadante obtido e ressuspende-se o precipitado em PBS. Procede-se ao armazenamento da solução de leucócitos em arca a -80° C.

b. Extração de DNA. A extração de DNA da solução de leucócitos é feita utilizando o MagNA Pure Compact da Roche[®], aplicando o kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I[®], de acordo com as indicações do fabricante, e definindo a recolha de uma amostra de 400 µl para uma eluição final em 50 µl.

2. Amplificação do exão 6 do gene da dectina-1.

a. Amplificação por PCR. Após a extração do DNA, procede-se à amplificação da sequência relativa ao gene da dectina-1 por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) Convencional do exão 6 deste gene. A mistura de reação, para um volume final de 50µl, e a programação da PCR estão especificadas na Tabela 1.

O par de primers utilizado foi adquirido com base em estudos prévios dos polimorfismos deste gene¹⁵ e são compostos pela sequência apresentada na Tabela 2.

Tabela 1 - Constituição da mistura e esquema da PCR.

Constituição da Mistura		PCR		
Tampão	10 µl	<u>Esquema Térmico</u>		
dNTP's	4 µl	<u>Temperatura</u>	<u>Tempo</u>	<u>Vezes</u>
Dectin-FWD	1,25 µl	98°C	30 seg	34 ciclos
Dectin-REV	1,25 µl	98°C	10 seg	
TaqPhusion®	0,5 µl	60°C	10 seg	
Amostra	2 µl	72°C	20 seg	
H ₂ O Milli-Q estéril	31 µl	72°C	5 min	
		4°C	∞	

Tabela 2 - Primers utilizados.

Exão	Primer (5' 3')	Sequência
6	dectina-1_Fwd	5'-AAT-CAC-AGC-CTC-TCC-CTT-CA-3'
	dectina-1_Rev	5'-GAT-TTA-AGC-CTC-CTT-TTC-CAA-3'

b. Eletroforese em gel de agarose. A presença do fragmento amplificado é confirmada por eletroforese em gel RedSafe[®], visualizando-se uma banda com, aproximadamente, 432 pares de bases (Figura 1).

A composição do gel preferencialmente utilizada é a apresentada na Tabela 3. Note-se que a preparação do TAE 1x é efetuada a partir do TAE 50x, passando 20 mL deste e perfazendo até 1L com H₂O destilada.

Tabela 3 - Composição do Gel de Agarose.

Total de Solução	120 mL
TAE 1x	120 mL
Agarose	1,2 g
RedSafe [®]	1,6 µl

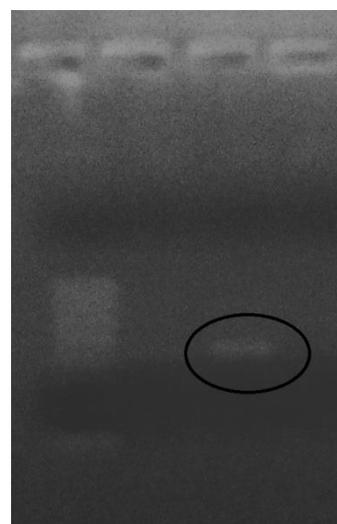


Figura 1 - Banda da dectina-1.

c. Purificação do produto de PCR. Caso se obtenha a banda correspondente, é efetuada a purificação do material genético ampliado. Esta purificação é feita a partir do próprio gel em que está contida a banda.

O kit utilizado é o da Promega[®] (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System[®]), efetuando a purificação a partir da banda cortada do gel de agarose.

3. Análise da sequência nucleotídica.

O envio para sequenciação é efetuado com cerca de 12 a 15µl do produto purificado, juntamente com 2µl de primer a 10 mM, para a empresa alemã LGC Genomics[®].

A análise *in silico* da sequência e a pesquisa de mutação são efetuadas no programa Bio-Web[®], permitindo pesquisar polimorfismos ao nível da alteração de pares de base ou alterações na cadeia de aminoácidos resultante da transcrição desse gene.

Resultados

O protocolo aqui referido foi, assim, o principal âmbito deste trabalho de investigação e resulta da adaptação de materiais e métodos já utilizados por este grupo de trabalho em estudos diretamente relacionados com a Proteína Viral R⁶ e trabalhos já realizados por outros grupos na deteção de polimorfismos do gene que codifica a dectina-1.¹⁵

Depois de ajustados todos os volumes, esquemas de PCR e kits a utilizar no protocolo anteriormente descrito foi possível passar à análise da sequência parcial do gene codificador da dectina-1, a partir das amostras de sangue de indivíduos infetados com o vírus HIV-1.

Os polimorfismos encontrados ao longo dos ensaios de aferição do protocolo, no exão 6, foram o Y238X, em que há substituição de uma base timina (T) por uma guanina (G), passando a transcrição de um aminoácido tirosina (codão TAT) para um codão STOP (TAG) e o I223S em que a substituição das mesmas bases origina um codão para serina (AGT) em substituição do original que seria para isoleucina (ATT).

Apresentam-se seguidamente como exemplos três casos reais em que este exão foi sequenciado através do protocolo anteriormente apresentado. As amostras em causa, dizem respeito a amostras de sangue de indivíduos infetados com HIV-1, que apresentam características clínicas e laboratoriais de LTNPs e, como podemos observar (Tabela 4) todas revelaram indivíduos homozigóticos para “wild type” deste gene, ou seja, sem polimorfismos encontrados.

Tabela 4 - Resultados da análise em três casos de LTNP.

Amostra	Sequência (REF.)	Y238X			I223S		
		Homo wild tp	Hetero	Homo Polim	Homo wild tp	Hetero	Homo Polim
1	TTGAAAACCTCTTCTCACAA ATACTATATGAGGGCACACT ACACAGTTGGTCATAAATGA CTGACACGTGAATCCATACA CAATTTGGAGATGGGTT	✓			✓		
	TTGAAAACCTCTTCTCACAA ATACTATATGAGGGCACACT ACACAGTTGGTCATAAATGA CTGACACGTGAATCCATACA CAATTTGGAGATGGGTT	ATA -> TAT			AAT -> ATT		
2	TTGAAAACCTCTTCTCACAA ATACTATATGAGGGCACACT ACACAGTTGGTCATAAATGA CTGACACGTGAATCCATACA CAATTTGGAGATGGGTT	✓			✓		
	TTGAAAACCTCTTCTCACAA ATACTATATGAGGGCACACT ACACAGTTGGTCATAAATGA CTGACACGTGAATCCATACA CAATTTGGAGATGGGTT	ATA -> TAT			AAT -> ATT		
3	TTGAAAACCTCTTCTCACAA ATACTATATGAGGGCACACT ACACAGTTGGTCATAAATGA CTGACACGTGAATCCATACA CAATTTGGAGATGGGTT	✓			✓		
	TTGAAAACCTCTTCTCACAA ATACTATATGAGGGCACACT ACACAGTTGGTCATAAATGA CTGACACGTGAATCCATACA CAATTTGGAGATGGGTT	ATA -> TAT			AAT -> ATT		

Discussão

As infecções fúngicas são consideradas, em indivíduos portadores de HIV, patologias “definidoras de SIDA”.²¹ Isto significa que a presença destas infecções é também determinante na avaliação da progressão da doença, pois marcam temporalmente a entrada numa fase clínica concreta decorrente da imunodeficiência provocada pelo vírus.

Como foi referido, há na literatura diversos dados que permitem correlacionar mutações na sequência do exão 6 do gene da dectina-1 com um aumento da suscetibilidade das infeções fúngicas.^{15,16,17,19,22} Assim, propusemo-nos a otimizar e a implementar um protocolo de estudo molecular dos polimorfismos Y238X e Y223S do gene que codifica para a dectina-1. Podemos considerar os resultados deste trabalho como capazes de corroborar esta hipótese, uma vez que em indivíduos considerados LTNPs, sem infeções fúngicas diagnosticadas, se encontraram sequências “wild type” do exão 6 do gene da dectina-1, ou seja, não foram encontradas mutações na porção sequenciada em amostras de doentes cuja proteção imunitária contra agentes fúngicos tem sido eficaz.

Seria também interessante procurar efeitos acumulados destes polimorfismos com outros também já estudados e descritos como responsáveis por alteração na progressão da SIDA, como sejam os genes da imunidade inata com polimorfismos já relacionados a alterações na infeção por HIV e progressão da doença, como o Gene MBL (“Mannose-Binding Lectin”);²³ as variações genéticas já identificadas por estudos alargados ao genoma de LTNPs (tipo GWAS, “Genome-Wide Association Studies”), como mutações no gene CCR5 e os muito discutidos alelos HLA de classe I e II;⁵ os polimorfismos ligados a outras doenças oportunistas características da SIDA, como o caso do Recetor Fc Gamma 3A e a infeção criptocócica;²⁴ ou as mutações presentes em partes do genoma do próprio vírus que possam estar a influenciar a sua interação com o sistema imunitário do hospedeiro, de que é exemplo o já referido caso da Vpr.

Por outro lado, poderia ser interessante pesquisar os níveis de alguns mediadores inflamatórios no sangue de indivíduos homocigotos para os polimorfismos Y238X ou Y223S. Ainda que esteja documentada a análise da produção de interleucinas em indivíduos com os diferentes tipos de sequência encontrados para este gene,^{19,22} adaptar esse estudo a portadores

de HIV teria importância na compreensão da dimensão real das consequências da presença destas variantes genéticas em indivíduos infetados.

A aferição deste protocolo implicou a ultrapassagem de algumas dificuldades e o recurso a diferentes soluções.

A quantidade de material genético obtido após as fases de extração e conservação dos leucócitos é, por vezes, insuficiente. Por outro lado, é essencial uma correta aferição da concentração exata de DNA nas amostras, como um garante do sucesso da fase de amplificação do fragmento do gene que se pretende estudar. Assim, estabeleceu-se um intervalo de concentrações de DNA de 80 a 150 µg/mL, determinadas através de um aparelho de leitura de Espectrofotometria NanoDrop[®], como valor indicativo para o sucesso na execução do protocolo de PCR. Há ainda a necessidade de verificação de existência de um bom grau de pureza na amostra, como garantia da qualidade do DNA e da ausência de outras espécies moleculares passíveis de reduzir ou inibir a reação de PCR.

Ultrapassaram-se ainda problemas relativos à obtenção de banda no gel de eletroforese, à adequação do esquema da reação de PCR aos primers utilizados e ao cumprimento das exigências de segurança requeridas num protocolo em que há manuseamento de amostras biológicas de portadores de HIV-1.

Num horizonte que está, em última análise, um pouco mais distante, as aplicações médicas práticas de um sistema que englobe este protocolo podem ser fulcrais no acompanhamento da evolução da SIDA e nas decisões terapêuticas a tomar em relação aos doentes infetados com HIV.

Estão em curso projetos que visam, por exemplo, a obtenção de ferramentas de análise maioritariamente informática que permitam modelar o tratamento de doentes infetados em função da previsão de resistências aos fármacos causadas por variabilidade genética.²⁵ A

integração nestes sistemas de dados relativos às características genéticas da imunidade inata (como é caso a dectina-1) poderia também complementar este tipo de análise e melhor adaptar o tratamento a cada doente.

Mais diretamente relacionada com o trabalho desenvolvido por este grupo de trabalho seria a já equacionada possibilidade de estabelecer correlações entre os dados genéticos da dectina-1 e os da Proteína Viral R (Vpr), com possibilidade eventual de se chegar a um mecanismo preditivo para a progressão do HIV-1 no indivíduo infetado. O objetivo final seria a construção de um auxiliar de diagnóstico na decisão clínica de iniciar ou não terapia antirretrovírica e/ou anti-fúngica. Recorde-se que, por si só, as infeções fúngicas em doentes com SIDA são, desde já, uma epidemia²⁶ difícil de tratar e que valeria a pena tentar prevenir.

O facto de o grupo trabalhar tanto com análise genética do gene da proteína viral Vpr como do gene do recetor dectina-1 de células do doente potencia a possibilidade de cruzamento destes dados. Seria interessante pesquisar se, por exemplo, indivíduos caracterizados como LTNPs apresentam mais frequentemente a combinação de Proteína Viral R mutada com dectina-1 “wild type” do que aqueles no grupo de doentes infetados de progressão rápida.

Os três casos apresentados nos resultados, ainda que condizentes com a hipótese de que dectina-1 funcional sem polimorfismos (“wild type”) pode facilitar a defesa através da imunidade a infeções fúngicas e atrasar a progressão da SIDA, são insuficientes em termos estatísticos para que se considere essa ligação provada (o que ultrapassaria também os objetivos deste trabalho em concreto).

Conclusões

As aplicações do protocolo que este trabalho permitiu elaborar e aferir são inúmeras e a sua exploração encontra-se em estudo, com base no conjunto alargado de amostras de doentes

portadores de HIV-1. O grupo de investigação dispõe de amostras suficientes para uma análise alargada de aferição da prevalência de polimorfismos do gene da dectina-1 e da correlação destes dados com a evolução clínica do doente correspondente.

Este protocolo permitirá no futuro não só a correlação das variantes obtidas com os dados clínicos de cada doente, especialmente no que diz respeito à infeção fúngica e à progressão da doença, como ajudar a identificar marcadores (deleções e/ ou inserções) no gene da dectina-1 com valor preditivo para a progressão do HIV-1 no indivíduo infetado, com o objetivo final de construir um auxiliar de diagnóstico na decisão clínica de iniciar ou não terapia antirretrovírica e/ou anti-fúngica, incluindo a profilaxia de infeções fúngicas.

Ainda que o projeto aqui apresentado esteja claramente numa fase inicial, o potencial do protocolo proposto parece ser indiscutível e o número de possibilidades para a sua utilização é provavelmente bastante alargado.

Aos resultados obtidos poderá juntar-se a análise de muitos outros casos, agora que o protocolo está completamente aferido e em funcionamento, aplicando as técnicas aqui descritas a conjuntos alargados de amostras de sangue infetado com HIV. Só assim poderá realmente estabelecer-se uma correlação estatisticamente significativa entre a presença de polimorfismos (em especial o Y238X) e uma eventual alteração no número de infeções fúngicas oportunistas, com destaque para as por *Candida albicans*.

Por fim conclui-se que, ainda que não seja muito fácil a manipulação deste tipo de produto biológico e, concretamente, a obtenção de bandas na eletroferese em gel para amplificações deste gene acaba por, através do protocolo apresentado, ser possível efetuá-lo de forma relativamente simples (em relação ao nível de técnica laboratorial requerido) e pouco dispendiosa.

Há pouco mais de uma dezena de anos a imunidade inata era desprezada e pouco conhecida, considerada demasiado simples para poder fazer a diferença nas defesas de alguém com uma imunodeficiência como a provocada pelo HIV. Atualmente, a comunidade científica começa não só a perceber que estas ideias estavam erradas, como a tentar juntar informações relativas à imunidade inata a uma análise que se quer cada vez mais pormenorizada de um indivíduo infetado.

Este trabalho vem acrescentar meios a este ramo de estudo e fornecer um método eficaz para a análise da função e contribuição de um recetor bastante específico e de importância comprovada no combate às infeções fúngicas.

Agradecimentos

Agradece-se à Dra. Marta Mota, Técnica Superiora da Microbiologia da FMUC e à Maria João Silva, aluna de Mestrado, o apoio prestado na aferição do protocolo.

Referências Bibliográficas

1. Rosentul DC, Plantinga TS, Papadopoulos A, et al. Variation in genes of β -glucan recognition pathway and susceptibility to opportunistic infections in HIV-positive patients. *Immunol Invest*. 2011;40(7-8):735-50.
2. Fauci AS, Lane HC. Human Immunodeficiency Virus Disease: AIDS and Related Disorders. In: Kasper DL, editor. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw Hill Education Medical; 2015.
3. Lama J, Planelles V. Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression. *Retrovirology*. 2007;4:52.
4. Fellay J. Host genetics influences on HIV type-1 disease. *Antivir Ther (Lond)*. 2009;14(6):731-8.
5. Santa-Marta M, De Brito PM, Godinho-Santos A, Gonçalves J. Host Factors and HIV-1 Replication: Clinical Evidence and Potential Therapeutic Approaches. *Front Immunol*. 2013;4:343.
6. Soares R, Rocha G, Nogueira C, Meliço-Silvestre A, Gonçalves T. R77Q and Q3R HIV1-VPR mutations in an otherwise asymptomatic 5-year-old child with repeated ear infections. *JMM Case Reports*. 2014;1(4).
7. Li SS, Kyei SK, Timm-McCann M et al. The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients. *Cell Host Microbe* 2013; 14(4): 387-97.
8. Rohatgi S, Gohil S, Kuniholm MH et al. Fc gamma receptor 3A polymorphism and risk for HIV-associated cryptococcal disease. *Mbio* 2013; 4(5):e00573-13.
9. Brown GD, Meintjes G, Kolls JK, et al. AIDS-related mycoses: the way forward. *Trends Microbiol*. 2014;22(3):107-9.
10. Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med*. 1994;97(4):339-46.
11. Ong EL. Common AIDS-associated opportunistic infections. *Clin Med* 2008; 8(5): 539-43.
12. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(1):67-78.

13. Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003;19(3):311-5.
14. Rizzetto L, De filippo C, Rivero D, Riccadonna S, Beltrame L, Cavalieri D. Systems biology of host-mycobiota interactions: dissecting Dectin-1 and Dectin-2 signalling in immune cells with DC-ATLAS. *Immunobiology*. 2013;218(11):1428-37.
15. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga T et al. Human Dectin-1 Deficiency and Mucocutaneous Fungal Infections. *N Eng J Med* 2009; 361(18): 1760-7.
16. Chai LY, De boer MG, Van der velden WJ, et al. The Y238X stop codon polymorphism in the human β -glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 2011;203(5):736-43.
17. Sainz J, Lupiáñez CB, Segura-catena J, et al. Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e32273.
18. Usluogullari B, Gumus I, Gunduz E, et al. The role of Human Dectin-1 Y238X Gene Polymorphism in recurrent vulvovaginal candidiasis infections. *Mol Biol Rep*. 2014;41(10):6763-8.
19. Rosentul DC, Plantinga TS, Oosting M, et al. Genetic variation in the dectin-1/CARD9 recognition pathway and susceptibility to candidemia. *J Infect Dis*. 2011;204(7):1138-45.
20. Romani B, Engelbrecht S. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. *J Gen Virol*. 2009;90(Pt 8):1795-805.
21. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Basic Pathology*. Elsevier Health Sciences; 2012.
22. Plantinga TS, Hamza OJ, Willment JA, et al. Genetic variation of innate immune genes in HIV-infected african patients with or without oropharyngeal candidiasis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;55(1):87-94.
23. Garred P, Madsen HO, Balslev U, et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet*. 1997;349(9047):236-40.
24. Rohatgi S, Gohil S, Kuniholm MH, et al. Fc gamma receptor 3A polymorphism and risk for HIV-associated cryptococcal disease. *MBio*. 2013;4(5):e00573-13.
25. Zazzi M, Incardona F, Rosen-zvi M, et al. Predicting response to antiretroviral treatment by machine learning: the EuResist project. *Intervirology*. 2012;55(2):123-7.
26. Armstrong-james D, Meintjes G, Brown GD. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol*. 2014;22(3):120-7.