

## Relato de experiência

# Histórico da descoberta do agente etiológico do sarcoma de Kaposi – *Human Herpesvirus 8* e a atuação do Instituto Adolfo Lutz na pesquisa dessa infecção/doença

History of the discovery of the etiological agent of Kaposi's sarcoma – *Human Herpesvirus 8*, and the role of the Instituto Adolfo Lutz in researching this infection/disease

Adele Caterino-de-Araujo 

Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Coordenaria de Controle de Doenças, Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia, São Paulo, São Paulo, Brasil

## Autor para correspondência

Adele Caterino-de-Araujo

E-mail: [adele.caterino@ial.sp.gov.br](mailto:adele.caterino@ial.sp.gov.br)

Instituição: Instituto Adolfo Lutz (IAL)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 351, CEP: 01246-000. São Paulo, São Paulo, Brasil

## Como citar

Caterino-de-Araujo A. Histórico da descoberta do agente etiológico do sarcoma de Kaposi – *Human Herpesvirus 8* e a atuação do Instituto Adolfo Lutz na pesquisa dessa infecção/doença. BEPA, Bol. epidemiol. paul. 2024; 21: e41435. doi: <https://doi.org/10.57148/bepa.2024.v.21.41435>

Primeira submissão: 13/11/2024 • Aceito para publicação: 26/11/2024 • Publicação: 13/12/2024

Editora-chefe: Regiane Cardoso de Paula

## Resumo

No ano em que se comemoram os 30 anos da descoberta do agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK), na época denominado *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV), depois *Human Herpesvirus 8* (HHV-8), a autora descreve como se deu essa descoberta e a atuação do Instituto Adolfo Lutz na pesquisa do agente por meio de técnicas de biologia molecular – primeiro em material de biópsia estocado em parafina e depois em sangue, saliva e urina – e na caracterização de subtipos e variantes virais que circulavam em pacientes com SK associado à aids (SK-aids) em São Paulo e em populações indígenas da Amazônia brasileira. Ademais, relata a padronização de técnicas sorológicas *in house* (imunofluorescência indireta e *Western blotting*) usando como antígenos linhagens celulares contendo HHV-8 nas fases latente e lítica da infecção viral e soro ou sangue coletado em papel de filtro para pesquisa de anticorpos específicos. Os testes sorológicos e moleculares de melhor custo-benefício foram empregados em inquéritos epidemiológicos, e determinadas taxas de prevalência de HHV-8 em diferentes populações: crianças, profissionais da saúde, indivíduos com HIV/aids, profissionais do sexo feminino, pessoas com SK endêmico e epidêmico, ameríndios, indivíduos com insuficiência renal crônica e população de Moçambique. Estudos relacionados à patogênese do HHV-8 e sua associação com o HIV/aids possibilitaram observar que a terapia antirretroviral (TARV ou HAART) preveniu o surgimento de casos de SK-aids no Brasil e sugerir seu uso para controle do SK-aids na África. Por fim, foi confirmada a infecção por HHV-8 em um caso de linfoma de efusão em cavidades (*peripheral effusion lymphoma*, PEL).

**Palavras-chave:** KSHV, HHV-8, diagnóstico, prevalência, subtipos virais e sarcoma de Kaposi.

## Abstract

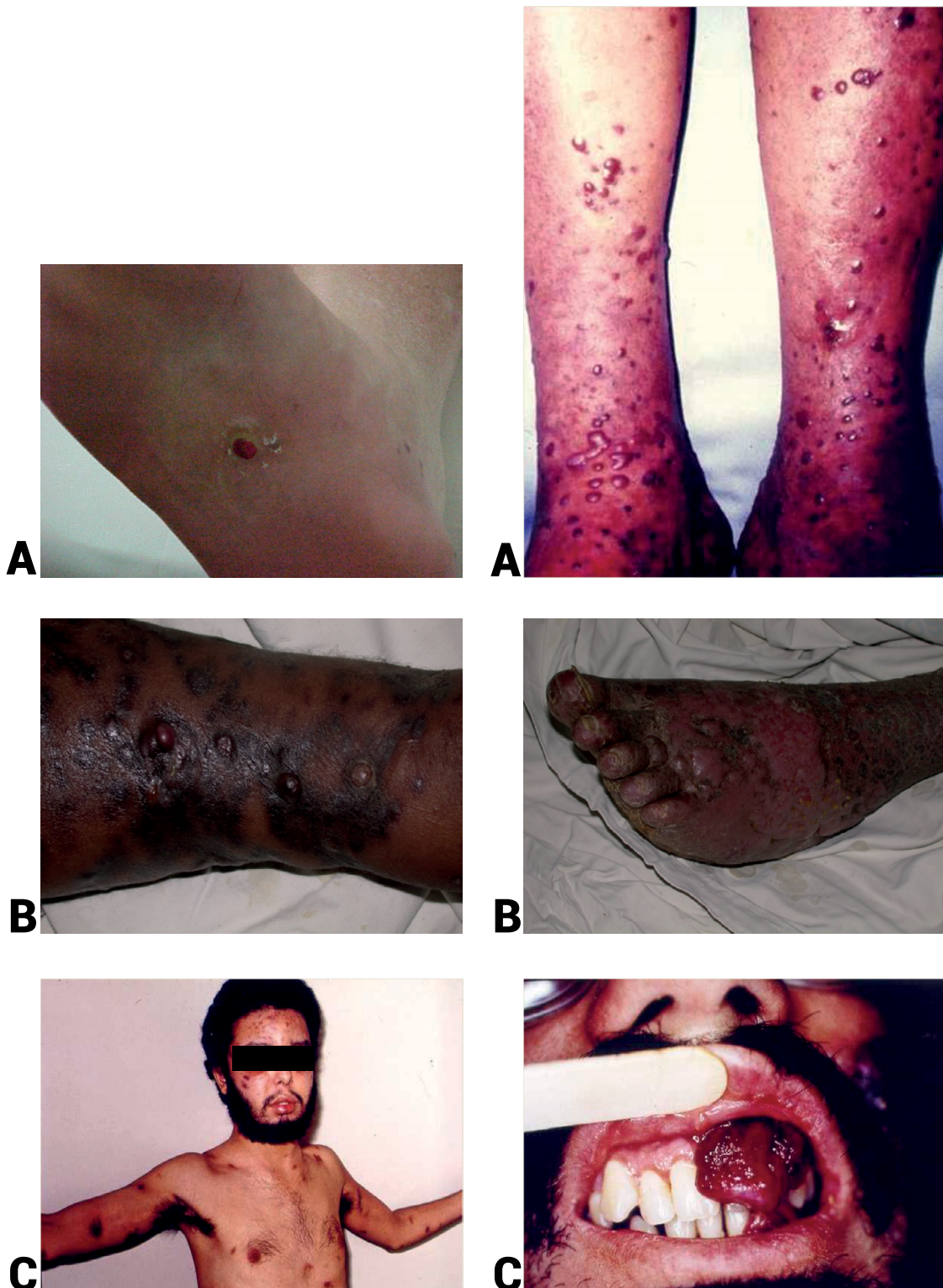
In the year in which we celebrate 30 years since the discovery of the etiological agent of Kaposi's sarcoma (KS), at the time named Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), later Human Herpesvirus 8 (HHV-8), the author reports on the role of the Instituto Adolfo Lutz in searching this agent using molecular biology techniques, first in biopsy material stored in paraffin and then in blood, saliva and urine, and in the characterization of subtypes and viral variants of HHV-8 that circulated in patients with KS associated with AIDS (KS-AIDS) in São Paulo, and in indigenous populations from the Brazilian Amazon. Furthermore, in-house serological techniques (indirect immunofluorescence and Western blotting) were standardized using cell lines containing HHV-8 in the latent and lytic phases of viral infection as antigens, and serum or blood collected on filter membrane to search for specific antibodies. The best cost/benefit serological and molecular tests were selected and employed in epidemiological surveys, and HHV-8 prevalence rates were determined in different populations: children, health professionals, individuals with HIV/AIDS, female sex workers, endemic and epidemic KS cases, Amerindians, individuals with chronic renal failure, and the general population of Mozambique. Based on studies related to the pathogenesis of HHV-8 and its association with HIV/AIDS, it was observed that the antiretroviral therapy prevented the emergence of KS-AIDS cases in Brazil and suggested its use to control KS-AIDS in Africa. Finally, HHV-8 infection was confirmed in a case of peripheral effusion lymphoma (PEL).

**Keywords:** KSHV, HHV-8, diagnosis, prevalence, viral subtypes, Kaposi's sarcoma.

## Histórico

Em 1872 Moritz Kaposi, um dermatologista húngaro que trabalhava em Viena, descreveu casos de uma doença angioproliferativa que se manifestava na pele, principalmente nos membros inferiores, como uma lesão única ou várias lesões, com aspecto de máculas e placas violáceas e em estágios mais avançados como nódulos. Essas lesões foram observadas em cinco homens com idade entre 40 e 68 anos, um dos quais foi a óbito por hemorragia gastrointestinal. As mesmas lesões foram identificadas por outro dermatologista em um menino de 10 anos; os seis casos foram publicados em um artigo escrito por Kaposi, em alemão, e a patologia foi denominada "*Idiopathisches multiples pigmentsarkom der haut*".<sup>1</sup> Em 1891, a doença recebeu o nome de *Kaposi's sarcoma*, em homenagem a seu descobridor, e o trabalho original foi traduzido para o inglês, "*Idiopathic multiple pigmented sarcomas of the skin*", e republicado em 1982.<sup>2</sup> Essa forma de sarcoma de Kaposi (SK) ficou conhecida como SK-clássico e ocorre mais em homens, a partir dos 50 anos, de países do Mediterrâneo (principalmente Itália e Grécia) e em pessoas de descendência judaica do Leste europeu. Nesses casos, a doença tem evolução lenta e geralmente não leva o paciente à morte. Além disso, apenas alguns indivíduos desenvolvem lesões em vísceras e mucosas. No decorrer dos anos, outras variantes clínico-epidemiológicas do SK foram descritas. Nos anos 1950, em países da África equatorial e no sul da África, desenvolve-se o SK-endêmico, que acomete pessoas negras de qualquer faixa etária. No sul da África, essa forma foi responsável por 25-50% dos sarcomas de tecidos moles em crianças. Nesse continente, o SK é mais agressivo, comprometendo vísceras e gânglios linfáticos. Entre os anos 1960 e 1970, surge o SK-iatrogênico, em consequência do advento dos transplantes e da introdução de terapia imunossupressora. Em dois terços dos casos em transplantados, a doença é indolente e pode apresentar remissão espontânea depois da suspensão da terapia. Nos outros casos, ela pode manifestar-se como doença grave, comprometendo mucosas, vísceras e gânglios linfáticos. Por fim, em 1981 foi relatado ao Center for Diseases Control and Prevetion (CDC) a forma epidêmica do SK associada à aids (KS-aids), em adultos jovens de Nova York e da Califórnia, principalmente em homens que faziam sexo com homens (HSH). Neles, a incidência de SK foi cerca de 20.000 vezes maior do que na população geral, e a doença foi considerada definidora de aids. Essa forma é considerada a mais grave da doença, com envolvimento da pele, vísceras e gânglios linfáticos levando o paciente a óbito por hemorragias.<sup>3,4</sup> A [Figura 1](#) retrata, em fotos ilustrativas, as várias formas clínico-epidemiológicas de SK em pacientes de São Paulo e de Moçambique.

Figura 1. Fotos representativas de casos de sarcoma de Kaposi (SK) clássico, endêmico e epidêmico.



Fonte: (A) SK-clássico, acervo: Instituto de Saúde e clínica particular Dr. Pedro Jabur; (B) SK-endêmico, Enfermaria de Dermatologia, Hospital Central de Maputo, Moçambique, acervo: Dra. Rolanda Carmen Rafael Manuel; (C) SK-epidêmico, Instituto de Infectologia Emílio Ribas, acervo: Dra. Luiza Keiko Oyafuso.

Passaram-se aproximadamente 120 anos para que o agente etiológico do SK fosse descoberto. Isso foi possível após a descrição de um método denominado *Representation difference analysis* (RDA), que usa como princípio básico a reação em cadeia da polimerase (PCR) e que identifica pequenas diferenças em DNAs homólogos.<sup>5</sup> Usando essa técnica, Chang e colaboradores, em 1994, compararam amostras de DNA obtidas de lesão de pele e amostras da pele íntegra de casos de SK-aids dos EUA e identificaram nas lesões uma região genômica de 1853 pares de base (pb) designadas KS 330 *Bam* e KS 631 *Bam*, que continham regiões abertas de leitura (*Open Reading Frames*, *ORF 26* e *ORF 75*, respectivamente), semelhantes às regiões que codificam as proteínas do capsídeo e tegumento de dois *Gammaherpesvirus*; o *Epstein-Barr virus* (EBV), relacionado ao linfoma de Burkitt e a tumores de nasofaringe em humanos, e o *Herpesvirus Saimiri* (HVS), responsável por um tipo de linfoma de células T, fulminante em macacos, sugerindo que as sequências encontradas na pele nos casos de SK-aids poderiam apresentar atividade oncogênica. Assim, foi padronizada uma PCR para identificar a *ORF 26*, denominada KS 330<sub>233</sub>; a *ORF 26* foi detectada em 90% das lesões da pele de casos de SK-aids e o vírus foi provisoriamente denominado KSHV (*Kaposi's sarcoma-associated virus*).<sup>6</sup>

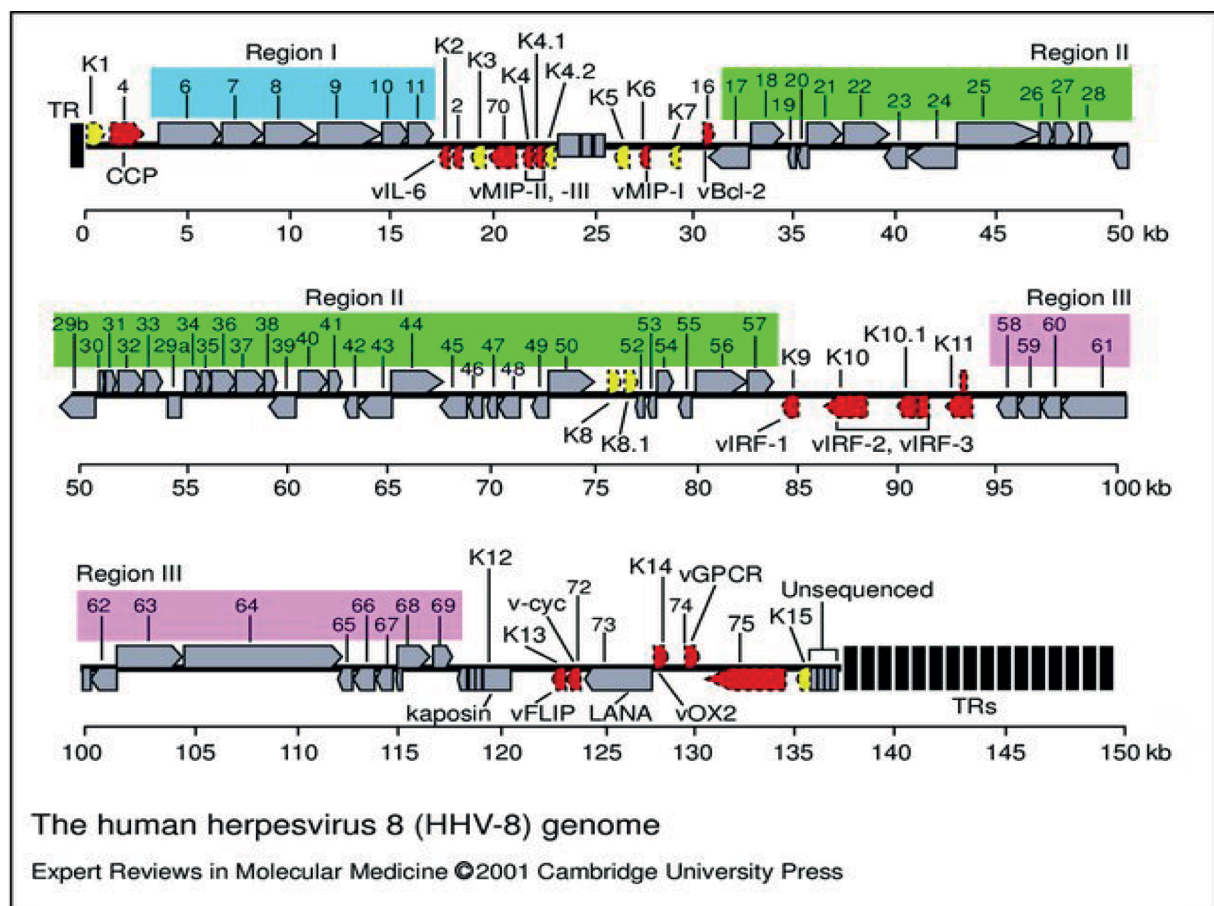
Para estabelecer a relação causal do SK ao KSHV, foi necessário preencher os postulados de Kock,<sup>7</sup> que consistem em uma sequência de procedimentos divididos em quatro etapas: associação constante do patógeno-hospedeiro, isolamento/cultivo, inoculação em modelo animal e reprodução dos sintomas e novo isolamento em cultura, mantendo as mesmas características do isolamento primário. Esses postulados foram preenchidos nos anos subsequentes. A *ORF 26* foi detectada em todas as variantes clínico-epidemiológicas do SK, em casos de SK de diferentes regiões geográficas, em vários espécimes biológicos, incluindo células endoteliais fusiformes (células características do SK denominadas de "*spindle cells*"), células B circulantes, células de linfoma de efusão em cavidades (pleura, pericárdio e peritônio), cujos linfomas em inglês são denominados BCBL ou PEL (*body cavity based lymphoma* ou *peripheral effusion lymphoma*), e em linfonodos na doença multicêntrica de Castleman associada à aids (MCD-aids). Como o novo agente não se restringia a casos de SK, e para manter a nomenclatura adotada para dois novos herpesvírus humanos recentemente descobertos, HHV-6 e HHV-7, o subcomitê do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus propôs denominá-lo Herpesvírus Humano 8 (*Human Herpesvirus 8*, HHV-8). O HHV-8 pertence à família *Herpesviridae*, sub-família *Gammaherpesvirinae*, gênero *Rhadinovirus*.

Em 1996, a partícula viral completa (vírion) foi identificada por microscopia eletrônica em líquido peritoneal de PEL-aids.<sup>8</sup> Posteriormente, o KSHV/HHV-8 foi isolado e transmitido para células B CD19+ de cordão, e essa linhagem recebeu o nome de BC-1, porém apresentava fragmentos genômicos de KSHV e EBV.<sup>9</sup> Para não haver reatividade cruzada, foram utilizadas células obtidas de PEL proveniente de duas mulheres HIV-soronegativas (uma delas com SK).<sup>10</sup> Com isso, foi possível estabelecer linhagens infectadas apenas pelo HHV-8, denominadas BC-3 e KS-1. A linhagem KS-1 foi inoculada em camundongo imunodeficiente e produziu ascite.<sup>11</sup> Em 1997, foram confirmadas a infecção pelo HHV-8 e sua manutenção em linhagem de células embrionárias de rim humano (HEK-293).<sup>12</sup> Em 1998, foi comprovado seu papel na etiologia do SK, quando se produziu tumor sólido em vários órgãos em

camundongo triplo imunodeficiente.<sup>13</sup> As linhagens celulares possibilitaram a obtenção de material para ser utilizado em ensaios sorológicos de imunofluorescência indireta (IFI), *Western blotting* (WB) e imunoenzimáticos (ELISA) e para sequenciamento e caracterização de subtipos virais.

A partícula viral completa do HHV-8 mede 150 nm de diâmetro e se caracteriza por apresentar um nucleocapsídeo de forma hexagonal que contém o material genético (DNA de fita dupla). Envolvendo o nucleocapsídeo há um material amorfo, rico em proteínas, denominado tegumento e um envelope contendo glicoproteínas de superfície.<sup>14,15</sup> Seu genoma é composto de um segmento longo de aproximadamente 170 Kb, no qual se encontram todas as *ORFs*. Nas extremidades desse segmento estão as regiões repetitivas (TR, *terminal repeats*), que controlam a formação do capsídeo.<sup>8</sup> As *ORFs* homólogas ao *Herpesvirus Saimiri* foram numeradas de 1 a 75; 15 *ORFs* únicas do HHV-8 receberam o prefixo K (*ORF K1* a *ORF K15*)<sup>16</sup> e mais quatro *ORFs* únicas do HHV-8, com valor decimal junto ao prefixo K (*ORFs K4.1*, *K4.2*, *K8.1* e *K10.1*)<sup>17</sup> (Figura 2).

Figura 2. Genoma do HHV-8 na forma linear.



Fonte: Foreman EK, 2001.<sup>18</sup>

Legenda: As áreas em azul, verde e rosa correspondem a genes conservados entre os *Rhadinovirus*, enquanto as intermediárias referem-se a genes específicos do HHV-8. As setas em vermelho mostram os genes que codificam proteínas semelhantes às humanas; as amarelas representam proteínas específicas do HHV-8.



proteínas relacionadas ao controle do crescimento e diferenciação celular, à inibição da apoptose e à regulação de sinais de transdução (Quadro 1).

**Quadro 1.** Genes do HHV-8 envolvidos no desenvolvimento do SK.

Gene	Proteína	Expressão	Propriedade Funcional	Potencial de transformação
K1	gpK1	Fase lítica	Sinalização, proliferação celular	Sim
K2	vIL-6	Fase latente	Citocina, proliferação celular	Desconhecido
K3/K5	MR1/MR2	Fase lítica	Internalização do CPH-I	Desconhecido
K4/4.1	vMIP-II, vMIP-III	Fase lítica	Quimiocina, angiogênese	Não
K6	vMIP-I	Fase lítica	Quimiocina, angiogênese	Não
K9/10/11	vIRF	Fase lítica	Inibição de IFN e expressão de CPH-I	Sim
K12	Kaposina A, B, C	Fase latente	Transformação de fibroblasto	Sim
K13/ORF71	vFLIP	Fase latente	Inibição de apoptose	Desconhecido
K14	vOX2	Fase lítica	Interação Fase-Fase, adesão	Desconhecido
K15	LMP	Fase latente	Sítio de ligação TRAF	Desconhecido
ORF4	CBP	Fase lítica	Controle do complemento, escape	Desconhecido
ORF16	vBcL-2	Fase lítica	Inibição da apoptose	Desconhecido
ORF72	v-cyc	Fase latente	Controle ciclo celular G1 → S	Não
ORF73	LANA	Fase latente	Controle do ciclo celular, persistência do epissoma viral	Desconhecido
ORF74	vGPCR/vIL-8	Fase latente	Proliferação, estimulação parácrina	Sim

Fonte: Caterino-de-Araujo A.

O Quadro 2 mostra quais *ORFs* codificam proteínas imunogênicas, que são utilizadas em ensaios sorológicos para a pesquisa de anticorpos de fase lítica e latente do HHV-8.

**Quadro 2.** Proteínas imunogênicas do HHV-8

Segmento do genoma HHV-8	Proteínas codificadas
ORF6	Ligante do DNA
ORF8	gp B ligante celular
ORF9	DNA polimerase
ORF25	Proteína de capsídeo principal
ORF26	Proteína de capsídeo menor
ORF59	Proteína de replicação de DNA
ORF65	Proteína de capsídeo
ORF73	LANA
ORF K8.1	gp classe1

Fonte: Caterino-de-Araujo A.

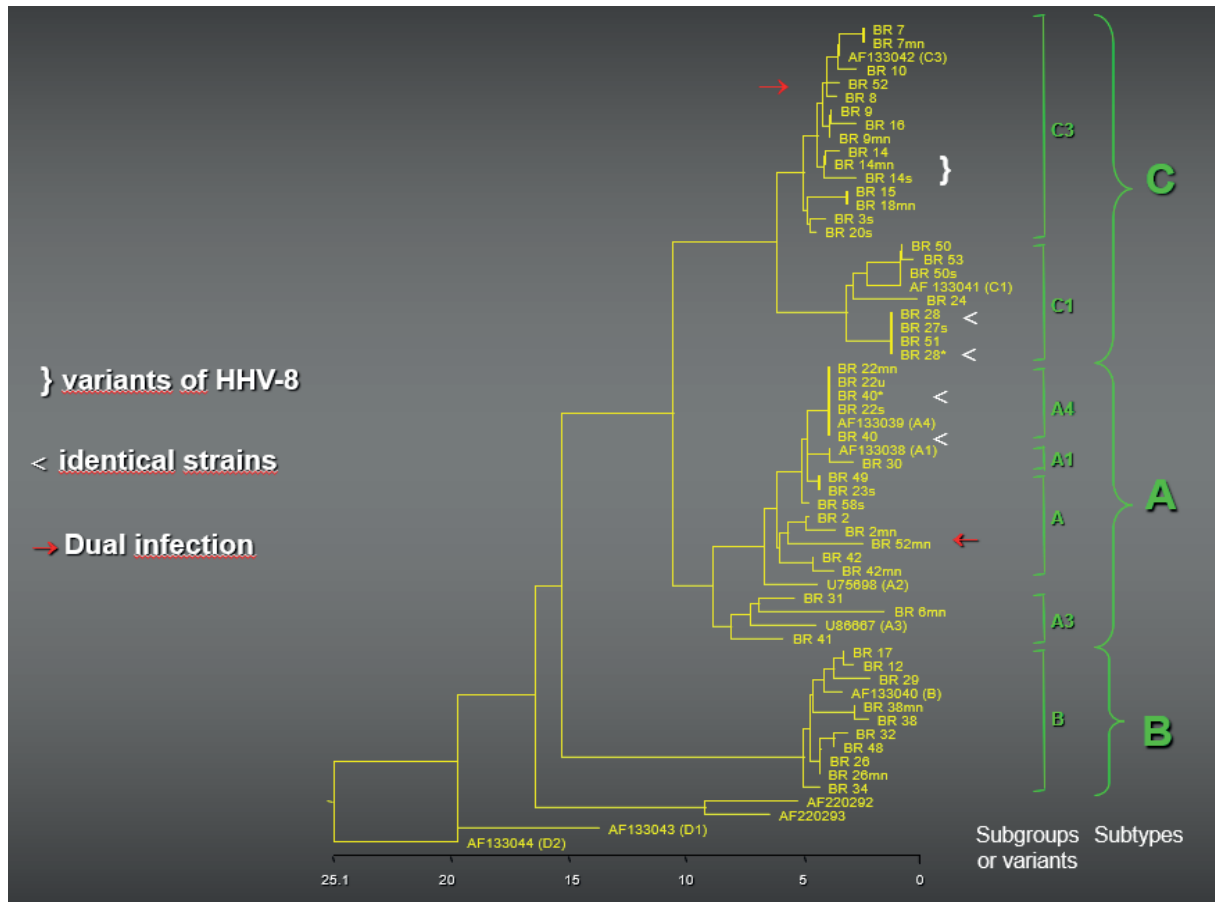


## Atuação do IAL em Biologia molecular

Em dezembro de 1994, após a descoberta do KSHV em lesão de pele de casos de SK-aids,<sup>6</sup> a autora deste manuscrito encontrava-se em programa de pós-doutorado em Biologia molecular no exterior (Instituto de Oncologia da Universidade de Pádua, IO-UP, Itália). Imediatamente, esse Instituto padronizou a PCR *ORF 26* e a empregou em material estocado de casos de SK-clássico italianos, confirmando a presença do KSHV nas lesões. Em seguida, o Prof. Luigi Chieco-Bianchi, diretor do IO, mostrou interesse em estudo colaborativo para pesquisa de KSHV em casos de SK de São Paulo. Houve concordância do Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, então diretor da Divisão de Patologia do IAL, e sete amostras de lesão estocadas em parafina de SK-aids de São Paulo foram analisadas, confirmando a presença do KSHV/HHV-8. O trabalho recebeu o prêmio P. Spiegel sobre aids e câncer durante a II Convenção Latino-Americana da ESO (European School of Oncology), em São Paulo, 1997, por ser pioneiro na América Latina,<sup>20</sup> e foi publicado.<sup>21</sup> Para confirmar tratar-se de HHV-8, foi realizado sequenciamento do fragmento *ORF 26*, que revelou pequenas alterações em relação às sequências de SK-clássico e semelhança com as sequências de SK-aids dos EUA e SK-endêmico africano. Esses vírus foram classificados como variantes dos subtipos B e C, e esse foi o primeiro trabalho de caracterização molecular de HHV-8 do Brasil publicado.<sup>22</sup>

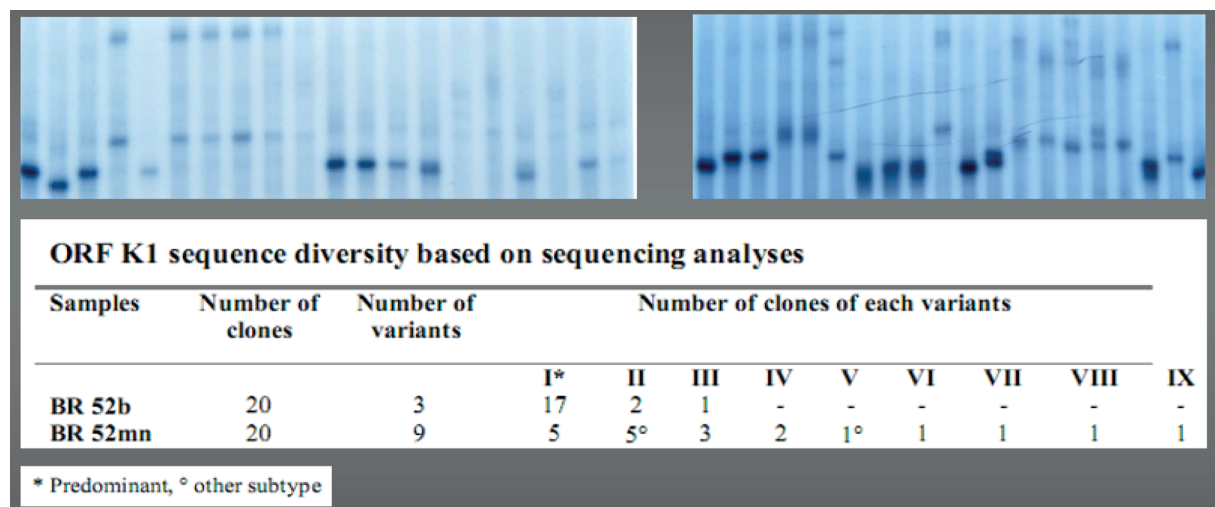
Em 2000, foi conduzido outro programa de pós-doutorado pela autora deste manuscrito no Public Health Laboratory Service (PHLS) de Londres, objetivando identificar e caracterizar os HHV-8 que circulavam em São Paulo. Foram usadas amostras de biópsia, sangue, saliva e urina de casos de SK-aids do IIER. A PCR empregada nessa pesquisa foi direcionada ao segmento *ORF K1*, regiões hipervariáveis VR1 e VR2, seguida de clonagem e sequenciamento Sanger de três clones de cada amostra amplificada. Foram detectados os subtipos A, B e C e um caso (BR52) de infecção por dois subtipos virais: A em células mononucleares (CMNs) e C em biópsia ([Figura 4](#), setas em vermelho). Para confirmar esses achados e descartar a hipótese de contaminação, foi realizada a técnica SSCP (*single strand conformational polymorphism*), que detecta alteração em um único nucleotídeo na corrida eletroforética em gel de poliacrilamida usando material radioativo. A avaliação de 20 clones de cada amostra revelou presença de três variantes de HHV-8 no material de biópsia e nove nas CMNs. O sequenciamento confirmou infecção por dois subtipos virais no sangue: A e C ([Figura 5](#)). É importante destacar que, no período, foram depositadas 33 sequências de HHV-8 em GenBank (números de acesso: AF 282184 a AF 282216) quando havia apenas 100 sequências depositadas por outros países nesse banco de dados.

Figura 4. Árvore filogenética de sequências ORF K1 (região VR1) de HHV-8 obtidas de casos de SK-aids de São Paulo.



Fonte: Caterino-de-Araujo A, 2000.

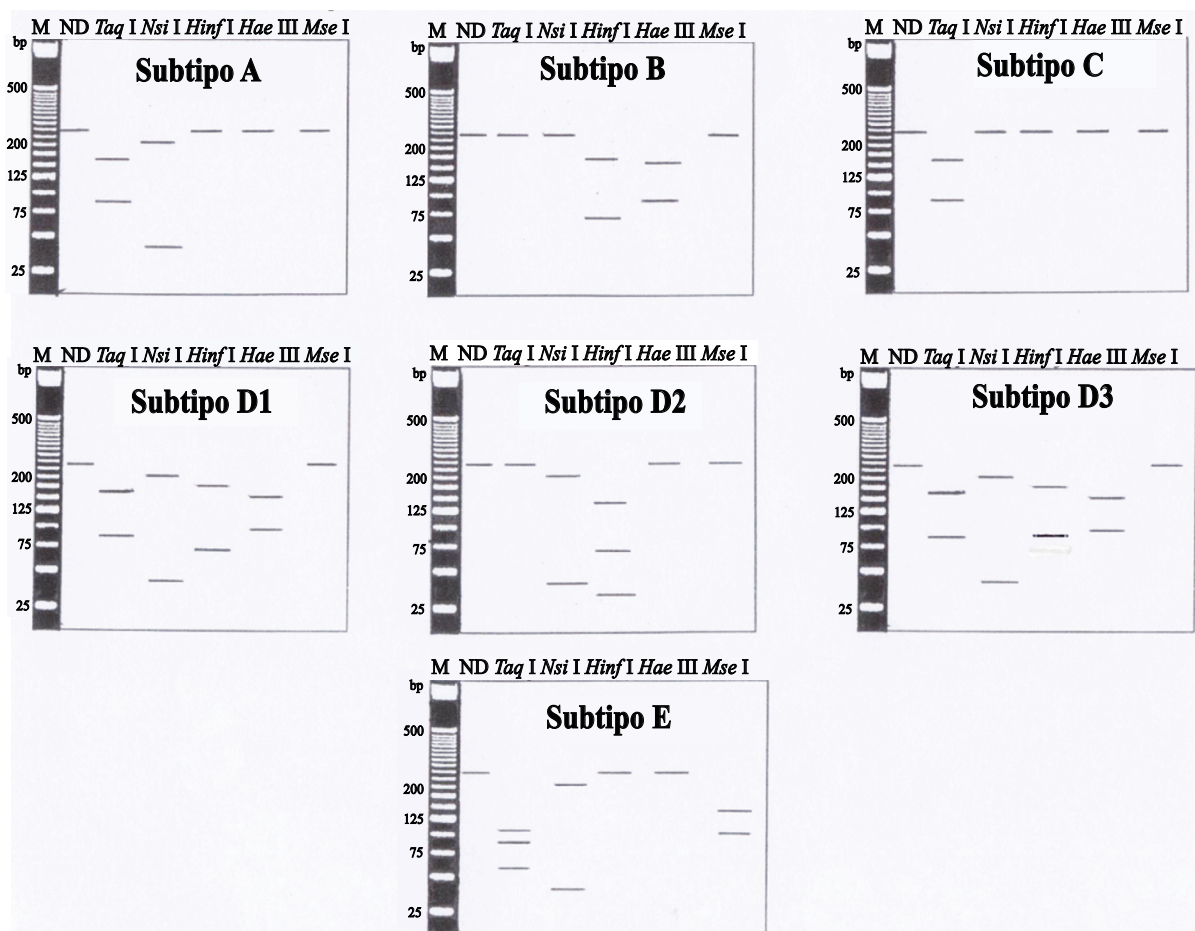
Figura 5. Variabilidade genética de HHV-8 intra-hospedeiro em paciente com SK-aids de São Paulo.



Fonte: Caterino-de-Araujo A, 2000.

Retornando ao Brasil e visando diminuir custos na caracterização molecular de HHV-8, foram pesquisados sítios de restrição enzimática em segmento da *ORF K1*, quando foram selecionadas cinco enzimas (*Taq I*, *Nsi I*, *Hinf I*, *Hae III* e *Mse I*) capazes de diferenciar os subtipos A, B, C e E, o último detectado em indígenas da Amazônia. Como os produtos de digestão tinham pequeno peso molecular, foi utilizada a eletroforese em gel de poliácridamida e coloração com brometo de etídio para visibilizar as bandas quando expostas à luz ultravioleta. O cálculo do tamanho dos fragmentos obtidos foi feito com base em marcadores de peso molecular (25 pb e 100 pb). Os resultados com a nova técnica, denominada PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism analyses*), corroboraram os do sequenciamento, podendo ser empregada para subtipagem de HHV-8 (Figura 6). A padronização, a validação e o emprego da técnica resultaram em dissertação de mestrado, defendida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP).<sup>23</sup> A PCR-RLFP foi empregada em outros estudos e confirmou a presença do subtipo B em casos de SK-aids de Salvador; subtipos A, B e C em SK-aids de Campinas; subtipos A, B, C e E em SK-aids de São Paulo; subtipo A em indígenas Waiãpi subtipo E das etnias Tiriyo e Parakanã.<sup>23,24</sup>

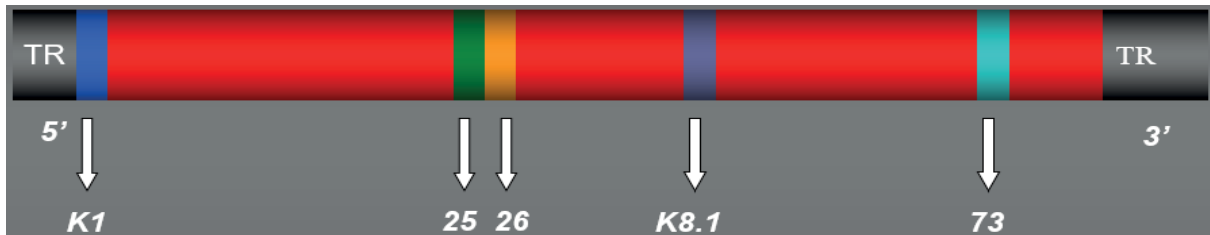
Figura 6. Painel representativo do perfil de restrição dos principais subtipos de HHV-8 descritos em literatura



Fonte: Moreira e Caterino-de-Araujo, 2003.<sup>23</sup>

Em 2000, havia incerteza quanto a fluidos biológicos potencialmente infectantes e sua relação com vias de transmissão do HHV-8. Assim, decidiu-se no IAL pesquisar segmentos estrategicamente posicionados ao longo do genoma do HHV-8 (Figura 7, *ORF K1*, *ORF 25*, *ORF 26*, *ORF K8.1* e *ORF 73*) em amostras de sangue, saliva e urina, além do controle positivo (biópsia) em casos de SK-aids, SK-endêmico, SK-clássico e em populações expostas a risco de adquirir essa infecção.

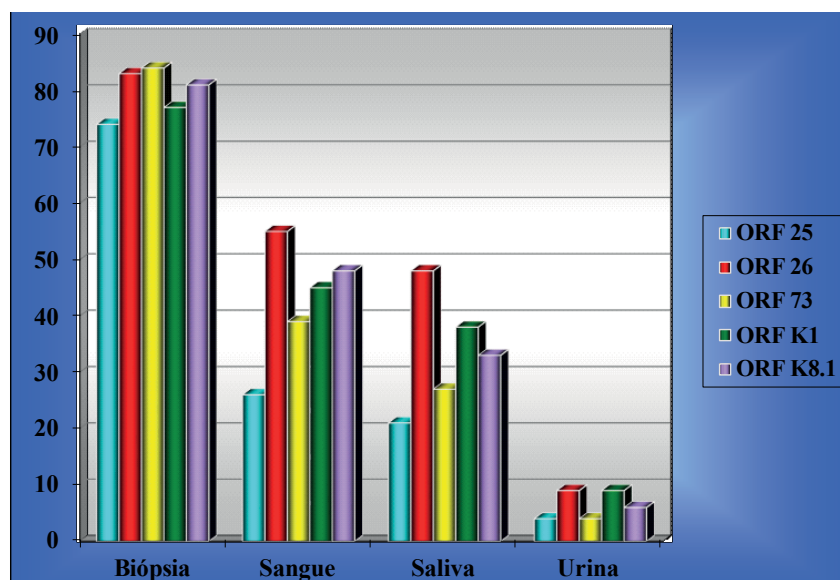
Figura 7. Regiões do genoma HHV-8 utilizadas na pesquisa de fluido potencialmente infectante.



Fonte: Santos-Fortuna e Caterino-de-Araujo, 2005.<sup>25</sup>

Os resultados obtidos com amostras de sangue, saliva e urina mostraram que todos tinham potencial infectante, ou seja, continham genes essenciais para manutenção e proliferação viral (Figura 8). Esses resultados, associados à caracterização molecular dos HHV-8, propiciaram uma tese de doutorado, defendida na FCF-USP.<sup>25</sup> Ademais, o encontro de HHV-8 em urina corroborou dados do Mallawi e fez sugerir a urina como fonte de transmissão, principalmente em crianças, por causa da falta de água e das condições precárias de higiene em alguns países do continente africano.<sup>26</sup>

Figura 8. Percentual de positividade para pesquisa de segmentos *ORF 25*, *ORF 26*, *ORF 73*, *ORF K1* e *ORF K8.1* em amostras de sangue, saliva e urina de casos de sarcoma de Kaposi de São Paulo.



Fonte: Santos-Fortuna e Caterino-de-Araujo, 2005.<sup>25</sup>

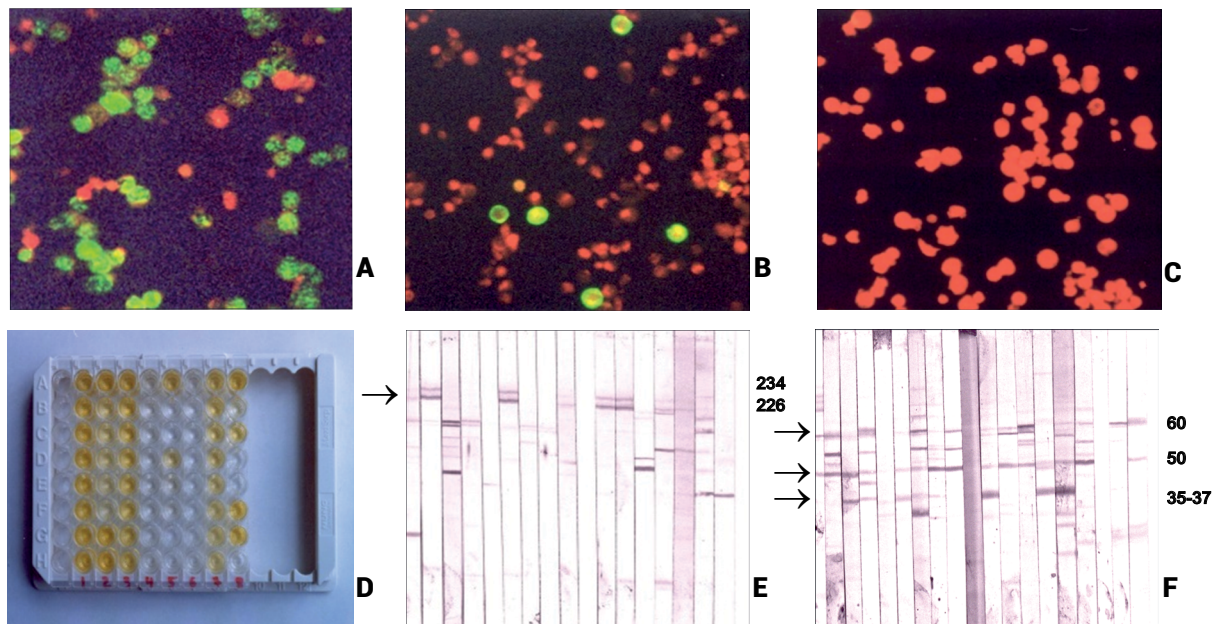
## Atuação do IAL em sorologia

Estudos sorológicos tiveram início em 1999 durante visita-trabalho da autora ao IO-UP. Usando linhagem BCP-1 na reação de IFI e amostras de soro de 162 indivíduos com HIV/aids do IIER e 81 doadores de sangue de São Paulo, foi possível detectar positividade para anticorpos de fase latente em 16% dos casos HIV/aids (variando de 30,4% em homossexuais e bissexuais masculinos a 7,8% em mulheres heterossexuais) e em 7,8% dos doadores de sangue de São Paulo.<sup>27</sup>

Para aumentar a casuística de estudo e verificar se esses anticorpos tinham valor para prever o surgimento do SK, foi realizado um estudo com 493 pacientes HIV/aids do IIER que vinham sendo acompanhados e recebendo terapia antirretroviral desde 1996 (TARV/HAART). Usando ELISA comercial para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8, foi detectada a prevalência de 17,2% (variando de 34,1% a 0%, dependendo do risco de adquirir o HIV). Analisando retrospectivamente (cinco anos) os prontuários desses pacientes, foram constatados 10 casos de SK em homossexuais/bissexuais masculinos e um caso em usuário de drogas. Um paciente cujos exames resultaram negativos para agentes bacterianos, foi a óbito por empiema pleural (pode ter sido um caso de PEL). O pequeno percentual de casos com SK (2%) vistos nessa população após a introdução da TARV/HAART contrasta com os 20% detectados no mesmo hospital durante a epidemia de aids e com a positividade de 17,2% de infecção pelo HHV-8. Isso fez supor que a TARV/HAART poderia controlar a replicação do HHV-8. Esses resultados foram imediatamente publicados na revista AIDS,<sup>28</sup> e o trabalho selecionado para apresentação oral na XIII Conferência Internacional de AIDS, em Durban, na África do Sul.<sup>29</sup> Após alguns anos, foi confirmado o papel da TARV/HAART no controle do crescimento, desenvolvimento e progressão da infecção pelo HHV-8 para o SK, assim como os possíveis mecanismos de ação. Com base nesses achados e na experiência brasileira de controle do HIV/aids e indiretamente do SK-aids, foi redigida uma nota dando ênfase ao uso da TARV/HAART na África para controlar a aids e o SK-aids.<sup>30</sup>

Devido ao alto custo do ELISA comercial, um novo desafio se impôs ao IAL: padronizar técnicas *in house* para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8. Usando linhagem BCBL-1 latentemente infectada pelo HHV-8 e estimulada com éster de forbol, foram produzidas lâminas para IFI-LANA e IFI-Lítico e os lisados virais empregados no WB (Figura 9). Os resultados obtidos revelaram baixa especificidade da IFI-LANA, devendo ser usado o teste confirmatório de WB-LANA. Já a IFI-Lítico prescindiu do teste confirmatório, podendo ser usada isoladamente. A padronização e o emprego dessas técnicas resultaram em dissertação de mestrado, defendida na FCF-USP.<sup>31</sup>

Figura 9. Ensaios sorológicos para detecção de infecção por HHV-8.



Fonte: Carbone e Caterino-de-Araujo, 2003.<sup>31</sup>

Legenda: **A**, IFI –LANA; **B**, IFI-Lítico; **C**, controle negativo; **D**, reação de ELISA; **E**, WB-LANA (ORF 73, Ag 226-234 KDa); **F**, WB-Lítico (ORF 65, ORF 59, ORF K8.1, Ags 60, 50, e 35-37 KDa, respectivamente).

Com as técnicas otimizadas, foram conduzidos estudos em diferentes populações e determinada a percentagem de casos HHV-8 soropositivos:

- crianças nascidas de mães HIV/aids (10,9%);<sup>32</sup>
- mulheres com HIV/aids (8,6%), gestantes com HIV/aids (7,4%) e mulheres profissionais da saúde sadias (1,5%);<sup>33</sup>
- população indígena (etnia Tiriýó, 57%; etnia Waiãpi, 55%) com percentual semelhante entre homens e mulheres;<sup>34</sup>
- profissionais do sexo feminino de Imbituba, SC (6,4%);<sup>35</sup>
- crianças atendidas em hospitais do Rio de Janeiro, HIV-negativas (7,6%), HIV-positivas (30,7%);<sup>36</sup>
- pacientes em hemodiálise e fila de transplante renal da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (22,9%);<sup>37,38</sup>
- indivíduos com doença renal crônica do Hospital do Rim e Hipertensão e Casa da Diálise da UNIFESP (18,0%) com 18,9% no grupo que estava em hemodiálise, 14,8% no grupo em diálise peritoneal e 17,7% no grupo conservador.<sup>39</sup> Vale destacar que, na doença renal crônica, houve associação significativa entre resultado HHV-8

soropositivo e ter realizado transplante prévio e ter contraído sífilis. A diálise não se associou ao HHV-8.<sup>39</sup>

Em 2007, com a *expertise* acumulada e tomando como base dados da literatura que apontavam a inexistência de levantamento sobre o HHV-8 em Moçambique, foram realizados uma missão exploratória, para ter ideia da magnitude do problema, e um projeto, para determinar a prevalência de HHV-8 no país. Para tanto, havia um desafio: como coletar as amostras de sangue e armazená-las de modo que permanecessem em condição de uso no Brasil? Assim, foi otimizada no IAL a reação de IFI-LANA e IFI-Lítico para ser usada em elauto de sangue coletado por punção digital e armazenado em papel de filtro.<sup>40</sup> Durante a missão exploratória realizada no Hospital Central de Maputo, foi feito o primeiro levantamento, que inclui vários grupos e cujas porcentagens de positividade na sorologia foram: estudantes de medicina (1,8%); funcionários do hospital (9,7%); pacientes atendidos no ambulatório de dermatologia (16,4%); e pacientes internados na Enfermaria de Dermatologia (47,1%).<sup>41</sup>

Para determinar a prevalência de HHV-8 na população geral de Moçambique, foram selecionados dois centros de saúde de cada região geográfica (norte, central e sul): um na zona rural e outro na zona urbana. Os resultados obtidos mostraram 21,4% de soropositividade na população geral, sendo 18,7% em Nampula (região norte), 24,3% em Beira (região central) e 21,4% em Maputo (região sul).<sup>42</sup> A prevalência aumentou com a idade e esteve associada com número de irmãos (região norte); gênero masculino, número de agregados familiar e local de atendimento (região central); número de agregados e *status* HIV (região sul). Vale ressaltar que, na época, Moçambique vivenciava uma epidemia de aids, com cerca de 20% da população infectada. No entanto, a experiência nos postos de saúde revelou que o percentual era maior, pois houve diferença entre o resultado da entrevista e a realização de sorologia para o HIV, ou seja, muitos desconheciam seu *status* HIV.<sup>42</sup> Foram comparados os títulos de anticorpos LANA e Lítico em diferentes populações e observadas associações com desenvolvimento de KS e títulos de anticorpos mais elevados em KS-aids.<sup>43,44</sup> Em conjunto, os resultados obtidos em Moçambique alertaram as autoridades sobre a necessidade de implementar a sorologia para HIV e a TARV/HAART no país, para se evitar uma explosão de casos de SK-aids nos anos subsequentes.

Finalizando, foi possível confirmar um caso de PEL do IIER utilizando-se as técnicas sorológicas e moleculares desenvolvidas no IAL em sangue e líquido pleural.<sup>45</sup>

## Agradecimento

Ao Instituto Adolfo Lutz (IAL), pelas oportunidades e confiança. Às instituições parceiras no Brasil e exterior, em especial às Dras. Luiza Keiko Oyafuso e Rosana Del Bianco do Instituto de Infectologia Emílio Ribas; ao Dr. Pedro Jabur da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e ao Dr. Sérgio Antonio Draibe e Dra. Maria Eugênia Fernandes Canziani da Unifesp; ao Dr. Luigi Chieco-Bianchi do Instituto de Oncologia da Universidade de Pádua; ao Dr. Chong Gee-Teo e Dra. Cristina Bez do Public Health Laboratory Service de Londres; à Dra. Rolanda Carmen Rafael Manuel e Dr. Rui Bastos da Enfermaria de Dermatologia do Hospital Central de Maputo, Moçambique. Às agências de fomento à pesquisa (Fapesp e CNPq). A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização dos trabalhos, em especial aos pacientes e aos alunos de pós-graduação.

## Referências

1. Kaposi M. Idiopathisches multiples pigmentsarkom der haut. Arch. f. Dermat. 1872;4:265-73. <https://doi.org/10.1007/BF01830024>.
2. Kaposi M. Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin. CA Cancer J Clin. 1982;32(6):342-7. <https://doi.org/10.3322/canjclin.32.6.342>.
3. Haverkos HW, Curran JWC. The current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. CA Cancer J Clin. 1982;32(6):330-9. <https://doi.org/10.3322/canjclin.32.6.330>.
4. CDC. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia Among Homosexual Men – New York City and California. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Centers for Disease Control. 1981;30(25):305- 8. [acesso em 4 outubro 2024] Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/23300179>.
5. Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. Science. 1993;259(5097):946-51. <https://doi.org/10.1126/science.8438152>.
6. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science. 1994; 266(5192):1865-9. <https://doi.org/10.1126/science.7997879>.
7. Koch R. Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus anthracis [Investigations into bacteria: V. The etiology of anthrax, based on the ontogenesis of Bacillus anthracis] (PDF). Cohns Beitrage zur Biologie der Pflanzen (em alemão). 1876; 2(2):277–310 [https://pt.wikipedia.org/wiki/Postulados\\_de\\_Koch](https://pt.wikipedia.org/wiki/Postulados_de_Koch).
8. Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D, et al. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. Nat Med. 1996 Mar;2(3): 342-6. <https://doi.org/10.1038/nm0396-342>.



9. Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett DN, *et al.* Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J Exp Med.* 1996 May 1;183(5):2385-90. <https://doi.org/10.1084/jem.183.5.2385>.
10. Said JW, Tasaka T, Takeushi S, Asou H, Vos S, Cesarman E, *et al.* Primary effusion lymphoma in women: Report of two cases of Kaposi's sarcoma herpes virus-associated effusion-based lymphoma in human immunodeficiency virus-negative women. *Blood* 1996;88(8):3124-8. <https://doi.org/10.1182/blood.V88.8.3124.bloodjournal8883124>.
11. Said JW, Chien K, Takeuchi S, Tasaka T, Asou H, Cho SK, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV or HHV8) in primary effusion lymphoma: Ultrastructural demonstration of herpesvirus in lymphoma cells. *Blood* 1996; 87(12): 4937-43. <https://doi.org/10.1182/blood.V87.12.4937.bloodjournal87124937>.
12. Foreman KE, Friborg J, Kong W-P, Woffendin C, Polverini PJ, Nickoloff BJ, *et al.* Propagation of a Human Herpesvirus from AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. *N Engl J Med.* 1997;336(3):163-71. <https://doi.org/10.1056/NEJM199701163360302>.
13. Boshoff C, Gao S-J, Healy LE, Matthews S, Thomas AJ, Coignet L, *et al.* Establishing a KSHV+ cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterizing its growth in Nod/SCID mice. *Blood.* 1998;91(5):1671-79. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.5.1671>.
14. Renne R, Lagunoff M, Zhong W, Ganem D. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J Virol.* 1996;70(11):8151-4. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.11.8151-8154.1996>.
15. Said J W, Chien K, Tasaka T, Koeffler HP. Ultrastructural characterization of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in Kaposi's sarcoma lesions: electron microscopy permits distinction from cytomegalovirus (CMV). *J Pathol.* 1997;182(3):273-81. [acesso em 8 novembro 2024]. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199707\)182:3<273::AID-PATH835>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199707)182:3<273::AID-PATH835>3.0.CO;2-P).
16. Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, *et al.* Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14862-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14862>.
17. Neipel F, Albrecht JC, Fleckenstein B. Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity? *J Virol.* 1997;71(6):4187-92. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.6.4187-4192.1997>.
18. Foreman KE. Kaposi's sarcoma. The role of HHV-8 and HIV-1 in pathogenesis. In: *Reviews in molecular medicine.* ED Cambridge, 2001. [acesso em 8 novembro 2024]. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/7084794\\_Kaposi's\\_sarcoma\\_The\\_role\\_of\\_HHV-8\\_and\\_HIV-1\\_in\\_pathogenesis/figures](https://www.researchgate.net/publication/7084794_Kaposi's_sarcoma_The_role_of_HHV-8_and_HIV-1_in_pathogenesis/figures).
19. Sharp TV, Boshoff C. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: from cell biology to pathogenesis. *IUBMB Life.* 2000;49: 97-104. [acesso em 8 novembro 2024]. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/12539340\\_Sharp\\_TV\\_Boshoff\\_C\\_Kaposi's\\_sarcoma-associated\\_herpesvirus\\_from\\_cell\\_biology\\_to\\_pathogenesis\\_IUBMB\\_Life\\_49\\_97-104/figures](https://www.researchgate.net/publication/12539340_Sharp_TV_Boshoff_C_Kaposi's_sarcoma-associated_herpesvirus_from_cell_biology_to_pathogenesis_IUBMB_Life_49_97-104/figures).
20. Caterino-de-Araujo A, Calabrò ML, Favero A, Santos-Fortuna E, Bertorelle R, Del Mistro A, *et al.* Detection of herpesvirus-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma tissues obtained from Brazilian AIDS patients. In: *Anais da 2a Convenção Educativa Latino-Americana da European School of Oncology;* 1997; São Paulo, SP, Brasil. 1997. Abstracts, G1, p. 91. Prêmio P. Spiegel sobre AIDS e Câncer.

21. Caterino-de-Araujo A, Calabrò ML, Favero A, Santos-Fortuna E, Del Mistro A, Alves VAF, *et al.* Detection of herpes virus (KSHV) DNA sequences in Brazilian patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Brazilian J Infect Dis.* 1997;1(5): 256-9. [acesso em 8 novembro 2024]. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/12223199\\_Detection\\_of\\_Herpes\\_Virus\\_KSHV\\_DNA\\_Sequences\\_in\\_Brazilian\\_Patients\\_With\\_AIDS-Associated\\_Kaposi's\\_sarcoma](https://www.researchgate.net/publication/12223199_Detection_of_Herpes_Virus_KSHV_DNA_Sequences_in_Brazilian_Patients_With_AIDS-Associated_Kaposi's_sarcoma).
22. Caterino-de-Araujo A. Human herpesvirus 8 group B and C variants circulating in São Paulo, Brazil. *J Infect Dis.* 1998;177(4):1136-7. <https://doi.org/10.1086/515242>.
23. Moreira AA, Caterino-de-Araujo A. Pesquisa de sítios de restrição enzimática em segmento da ORF K1 do genoma de herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em isolados clínicos de São Paulo: relação com subtipos virais e implantação da técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism analyses) para determinar subtipos virais. Resumo de dissertação. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2003;62(2):140. [acesso em 8 novembro 2024]. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/34931/33429>.
24. Cunha AMG, Costa SCB, Costa FF, Caterino-de-Araujo A, Galvão-Castro B. Serological and molecular detection of HHV-8 in Brazilian populations. *Brazilian J Infect Dis.* 2005;9(5):442. [acesso em 11 novembro 2024]. Disponível em: <https://search.scielo.org/?lang=pt&q=au:%22Cunha,%20Andr%C3%A9%20Mendon%C3%A7a%20Gusm%C3%A3o%22>.
25. Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): Estudo de segmentos alvo do genoma viral em amostras de sangue, saliva e urina de pacientes infectados pelo HIV/aids, com e sem Sarcoma de Kaposi. Resumo de Tese. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2005;64(4):278. [acesso em 8 novembro 2024]. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/32999/31831>.
26. Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Confirming shedding of human herpesvirus 8 in urine from Brazilian infected patients. *J Clin Microbiol.* 2005;3(2):1008. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.1008.2005>.
27. Caterino-de-Araujo A, Calabrò ML, Santos-Fortuna E, Suleiman J, Chieco-Bianchi L. Searching for human herpesvirus 8 antibodies in serum samples from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 and blood donors from São Paulo, Brazil. *J Infect Dis.* 1999;179:1591-2. <https://doi.org/10.1086/314789>.
28. Caterino-de-Araujo A, Carbone PHL, Martinelli FLB, Santos-Fortuna E, Moreira AA, Suleiman J, *et al.* Absence of an association between the presence of HHV-8 antibodies and the development of Kaposi's sarcoma in HIV-1-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS.* 2000;14:1455-7. <https://doi.org/10.1097/00002030-200007070-00022>.
29. Caterino-de-Araujo A, Carbone PHL, Martinelli FLB, Santos-Fortuna E, Moreira AA, Suleiman J, *et al.* Lack in detecting an association between the presence of human herpesvirus 8 antibodies and the development of Kaposi's sarcoma in HIV-1-infected patients receiving anti-retroviral therapy. *In: XIII International AIDS Conference, Durban, South Africa, 2000. Abstract Book Volume II, WeOrA474, p.4.*
30. Caterino-de-Araujo A. The fight against Kaposi's sarcoma in AIDS – Lessons from Brazil. *S Afr J HIV Med.* 2007;26:5354. <https://doi.org/10.4102/sajhivmed.v8i1.632>.
31. Carbone PHL, Caterino-de-Araujo A. Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): Prevalência em populações sob risco epidemiológico e população sadia de São Paulo. Resumo de Dissertação. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2003;62(2):141. [acesso em 8 novembro 2024]. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/34932/33430>.

32. Caterino-de-Araujo A, Cibella SEL. Searching for antibodies to HHV-8 in children born to HIV-1 infected mothers from São Paulo, Brazil. Relationship to maternal infection. *J Trop Pediatr.* 2003;49(4):247-50. <https://doi.org/10.1093/tropej/49.4.247>.
33. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Carbone PHL, Cibella SE, Moreira AA. Human herpesvirus 8 (HHV-8) antibodies among women from São Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. *Brazilian J Infect Dis.* 2003;7(6):395-401. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702003000600007>.
34. Cunha AMG, Caterino-de-Araujo A, Costa SCB, Santos-Fortuna E, Boa-Sorte NCA, Gonçalves MS, et al. Increasing seroprevalence of Human herpesvirus 8 (HHV-8) with age confirms HHV-8 endemicity in Amazon Amerindians from Brazil. *J Gen Virol.* 2005;86(9):2433-7. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81087-0>.
35. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Magri MC, Schuelter-Trevisol F, Silva MV. Latent Human Herpesvirus – 8 (HHV-8) infection in female commercial sex workers from Imbituba, Santa Catarina, Brazil. *Brazilian J Infect Dis.* 2007;1(1):9-11. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702007000100004>.
36. Avelleira J C R, Lupi O, Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E. Seroprevalence of HHV-8 infection in the pediatric population of two university hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dermatol.* 2006;45:381-3. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2006.02523.x>.
37. Magri MC, Caterino-de-Araujo A. Pesquisa da Prevalência de Anticorpos Anti-HHV-8 em Pacientes em Diálise e em Fila de Transplante Renal. *BEPA, Bol. epidemiol. paul.* 2006; 3(36): 1-5. [acesso em 21 outubro 2024] Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/38783/36510>
38. Caterino-de-Araujo A., Magri MC, Santos-Fortuna E, Souza JF, Sens YAS, Pedro J. Human herpesvirus 8 infection in hemodialysis patients from São Paulo, Brazil: Preliminary results. *Tranplantation Proceedings.* 2007;39(10):3044-6. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.07.087>.
39. Magri MC, Canziani MEF, Draibe SA, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Confirming high prevalence of human herpesvirus 8 infection in chronic kidney disease patients from São Paulo, Brazil. *NDT Plus.* 2009;1:93-4. <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfn189>.
40. Silva JMK, Magri MC, Jacob F, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Otimização e avaliação do ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-herpesvírus humano 8 (HHV-8) usando sangue colhido em papel de filtro. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2007;66(1):68-72. <https://doi.org/10.53393/rial.2007.66.32852>.
41. Caterino-de-Araujo A, Manuel RCR, Del Bianco R, Santos-Fortuna E, Magri MC, Silva JMK, et al. First survey for detecting the presence of human herpesvirus 8 infection (HHV-8) in Maputo, Mozambique. *Brazilian J Infect Dis.* 2009;13(3):200-2. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702009000300008>.
42. Caterino-de-Araujo A, Manuel RCR, Del Bianco R, Santos-Fortuna E, Magri MC, Silva JMK, et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) infection in individuals from health care centers in Mozambique: Potential for endemic and epidemic Kaposi's sarcoma. *J Med Virol.* 2010;82(7):1216-23. <https://doi.org/10.1002/jmv.21789>.

43. Magri MC, Carbone PHL, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. A comparative study of the frequency of antibody and titers against human herpesvirus 8 latent and lytic antigens in “at-risk individuals” and among patients with Kaposi’s sarcoma. *J Med Virol.* 2009;81(7):1292-7. <https://doi.org/10.1002/jmv.21513>.
44. Caterino-de-Araujo A, Magri MC, Manuel RCR. Patterns of antibodies against latent and lytic antigens of human herpesvirus 8 (HHV-8) in an endemic population and patients with Kaposi’s sarcoma in Mozambique. *J Med Virol.* 2010;82:1576-81. <https://doi.org/10.1002/jmv.21854>.
45. Tanaka PY, Atala MM, Pereira J, Caterino-de-Araujo A. Primary effusion lymphoma with cardiac involvement in HIV positive patient – complete response and long survival with chemotherapy and HAART. *J Clin Virol.* 2009;44(1):84-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.08.013>.

## Contribuição dos autores

O autor é responsável por todos os aspectos do trabalho, incluindo a garantia de sua precisão e integridade.

## Preprint

O manuscrito não foi previamente publicado em servidores preprint.

## Aprovação dos autores

O autor participou efetivamente do trabalho, aprova a versão final do manuscrito para publicação e assume total responsabilidade por todos os seus aspectos, garantindo que as informações sejam precisas e confiáveis.

## Conflito de interesses

O autor declara não haver conflito de interesse de natureza política, comercial e financeira no manuscrito.

## Financiamento

O autor declara que não houve fontes de financiamento.