

Daniela Alexandra Malaquias Ramos

# Imunohistoquímica na Investigação Médico-Legal: Contributo real ou ficção?

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra  
Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

Dezembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra  
Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

Daniela Alexandra Malaquias Ramos

## IMUNOHISTOQUÍMICA NA INVESTIGAÇÃO MÉDICO-LEGAL: CONTRIBUTO REAL OU FICÇÃO?

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses

Orientadora: Professora Doutora Rosa Henriques de Gouveia

Co-orientador: Professor Doutor Francisco Corte Real  
(Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra)

Coimbra

2015

**“There is no formula for success except perhaps an unconditional acceptance of the act and what it brings.”**

*Arthur Rubinstein*

# RESUMO

A Anatomia Patológica Forense – vertente fundamental do exame necrópsico médico-legal – recorre a técnicas complementares, tais como a Imunohistoquímica (IHQ), face a casos complexos e/ou com características particulares. A IHQ – processo baseado em reacções antigénio-anticorpo – é uma ferramenta diagnóstica imprescindível em Anatomia Patológica não-forense (hospitalar/privada). Conhecem-se estudos e aplicações na área forense; mas qual é o seu contributo real para a investigação médico-legal? Este trabalho pretende demonstrar a sua relevância, utilizando como material 47 amostras tecidulares de 42 casos das 1141 autópsias com exame anátomo-patológico realizadas na Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. no ano de 2011. Estes casos correspondem a 25 vítimas do género masculino com idade média de 55,85 anos e a 17 do género feminino, cuja idade média é de 61,59 anos. Foi utilizada imunomarcacão segundo o “Two-Step Indirect Method, em material fixado e parafinado de lesões / alterações patológicas. Esta técnica permitiu não apenas para comprovar diagnósticos anteriormente estabelecidos, como também concluir casos em aberto não solucionados pela observação de lâminas coradas com HE e/ou Histoquímica, nomeadamente na área oncológica; contribuindo para a determinação da causa e da etiologia médico-legal da morte.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anatomia Patológica Forense, Técnicas, Imunohistoquímica

# ABSTRACT

Forensic Anatomic-Pathology – a main area of the medico-legal *postmortem* examination – uses ancillary techniques, such as Immunohistochemistry (IHC), when the cases are complex and/or unusual. IHC – a procedure based on antigen-antibody reaction – is a major diagnostic tool in Non-Forensic Anatomic-Pathology (hospitalar/private practice). There are studies concerning its applicability on the forensic field; yet, which is IHC real contribution to the medico-legal death investigation? This work aims to show its relevance, by using 47 tissue samples of 42 cases out of the 1141 autopsies with histopathology examination performed at the Central Branch of Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P., during the year 2011. The victims were males (n=25) with a mean age of 55.85 years and females (n=17), whose mean age was 61.59 years. “Two-Step Indirect Method” immunostaining was performed in formalin-fixed, paraffin-embedded material from tissue lesions / pathologic alterations. This technique, not only confirmed diagnosis already made in the routine histopathological examination, but also allowed to conclude unsolved cases, namely within the oncologic area; thus contributing to the establishment of the cause and manner of death.

KEY-WORDS: Forensic Anatomic-Pathology, Techniques, Immunohistochemistry

# INDICE GERAL

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
INDICE DE FIGURAS.....	8
INDICE DE QUADROS E TABELAS.....	8
INDICE DE GRÁFICOS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
DEDICATÓRIA.....	11
AGRADECIMENTOS.....	12
CAPÍTULO I.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Introdução Geral e Objectivo.....	13
1.2. Enquadramento Teórico da Imunohistoquímica.....	14
Princípios da Imunohistoquímica.....	16
ANTICORPO (AC).....	16
ANTIGÉNIO (AG).....	17
ESCOLHA DO ANTICORPO / ANTIGÉNIO.....	18
MARCADORES – ANTICORPOS.....	19
CAPITULO II.....	24
1. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.1 Material.....	24
1.2 Métodos.....	24
CAPITULO III.....	29
RESULTADOS.....	29
CAPITULO IV.....	39

1. DISCUSSÃO .....	39
2. CONCLUSÃO .....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41
ANEXOS .....	44

**Nota:** Texto escrito segundo o antigo acordo ortográfico.

# INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estrutura de anticorpo (Immunology, s.d.) .....	17
<b>Figura 2</b> Tecido com localização de antígenos alvo (Biosystems, s.d.) .....	26
<b>Figura 3</b> Localização do anticorpo primário ao antígeno específico (Biosystems, s.d.)..	26
<b>Figura 4</b> Ligação do anticorpo secundário ao anticorpo primário (Biosystems, s.d.) .....	27
<b>Figura 5</b> Ligação da streptavidina com substância propiciadora de visualização ao anticorpo secundário (Biosystems, s.d.) .....	27
<b>Figura 6</b> Ligação do DAB ao polímero (Biosystems, s.d.) .....	28
<b>Figura 7</b> CD20+, x100, secção de coração. Linfoma não-Hodgkin, B, com envolvimento multissistémico como causa de morte natural, ♂, 73 anos (Fonte: INMLCF,I.P.) .....	35
<b>Figura 8</b> MNF116+, x100, secção de laringe. Carcinoma pavimento-celular invasivo, moderadamente diferenciado, como causa de morte violenta (asfíxica), ♂, 59 anos (Fonte: INMLCF,I.P.) .....	36
<b>Figura 9</b> MNF116+, x400, secção de pulmão. “Rolhões” de escamas de queratina / células epiteliais cutâneas intra-alveolares, como causa de morte asfíxica in utero, ♂, feto de 35 semanas de gestação (Fonte: INMLCF,I.P.) .....	37

# INDICE DE QUADROS E TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Número de casos relativos à natureza da lesão / alteração patológica.....	29
<b>Tabela 2</b> Tipo e Distribuição dos anticorpos utilizados. ....	32



# INDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> Número de Neoplasias relativo à localização .....	30
<b>Gráfico 2A, B:</b> Número de lesões primárias e secundárias em relação ao prognóstico (benigno vs maligno).....	31
<b>Gráfico 3:</b> Tecido onde as lesões / alterações patológicas se originaram. ....	31
<b>Gráfico 4</b> Comparação de resultados obtidos através de coloração de rotina (HE) com marcação imunohistoquímica (IHQ). ....	33
<b>Gráfico 5</b> Relevância de achados autópticos para a morte. ....	34

# LISTA DE ABREVIATURAS

IHQ – Imunohistoquímica

INMLCF, I.P. – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

HE – Hematoxilina / Eosina

ABC – Complexo avidina-biotina

IG – Imunoglobulinas

AC – Anticorpo

AG – Antígeno

CK – Citoqueratina

GFAP - Glial fibrillary acidic protein

LAB – Labelled avidin-biotin

LSAB – Labelled streptavidin-biotin

DAB – Diaminobenzidina

RNA – Ácido Ribonucleico

CHC – Carcinoma Hepatocelular

CD – Cluster of Differentiation

PCR – Polimerase Chain-Reaction

HRP – Horseradish peroxidase

# DEDICATÓRIA

Aos meus Pais,  
pela ajuda, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.  
Esta vitória dedico-a com todo o amor e orgulho a vocês.

# AGRADECIMENTOS

À Professora Rosa Gouveia pela disponibilidade, dedicação, atenção dispensada, paciência e profissionalismo, um muito obrigado.

Ao Professores Francisco Corte Real e Professor Duarte Nuno Vieira pela colaboração neste projecto.

Às técnicas Fernanda e Ana Filipa por todo o apoio, ajuda e conhecimentos partilhados.

Ao Serviço de Patologia Forense do INMLCF pela disponibilidade de espaço e apoio material na execução deste projecto.

Um mais sincero e profundo obrigada aos meus pais pelo suporte e amor incondicional em todos os momentos, por serem o meu orgulho e poder ser o deles.

À minha irmã por toda a cumplicidade e apoio único mesmo na distância.

Ao meu melhor amigo, namorado, noivo e alma gémea por todas as lágrimas enxutas e todos os sorrisos arrancados, sem ele esta caminhada teria sido impossível.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Introdução Geral e Objectivo

Para a *Investigação Médico-Legal* contribuem múltiplos métodos, técnicas e ciências forenses.

Quando a investigação é postmortem, a autópsia com exame anátomo-patológico é crucial na determinação da causa de morte e no estabelecimento da etiologia médico-legal da mesma.

No exame anátomo-patológico, o conhecimento da informação clínica / pericial e a correlação macro-microscópica [esta a partir de lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE)] são usualmente suficientes para facultar um diagnóstico. Contudo, casos há em que o diagnóstico definitivo requer técnicas complementares, tais como a Histoquímica [através da afinidade tintorial entre corante e tecido (são ou lesado)] (Bancroft & Gamble, 2002) ou a Imunohistoquímica (IHQ) [através da interacção anticorpo-antígeno do tecido (são ou lesado)] (Bancroft & Gamble, 2002)

A utilidade inequívoca e a utilização da Imunohistoquímica como técnica complementar de rotina está plenamente aceite e comprovada na prática anátomo-patológica hospitalar e privada. E na forense?

Artigos há, tais como “Pulmonary immunohistochemistry and serum levels of a surfactant-associated protein A in fatal drowning” (Zhu, et al., 2002) e “Immunohistochemistry utilization in autopsy pathology: A Canadian experience” (Bromley & Trotter, 2011), que sustentam a sua importância na área forense. Esta importância englobaria múltiplas vertentes, desde a cronodiagnose de lesões traumáticas (estudo da cicatrização tecidual), à patologia infecciosa (citomegalovírus), à oncológica, entre outras.

O objectivo deste trabalho é pesquisar e tentar demonstrar a relevância da ImunoHistoquímica aplicada à rotina Anátomo-Patológica Forense na Investigação Médico-Legal.

## 1.2. Enquadramento Teórico da Imunohistoquímica

O princípio da Imunohistoquímica existe desde aproximadamente 1930; no entanto, o primeiro estudo evidenciado foi em 1941 (Borges-Ferro, 2014). Coons e colaboradores usaram anticorpos marcados com o Isotiocianato de fluoresceína para localizar antigénios de pneumococos em tecidos infetados. Desde então, os inúmeros desenvolvimentos físico-químicos permitiram alcançar a simplicidade técnica actual.

A *Imunohistoquímica* é o nome dado ao conjunto de técnicas que utilizam anticorpos para identificar estruturas tecidulares (que funcionam como antigénios) *in situ*. O objectivo principal destas técnicas consiste em situar e identificar determinadas substâncias/estruturas tecidulares. Assim, o princípio incide num conjunto de reacções específicas (interacções anticorpo-antigénio), que conferem cor ou electrodensidade aos compostos que se pretende estudar.

Uma vez que os anticorpos, como proteínas que são, não possuem cor própria nem outra forma de serem visualizados nas preparações histológicas e citológicas de rotina, foi necessário encontrar forma de os tornar observáveis quando ligados aos antigénios que se querem detectar. (Borges-Ferro, 2014)

Existem dois métodos de detecção, o directo e o indirecto. O *método directo* utiliza apenas um anticorpo marcado com a substância que permite visualização, enquanto o *método indirecto* usa dois anticorpos. O primeiro dirigido contra as imunoglobulinas da espécie animal onde foi produzido o anticorpo primário e o segundo anticorpo marcado com a substância que permite a visualização do complexo antigénio-anticorpo (Ag-Ac).

Os métodos de Avidina-Biotina são utilizados desde a década de 40 em cromatografias bioquímicas, que se baseavam na grande afinidade entre a avidina (glicoproteína) e a biotina (vitamina, que funciona como coenzima). Em 1977, dá-se a aplicação do sistema avidina-biotina em Imunocitoquímica, por *Heggeness e Ash*, em

métodos de imunofluorescência. E em 1980, *Hsu et al* introduziram os métodos de Imunocitoquímica pelo Complexo Avidina-biotina (ABC), actualmente os mais utilizados. Com o desenvolvimento da ciência, foram aparecendo inovações tais como a utilização da streptavidina, a técnica de Labelled avidin-biotin (LAB) e a técnica de Labelled streptavidin-biotin (LSAB). Os métodos de avidina biotina baseiam se em quatro princípios gerais tais como a extraordinária afinidade existente entre a avidina e a biotina, que ao ligarem-se, formam um complexo praticamente indissociável; a possibilidade existente de ligação entre a biotina e outras moléculas (enzimas e anticorpos); a possibilidade de a avidina ser marcada com uma variedade de substâncias como enzimas, metais pesados e fluorocromos e ainda a possibilidade de utilização da avidina como ligação entre duas moléculas biotiniladas. (Borges-Ferro, 2014)

Estes métodos possuem grande versatilidade e grande sensibilidade, o que permite o aumento da qualidade da marcação em casos de fixação prolongada ou processamento deficiente e a diminuição do tempo de duração e dos custos da técnica. Também permitem a melhoria da qualidade da marcação, com maior intensidade e melhor aspecto visual (melhor fotografia). Para além disso, facultam a diminuição do “fundo” e elevada especificidade. No entanto, a alta sensibilidade pode ter consequências negativas como a ampliação do sinal de pequenas quantidades de biotina endógena ou a ampliação de sinal de pequena quantidade de Anticorpo primário ligado inespecificamente. (Borges-Ferro, 2014)

O valor prático desta área tecnológica da Anatomia Patológica, resulta da possibilidade de conjugar um “marcador” com um anticorpo, sem provocar qualquer tipo de dano à ligação específica estabelecida entre o anticorpo e o antigénio. Esta conjugação permite a observação microscópica dos locais onde se encontra o anticorpo e, conseqüentemente, o antigénio. Assim, a *Imunohistoquímica* apresenta-se como um poderoso meio de identificação de várias estruturas celulares normais (através dos respectivos antigénios) e patológicas (neoplásicas ou não).

## Princípios da Imunohistoquímica

### ANTICORPO (AC)

Os anticorpos são proteínas em forma de Y que são recrutadas pelo sistema imunitário para identificar e neutralizar objectos estranhos ao organismo, como bactérias ou vírus.

Cada anticorpo tem um alvo original conhecido como antigénio no organismo de invasão. Este antigénio é como uma chave que ajuda o anticorpo a identificar o organismo. Tal como cada fechadura tem a sua chave, também cada anticorpo tem o seu antigénio. Quando um se combina com o outro o anticorpo activa-se, marcando ou neutralizando o antigénio. Assim, a principal função do sistema imunitário é a produção de anticorpos.

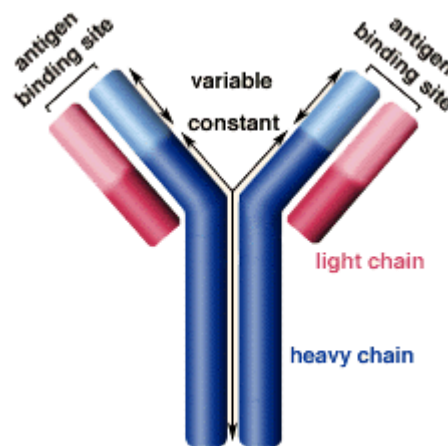
As **imunoglobulinas (IG)** são basicamente proteínas que funcionam como anticorpos. Anticorpo e imunoglobulina são termos frequentemente permutáveis. IG são encontradas no sangue, tecidos e outros fluidos e são compostas por células plasmáticas que são derivadas das células B. As células B tornam-se células plasmáticas quando activadas através da ligação a um antigénio específico na superfície do anticorpo. Por vezes é necessária a interação de uma célula B com uma célula T Helper. Todas as IG têm uma estrutura de quatro cadeias como unidade básicas, duas cadeias leves (light chain) idênticas e duas cadeias pesadas (heavy chain) idênticas. Para que a estrutura em forma de Y se crie, as cadeias pesadas e leves têm de ser ligadas entre si. Assim, é necessário ter ligações que liguem as cadeias leves com as cadeias pesadas e ainda ligações que liguem os dois conjuntos, e estas ligações são mantidas por pontes de dissulfeto intercadeia e por interações não-covalentes. O número de pontes dissulfeto varia entre as diferentes moléculas de IG. Dentro de cada uma das cadeias polipeptídicas existem ainda pontes dissulfeto intracadeia. Sabe-se ainda que as cadeias pesadas e leves podem ser separadas em duas regiões, variáveis e constantes (variable and constant), baseando-se na sequência de aminoácidos que as compõem. Assim, as cadeias leves tanto na região constante como na variável possuem 110 aminoácidos, enquanto a cadeia pesada na



região constante possui entre 330 a 440 aminoácidos e 110 aminoácidos na região variável.

Existem cinco classes diferentes de imunoglobulinas, com base na diferença das sequências de aminoácidos na região constante das cadeias pesadas. Todas as IG de uma determinada classe tem regiões constantes de cadeia pesada muito similares. Assim as IG dividem-se em IgM (cadeias pesadas mu), IgG (cadeias pesadas gama), IgA (cadeias pesadas alfa), IgD (cadeias pesadas delta) e IgE (cadeias pesadas épsilon).

As IG podem ainda ser classificadas de acordo com o tipo de cadeia leve que possuem, podendo ser kappa ou lambda, sendo que também estas são diferenciadas de acordo com a sequência de aminoácidos. (Borges-Ferro, 2014) (Pathologika, s.d.)



**Figura 1** Estrutura de anticorpo (Immunology, s.d.)

## ANTIGÉNIO (AG)

Um antígeno é qualquer substância estranha ao organismo que estimula uma resposta imune. São também chamados de imunogénios. A região específica num antígeno que um anticorpo reconhece denomina-se de epítopo ou determinante antigénico. Um epítopo normalmente é constituído por uma cadeia de 5 a 8 aminoácidos na superfície de uma proteína, esta cadeia é normalmente tridimensional. Se o epítopo existe numa cadeia polipeptídica simples é um epítopo contínuo ou linear. O anticorpo

pode bloquear fragmentos, segmentos desnaturados de uma proteína ou uma proteína básica.

O anticorpo liga-se a antígenos específicos, estimulando outras células do sistema imunitário a destruírem os invasores. A força de ligação entre um anticorpo e um antígeno num único local é conhecido como afinidade do anticorpo com o antígeno. Esta afinidade é determinada pelo tipo de ligação. Sendo que um antígeno pode ter vários epítomos, múltiplos anticorpos podem ligar-se à proteína. Quando dois ou mais locais do antígeno são idênticos, o anticorpo pode formar uma ligação mais forte com o antígeno. (Borges-Ferro, 2014) (Pathologika, s.d.)

### ESCOLHA DO ANTICORPO / ANTIGÉNIO

O diagnóstico útil com a *Imunohistoquímica* é determinado pela escolha do anticorpo capaz de marcar a presença de antígenos.

Basicamente, existem nove categorias distintas de antígenos potencialmente úteis na capacidade de avaliar características celulares/patológicas importantes.

O marcador ideal para análise de diagnóstico é o que possui tanto alta especificidade como alta sensibilidade para o seu antígeno alvo. No entanto, na prática, isto raramente é encontrado. Na maioria dos casos, os que têm alta especificidade (>90%) tem normalmente baixa sensibilidade (<70%) e vice-versa.

A versatilidade de um anticorpo relaciona-se com a capacidade do anticorpo funcionar efectivamente numa variedade de substractos e em diferentes condições de processamento histológico. É recomendado usar anticorpos que tenham controlos externos disponíveis comercialmente; bem como o custo-efectividade seja adequado.

Podem utilizar-se “kits de marcação” com anticorpos concentrados ou já pré-diluídos.

Numa abordagem inicial, o “kit de marcação” deveria conter os anticorpos-base para os grandes grupos celulares / tecidulares; isto é: *citoqueratinas* (tecido epitelial), *vimentina*

(tecido mesenquimatoso), *HMB45* (melanoma) e *CD45* (linfócitos). (Borges-Ferro, 2014) (Pathologika, s.d.)

A co-expressão de anticorpos-base também é diagnóstica, como por exemplo no caso dos mesotélios e suas lesões (co-expressão de queratina e vimentina).

Posteriormente, adicionar-se-iam anticorpos mais direccionados para determinado(s) tipo(s) de tecido / lesão.

### MARCADORES – ANTICORPOS

Existem vários tipos de marcadores (*imunossoros*) que foram utilizados ao longo do estudo. A utilização de mais do que um anticorpo em conjunto no mesmo tecido é explicado pela necessidade de especificidade necessária para um diagnóstico preciso e concreto. É necessário saber com o que cada um reage positiva e negativamente para adaptá-lo e conjugá-lo com outros de modo a obter um resultado fidedigno.

A escolha dos imunossoros está, hoje, muito facilitada pela variedade disponível no mercado. A leitura dos livros da especialidade e de artigos científicos, a consulta dos catálogos e das bulas dos produtos, bem como a experiência do médico e do técnico anátomo-patologista permitem criar o repositório adequado às necessidades de cada Laboratório de Anatomia Patológica.

Dentre os inúmeros imunossoros existentes, vejamos as características de alguns frequentemente utilizados na rotina diagnóstica:

O **MNF116** é um anticorpo que detecta um epítopo que está presente num vasto leque de queratinas, relativamente ao seu peso molecular, mais especificamente queratinas 5, 6,8, 17 e provavelmente 19. Demonstra especial reactividade com células epiteliais humanas de tecido glandular simples a epitélio escamoso estratificado e pode ser usado na detecção e classificação de células normais e neoplásicas de origem epitelial. É frequentemente utilizado em conjunto com GFAP e vimentina. (MNF116, Cytokeratin Clone)

A **Citoqueratina 7 (CK7)** é um marcador de epitélios glandulares e transicionais – adenocarcinomas do ovário, da mama e do pulmão. É utilizado comumente na diferenciação entre o carcinoma de células transicionais do urotélio e o cancro da próstata, face à menor expressividade de CK7 neste tecido. É utilizado com o CK20 na diferenciação de carcinomas do ovário (excepto mucinosos), gástricos e do cólon. (Cytokeratin 7)

A **Citoqueratina 20 (CK20)** é um marcador de tumores gastrointestinais, carcinomas de células transicionais, tumor de células de Merkel. É extremamente útil no diagnóstico diferencial com adenocarcinomas não-mucinosos do ovário. Identifica células Merkel de carcinomas metastáticos de pequenas células. A maioria dos carcinomas de células escamosas e maioria dos adenocarcinomas não-mucinosos do ovário e carcinomas de pequenas células do pulmão são essencialmente ou completamente negativos na expressão de CK20. É frequentemente utilizado com CK7. (Cytokeratin 20)

Na expressão positiva para CK7 e CK20, os carcinomas do tracto gastrointestinal e do tracto geniturinário devem ser considerados. No caso de negatividade para ambos devem ser considerados os carcinomas prostáticos, hepatocelulares e carcinomas da cortical supra-renal e carcinóides. (Barra, 2006)

Relativamente à **Citoqueratina 5/6 (CK5/6)**, é um marcador de epitélio escamoso normal e neoplásico. Marca mesoteliomas e células epiteliais basais na próstata e amígdalas. É utilizado na diferenciação de adenocarcinomas e mesoteliomas epiteliais, visto nos primeiros ser expresso em baixos níveis e em altos níveis no segundo. (Cytokeratin 5/6)

O anticorpo **CEA** (carcinoembryonic antigen) é clinicamente importante na marcação de adenocarcinomas, maioritariamente nos do tubo gastrointestinal. É também utilizado para demonstrar canalículos biliares. (Carcinoembryonic Antigen (CEA))

A **Actina** é um marcador de músculo liso e células mioepiteliais; a actina-alfa identifica especificamente a isoforma simples característica do músculo liso e de células com diferenciação miofibroblástica. (Actin (Muscle))

O anticorpo **Desmina** é marcador de células musculares, estriadas ou lisas, isto é: tumores musculares lisos e estriados. É verdadeiramente útil na diferenciação de diagnóstico de tumores de origem incerta. É frequentemente utilizado em conjunto com outras

proteínas de filamentos intermédios, tais como GFAP, citoqueratinas MNF116 e Vimentina. (Desmin)

A **Vimentina** é um marcador de células de origem mesenquimatosa. Quando usado em conjunto com citoqueratinas ajuda na distinção entre melanomas, carcinomas indiferenciados e linfomas de grandes células. Por vezes a sua não reactividade é também útil, pois é menor o número de tumores que não contêm vimentina. É também usado em conjunto com Desmina, GFAP e neurofilamentos. (Vimentin)

O anticorpo **CD31** é um marcador de células endoteliais, tanto benignas como malignas, sendo aparentemente mais sensível que o CD34 como marcador de endotélio vascular maligno. (CD31)

Já o **CD34** é um marcador de células hematopoiéticas primitivas e células capilares endoteliais; pode ser positivo em casos de tumor fibroso solitário da pleura, hemangiopericitoma e tumor estromal gastrointestinal. (CD34)

A parte intracelular do **CD30** possui actividade de quinase com papel importante na diferenciação e proliferação. A sua expressão pode ser de membrana, paramembrana (Golgi) ou ambas. O CD30 é positivo nas *Células de Reed-Sternberg* em cerca de 90% dos *linfomas de Hodgkin* clássicos; mas também no linfoma anaplásico de grandes células e no carcinoma embrionário. (CD30) (Barra, 2006)

O **CD20** é o marcador mais útil para neoplasias derivadas de células B. É expresso em células B maduras e pré-maduras, mas não após a diferenciação terminal das células B em plasmócitos. Têm relevância no diagnóstico mas não no prognóstico. Tem uma sensibilidade e especificidade de 95 a 100% para os linfócitos B. (Barra, 2006)

O **CD45** é um marcador de leucócitos. É um dos anticorpos mais específicos usados no diagnóstico. Tanto linfócitos T (75%) como B (4%), granulócitos, monócitos e macrófagos expressam CD45. É extremamente útil para diferenciar tumores de grandes células anaplásicas. É também importante que faça parte do painel usado para o diagnóstico diferencial entre linfomas e outros tumores de pequenas células, tanto em adultos como em crianças. (CD45) (Barra, 2006)

O **CD3** é um marcador de linfócitos T. É expresso em cerca de 80% dos linfomas de células T. (Barra, 2006)

O anticorpo **CD 10** está presente na superfície de células, expresso em células progenitoras linfóides iniciais e num pequeno subconjunto de células B imaturas na medula óssea, apesar de esta expressão ser perdida quando as células atingem a maturidade. No entanto, é novamente expresso em células proliferativas e neutrófilos maduros. É útil na identificação do linfoma folicular (CD10) (Barra, 2006)

O **CD68** está presente nos grânulos citoplasmáticos de macrófagos, monócitos, basófilos, neutrófilos, células dendríticas, células B e T e células de Langerhans. É importante no reconhecimento de células do sistema monocítico-macrofágico e sua. (CD68)

O anticorpo **GFAP** (glial fibrillary acidic protein) é um marcador de células gliais, como astrócitos e células ependimárias, sendo de primordial importância na avaliação da diferenciação astrocitária dos tumores. (Barra, 2006)

O **NSE** (neuron-specific enolase) é conhecido como marcador de origem neural e neuroectodérmica – tumores neuroendócrinos. (Almeida, et al., 2007)

Já o **HMB45** (melanosome) identifica melanossomas imaturos. Está presente nos melanócitos da pele normal e retina, nevos e em mais de 85% dos melanomas. (Melanosome)

O conhecido **PSA** (prostate specific antigen) é um marcador de epitélio ductal prostático, utilizado para neoplasias de origem prostática. (Almeida, et al., 2007)

A **Cromogranina A** é o marcador de diferenciação neuroendócrina mais usado. Encontra-se nos tumores carcinoides e outros de células neuroendócrinas. (Barra, 2006)

A **prot.S100** expressa-se numa extensa variedade de células normais. É marcador de células de Schwann, melanócitos, adipócitos, condrócitos, células de Langerhans e células reticulares interdigitantes, podendo também expressar-se nos tumores correspondentes, com expressão citoplasmática e nuclear. (Barra, 2006)

A  **$\alpha$ -fetoproteína** é uma glicoproteína composta por 590 aminoácidos residuais. É marcador de tumores de células germinativas (seio endodérmico) e carcinoma

hepatocelular. Tanto o saco vitelino embrionário, o fígado fetal e tubo gastrointestinal sintetizam esta glicoproteína. É usada para tumores da linha germinativa e diferenciação entre o carcinoma hepatocelular (CHC) e o carcinoma metastático do fígado. Deve ser usada em conjunto com: CK19 (expressa pelo epitélio do ducto biliar e colangiocarcinoma); CK20 (colangiosarcoma e tumor gastro-intestinal); CEA (canaliculos biliares no CHC e citoplasma no colargiocarcinoma e adenocarcinoma metastático difuso). (Almeida, et al., 2007)

O anticorpo **EMA** (epitelial membrane antigen) é um marcador de células de origem epitelial, particularmente adenocarcinomas, meningiomas e linfoma anaplásico de grandes células. (Epithelial Membrane Antigen (EMA))

A **Calretinina** é uma proteína imunorreactiva nas células mesoteliais das membranas serosas e suas lesões. (Calretinin)

A **Miosina** é um importante marcador do músculo estriado e suas neoplasias. (Myosin Heavy Chain (Smooth Muscle))

# CAPITULO II

## 1. MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1 Material

O estudo reporta-se a 42 casos das 1141 autópsias com exame anátomo-patológico realizadas em 2011 no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I. P. (Delegação do Centro e seus Gabinetes Médico-Legais, Ilhas da Madeira e Açores).

Os 42 casos correspondem a 25 vítimas do género masculino com idade média de 55,85 anos [0-79 anos] e a 17 vítimas do género feminino, cuja idade média é de 61,59 anos [21-94 anos].

Estes 42 casos tinham 47 lesões / alterações patológicas que requeriam estudo imunohistoquímico.

### 1.2 Métodos

Após exame microscópico, a Médica Anatomopatologista da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. solicitou a realização da técnica de *Imunohistoquímica* nos casos referidos, com imunossoros específicos para cada lesão / alteração tecidual patológica segundo a hipótese diagnóstica.

A técnica foi efectuada, em parte, manualmente e, em parte, de forma automática. Esta última utilizando o aparelho de imunohistoquímica da marca *Shandon*, modelo Sequenza.

Finalizada a imunomarcagem das amostras, as lâminas foram observadas pela Médica Anatomopatologista, com vista a estabelecer o diagnóstico definitivo. Os dados obtidos após esta análise foram submetidos a análise estatística descritiva, utilizando o *Microsoft Excel 2010*. As imagens histológicas apresentadas foram obtidas num microscópio óptico



*LEICA DM1000 LED*, com sistema de aquisição de imagem *LEICA ICC50 HD* e *LAS EZv2.0.0* para Windows.

As amostras processadas encontravam-se incluídas em blocos de parafina, depois de terem sido fixadas em formol, desidratadas em álcool e clarificadas com xilol. Essas amostras foram seccionadas em cortes de micrótomo com 3  $\mu\text{m}$  de espessura e adicionadas as lâminas silanizadas, isto é, laminas adesivadas que, face a determinadas etapas mais agressivas para o tecido durante o processamento, vão impedir o descolamento do corte da lâmina. As lâminas foram posteriormente colocadas na estufa a alta temperatura durante a noite, para permitir a boa adesão do corte.

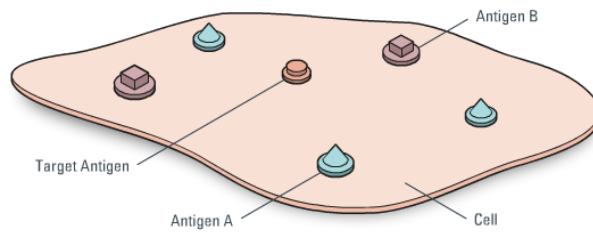
A primeira etapa da técnica de Imunohistoquímica consiste na remoção da parafina existente na lâmina, pelo que as lâminas com a amostra são submetidas a imersões em xilol, seguidas de uma sequência de concentrações decrescentes de álcool para a remoção do xilol e hidratação do tecido. Para a hidratação total, as lâminas são, por fim, colocadas em água.

Devido à fixação das amostras em formol a 10% para a sua preservação, as proteínas celulares sofrem alterações na sua estrutura terciária e há a formação de ligações cruzadas, criando efeitos que podem interferir com a imunomarcação, tais como mascarar o antigénio, criar fraca reacção, aumentar o “ruído de fundo”, entre outras.

Para combater estas alterações é realizada a recuperação antigénica pelo calor, que envolve a utilização de citrato de sódio com pH 6.0 no micro-ondas em 3 ciclos de 2 minutos cada na potência máxima, assim se quebrando a maioria dessas ligações cruzadas, expondo-se os epítomos alterados pela fixação com formol.

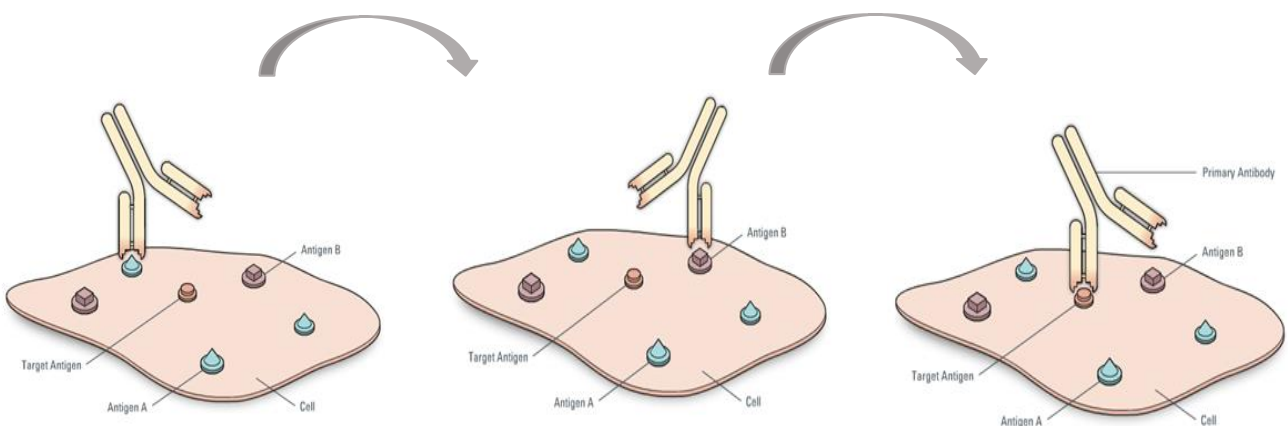
Após a recuperação antigénica, faz-se o bloqueio da peroxidase endógena. A emissão da coloração acontece quando se aplica diaminobenzidina - DAB (cromógeno associado a peróxido de hidrogénio), que reage com a peroxidase associada a estreptoavidina e emite cor. As células possuem a enzima peroxidase, que é uma proteína que se encontra principalmente em tecidos com glóbulos vermelhos, mas também ao nível do rim, baço, fígado, medula óssea e em áreas de necrose. Se essa enzima não for bloqueada, quando se aplicar o DAB, haverá reacção cruzada e ele reagirá com a peroxidase endógena. Deste modo, não se saberá se a reacção ocorreu porque houve reacção antigénio-anticorpo ou

porque reagiu com peroxidase já existente, condicionando o aparecimento de falsos positivos. É, pois, fundamental proceder a este bloqueio através da aplicação de um excesso de substrato, que leva à saturação da actividade enzimática.



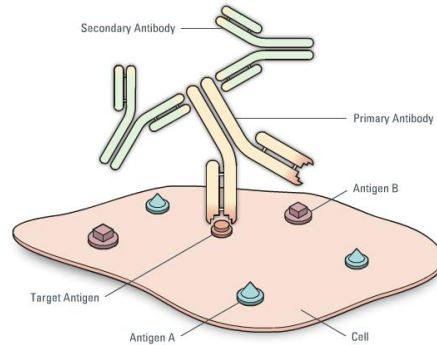
**Figura 2** Tecido com localização de antígenos alvo (Biosystems, s.d.)

Para a marcação Imunohistoquímica foi utilizado um método indirecto de dois passos, um método que utiliza a aplicação de dois anticorpos, um posterior ao outro, para aumentar a imunomarcação e assim a sua visualização. Este é um método mais versátil do que o directo, já que uma grande variedade de anticorpos primários de algumas espécies podem ser conjugados com o mesmo anticorpo secundário. O procedimento é também mais sensível do que o directo, pois vários dos anticorpos secundários conjugam-se com um diferente número de epítopos do anticorpo primário, sendo a amplificação do sinal directamente proporcional ao número de enzimas ligadas por sítio alvo.



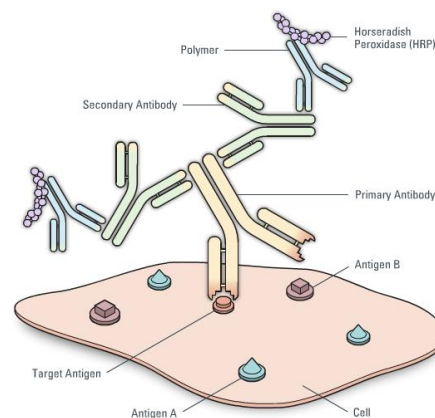
**Figura 3** Localização do anticorpo primário ao antígeno específico (Biosystems, s.d.)

Após preparado o tecido, é aplicado o anticorpo primário que é dirigido ao antígeno que se quer detectar. Secundariamente, é aplicado um anticorpo biotinizado que, caso tenha existido reação anterior, se vai ligar ao complexo antígeno-anticorpo primário.



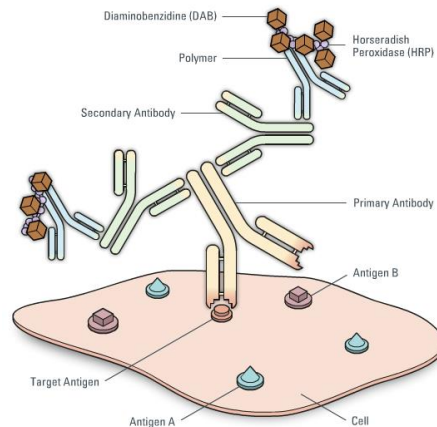
**Figura 4** Ligação do anticorpo secundário ao anticorpo primário (Biosystems, s.d.)

Posteriormente, aplica-se streptavidina marcada com substância responsável pela visualização, neste caso peroxidase, que se ligará fortemente às moléculas de biotina associadas ao anticorpo primário.



**Figura 5** Ligação da streptavidina com substância propiciadora de visualização ao anticorpo secundário (Biosystems, s.d.)

O anticorpo não cora o tecido, pelo que tem de ser apicado um cromogénico que torne visível a marcação efectuada. Esta revelação obtém-se com a aplicação de DAB, que ao reagir com a peroxidase emite coloração.



**Figura 6** Ligação do DAB ao polímero (Biosystems, s.d.)

Como sobre um único antígeno foi acrescentado um grande complexo formado por anticorpo secundário, streptavidina e peroxidase, haverá uma grande amplificação da marcação o que facilita a interpretação do patologista.

Existem determinadas estruturas no tecido que não sofrem marcação, mas que, no entanto, são fundamentais para a correcta interpretação histológica. É pois, necessário proceder à contração do tecido com solução de hematoxilina, que cora as estruturas ácidas dos tecidos (núcleo celular, porções do citoplasma ricas em RNA, matriz cartilaginosa).

Já vimos que, no início do procedimento é necessário hidratar o tecido para que a marcação seja possível. Ora, no final é necessário realizar a sua desidratação. Esta é realizada utilizando sequências crescentes de álcool e posteriores imersões em xilol. Termina-se com a colocação de lamela sobre a lâmina, para a conservação da amostra

## CAPITULO III

### RESULTADOS

No ano de 2011, em 42 (3,68%) das 1141 autópsias com exame anátomo-patológico da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. foram realizadas técnicas complementares de Imunohistoquímica.

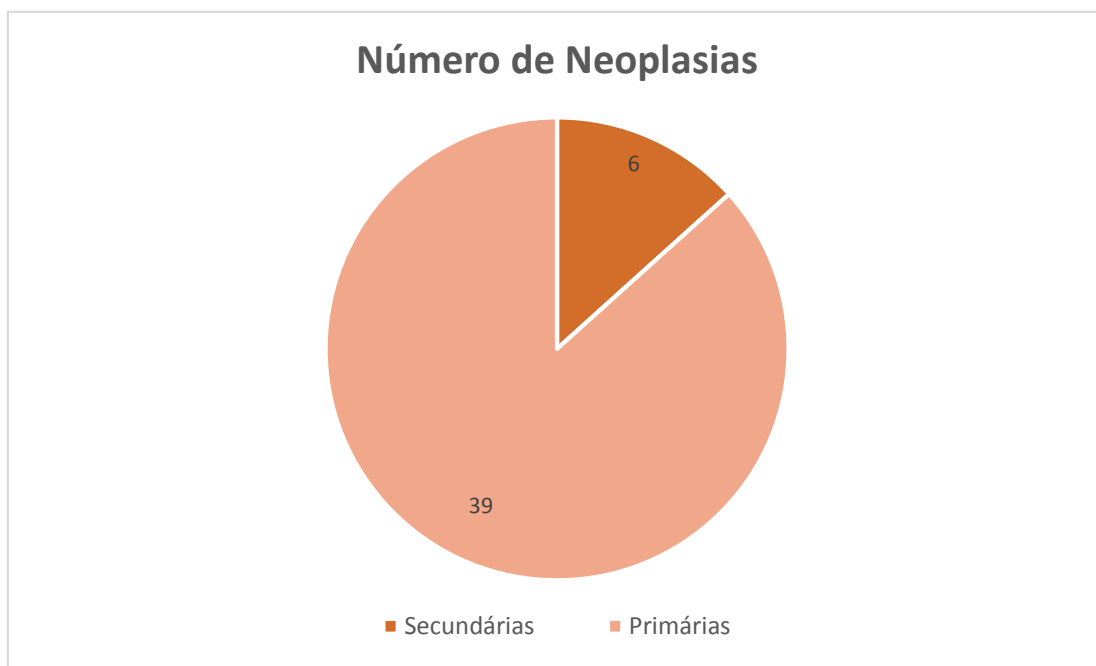
A imunomarcação foi efectuada em 47 amostras (4,12%), já que 4 dos 42 casos apresentavam mais do que uma lesão / alteração patológica.

Estas lesões / alterações patológicas foram maioritariamente neoplásicas (n=45), das quais 51,06% eram benignas e 44,68% malignas. Os dois casos restantes (4,26%) eram de outra natureza. Tratava-se da presença de células epiteliais cutâneas intra-alveolares, em casos de asfixia in *utero* / *intra-parto* (Tabela 1).

Natureza da lesão/alteração patológica	Número de casos
Neoplasia Benigna	24
Neoplasia Maligna	21
Outra	2
Total	47

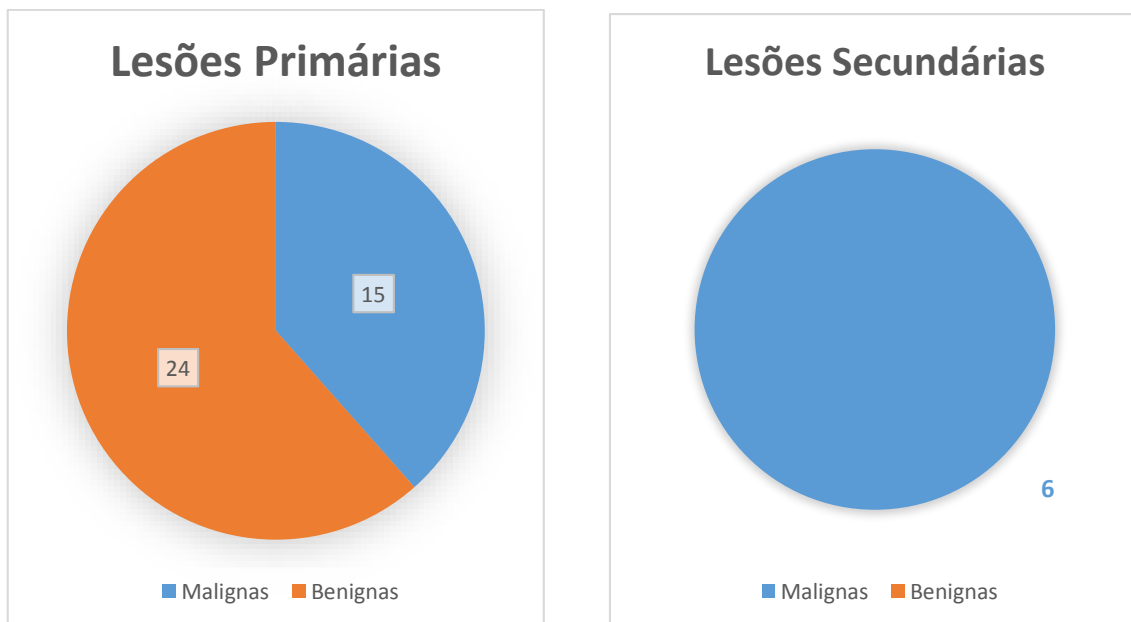
**Tabela 1:** Número de casos relativos à natureza da lesão / alteração patológica

Das 45 lesões neoplásicas, 39 (87%) eram primárias; isto é, estão no local de origem e 6 (13%) eram lesões secundárias, ou seja, metastáticas (Gráfico 1).



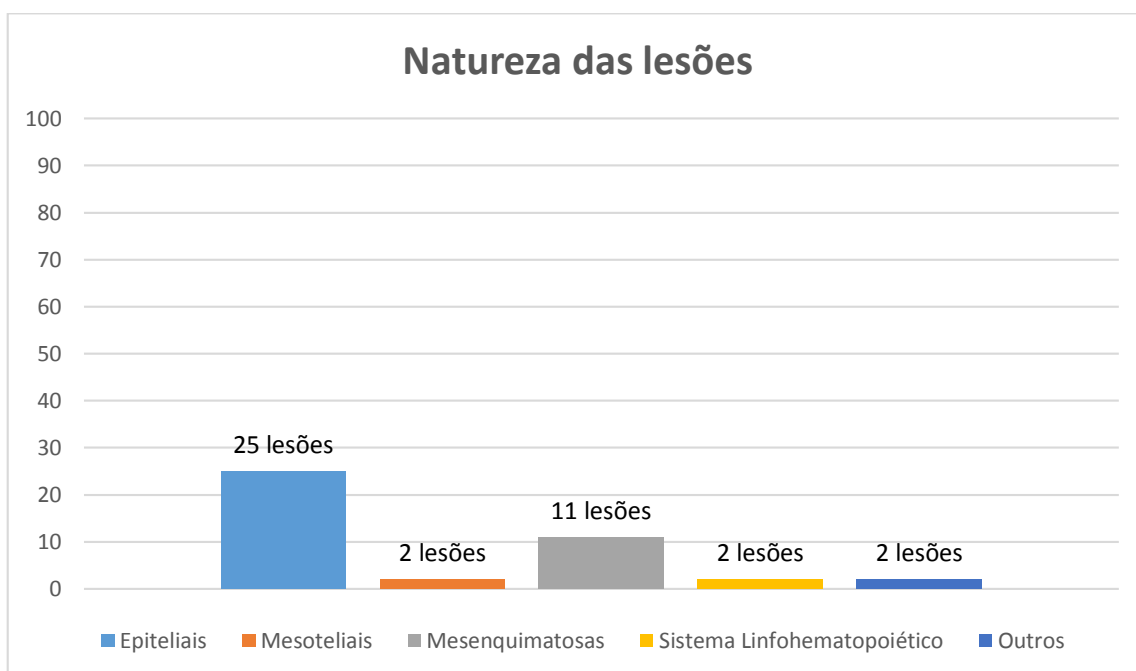
**Gráfico 1** Número de Neoplasias relativo à localização

Das lesões neoplásicas primárias, 24 eram de natureza benigna (61,54%) enquanto 15 (38,46%) eram malignas (Gráfico 2A). As secundárias ou metastáticas (n=6) eram todas malignas (Gráfico 2B).



**Gráfico 2 A, B:** Número de lesões primárias e secundárias em relação ao prognóstico (benigno vs maligno).

A caracterização histogénica das 47 lesões / alterações patológicas revelou 27 de origem **epitelial** – 25 neoplásicas (59,52%) e 2 não tumorais (4,76%) –, 11 **mesenquimatosas** e neoplásicas (26,2%), 2 **mesoteliais** e neoplásicas (4,76%) e 2 **linfoproliferativas** e tumorais (4,76%) (Gráfico 3).



**Gráfico 3:** Tecido onde as lesões / alterações patológicas se originaram.

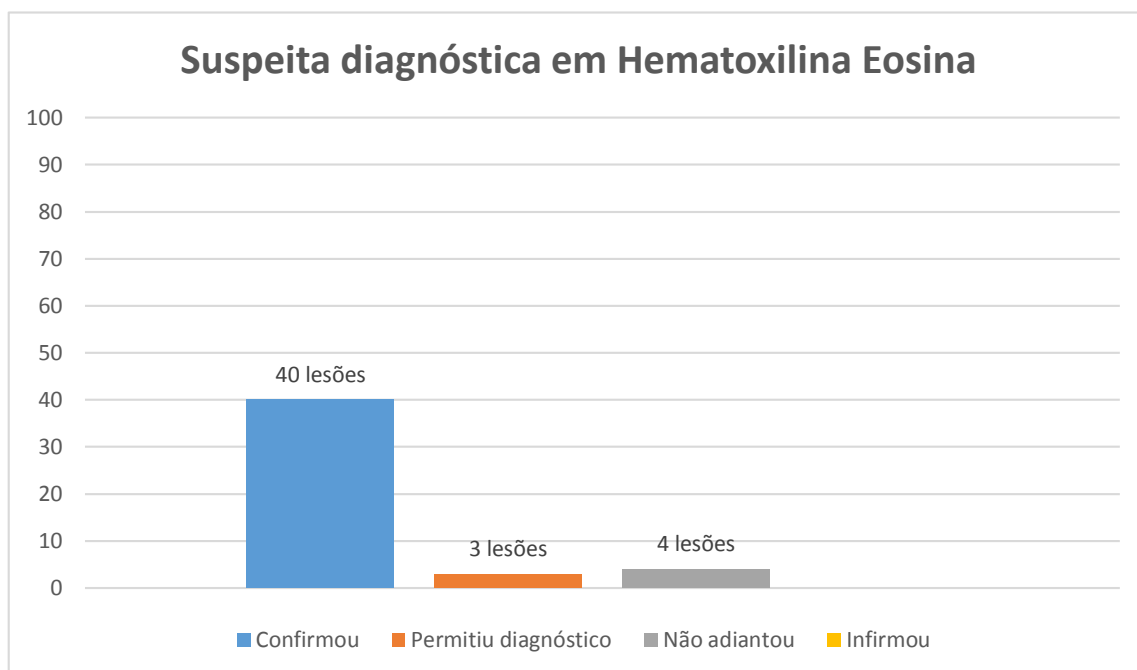
Para a caracterização histogénica destas lesões / alterações patológicas foram utilizados os imunossoros referidos na Tabela 2.

<b>Anticorpo</b>	<b>Nº de casos com marcação</b>	<b>% de casos com marcação</b>
<b>MNF116</b>	25	59,5
<b>CK7</b>	12	28,6
<b>CK20</b>	4	9,5
<b>CEA</b>	6	14,3
<b>EMA</b>	1	2,4
<b>PSA</b>	4	9,5
<b>Cromogranina</b>	3	7,1
<b>Alfa-fetoproteína</b>	1	2,4
<b>Calretinina</b>	3	7,1
<b>Vimentina</b>	12	28,6
<b>Actina</b>	8	19
<b>Desmina</b>	3	7,1
<b>Miosina</b>	2	4,8
<b>CD34</b>	9	21,4
<b>PS100</b>	7	16,7
<b>HMB45</b>	5	11,9
<b>GFPA</b>	1	2,4
<b>NSE</b>	3	7,1
<b>CD30</b>	2	4,8
<b>CD20</b>	3	7,1
<b>CD45</b>	2	4,8
<b>CD10</b>	1	2,4
<b>CD5</b>	1	2,4
<b>CD3</b>	3	7,1
<b>CD68</b>	1	2,4

Tabela 2 Tipo e Distribuição dos anticorpos utilizados.



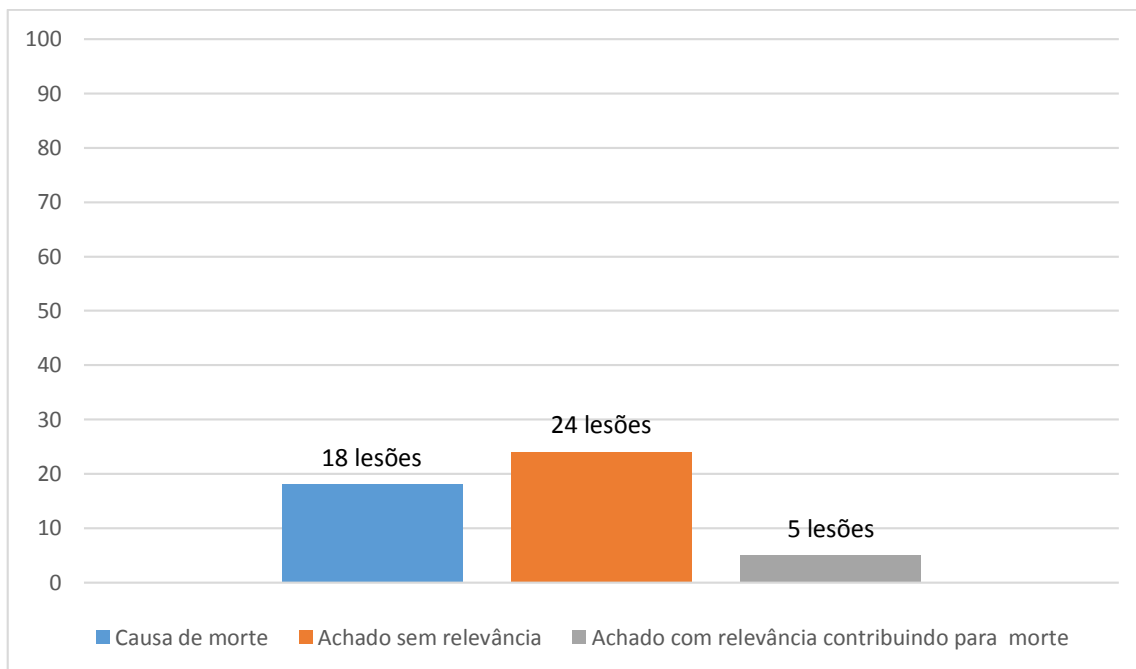
A *Imunohistoquímica* (IHQ) confirmou a hipótese diagnóstica em hematoxilina/eosina (HE) em 40 das 47 lesões / alterações patológicas (85,11%); permitiu realizar o diagnóstico em 3 (6,38%) e não contribuiu para o esclarecimento da hipótese diagnóstica em 4 lesões (8,51%) (Gráfico 4).



**Gráfico 4** Comparação de resultados obtidos através de coloração de rotina (HE) com marcação imunohistoquímica (IHQ).

Nove das 21 neoplasias malignas haviam sido diagnosticadas em vida, 7 das quais com informação clínica de intervenção terapêutica actual ou prévia.

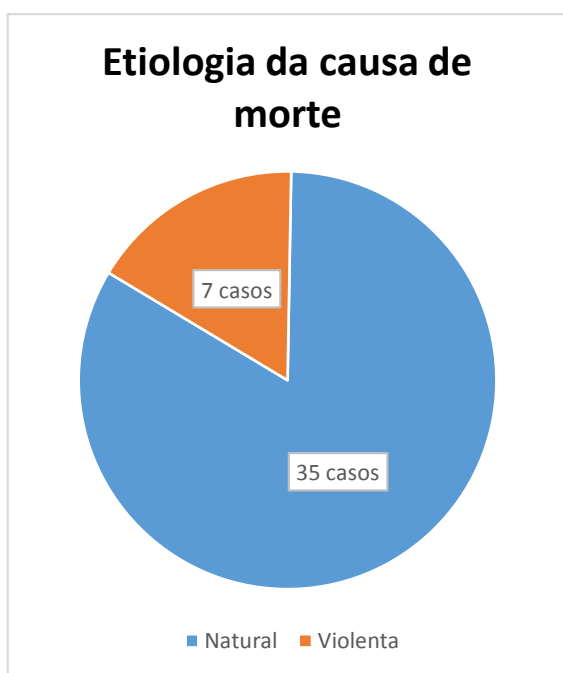
Das 47 lesões / alterações patológicas caracterizadas imunohistoquimicamente, 18 (38,3%) foram efectivamente a causa de morte e 29 (61,7%) constituíram achados autópticos. No entanto, destes achados 24 (82,76%) foram considerados sem relevância para o desfecho fatal; enquanto 5 (17,24%) foram considerados como tendo relevância, ou seja, realmente contribuindo para a morte (Gráfico 5).



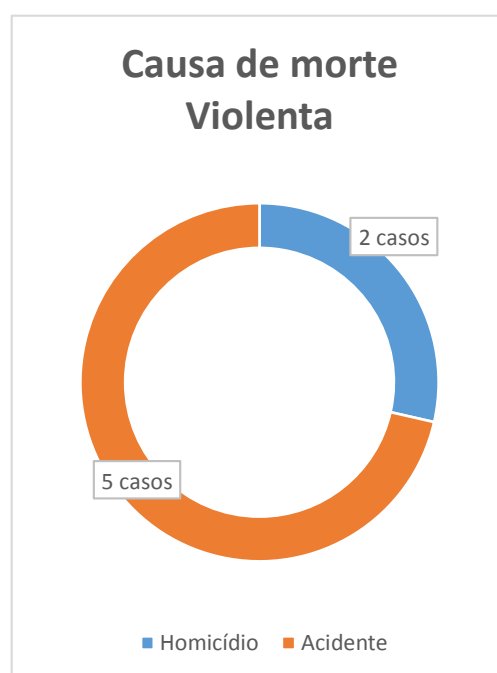
**Gráfico 5** Relevância de achados autópticos para a morte.

Quanto à etiologia médico-legal da morte, 35 dos 42 casos (83,33%) foram vítimas de morte natural e 7 (16,67%) de morte violenta; isto é, com a intervenção de uma força externa como causa desencadeante.

Nos casos de morte violenta, 5 (71,43%) foram acidentes e 2 (28,55%) foram homicídios.

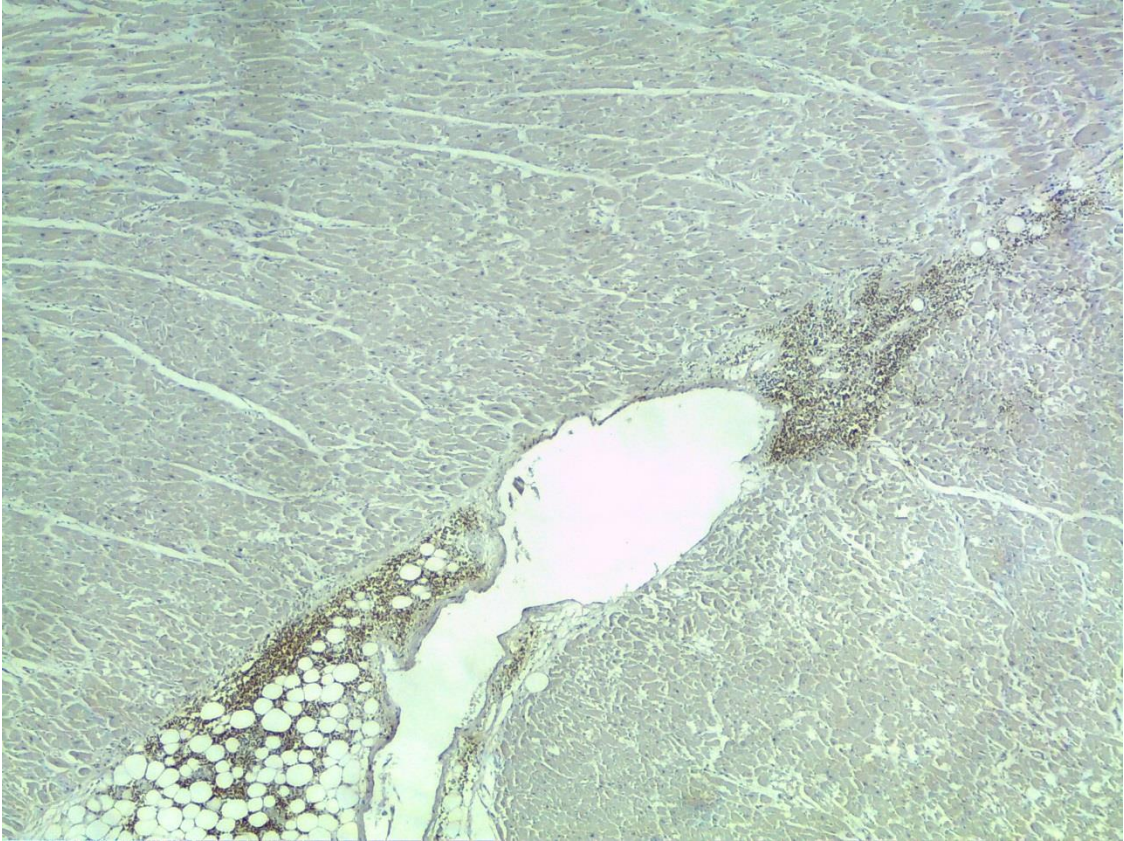


**Gráfico 6** Etiologia de causa de morte

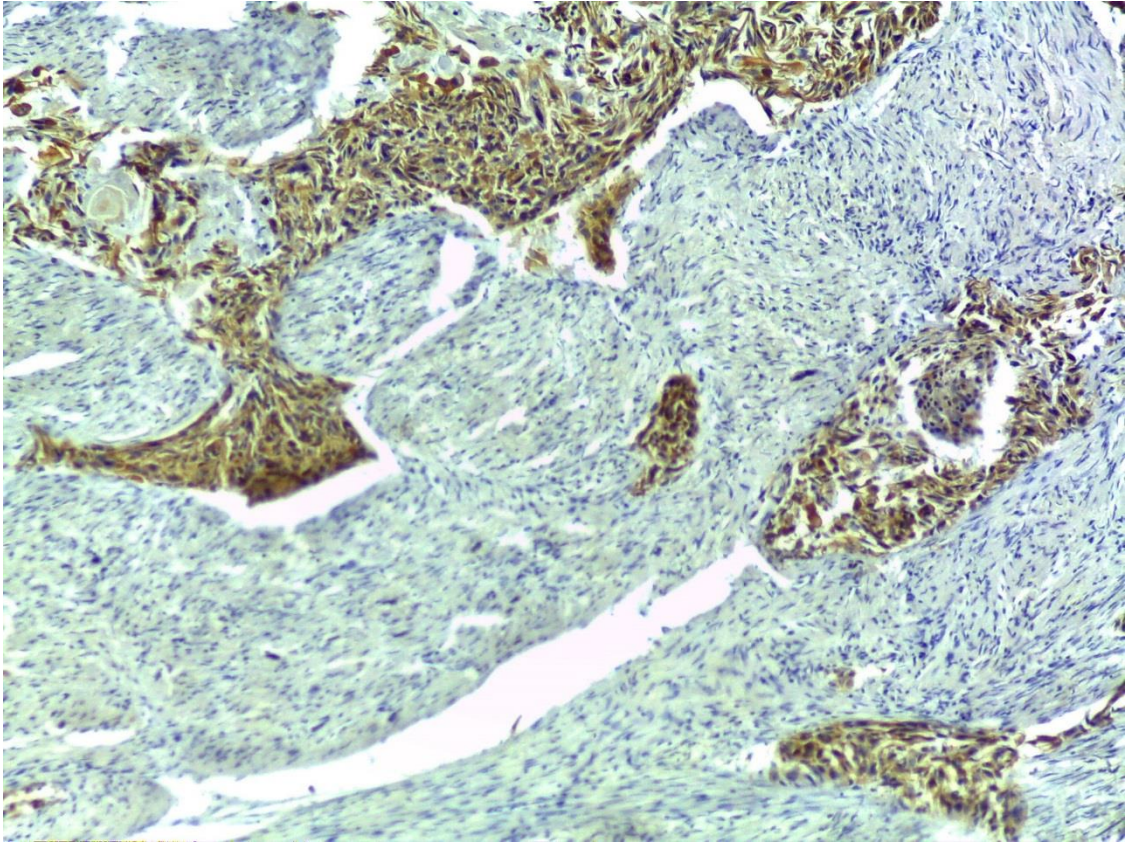


**Gráfico 7** Causa de morte violenta

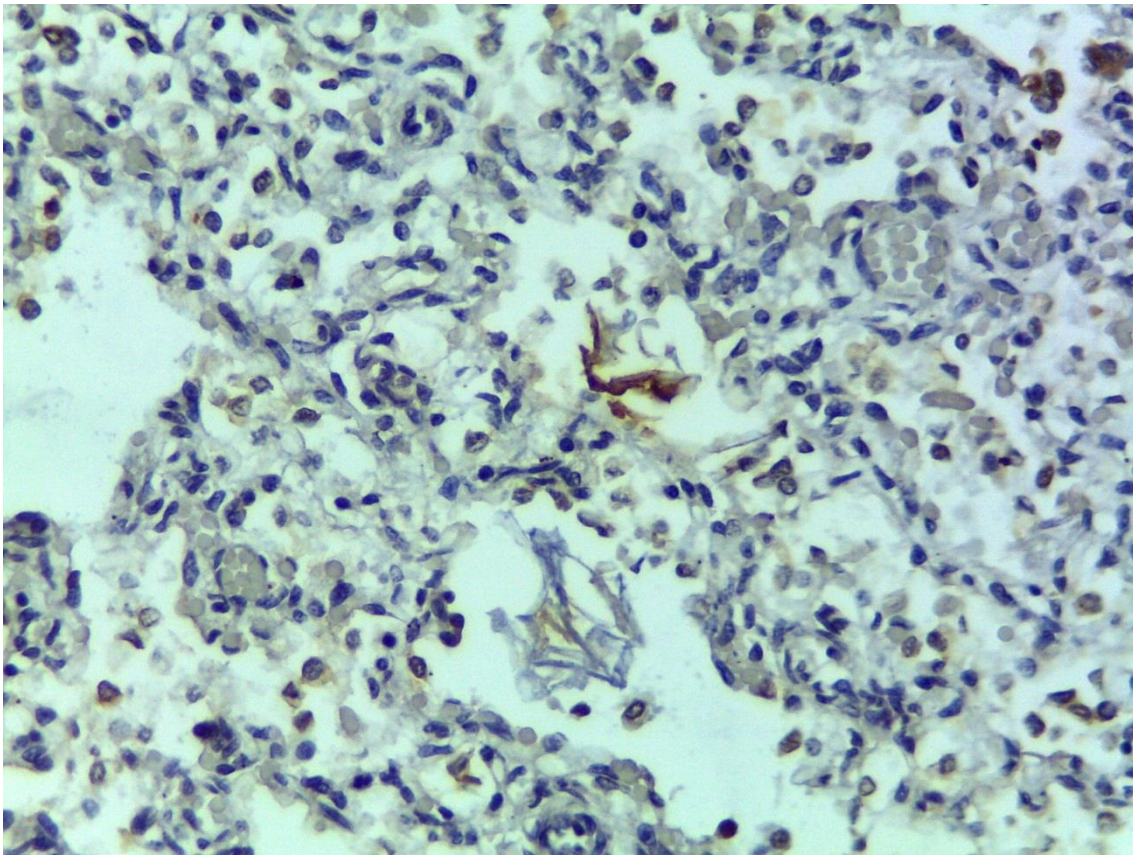
Nas Figuras 7 a 10, apresentamos imagens histopatológicas que ilustram os resultados obtidos.



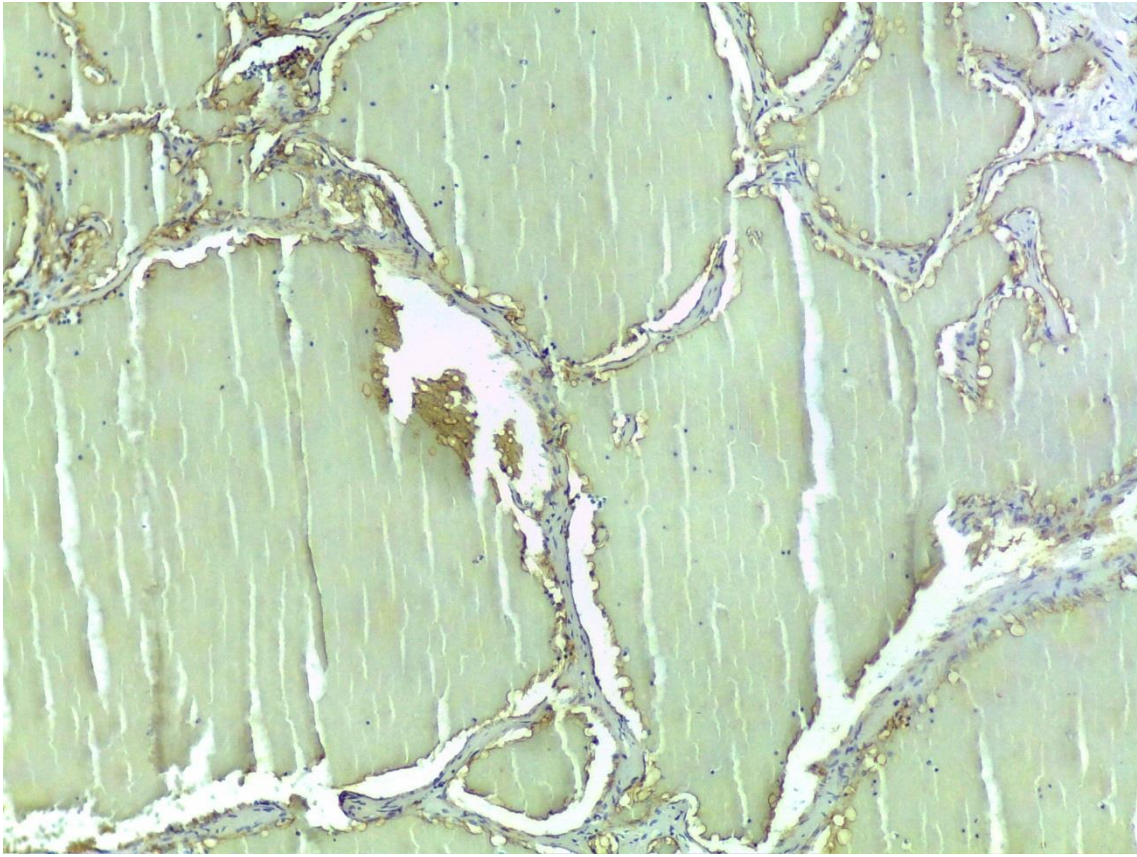
**Figura 7** CD20+, x100, secção de coração. Linfoma não-Hodgkin, B, com envolvimento multissistémico como causa de morte natural, ♂, 73 anos (Fonte: INMLCF, I.P.).



**Figura 8** MNF116+, x100, secção de laringe. Carcinoma pavimento-celular invasivo, moderadamente diferenciado, como causa de morte violenta (asfíxica), ♂, 59 anos (Fonte: INMLCF,I.P.).



**Figura 9** MNF116+, x400, secção de pulmão. “Rolhões” de escamas de queratina / células epiteliais cutâneas intra-alveolares, como causa de morte asfíxica in utero, ♂, feto de 35 semanas de gestação (Fonte: INMLCF, I.P.).



**Figura 10:** CD31+, x100, secção de fígado. Hemangioma cavernoso – tumor mesenquimatoso benigno – um achado autóptico sem relevância para o desfecho fatal, em vítima com causa de morte natural (broncopneumonia), ♀, 55 anos (Fonte: INMLCF,I.P.).

# CAPITULO IV

## 1. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a *Imunohistoquímica* (IHQ) em âmbito forense é uma mais-valia, já que:

- É uma técnica de execução fácil e custo moderado; podendo ser realizada em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina.
- Aplica-se a lesões / alterações patológicas de todas as faixas etárias, desde a vida intra-uterina.
- Aplica-se em ambos os géneros e qualquer afinidade populacional.
- Aplica-se a lesões / alterações patológicas de natureza diversa, desde asfixia *in utero* / intra-parto até à neoplásica (que predomina nesta série).
- À semelhança da prática hospitalar / privada e de estudo forense publicado (Bromley & Trotter, 2011), permite a caracterização das lesões neoplásicas (sobretudo se malignas, moderadamente ou pouco diferenciadas e/ou metastáticas) e a sua correlação com a causa e etiologia médico-legal da morte. Veja-se o exemplo da **Figura 7**, em que o Linfoma não-Hodgkin, B (CD45 +, CD20 +) foi causa de morte natural, pelo seu insuspeitado envolvimento multissistémico. Ou veja-se o caso da **Figura 8**, em que Carcinoma pavimento-celular moderadamente diferenciado da Laringe (desconhecido da vítima e familiares) foi causa de morte violenta, por asfixia mecânica, com obstrução e compressão extrínseca pelo tumor; sendo que a hipótese diagnóstica para o óbito, aquando da autópsia, era de Enfarte Agudo do Miocárdio ou Tromboembolia Pulmonar.
- Mais ainda, as neoplasias podem actuar como concausa de morte, nomeadamente pela associação com tromboembolia pulmonar e/ou pneumonia.
- O facto de 9 das neoplasias malignas terem sido diagnosticadas *antemortem* e destas, 6 haverem sido submetidas ou estarem sob terapêutica, confere importância

acrescida ao seu acurado estudo *postmortem*, dada a sempre possível suspeita de “má-prática” médica / profissionais de saúde, quer na vertente diagnóstica quer na de tratamento, com as consequências jurídicas.

## 2. CONCLUSÃO

O contributo da Imunohistoquímica para a Investigação Médico-Legal é, de facto, real e relevante quer em morte de causa natural quer violenta; devendo, pois, ser aceite como procedimento de rotina Anátomo-Patológica Forense.



# BIBLIOGRAFIA

- Actin (Muscle)*. (s.d.). Obtido em 29 de Março de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p102010/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p102010/prod_products.htm)
- Almeida, J. R., Pedrosa, N. d., Leite, J. B., Fleming, T. R., Carvalho, V. H., & Cardoso, A. d. (2007). Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura.
- Bancroft, J. D., & Gamble, M. (2002). *Theory and practice of histological techniques* (5ª ed.). Harcourt.
- Barra, M. B. (2006). *O uso da Imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações*. Porto Alegre.
- Bi, H., Yang, Y., Huang, J., Li, Y., Ma, C., & Cong, B. (Maio de 2013). Immunohistochemical detection of S100A1 in the postmortem diagnosis of acute myocardial infarction. *Diagn Pathol*.
- Biosystems, L. (s.d.). *An Animated Guide to Immunohistochemistry*. Obtido de An Animated Guide to Immunohistochemistry: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-animated-guide-to-immunohistochemistry/>
- Boenisch, T. (2001). *Immunochemical staining methods and book* (3ª ed.). Dako Corporation.
- Borges-Ferro, A. (2014). *Imunohistoquímica*. Lisboa, Portugal.
- Bromley, A. B., & Trotter, M. J. (2011). Immunohistochemistry utilization in autopsy pathology: A Canadian experience. *Pathology - Research and Practice*, pp. 241-246.
- Calretinin*. (s.d.). Obtido de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/uk/ar38/p118920/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/uk/ar38/p118920/prod_products.htm)
- Carcinoembryonic Antigen (CEA)*. (s.d.). Obtido em 29 de Março de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p102510/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p102510/prod_products.htm)
- CD10*. (s.d.). Obtido em 2 de Maio de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p235500/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p235500/prod_products.htm)
- CD30*. (s.d.). Obtido em 2 de Maio de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p102850/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p102850/prod_products.htm)
- CD31*. (s.d.). Obtido em 27 de Abril de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p102870/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p102870/prod_products.htm)
- CD34*. (s.d.). Obtido em 27 de Abril de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p102910/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p102910/prod_products.htm)
- CD45*. (s.d.). Obtido em 2 de Maio de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p103020/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p103020/prod_products.htm)

- CD68. (s.d.). Obtido em 2 de Maio de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p103250/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p103250/prod_products.htm)
- Cytokeratin 20*. (s.d.). Obtido em 29 de Março de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p103700/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p103700/prod_products.htm)
- Cytokeratin 5/6*. (s.d.). Obtido em 29 de Março de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p103610/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p103610/prod_products.htm)
- Cytokeratin 7*. (s.d.). Obtido em 29 de Março de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p103620/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p103620/prod_products.htm)
- Dabbs, J. D. (2002). *Diagnostic immunohistochemistry*. Churchill Livingstone.
- Davceva, N., Janevska, V., Ilievski, B., Spaveska, L., & Popeska, Z. (Maio de 2012). Dilemmas concerning the diffuse axonal injury as clinicopathological entity in forensic medical practice. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, pp. 413-418.
- Desmin*. (s.d.). Obtido em 27 de Abril de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p104050/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p104050/prod_products.htm)
- Dettmeyer, R. B. (1 de Março de 2014). The role of histopathology in forensic practice: an overview. *Forensic Sci Med Pathol*, pp. 10:401-412.
- Epithelial Membrane Antigen (EMA)*. (s.d.). Obtido de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/uk/ar49/p235229/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/uk/ar49/p235229/prod_products.htm)
- Fragata, V. J., & Faria, P. R. (2011). Erro em medicina e o direito penal. *Lex Medicinæ - Revista Portuguesa de Direito da Saúde*, No14, pp. 22, 17 e ss.
- Fronczek, J., Hollingbury, F., Biggs, M., & Ruty, G. (23 de Novembro de 2013). The role of histology in forensic autopsies: is histological examination always necessary to determine a cause of death? *Forensic Sci Mad Pathol*, pp. 10:39-43.
- Grahama, D., Smithb, C., Reicharda, R., Leclercqd, P., & Gentleman, S. (2004). Trials and tribulations of using b-amyloid precursor protein immunohistochemistry to evaluate traumatic brain injury in adults. *Forensic Science International*, pp. 89-96.
- Immunology, T. B. (s.d.). *Antibody Structure*. Obtido de The Biology Project - Immunology: <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/antibody/structure.html>
- INMLCF, I. (s.d.). *Missão*. Obtido em 27 de Outubro de 2015, de Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses: <http://www.inml.mj.pt/sobre-o-inmlcf/missao>
- Janasi, B., & Schmid, K. W. (1993). *Immunocytochemistry in Diagnostic Histopathology*. Churchill Livingstone.
- Keiichi, T. (1996). Forensic application of organ-specific antigens. *Forensic Science International*, pp. 63-69.
- Kondo, T., & Ishida, Y. (2010). Molecular pathology of wound healing. *Forensic Science International*, pp. 93-98.
- Kubo, S., Kitamura, O., Orihara, Y., Ogata, M., Tokunaga, I., & Nakasono, I. (Fevereiro de 1998). Immunohistochemical diagnosis and significance of forensic neuropathological changes. *The journal of medical investigation*, pp. 44(3-4):109-19.

- Langlois, N. e. (2006). The use of histology in 638 Coronal post-mortem examinations of adults: an audit. *46, No. 4*.
- Leong, A. S.-Y., Cooper, K., & Leong, F. (2002). *Manual of diagnostic antibodies of immunohistology* (2ª ed.). GMM.
- Luna, A. (Abril de 2009). Is postmortem biochemistry really useful? Why is it not widely used in forensic pathology? *Legal Medicine*, pp. 527-539.
- Martin, L. M. (s.d.). O erro médico e a má prática nos códigos Brasileiros de ética médica. *Revista Bioética*, 2(2).
- Melanosome. (s.d.). Obtido de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/uk/ar38/p105190/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/uk/ar38/p105190/prod_products.htm)
- MNF116, Cytokeratin Clone. (s.d.). Obtido em 29 de Março de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p103600/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p103600/prod_products.htm)
- Myosin Heavy Chain (Smooth Muscle). (s.d.). Obtido de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/uk/ar38/p105350/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/uk/ar38/p105350/prod_products.htm)
- Pathologika. (s.d.). *Pathologika Imunohistoquímica*. Obtido de Pathologika: <http://www.pathologika.com/imuno-histoquimica/>
- Pereira, A. G. (2007). Breves notas sobre a responsabilidade médica em Portugal. *Revista Portuguesa do Dano Corporal*, pp. 11-22.
- Ramirez, C. S., & Torretti, J. T. (2004). Surfactante pulmonar. *Revista Pediatria Electrónica*, 1(1).
- Ribeiro-Silva, A., Martin, C., & Rossi, M. (2002). Is Immunohistochemistry a useful tool in the post-mortem recognition of myocardial hypoxia in human tissue with no morphological evidence of necrosis? *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 23(1):72-77.
- Vimentin. (s.d.). Obtido em 27 de Abril de 2015, de Monoclonal Mouse Anti-Human: [http://www.dako.com/dist/ar38/p106300/prod\\_products.htm](http://www.dako.com/dist/ar38/p106300/prod_products.htm)
- Yazıcı, Y. A., Şen, H., Aliustaoğlu, S., Sezer, Y., & İnce, C. H. (Maio de 2015). Evaluation of the medical malpractice cases concluded in the General Assembly of Council of Forensic Medicine. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 21(3).
- Yoshida, C., Ishikawa, T., Michiue, T., Zhao, D., Komatsu, A., Quan, L., & Maeda, H. (2009). Immunohistochemical distribution of chromogranin A in medicolegal autopsy materials. *Legal Medicine*, pp. 5231-5233.
- Zhu, B.-L., Ishida, K., Quan, L., Li, D.-R., Taniguchi, M., Fujita, M. Q., . . . Tsuji, T. (2002). Pulmonary immunohistochemistry and serum levels of a surfactant-associated protein A in fatal drowning. *Legal Medicine*, pp. 1-6.

# ANEXOS

## **PROCEDIMENTO LSAB-HRP**

1. Desparafinar e hidratar
2. Recuperação antigénica:
  - » Micro-ondas, tampão citrato 0,01M, pH 6.0
  - » Potência máxima, 3 ciclos de 2 minutos
3. Deixar arrefecer 10 a 15 minutos
4. Passar por água destilada
5. Peroxidase block 5 minutos
6. Lavar com água 5 minutos
7. Tampão-lavagem 5 minutos
8. Anticorpo primário 45 minutos
9. Tampão-lavagem 5 minutos
10. Ligando-biotinizado 15 minutos
11. Tampão-lavagem 5 minutos
12. Streptavidina-HRP 15 minutos
13. Tampão-lavagem 5 minutos
14. DAB 15 minutos
15. Água destilada 5 minutos
16. Contrastar com hematoxilina 5 minutos
17. Água corrente 10 minutos
18. Desidratar
19. Montar lâmina (colocar lamela)