

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mariana Paixão Ferreira dos Santos

Six test tubes containing liquids of different colors: red, orange, yellow, green, light blue, and dark red.

HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA:
APLICABILIDADE NO CONTEXTO FORENSE

Dissertação no âmbito do Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses orientada pela Professora Doutora Isabel Fonseca e co-orientada pela Mestre Cristina Cordeiro. Apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Junho de 2022

Faculdade de Medicina
da Universidade de Coimbra

Histoquímica e Imunohistoquímica: Aplicabilidade no Contexto Forense

Mariana Paixão Ferreira dos Santos

Dissertação de Mestrado na área científica de Medicina Legal e Ciências Forenses orientada pela Professora Doutora Isabel Fonseca e co-orientada pela Mestre Cristina Cordeiro. Apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Junho de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Agradeço primeiramente às minhas orientadoras, Professora Doutora Isabel Fonseca e Mestre Cristina Cordeiro, por toda a disponibilidade, apoio e, acima de tudo, por me guiarem ao longo deste processo.

Ao Mestre Calil Makhoul pela ajuda na recolha dos dados e por todo o tempo dispensado.

Ao Professor Doutor Duarte Nuno Vieira e ao Professor Doutor Francisco Corte Real pelo investimento constante na Medicina Legal e pela sua promoção, nomeadamente através deste Mestrado.

Quero agradecer à minha Rosa, por me ensinar a querer sempre mais, por me incentivar a aprender, a crescer pessoal e profissionalmente e por ser uma mãe fantástica.

Ao meu *Ricky*, tão simplesmente por ser meu pai.

À minha irmã que, por ser tão diferente de mim, me ensina lições todos os dias.

E ao Frederico, pela paciência interminável, compreensão e apoio incondicional.

Finalmente, às minhas colegas do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPO), E.P.E., por serem sempre compreensivas e por todas as vezes que se comprometeram a assegurar o serviço nas horas em que me ausentei para estudar. Agradeço também aos anatomopatologistas que esclareceram a minha lista interminável de dúvidas.

Resumo

Palavras-chave: Causa de morte, Medicina Legal, Anatomia Patológica, Histoquímica, Imunohistoquímica.

Na Medicina Legal os objetivos a cumprir na área da Anatomia Patológica são bastante diferentes do contexto hospitalar, e devem focar-se sobretudo na determinação da causa de morte, ao invés de terem uma aplicação relacionada ao diagnóstico, prognóstico e decisão terapêutica. Para tal, adicionalmente à coloração histológica de rotina (Hematoxilina e Eosina), podem ser usadas técnicas complementares, como a Histoquímica e a Imunohistoquímica, cuja realização deve ser ponderada em contexto médico-legal.

O intuito deste trabalho é partir de casos nos quais tenham sido feitos pedidos de técnicas complementares e avaliar a sua contribuição para a determinação da causa da morte. Pretende-se, deste modo, compreender a aplicabilidade das técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas em diferentes contextos, nomeadamente comparando a sua utilidade em causas de morte naturais *versus* causas de morte violentas, de forma a promover uma maior rentabilização de recursos no futuro, evitando a realização de técnicas que não irão ter um contributo significativo para os objetivos de um relatório médico-legal, evitando gastos desnecessários e atrasos na conclusão dos respetivos processos.

Demonstrou-se que, tanto as técnicas histoquímicas como as imunohistoquímicas, têm uma maior contribuição para a determinação da causa de morte em situações de mortes naturais, do que violentas, sendo que o seu principal propósito foi o de confirmar e clarificar alterações já observadas por Hematoxilina e Eosina.

Observou-se um grande número de técnicas realizadas sem contributo direto para o estabelecimento da causa de morte, o que pode ser justificado pela falta de diretrizes adaptadas ao contexto forense. De forma a reduzir este número e permitir uma gestão mais eficaz de tempo e recursos, deveriam ser criadas *guidelines* específicas para Anatomia Patológica Forense, com o intuito de clarificar quais os protocolos mais úteis e quais as principais situações em que devem, ou não, ser realizados aquelas técnicas.

Abstract

Keywords: Cause of death, Legal Medicine, Histopathology, Histochemistry, Immunohistochemistry.

From a Legal Medicine standpoint, the purposes of histological examination are quite different from the ones related to clinical practice. Although in the hospital field the histological analysis provides prognostic and therapeutic options, in forensics the main goal of this analysis is to establish cause of death. Therefore, in addition to the Hematoxylin & Eosin stain used routinely in histological observation, ancillary techniques such as Histochemistry and Immunohistochemistry adapted to the forensic context can be performed.

The purpose of this study was to evaluate the usefulness of the ancillary techniques performed at the Center Branch of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences in the cause of death determination. To do so, we evaluated the contribution of Histochemical and Immunohistochemical techniques in different contexts, and compared their usefulness in natural vs. violent deaths, in order to promote better resource's management in the future, avoiding procedures that won't be significant to the final conclusions of the medico-legal report.

The additional information provided by both histochemical and immunohistochemical stains was higher in natural causes of death when compared to violent causes of death. The main purpose of these techniques was to confirm and clarify the alterations already assessed by Hematoxylin & Eosin, instead of finding these alterations.

A significant number of techniques performed did not provide any information that could be directly related to the cause of death. The inexistence of guidelines specific for legal medicine could be the main source of this issue. Therefore, the creation of histological guidelines adapted to the forensic field can be an important step in reducing the number of techniques requested, allowing for a better time and resources management. These guidelines should clarify which techniques are more useful as well as the main situations in which they should or should not be performed.

Lista de Abreviaturas

β -HCG	β - Gonadotropina Coriônica Humana
κ	Kappa
λ	Lambda
AB	<i>Alcian Blue</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
Ck	Citoqueratina
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro
EAM	Enfarte Agudo do Miocárdio
EMA	<i>Epithelial Membrane Antigen</i>
EVG	<i>Elastic Van Gieson</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
H&E	Hematoxilina e Eosina
HQ	Histoquímica/o/as/os
IHQ	Imunohistoquímica/o/as/os
INMLCF, I.P.	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
LCA	<i>Leukocyte Common Antigen</i>
ML	Médico-Legal/ais
NSE	<i>Neuron-Specific Enolase</i>
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>
PIE	Ponto Isoelétrico
TEP	Tromboembolia Pulmonar
TM	Tricrômio de Masson
VC	Vermelho do Congo
ZN	Ziehl-Neelsen

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas	ix
Índice Geral.....	xi
Índice de Gráficos, Figuras e Tabelas.....	xiii
1. Introdução	xv
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1. Relevância da Histopatologia no Contexto Forense	18
2.2. Histoquímica	19
2.3. Imunohistoquímica.....	21
3. Materiais e Métodos	27
4. Resultados.....	29
4.1. Histoquímica	31
4.2. Imunohistoquímica.....	33
5. Discussão.....	35
6. Conclusão	43
Bibliografia	45

Índice de Gráficos, Figuras e Tabelas

Índice de Gráficos

Gráfico 1 e 2 – Gráfico de barras com representação das frequências de idades dos casos selecionados (à esquerda), cada barra corresponde a um intervalo de 5 anos. Gráfico circular com representação dos sexos dos casos selecionados (à direita).	29
Gráfico 3 - Representação das técnicas HQ de acordo com os diferentes protocolos pedidos.....	30
Gráfico 4 - Representação das técnicas IHQ de acordo com os diferentes protocolos pedidos.	30

Índice de Figuras

Figura 1 – Observação microscópica de fragmento de miocárdio onde se identifica um vaso, corado por (A) H&E, (B) Tricrómio de Masson e (C) Desmina (40x).	17
Figura 2 - Organograma ilustrativo dos passos seguidos para obtenção da amostra e recolha de dados.	28

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resumo de técnicas HQ [adaptado de (4)].	20
Tabela 2 - Resumo de técnicas IHQ (1ª parte) [adaptado de (33) (34) (35)].	23
Tabela 3 - Resumo de técnicas IHQ (2ª parte) [adaptado de (33) (34) (35) (36)].	24
Tabela 4 - <i>Scores</i> atribuídos a cada técnica, que pretende traduzir a sua relevância na determinação da causa de morte.	27
Tabela 5 - Principais estatísticas descritivas aplicadas aos pedidos HQ e IHQ.	29
Tabela 6 - Frequências dos <i>scores</i> atribuídos às técnicas HQ de acordo com a causa de morte.....	31
Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis para as técnicas HQ, com nível de significância de 0,05.	32
Tabela 8 – Análise estatística Pairwise para as técnicas HQ, com nível de significância de 0,050 e valores ajustados pela correção de Bonferroni.....	32
Tabela 9 – Média dos <i>scores</i> atribuídos a cada tipo de causa de morte, incluindo o número total técnicas HQ em cada causa de morte e o desvio padrão associado à média.	32
Tabela 10 - Frequências dos <i>scores</i> atribuídos às técnicas IHQ de acordo com a causa de morte.....	33

Tabela 11- Teste de Kruskal-Wallis para as técnicas IHQ, com nível de significância de 0,05	33
Tabela 12 - Análise estatística Pairwise para as técnicas IHQ, com nível de significância de 0,050 e valores ajustados pela correção de Bonferroni.....	34
Tabela 13 - Média dos <i>scores</i> atribuídos a cada tipo de causa de morte, incluindo o número total técnicas IHQ em cada causa de morte e o desvio padrão associado à média.....	34

I. Introdução

A Histoquímica (HQ) e a Imunohistoquímica (IHQ) são dois tipos de técnicas complementares que podem ser realizadas no âmbito da Anatomia Patológica. O seu objetivo é evidenciar estruturas, constituintes ou marcadores que não são visíveis através da coloração de rotina, a Hematoxilina e Eosina (H&E).

No âmbito clínico estas técnicas são amplamente utilizadas nos mais variados contextos, de forma a auxiliar no diagnóstico e prognóstico de diversas patologias. No contexto Médico-Legal (ML), em que o objetivo principal da Anatomia Patológica Forense é o estabelecimento da causa de morte, estas técnicas poderão ter uma aplicabilidade diferente. Já não será necessário o diagnóstico para uma decisão terapêutica, que pode necessitar de muito mais contexto e informações, do que aquele necessário para compreender se uma lesão específica poderia ou não ter conduzido à morte.

Este trabalho visa estudar as técnicas complementares requeridas em processos histológicos da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF, I.P.), de forma a avaliar a sua necessidade para cada contexto, com o objetivo de promover uma melhor alocação de esforços e recursos.

Para tal, recolheu-se informação relativa às técnicas pedidas em cada processo, à causa de morte constante no relatório de autópsia e aos achados descritos no relatório histológico. Com base nesta informação atribuíram-se *scores* individualmente para cada técnica, de acordo com a pertinência da sua realização para a determinação da causa de morte. Foram criados três grupos de causa de morte (indeterminada, natural e violenta), e os *scores* dos diferentes grupos foram comparados entre si. Este processo foi realizado individualmente para as técnicas HQ e IHQ.

Pretende-se concluir se a aplicabilidade das técnicas complementares difere de acordo com o tipo de morte. O esperado será que as técnicas HQ e IHQ tenham maior aplicabilidade em causas de morte naturais, fornecendo informações que permitam caracterizar melhor esta causa, do que em morte violentas, onde as técnicas serão mais utilizadas para caracterizar alterações não relacionadas à causa de morte.

O objetivo principal é o de determinar se existe um elevado número de técnicas realizadas que não têm influência na determinação da causa de morte. Cada técnica adicional traduz-se num custo, não só monetário, como também material, de recursos humanos e de tempo, pelo que a sua gestão deve ser ponderada e adequada a cada caso.

2. Revisão de Literatura

Histologia é a ciência que estuda as células, mais concretamente, a histopatologia recorre à observação macro- e microscópica para estudar doenças, do ponto de vista celular. (1) De forma a preparar os tecidos para a visualização microscópica, as amostras são submetidas a uma sequência de etapas, a Técnica Histológica. Este conjunto de procedimentos visa a preservação, preparação e coloração dos tecidos, do qual resulta uma lâmina histológica que pode ser visualizada ao microscópio. (2) (3)

A HQ e a IHQ são duas áreas, dentro da histologia, que partilham algumas semelhanças uma vez que ambas permitem evidenciar componentes que não são visíveis, ou que são difíceis de identificar, com a coloração de H&E, que é a usada por rotina. (4) (5) A principal diferença entre ambas é que as técnicas HQ visam localizar componentes estruturais dos tecidos com base em afinidades químicas entre os corantes e os componentes das células, enquanto a marcação IHQ se baseia na afinidade antigénio-anticorpo para detetar moléculas (os antigénios), apresentando uma maior sensibilidade e especificidade. (2) (6) (7) (8) (9)

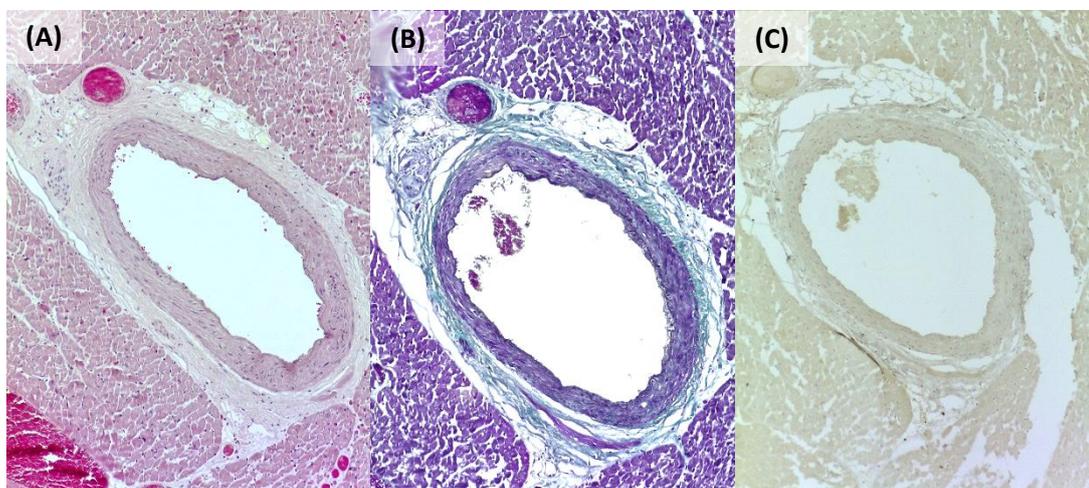


Figura 1 – Observação microscópica de fragmento de miocárdio onde se identifica um vaso, corado por (A) H&E, (B) Tricrómio de Masson e (C) Desmina (40x).

Em contexto hospitalar, as técnicas podem ser efetuadas em amostras de várias naturezas, tanto de autópsias anatomoclínicas, como biópsias e peças cirúrgicas de pacientes, tendo como objetivo clarificar o diagnóstico, de forma a obter o máximo de informação necessária para uma decisão terapêutica o mais adequada possível à situação em concreto. Esta informação é especialmente valiosa em casos de neoplasias, por exemplo, podendo ter um impacto significativo

na vida dos pacientes. (2) (10) (11) Em doenças infecciosas, as técnicas podem ser utilizadas para a identificação de vírus, fungos e bactérias. (12)

Contudo, no contexto ML, em que já não há necessidade de intervenção terapêutica, a pertinência da realização de técnicas HQ e IHQ poderá ser mais controversa e, à partida, ser necessária em menos casos. Neste âmbito, o objetivo principal será determinar a causa da morte, o que no contexto histopatológico, significa que é necessário compreender se as alterações celulares observadas, resultarão em consequências suficientemente graves para o organismo para que lhes seja imputada a causa de morte. (13) (14) (15) (16)

A consulta de publicações científicas sobre esta matéria revelou escassos estudos, e nos quais se encontram resultados discordantes.

2.1. Relevância da Histopatologia no Contexto Forense

A análise histológica de amostras recolhidas em autópsias ML tem como principal objetivo detetar ou confirmar a causa da morte. Porém, podem existir outros objetivos secundários relacionados com o esclarecimento das circunstâncias em que a morte ocorreu e ainda um propósito académico. Estes objetivos secundários incluem datar lesões e determinar a sua vitalidade, identificar células ou outro material biológico para investigação futura, detetar ou excluir achados patológicos, avaliar intervenções médicas, confirmar diagnósticos realizados em vida e também caracterizar patologias genéticas que devem ser comunicadas aos médicos assistentes de eventuais familiares. (16) (17) (18)

Em Portugal, a colheita de amostras para histopatologia é realizada por rotina na maioria das autópsias ML, sendo o coração, pulmões, fígado e cérebro os órgãos colhidos com maior frequência. No Reino Unido, por exemplo, a realidade é diferente e a realização de colheita para histologia é feita apenas em casos específicos, em que a causa de morte não seja evidente por meios macroscópicos. Perante este contexto, existe muito debate acerca do papel da histopatologia como prática rotineira nas autópsias ML. (19)

Molina et al. demonstraram que a análise histológica apenas alterou a causa ou mecanismo de morte em 1% dos casos de autópsias de rotina. Sendo consideradas “de rotina” as autópsias em que existiam evidências macroscópicas que suportavam uma determinada causa e mecanismo de morte. (19). Fronczek também concluiu que a análise histológica não é crucial para a determinação da causa e mecanismo de morte em autópsias ML. (20)

Já Grandmaison et al. afirmam que a histologia permitiu estabelecer a causa de morte em 8,4% dos casos, sendo particularmente importante na determinação de causas de morte naturais, que estavam anteriormente referidas como indeterminadas. (21). O que é consistente com o estudo de Langlois, que concluiu que a histologia contribuiu para o estabelecimento de causa de morte em 53% dos casos, mas que apenas alterava o mecanismo de morte em 13% dos casos. (22)

De-Giorgio afirma que a análise histológica tem relevância para além do estabelecimento de causa e mecanismo de morte, sendo necessária em todas as autópsias. A histologia ajuda, não só,

a detetar lesões e patologias não visíveis a macroscopicamente, como se demonstra essencial na documentação do caso, podendo ser uma prova valiosa em contexto jurídico. (23) (24)

Perante opiniões tão distintas, torna-se difícil adotar uma posição relativamente à utilidade da análise histológica. Porém, os estudos referidos foram realizados em autópsias para as quais já havia indícios claros da causa de morte, o que pode influenciar as suas conclusões. A histologia é crucial em muitos casos nos quais não existe causa de morte aparente, é útil para determinar a vitalidade de lesões e funciona como um registo fidedigno dos achados durante a autópsia, preservados através de blocos e lâminas que podem ser revistos a qualquer momento.

2.2. Histoquímica

As técnicas HQ dependem de mecanismos físicos e químicos. A maioria das técnicas tem como base a adsorção do corante, que posteriormente se liga aos componentes do tecido por ligações eletrostáticas, covalentes ou pontes de hidrogénio. (4) (25)

A coloração nuclear ocorre essencialmente através de dois mecanismos: ligação com corantes básicos, uma vez que o núcleo é rico em ácidos nucleicos, conferindo-lhe uma carga negativa; e coloração usando corantes combinados com mordentes metálicos que facilitam a ligação. A coloração nuclear mais utilizada é a hematoxilina, contudo a hemateína, que é um produto da oxidação da hematoxilina, é que atua como corante. (4) (25)

Já a coloração do citoplasma depende das proteínas que o constituem, que podem ter carga positiva ou negativa, uma vez que são anfotéricas. Isto dá origem a uma organização intracelular das proteínas, que migram de acordo com cargas elétricas, de forma a atingir o equilíbrio, do qual resulta o Ponto Isoelétrico (PIE), no qual deixa de existir esta migração e que tem $\text{pH} \approx 6$. Abaixo do PIE ($\text{pH} < 6$) a carga elétrica total das proteínas citoplasmáticas é positiva, pelo que revelam afinidade por corantes aniónicos (ácidos); por oposição, acima do PIE ($\text{pH} > 6$) a carga elétrica total é negativa e verifica-se atração por corantes catiónicos (básicos). Quando as proteínas são coradas por ácidos são denominadas acidofílicas, e por corantes básicos, são chamadas basofílicas. A Eosina é o corante mais utilizado para corar o citoplasma, e tem carga negativa, pelo que a coloração deve ocorrer com $\text{pH} < 6$. (4) (25)

A denominação de corantes como ácidos ou básico refere-se à sua carga, corantes ácidos têm carga negativa e são denominados aniónicos e corantes básicos têm carga positiva e são denominados catiónicos. Existem ainda colorações neutras, que não são solúveis em água, mas sim em alguns solventes orgânicos e estão associadas a colorações de lípidos. (4) (25)

Existem ainda corantes denominados de “contraste” que são utilizados em combinação com outras técnicas, com o objetivo de adicionar informação à coloração original. Para serem eficazes, devem contrastar esta (de forma a não se confundirem), devem ser subtis e não interferir com a outra técnica. Enquanto a técnica principal tem como objetivo evidenciar uma certa estrutura ou substância, o contraste deve permitir observar a arquitetura celular. (4) (25)

Os cromóforos são as moléculas orgânicas presentes no corante que conferem a cor, quanto maior for o seu número na solução, mais intensa será a cor. É também necessária a presença de um auxocromo, que fortalece a ligação do cromóforo. (4) (25)

O mais habitual num laboratório de histologia é realizar a coloração de rotina, a HE. Depois de analisadas estas lâminas, podem ser pedidas técnicas IHQ de forma a complementar a análise. Estas técnicas podem dividir-se em: colorações para tecido conjuntivo, ferro, membranas ou microorganismos. (17)

Tabela 1 - Resumo de técnicas HQ [adaptado de (4)].

Técnicas HQ	
Técnica	Target
EVG (<i>Elastic Van Gieson</i>) ou Verhoeff	Fibras elásticas
Giemsa	Bactérias (<i>Helicobacter pylori</i>)
Gomori	Fibras de colagénio e músculo liso
Gram	Bactérias
Grocott	Fungos
PAS (<i>Periodic Acid Schiff</i>)	Mucosubstâncias neutras
PAS-AB (<i>Periodic Acid Schiff-Alcian Blue</i>)	Mucosubstâncias neutras e ácidas
Perls	Ferro
TM (Tricrómio de Masson)	Tecido conjuntivo (colagénio)
VC (Vermelho do Congo)	Amilóide
ZN (Ziehl-Neelsen)	Bactérias (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)

Periodic Acid Schiff

Periodic Acid Schiff (PAS) é uma técnica que permite a demonstração de polissacarídeos, mucosubstâncias neutras e membranas basais através de uma reação de oxidação pelo ácido periódico. (4) (25)

As substâncias PAS positivas, são coradas de rosa forte, tornando-se mais evidentes ao microscópio. Alguns exemplos destas substâncias são o glicogénio, mucosubstâncias neutras, material colóide, paredes de fungos e algumas sulfomucinas e sialomucinas epiteliais. Esta técnica pode ser realizada individualmente ou combinada com a utilização de Diastase ou de *Alcian Blue* (AB). (4) (25)

A Diastase é uma enzima que despolimeriza o glicogénio, pelo que é possível a sua demonstração a partir da comparação de uma lâmina corada com PAS sem digestão enzimática, com uma lâmina corada com PAS-Diastase. (4) (25)

O AB é um corante que permite identificar mucopolissacarídeos ácidos, através da formação de ligações iónicas. Desta forma, a combinação PAS-AB permitirá a distinção entre mucosubstâncias ácidas e neutras, uma vez que o PAS irá evidenciar as mucosubstâncias neutras, e o AB as ácidas. (4) (25)

É uma coloração amplamente utilizada na observação da mucosa gástrica e parênquima hepático. (26)

Tricrómio de Masson

Os tricrómios são colorações caracterizadas pela utilização de três cores e permitem a distinção de determinados tecidos, sendo especialmente utilizados para evidenciar fibras de tecido conjuntivo. (4) (25)

O Tricrómio de Masson (TM) permite corar os núcleos de azul-escuro (quase preto), o colagénio de azul e o citoplasma, músculo e eritrócitos de vermelho.

Um dos principais usos do Tricrómio de Masson é a distinção entre colagénio e músculo liso em tumores, assim como a identificação de um aumento de colagénio, em doenças como a cirrose hepática. (4) (25) Pode ainda ser útil na deteção de fibrose cardíaca, distinção entre miocárdio necrótico e viável (em casos de enfarte), e na avaliação de trombos. (6) (27) (28) (29)

Elastic Van Gieson

Elastic Van Gieson (EVG) é uma coloração que permite a identificação de fibras elásticas, devido à grande afinidade destes tecidos à hematoxilina férrica alcoólica. É baseada numa combinação da técnica Verhoeff (que permite evidenciar as fibras elásticas), com a utilização de Solução de Van Gieson como contraste (que cora o colagénio de vermelho e o musculo e citoplasma de amarelo). Deste modo, as fibras elásticas irão adquirir uma cor azul escura/preta, o colagénio vermelha e os restantes elementos amarela. (4) (25)

A demonstração das fibras elásticas é útil, não só para tecidos normais, mas também para observar alterações patológicas (como atrofia ou perda de tecido em alterações ateroscleróticas) e ainda para identificar vasos sanguíneos e determinar se têm invasão tumoral. (4) (25) (30)

2.3. Imunohistoquímica

Os anticorpos são proteínas produzidas em resposta à presença de agentes estranhos no organismo (os antígenos), são também conhecidos como imunoglobulinas e podem-se agrupar por classes, de acordo com a sua estrutura e função. Um antígeno é uma molécula capaz de produzir uma resposta imunológica, levando à produção de anticorpos. (4) (25) (7)

A zona do antígeno que se liga ao anticorpo é denominada epítopo, e um antígeno pode conter vários epítopos. Um anticorpo pode ligar-se a mais de um antígeno, mas é específico para apenas um epítopo. A IHQ baseia-se nesta ligação com elevada afinidade e especificidade para detetar os antígenos *in situ*, através da utilização de soros de anticorpos, que podem ser mono ou policlonais. Os soros policlonais contêm anticorpos específicos para vários epítopos do mesmo antígeno, enquanto os soros monoclonais são compostos por anticorpos para o mesmo epítopo. (4) (25) (7)

Existem vários métodos de visualização que permitem identificar os anticorpos, e consequentemente os antígenos aos quais se encontram ligados, nos tecidos. Estes dividem-se em imunofluorescência e imunoenzimologia. (4) (25) (7)

Há vários protocolos de colorações IHQ que utilizam anticorpos ligados a marcadores e permitem a sua visualização em microscópios óticos. Os métodos usados para ligar o anticorpo ao(s) marcador(es) incluem: métodos diretos, indiretos, polímeros, avidina e biotina, entre outros. A maioria destas técnicas tem uma aplicação reduzida porque têm pouca capacidade de amplificação, ou seja, resultam em pouca marcação. Porém, o método do polímero permite acoplar várias moléculas de marcador a um anticorpo, permitindo uma grande amplificação do sinal, pelo que é o método utilizado com mais frequência. (4) (25) (7)

Como marcadores, geralmente, recorrem-se a métodos imunoenzimáticos que utilizam cromogéneos incolores, que ganham cor através de reações enzima-substrato. A enzima mais utilizada é a peroxidase (HRP), que na presença de peróxido de hidrogénio (o seu substrato), oxida dadores de eletrões que ganham cor e precipitam no local onde ocorreu a reação. A 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) é o dador de eletrões utilizado com maior frequência, gerando um precipitado castanho. (4) (25) (7)

A imunofluorescência utiliza fluorocromos acoplados aos anticorpos, que são corantes que absorvem luz e depois a emitem num comprimento de onda superior. Os fluorocromos mais utilizados são o isotiocianato de fluoresceína, que absorve luz azul e emite fluorescência verde; e a rodamina, que absorve luz verde e emite fluorescência vermelha. Para observar esta marcação é necessário recorrer a um microscópio de fluorescência. (4) (25) (7)

A IHQ é utilizada frequentemente na prática clínica de forma estabelecer diagnósticos e ainda com um objetivo preditivo / de prognóstico. No contexto forense, este último propósito não é relevante, e o acesso total aos órgãos pode agilizar o processo de diagnóstico, tornando menos necessária a realização de técnicas complementares. Deste modo, a sua utilização é mais questionada nesta área. (15) (31)

Bromleya et al. realizaram um estudo que indica uma prevalência de pedidos de IHQ para casos de patologia neurológica, maioritariamente para examinar doenças neurodegenerativas, sendo os restantes pedidos mais utilizados para confirmar diagnósticos anteriores de malignidade. (15)

Apesar de a IHQ ser uma técnica com uma grande especificidade e sensibilidade, existem algumas limitações, especialmente associadas ao contexto forense, relacionadas com o estado de preservação das amostras. A decomposição *post-mortem* pode afetar a qualidade da marcação, tornando a técnica inviável, quer por ausência de marcação, quer por marcação inespecífica. Um estudo realizado por Lesnikova et al. analisou a qualidade da marcação de alguns dos anticorpos mais usados para a caracterização de neoplasias, em amostras com diferentes tempos de decomposição. Como esperado, concluiu que quanto maior for o intervalo *post-mortem*, menor será a qualidade da marcação IHQ. Foi também observada uma maior preservação da antigenicidade em tecidos neurológicos, em comparação com os pulmões e fígado, e uma rápida degradação de tumores malignos com taxas metabólicas muito elevadas. (31)

Judkins et al. estudaram o desempenho de vários anticorpos em marcações IHQ em tecidos necróticos e concluíram que existem marcadores que continuam a permitir uma boa sensibilidade

e especificidade. As citoqueratinas, como a AE1/AE3, são um exemplo destes marcadores, sendo usadas com frequência na identificação de histogénese epitelial. Ao contrário da proteína S100, que é sobretudo utilizada no diagnóstico de melanomas e que demonstrou uma baixa reatividade. Já o CD45, utilizado no diagnóstico de patologias linfohematopoiéticas, mostrou ser reativo com células linfóides, mas também revelou marcação inespecífica em tecidos necróticos, incluindo em tecidos epiteliais, nos quais não deveria haver reatividade. (32)

Em 2013, Ezyaguirre et al. realçaram outra utilidade da IHQ num artigo dedicado à sua utilização no diagnóstico de doenças infecciosas, destacando a sua utilidade em detetar infeções virais como a Hepatite B e o Herpes; infeções bacterianas como *Helicobacter pylori*, Sífilis ou *Mycobacterium tuberculosis*; infeções fúngicas e também de protozoários. Referindo ainda algumas doenças infecciosas emergentes, nomeadamente SARS-Cov-2, que podem ser detetadas por IHQ com grande rapidez e também segurança, uma vez que o procedimento é realizado em amostras fixadas e processadas. (12)

Tabela 2 - Resumo de técnicas IHQ (1ª parte) [adaptado de (33) (34) (35)].

Marcadores IHQ (1)	
Anticorpo	Target / Aplicabilidade
α – fetoproteína	Carcinoma hepatocelular, tumores hepatóides, tumores germinativos da testis e ovário e carcinoma embrionário.
β-HCG (β -gonadotropina coriônica humana)	Sinciciotrofoblasto na placenta e em tumores como o coriocarcinoma e seminoma.
κ (Kappa)	Células linfóides e plasmócitos, com cadeias kappa. Linfócitos B (normais e neoplásicos).
λ (Lambda)	Células linfóides e plasmócitos com cadeias lambda . Linfócitos B (normais e neoplásicos).
Actina	Músculo liso, miofibroblastos e células mioepiteliais. Identificar enfartes e áreas de remodelação no miocárdio (miofibroblastos).
Calretinina	Células mesoteliais, mesoteliomas, neurónios.
CD3	Linfócitos T (e neoplasias associadas).
CD5	Linfócitos T (normais ou neoplásicos) e Linfócitos B (neoplásicos).
CD10	Leucemia linfoblástica aguda, linfócitos T <i>helper</i> , Carcinoma de Células Renais, Carcinoma Hepatocelular, linfoma folicular.
CD20	Linfócitos B maduros (normais e neoplásicos), precursores de linfócitos B.
CD30	Células de Reed-Sternberg em Linfomas de Hodgkin, linfomas anaplásicos de grandes células, carcinomas embrionários e doenças cutâneas linfoproliferativas de células T.
CD31	Células endoteliais (normais e neoplásicas). Angiossarcomas, sarcomas de Kaposi, hemangioendelioma epitelióide.
CD34	Células progenitoras hematopóéticas, células vasculares endoteliais, fibroblastos embrionários. Gastrointestinal stromal tumors (GIST) e alguns sarcomas.
CD45 / LCA (<i>Leukocyte Common Antigen</i>)	Células de linhagem hematopoiética (linfócitos malignos e benignos, precursores de células plasmáticas). Diagnóstico diferencial em neoplasias em que há suspeita de linfoma.

Tabela 3 - Resumo de técnicas IHQ (2ª parte) [adaptado de (33) (34) (35) (36)].

<i>Marcadores IHQ (2)</i>	
Anticorpo	Target / Aplicabilidade
CD68	Monócitos / macrófagos e células de Kupffer, osteoclastos, granulócitos e os seus precursores. Tumores mielomelanocíticos e histiocíticos. (Negativo em linfomas).
CEA (<i>Carcinoembryonic Antigen</i>)	Diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma e mesoteliomas malignos epitelioides. Adenocarcinomas do trato gastrointestinal, pâncreas, pulmão e carcinomas neuroendócrinos, entre outros.
Ck7 (Citoqueratina 7)	Células epiteliais ductais, glandulares, transicionais e das vias biliares. Diagnóstico diferencial entre carcinoma da mama, pulmão, ovário, tireoide ou urotelial (Ck 7 +) <i>versus</i> carcinomas do cólon e próstata (Ck7 -).
Ck20 (Citoqueratina 20)	Epitélio gástrico e intestinal, urotélio e células de Merkel. Adenocarcinomas do cólon, estômago e vias biliares. (Negativo em adenocarcinomas do pulmão e mama, carcinomas não mucinosos do ovário).
Cromogranina	Células neuroendócrinas e tumores com diferenciação neuroendócrina.
Desmina	Músculos liso e estriado (esquelético e cardíaco), células mesoteliais reativas, tumores com origem muscular (ex: leiomiomas e rabiomiossarcomas).
EMA (<i>Epithelial Membrane Antigen</i>)	Epitélios normais e neoplásicos. Geralmente positivo nos carcinomas pavimentocelulares e negativo nos carcinomas basocelulares.
GFAP (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)	Astrócitos no SNC e tumores relacionados.
HMB45	Melanócitos e melanossomas. Diagnóstico diferencial de melanomas (melanocíticos e não melanocíticos), com outras neoplasias de morfologia semelhante.
Lisozima	Histiócitos, granulócitos e monócitos. Neoplasias histiocíticas e classificação de doenças linfoproliferativas.
MNF116	Células epiteliais (normais e neoplásicas).
NSE (<i>Neuron-Specific Enolase</i>)	Células neurais e neuroendócrinas e tumores correspondentes.
PSA (<i>Prostate Specific Antigen</i>)	Células epiteliais prostáticas benignas e malignas.
Proteína S100	Melanócitos, células de Langhans, histiocitos, condrócitos, lipócitos, músculo esquelético e cardíaco, células de Schwann, células epiteliais e mioepiteliais da mama, glândulas salivares e sudoríparas, e células da glia (normais e neoplásicas).
Tireoglobulina	Células epiteliais da tireoide (normais e neoplásicas).
TTF-1 (<i>Thyroid transcription factor-1</i>)	Células normais e neoplásicas do pulmão e tireoide. Diagnóstico diferencial entre tumores primários e metastáticos do pulmão e tireoide. (Mesoteliomas são negativos).
Vimentina	Células mesenquimatosas (normais e neoplásicas). Marcador de fibroblastos no miocárdio.

Vimentina

A Vimentina é expressa em várias células mesenquimatosas, como melanócitos, células endoteliais, fibroblastos e alguns linfócitos. (33) (34)

Em conjunto com a queratina, pode ser utilizado na distinção entre melanomas e carcinomas indiferenciados ou linfomas de grandes células, uma vez que os melanomas (e também os schwannomas) têm uma forte expressão de vimentina. Também pode ser útil na caracterização adenocarcinomas endometrioides do útero, que expressam vimentina e citoqueratina. (33) (34)

Este marcador pode ainda ser útil na identificação de miofibroblastos em miocárdio normal e lesionado, permitindo evidenciar áreas de enfarte ou remodelação. (35) E pode também ser usado na verificação da qualidade da preservação e processamento das amostras. (33) (34)

MNF-116

O marcador MNF-116 permite detetar um conjunto de citoqueratinas (Ck), incluindo Ck5, Ck6, Ck8, Ck17 e, provavelmente, também a Ck19. Estas proteínas estão presentes essencialmente em células epiteliais. (34)

A utilidade o MNF-116 prende-se com a identificação de neoplasias epiteliais, como carcinomas (pavimento-celulares, pequenas células, sarcomatoides, adenocarcinomas...) e mesoteliomas. Também pode ser utilizado na confirmação de diagnóstico de várias neoplasias de tecidos moles. (34)

Proteína S100

A proteína S100 está presente em inúmeras células normais (melanócitos, células de Langhans, histiócitos, condrócitos, lipócitos, musculo esquelético e cardíaco, células de Schwann, células epiteliais e mioepiteliais da mama, glândulas salivares e sudoríparas, e células da glia), assim como nas neoplasias derivadas destes tipos de células. Assim sendo, este marcador é útil na identificação se diversas neoplasias, como tumores das glândulas salivares, do tecido adiposo ou cartilágneo, Shwannomas e, particularmente, em melanomas. (33)

Citoqueratina 7 (Ck7)

A Ck7 está presente na maioria das células epiteliais (ductais, glandulares, de transição e vias biliares). (33) (34)

Na prática, este anticorpo é utilizado no diagnóstico diferencial entre carcinomas da mama, pulmão, ovário e urotélio (que são Ck7 positivos) e carcinomas do cólon e próstata (Ck7 negativos). A Ck7 também pode ser usada para o diagnóstico de adenocarcinoma do pulmão, mas com menor especificidade, uma vez que existem outros carcinomas primários (do pulmão e não só), que expressam esta proteína. (33) (34)

3. Materiais e Métodos

O presente trabalho teve início com a seleção de processos histológicos da Delegação do Centro do INMLCF, I.P. entre os anos de 2014 e 2020, com realização de colorações HQ e IHQ, em simultâneo, tendo sido encontrados 156 casos que correspondiam a estes critérios. Durante o processo de seleção dos casos, recolheu-se a informação relativa às técnicas pedidas (nomes das técnicas e blocos onde foram realizadas).

Posteriormente, foram recolhidas informações relativas aos achados anátomo-patológicos e às causas da morte constantes do relatório da autópsia ML. Com base nestes dados, foi possível atribuir um *score* a cada técnica realizada, que pretende traduzir a sua relevância/contribuição para a determinação da causa de morte. Os *scores* encontram-se especificados na tabela 4.

Tabela 4 - *Scores* atribuídos a cada técnica, que pretende traduzir a sua relevância na determinação da causa de morte.

Tabela de <i>Scores</i>		
<i>Score</i>	Descrição	Exemplo
0	Não acrescenta informação.	<ul style="list-style-type: none">• Não permite determinar, descrever ou caracterizar nenhuma patologia ou lesão.• Técnicas às quais não corresponde nenhum achado descrito no relatório.• A realização da técnica não acrescenta mais informação do que a H&E.
1	Acrescenta informação não relacionada à causa de morte.	<ul style="list-style-type: none">• Acrescenta informação relativa ao contexto, mas não à causa de morte.• Caracteriza, descreve ou define outras patologias ou lesões presentes.
2	Acrescenta informação acerca da causa de morte, mas não é essencial para a sua determinação.	<ul style="list-style-type: none">• Acrescenta informação que caracteriza ou descreve a causa de morte, mas não tem influência na sua determinação.• Mesmo sem as técnicas, teria sido possível estabelecer a causa de morte.
3	Essencial para a determinação da causa da morte.	<ul style="list-style-type: none">• Tem influência direta no estabelecimento da causa da morte.• Sem as técnicas não teria sido possível determinar a causa de morte.

Além do *score*, as técnicas foram divididas de acordo com a causa de morte atribuída ao processo correspondente, formando três grandes grupos: causas de morte naturais, violentas e indeterminadas. Foram criados dois ficheiros distintos, um para os pedidos HQ e outro para IHQ.

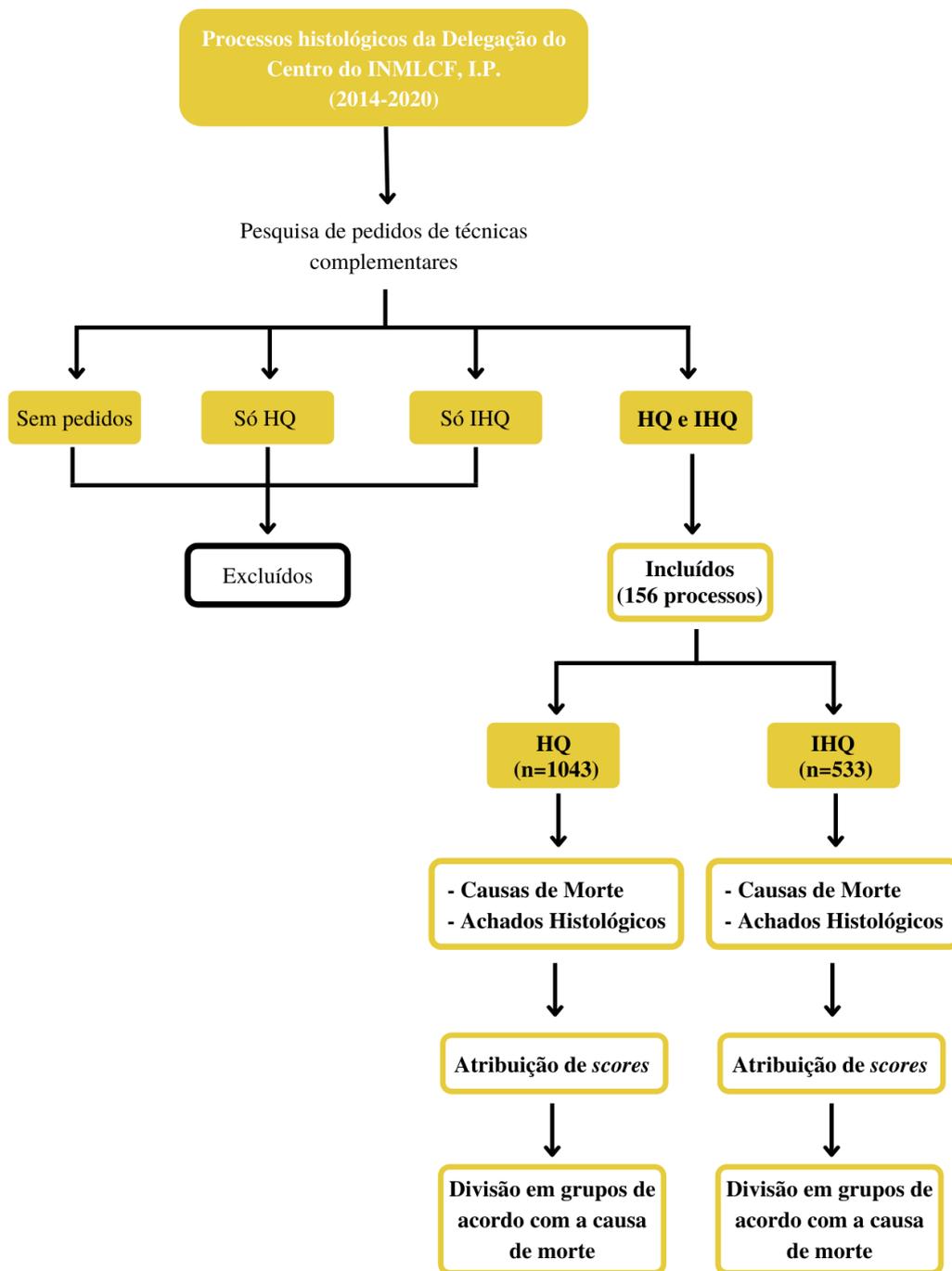


Figura 2 - Organograma ilustrativo dos passos seguidos para obtenção da amostra e recolha de dados.

4. Resultados

Dos 156 processos histológicos selecionados, 60,9% (n=95) correspondem a vítimas do sexo masculino e 39,1% (n=61) a vítimas do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 0 e os 96 anos.

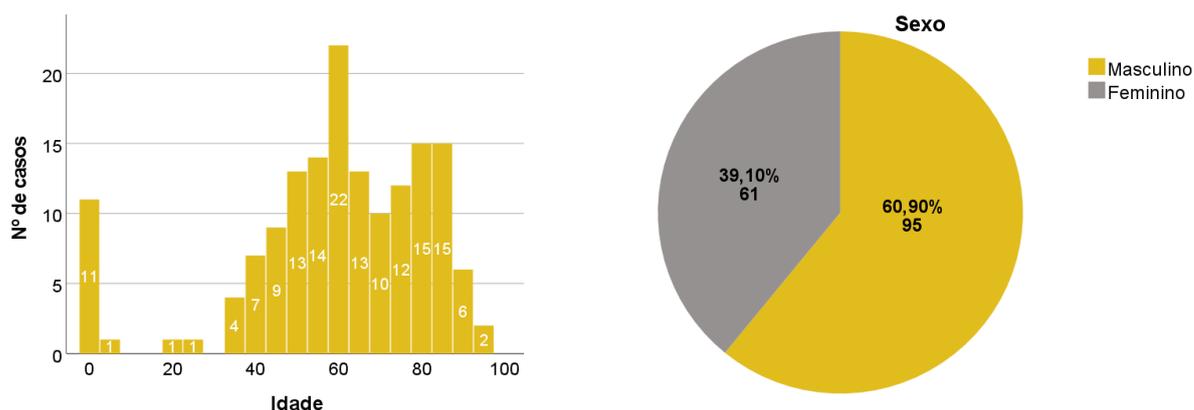


Gráfico 1 e 2 – Gráfico de barras com representação das frequências de idades dos casos selecionados (à esquerda), cada barra corresponde a um intervalo de 5 anos. Gráfico circular com representação dos sexos dos casos selecionados (à direita).

No total, foram realizadas 1043 HQ e 533 IHQ, sendo que, em média, o número de técnicas pedidas em cada processo foi de 6,69 HQ e 3,42 IHQ. Foram identificados 11 protocolos de HQ e 31 marcadores IHQ distintos.

Tabela 5 - Principais estatísticas descritivas aplicadas aos pedidos HQ e IHQ.

Estatística Descritiva de Pedidos HQ e IHQ		
	Pedidos de HQ	Pedidos de IHQ
N	156	156
Média	6,69	3,42
Mediana	5,00	3,00
Soma	1043	533

Relativamente às técnicas HQ, as mais realizadas foram o TM em 40,56% (n=423) dos pedidos, EVG em 37,49% (n=391) dos pedidos e PAS-AB em 9,01% (n=94) dos pedidos

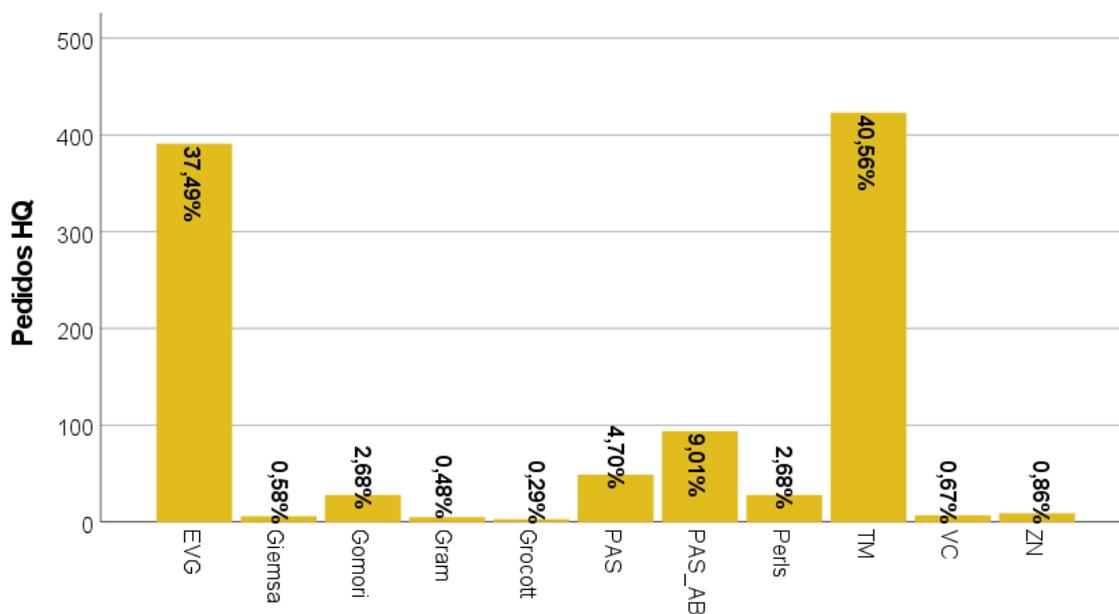


Gráfico 3 - Representação das técnicas HQ de acordo com os diferentes protocolos pedidos.

No que concerne à IHQ, os anticorpos mais utilizados foram o MNF-116 em 12,95% (n=69) dos pedidos, Vimentina em 10,51% (n=56), proteína S100 em 7,13% (n=38), Ck7 em 6,94% (n=37) e Actina em 5,44% (n=29).

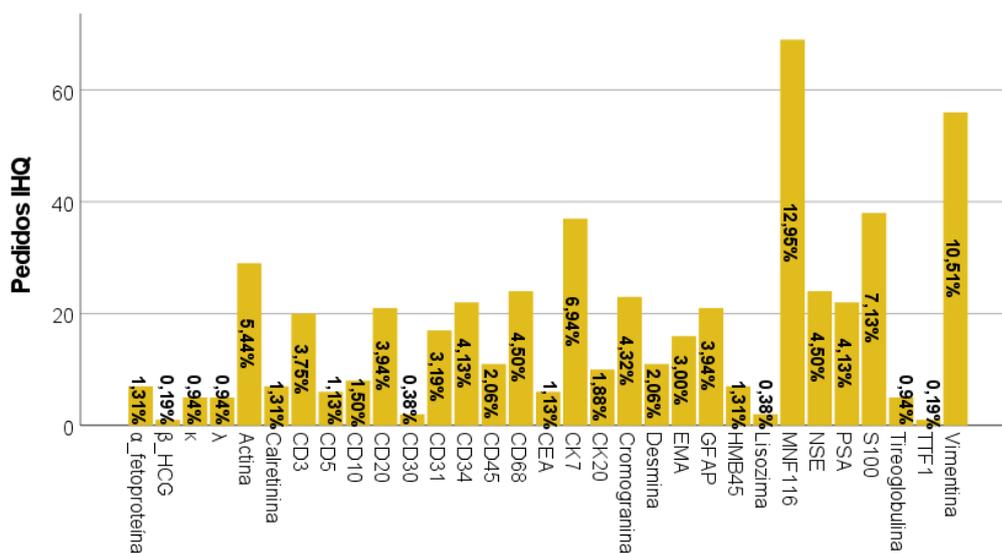


Gráfico 4 - Representação das técnicas IHQ de acordo com os diferentes protocolos pedidos.

4.1. Histoquímica

Relativamente às técnicas HQ (n=1043), observou-se que foram realizadas maioritariamente em processos cuja causa de morte foi atribuída a causas naturais (n=792) e que o *score* atribuído com maior frequência foi “1” (n=507).

Ao analisarmos a distribuição dos *scores* pelas diferentes causas de morte, podemos observar que nas causas indeterminadas não foram atribuídos *scores* “2” e “3”, uma vez que são os que estão diretamente relacionados com a causa de morte e que, nestes casos, não foi estabelecida. Neste grupo, todos os *scores* atribuídos (n=13) foram de “1”.

Nas mortes naturais, o *score* mais atribuído foi o “2” em 47,1% (n=373) das técnicas, seguido do “1” em 35,1% (n=278) dos pedidos. O *score* “0” foi atribuído a uma percentagem menor de técnicas, correspondente a 17,7% (n=140) e o *score* “3” apenas foi atribuído a um caso, o que resulta numa percentagem de 0,1%.

No que respeita às mortes violentas, a grande maioria obteve um *score* “1”, numa percentagem de 90,8% (n=216), sendo que o *score* “0” foi atribuído a 5,5% (n=13) das técnicas e o “2” apenas a 3,8% (n=9).

Tabela 6 - Frequências dos *scores* atribuídos às técnicas HQ de acordo com a causa de morte.

Tabela de Frequências HQ			
Causa de Morte	Score	Frequência	Percentagem
Indeterminada	1	13	100,0
Natural	0	140	17,7
	1	278	35,1
	2	373	47,1
	3	1	,1
	Total	792	100,0
Violenta	0	13	5,5
	1	216	90,8
	2	9	3,8
	Total	238	100,0

Tendo em conta estes resultados, realizou-se um teste de Hipóteses, para determinar se existe uma diferença estatisticamente significativa na distribuição dos *scores*, consoante a causa de morte. O teste escolhido foi o teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes, uma vez que as variáveis são qualitativas (logo é necessário um teste não paramétrico) e que estão divididas em três grupos, utilizando um nível de significância de 0,050.

Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis para as técnicas HQ, com nível de significância de 0,05.

Teste de Kruskal-Wallis: HQ			
Hipótese nula	Teste	Sig.	Decisão
A distribuição de <i>Score</i> é igual nas categorias de Causa de Morte.	Amostras Independentes de Teste de Kruskal-Wallis	,000	Rejeitar a hipótese nula.

O teste permitiu rejeitar a hipótese nula de que a distribuição dos *scores* é igual, independentemente da causa de morte. O que significa que a causa de morte tem influência na distribuição dos *scores*, que se reflete na aplicabilidade da HQ.

Tabela 8 – Análise estatística Pairwise para as técnicas HQ, com nível de significância de 0,050 e valores ajustados pela correção de Bonferroni.

Comparações por método Pairwise: HQ		
	Sig.	Adj. Sig. ^a
Violenta-Indeterminada	,988	1,000
Violenta-Natural	,000	,000
Indeterminada-Natural	,048	,145

Através de uma análise estatística pelo método Pairwise, com nível de significância de 0,050 e com ajuste dos valores de significância através da correção de Bonferroni, podemos observar que existe uma diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos *scores* nas causas de morte naturais e violentas. As mortes de causa natural estão associadas a *scores* mais altos do que as mortes de causa violenta.

Existe também uma tendência estatística para uma distribuição de *scores* diferente entre as mortes de causa natural e indeterminada. Porém, o número de mortes de causa indeterminada (n=13) é muito inferior às mortes naturais (n=792) e violentas (n=238), além de que não existe variabilidade (todos os *scores* atribuídos são “1”), pelo que os resultados do teste para esta categoria não apresentam a mesma robustez estatística.

Tabela 9 – Média dos *scores* atribuídos a cada tipo de causa de morte, incluindo o número total técnicas HQ em cada causa de morte e o desvio padrão associado à média.

Tabela de médias por grupos: HQ			
Causa de Morte	Média	N	Desvio Padrão
Indeterminada	1,00	13	,000
Natural	1,30	792	,752
Violenta	,98	238	,304
Total	1,22	1043	,684

4.2. Imunohistoquímica

Os resultados dos marcadores IHQ (n=533) foram semelhantes à HQ. Neste contexto, a causa de morte prevalente continua a ser a natural (n=422) e o *score* atribuído mais frequentemente mantém-se o “1” (n=277).

No grupo de causa de morte indeterminada, todos os casos obtiveram um *score* de “1” (n=10).

Relativamente à causa de morte natural, prevalece o *score* “2” em 49,8% (n=210) dos pedidos, seguido do *score* “1” em 41,7% (n=176) das técnicas. O *score* “0” foi atribuído apenas a 8,5% (n=36) dos pedidos.

Em concordância com os resultados da HQ, o *score* “1” foi atribuído à maioria das IHQ com causa de morte violenta, numa percentagem de 90,1% (n=91). Os *scores* “0” e “2” foram atribuídos, respetivamente a 6,9% (n=7) e 3% (n=3) destes pedidos.

Não foi atribuído nenhum *score* “3”, em nenhuma marcação HQ.

Tabela 10 - Frequências dos *scores* atribuídos às técnicas IHQ de acordo com a causa de morte.

Tabela de frequências IHQ			
Causa de Morte	Score	Frequência	Percentagem
Indeterminada	1	10	100,0
	0	36	8,5
Natural	1	176	41,7
	2	210	49,8
	Total	422	100,0
	0	7	6,9
Violenta	1	91	90,1
	2	3	3,0
	Total	101	100,0

Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes, com um nível de significância de 0,050 que permitiu, mais uma vez, rejeitar a hipótese nula e concluir que a distribuição dos *scores* é diferente de acordo com a causa de morte.

Tabela 11- Teste de Kruskal-Wallis para as técnicas IHQ, com nível de significância de 0,05

Teste de Kruskal-Wallis: IHQ			
Hipótese nula	Teste	Sig.	Decisão
A distribuição de <i>Score</i> é igual nas categorias de Causa de Morte.	Amostras Independentes de Teste de Kruskal-Wallis	,000	Rejeitar a hipótese nula.

Seguindo uma nova análise pelo método Pairwise, com nível de significância de 0,050 e valores de significância ajustados através da correção de Bonferroni, analisámos a comparação

par a par da distribuição dos *scores*. Podemos verificar, à semelhança dos resultados anteriores, que se observa uma diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos *scores* dos grupos de causa de morte violenta e natural. Estando as mortes naturais associadas a *scores* mais altos.

Tabela 12 - Análise estatística Pairwise para as técnicas IHQ, com nível de significância de 0,050 e valores ajustados pela correção de Bonferroni.

Comparações por método Pairwise: IHQ		
	Sig.	Adj. Sig. ^a
Violenta-Indeterminada	,933	1,000
Violenta-Natural	,000	,000
Indeterminada-Natural	,014	,041

Mais uma vez, as causas de morte indeterminadas (n=10) ocorrem em número muito inferior às causas de morte naturais (n=422) e violentas (n=101), obtendo sempre o mesmo *score* (“1”). Estes factos influenciam os resultados dos testes estatísticos para este grupo.

Tabela 13 - Média dos *scores* atribuídos a cada tipo de causa de morte, incluindo o número total técnicas IHQ em cada causa de morte e o desvio padrão associado à média.

Tabela de médias por grupos: IHQ			
Causa de Morte	Média	N	Desvio Padrão
Indeterminada	1,00	10	,000
Natural	1,41	422	,643
Violenta	,96	101	,314
Total	1,32	533	,616

5. Discussão

Os resultados estatísticos permitiram-nos concluir que a utilidade das técnicas HQ e IHQ depende do tipo de morte, apresentando maior aplicabilidade em contexto de morte natural. Essencialmente, estas técnicas têm o objetivo de detetar e caracterizar patologias, o que é concordante com os resultados.

Se a morte for devida a uma patologia que possa ser caracterizada através de técnicas, a sua relevância será muito maior do que em mortes violentas, não associadas a patologias. Sendo que, no contexto de mortes violentas, o estabelecimento da causa da morte tende a ser mais óbvio, e pode ser determinado durante a autópsia ou apenas com a análise macroscópica dos órgãos, tendo sempre por base a informação circunstancial.

Em mortes presumidamente naturais, é possível que não existam quaisquer indícios sobre a sua causa, mesmo depois de uma autópsia completa e detalhada (antes da análise histológica). É precisamente nestes casos que a histologia, nomeadamente, a HQ e IHQ apresentam maior aplicabilidade, apesar de podermos observar, pelos resultados deste estudo, que estas técnicas têm uma aplicabilidade muito mais centrada na caracterização de patologias, do que propriamente na sua descoberta.

O Enfarte Agudo do Miocárdio (EAM) é uma causa de morte natural frequente, que pode não ter repercussões morfológicas muito significativas quando a morte ocorre pouco tempo após o evento, não havendo sido iniciado o processo de morte celular por hipoxia e posterior processo de reparação. Nestes casos as alterações macro- e microscópicas são escassas, inespecíficas ou podem assemelhar-se a artefactos relacionados com a autólise e putrefação. Assim sendo, é muito usual recorrer-se a técnicas HQ, como o TM e o EVG, ou a marcadores IHQ como a Desmina, Vimentina, proteína S100, entre outros. (37) (28) (38)

Ouyang et al. realizaram um estudo onde compararam cortes seriados de miocárdio com áreas de enfarte corados com H&E, TM e marcados com Desmina. O TM permite distinguir miocárdio necrótico (azul) de miocárdio viável (vermelho), apresentando ainda uma orla de células coradas a roxo que delimita a área de enfarte. A Desmina é uma proteína que está presente no miocárdio normal, e ausente em miocárdio necrótico. (28)

O estudo revelou que tanto o TM como a Desmina permitiram identificar a área de enfarte, mesmo quando as alterações celulares observadas por H&E eram escassas ou nulas. Inclusivamente, quando as alterações eram visíveis por H&E, as técnicas especiais identificavam uma área de enfarte muito mais extensa. (28)

Outra abordagem relacionada com o EAM, e também outras cardiopatias, é a identificação de fibroblastos. Os fibroblastos desempenham um papel na mediação da inflamação e reparação no miocárdio. Quando o tecido cardíaco sofre lesões, as células mortas são substituídas por uma cicatriz rica em colagénio, através de um processo de remodelação que pode ter repercussões na própria estrutura do coração (por exemplo hipertrofia, dilatação...) e que, por sua vez, podem estar associadas a uma maior taxa de mortalidade. Neste contexto, a Vimentina, Actina e proteína S100 são marcadores IHQ muito utilizados. (39)

Existem ainda cardiopatias que não estão necessariamente associadas a EAM, e nas quais também se verifica um aumento das fibras de colagénio, neste caso porque existe uma situação de esforço que exige mais força mecânica por parte do músculo. Estas situações também podem estar associadas a mortes naturais, pelo que também são estudadas em contexto forense, nomeadamente com recurso a TM e EVG para evidenciar o colagénio. (27)

Kovanen et al. defendem que os mastócitos também podem ser um alvo de marcação IHQ útil no contexto de EAM, uma vez que grande parte dos EAM têm origem em trombos resultantes de placas de ateroma das próprias coronárias, e os mastócitos parecem acumular-se junto às zonas de aterosclerose coronária, podendo inclusive contribuir para a erosão da placa e libertação do trombo. Para marcação destas células, pode ser utilizado um anticorpo para a Triptase. (40)

Nos casos analisados no presente estudo, observámos que o TM e o EVG são técnicas usadas com bastante frequência em casos de EAM e alterações cardíacas, assim como a marcação IHQ de Desmina, Vimentina, Actina e proteína S100. Porém, não foi realizada nenhuma marcação para mastócitos.

Existem vários estudos que indicam o C5b-9 como um marcador IHQ que produz resultados confiáveis na deteção de EAM, mesmo perante avançados estados de putrefação. Com base nessas observações, parece ser um bom anticorpo do ponto de vista forense, pelo que poderia ser uma boa implementação no contexto do laboratorial do INMLCF, I.P. Contudo, a maioria dos estudos aconselha a utilização de um painel, com pelo menos 3 marcadores, para permitir resultados mais confiáveis. (37) (38) (41)

Barranco e Ventura realizaram um estudo de revisão acerca dos marcadores IHQ utilizados para a determinação de EAM, onde analisaram as suas limitações nomeadamente no que concerne à decomposição cadavérica. Dos marcados analisados neste estudo, os que demonstraram melhores resultados foram o C5b-9, fibronectina e troponinas. Para permitir avaliação correta dos resultados obtidos, Barranco e Ventura, defendem que é importante referir o estado de conservação do corpo em concreto, e não apenas o intervalo *post-mortem*. Assim como é crucial a utilização de bons controlos. (37)

Thomsen e Held estudaram a marcação com C5b-9 em condições de putrefação e autólise, uma vez que este é dos marcadores mais promissores na determinação de EAM em contexto forense. Determinaram que este marcador é bastante confiável, conseguindo demonstrar a existência de necrose em miocárdio em avançado estado de putrefação e autólise (até 11 dias após a morte). (41)

Mais tarde, Ortmann et al. confirmaram estes resultados através de outro estudo, onde provaram que o C5b-9 é um marcador com grande especificidade. Para além disso, muito provavelmente devido aos avanços do próprio protocolo de IHQ, provou-se que este anticorpo mantém a sua confiabilidade por um período de tempo ainda mais alargado, confirmando a sua robustez relativamente a alterações putrefactivas. (38)

A tromboembolia pulmonar (TEP) é também uma causa de morte natural frequente. A sua determinação depende da identificação de trombos nas principais artérias pulmonares, macroscopicamente, durante a autópsia. Contudo, é muito frequente a utilização de técnicas especiais neste contexto, com o objetivo de confirmar que, de facto se trata de um trombo e não de um coágulo sanguíneo que se possa ter formado *post-mortem*, e ainda para datar a trombo. (42) (43)

A maioria dos trombos pulmonares tem origem em grandes vasos dos membros inferiores (veias femoral e ilíaca). Por este motivo, quando se encontram indícios de TEP durante a autópsia, devem-se analisar estes vasos, de forma a encontrar a origem do trombo. (42)

A datação do trombo é realizada com base nas suas diferentes fases de organização, que estão descritas na literatura, e a sua importância prende-se com o estabelecimento de uma relação causal entre a morte e algum evento que possa ter desencadeado a TEP (viagem aérea longa, acidente, cirurgia...). (42) (43) (18) A datação do trombo pode ainda ajudar a estabelecer com maior precisão a data de morte. (44)

Para conseguir datar um trombo, é necessário avaliar os seus componentes, e por é por este motivo que são requeridas técnicas HQ e IHQ. Os protocolos HQ mais frequentes nestes casos são TM, EVG e Perls e os anticorpos são o CD3, CD15, CD45, CD61 e CD68. Os primeiros, pretendem pesquisar fibrina e ferro, enquanto os marcadores IHQ têm como objetivo detetar células inflamatórias como macrófagos e leucócitos. Deste modo, no contexto de TEP, as técnicas especiais desempenham um papel importante, mas apenas com o intuito de confirmação dos achados macroscópicos e microscópicos por H&E. (42) (44) Apesar de todos estes marcadores IHQ estarem disponíveis no INMLCF, I.P., verificámos que o estudo de TEPs é realizado principalmente com recurso a TM e EVG, e esporadicamente Perls e PAS-AB, sem recurso a IHQ.

Mortes relacionadas com sépsis podem ser estudadas através de técnicas auxiliares, nomeadamente IHQ para pesquisa das células que compõe o infiltrado inflamatório ou HQ para pesquisa de agentes que possam estar na origem da inflamação, como vírus, bactérias e fungos. À semelhança de outras causas de morte naturais, as alterações macro- e microscópicas de sépsis são inespecíficas, pelo que o seu diagnóstico pode estar dependente de técnicas especiais, e também de resultados de outras áreas laboratoriais como, por exemplo, microbiologia. Neste contexto, o pulmão é um órgão que é particularmente afetado, pelo que é um bom alvo de estudo histológico. (45) (46) (47)

Relativamente às técnicas mais utilizadas para deteção de agentes infecciosos, destaca-se o Giemsa para deteção de *Helicobacter pylori*, o ZN para evidenciar bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* e o PAS e Grocott para pesquisa de fungos. (12) No caso particular deste estudo, além destas técnicas, também foram utilizados o TM e o EVG em casos inflamatórios de forma a pesquisar por áreas de fibrose e, deste modo, distinguir inflamações agudas e crónicas.

Alguns dos marcadores IHQ mais descritos na literatura, incluem a Lisozima, E-selectina, CD15, CD54, VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), Lactoferrina, Lectinas, VLA-4 e I-CAM-1. (45) (46) (47) Nos casos analisados da Delegação do Centro do INMLCF, IP, os anticorpos utilizados nestas situações são κ , λ , CD3, CD20, CD31, CD45 e o CD68.

No contexto de mortes violentas, a aplicabilidade das técnicas especiais torna-se bastante limitada, sendo principalmente utilizadas na caracterização de patologias presentes, mas não relacionadas à causa de morte. Apesar de ser um acréscimo de informação, levanta um dilema que contrapõe o interesse forense e académico. Não podemos afirmar que descobrir uma nova patologia não seja útil, porque pode trazer novos conhecimentos e acrescentar informação que esclareça as circunstâncias da morte. Porém, não cumpre os principais objetivos de uma autópsia ML, por não acrescentar informação diretamente relacionável com a causa de morte. Surge assim um confronto de perspetivas, que pode gerar várias interpretações e levar a diferentes posicionamentos.

Além deste facto, quando as mortes aparentam ter uma causa violenta, mesmo que pareça óbvia, é essencial descartar patologias concomitantes que possam ter conduzido à morte. É necessário estudar estas patologias, para descartar o seu contributo na morte ou, pelo contrário, para provar que o óbito foi devido a uma causa natural e não à causa violenta mais espectável. (13) (14)

Existem, nomeadamente, mortes violentas cujo diagnóstico é realizado por exclusão, como por exemplo, afogamentos. Nestes casos, a informação circunstancial pode ter especial relevância, mas também é necessário que não seja encontrado qualquer outro achado adequado à morte. Um cadáver encontrado dentro de um rio, por exemplo, pode não ter morrido por afogamento, mas sim ter falecido por causa natural, enquanto estava perto da água, e acabar por cair dentro do rio. Por mais claro que pareça um dado contexto, é muito importante excluir todas as outras possíveis causas de morte, para garantir que se alcança (o mais possível) a verdade dos acontecimentos.

Apesar destes factos, há estudos que defendem a utilização de técnicas especiais em casos de morte violenta, nomeadamente a utilização de marcadores HQ e IHQ para evidenciar alterações celulares relacionadas com a isquemia e hipoxia no cérebro e pulmão, que se podem demonstrar úteis em vários casos de mortes violentas como afogamentos, enforcamentos e asfixias em geral. (48) (49)

Em mortes que ocorrem por falta de oxigenação sanguínea (hipóxia) ou pela própria falta de fluxo sanguíneo no cérebro (isquémia), podem não existir alterações celulares visíveis, quando o

óbito ocorre muito próximo ao evento, o que é muito frequente nos casos ML. Para que se estabeleçam alterações visíveis (macro- e microscópicas) é necessário algum tempo de sobrevida, o que pode nem sempre ocorrer. (49)

Barranco et al. estudaram vários marcadores IHQ para evidenciar estas alterações, em parênquima cerebral. Dos marcadores testados, a MAP 2 e a Calbidina-D28K mostraram-se os mais úteis. Mas foram também estudados outros anticorpos, entre os quais a Vim e GFAP que, segundo este estudo, precisam de algum tempo de sobrevida para se mostrarem úteis. (49)

Já Gutjahr e Madea utilizaram técnicas HQ e IHQ para estudar alterações pulmonares em casos de asfixia, partindo do pressuposto de que, neste tipo de mortes, existe uma concentração alveolar de macrófagos elevada. Assim, foram utilizadas técnicas IHQ para evidenciação dos macrófagos, e técnicas HQ para excluir doenças crônicas. (48)

As técnicas HQ utilizadas foram o EVG e o *Prussian Blue*, para observação de fibrose e hemossiderofagos, respetivamente, que são indicadores de doenças crônicas. Relativamente à IHQ, utilizou-se o CD68 que marca macrófagos e monócitos, e a proteína S100 que está presente em monócitos em transformação para macrófagos (mas não em macrófagos maduros). (48)

Verificou-se que a aplicabilidade destas técnicas no contexto do estudo ainda tem bastantes limitações, pelo que são necessárias mais investigações para permitir a implementação destes métodos em contexto forense, sendo que os resultados obtidos não se revelaram superiores aos dos métodos já estabelecidos (como a H&E). (48)

Existem ainda publicações acerca de técnicas HQ e IHQ para datar “sulcos de ligadura”, no sentido de estimar a data da morte, com o intuito de estabelecer uma relação de causalidade entre o “sulco” e a morte. Esta informação pode ser bastante útil em casos de homicídio em que o agente tenta esconder o crime através de uma encenação de suicídio por ligadura. (50) (51)

Foram estudados vários marcadores, incluindo a Catepsina D, P-Selectina, Triptase, Fibronectina, entre outros. Contudo, não existe nenhum marcador que, por si só, revele resultados fiáveis. Mesmo utilizando um conjunto de técnicas, é necessário realizar mais estudos e testar as técnicas de forma a validá-las para que possam ser utilizadas na prática forense. (50) (51)

Tendo em conta que, no geral, a utilização de técnicas especiais em contexto de mortes violentas ainda não apresenta resultados suficientemente robustos, a sua aplicabilidade é bastante limitada. Assim sendo, nos casos estudados para este trabalho, não se verificou utilização de nenhuma das técnicas mencionadas, nos contextos descritos. Porém, se mais estudos continuarem a ser realizados, e se os resultados obtidos começarem a ser mais confiáveis, poderá ser interessante testá-las, uma vez que existe um elevado número de mortes relacionadas com eventos asfíxicos.

No presente estudo foram identificadas algumas limitações. A primeira relacionada com a repetição das técnicas, porque muitas vezes a mesma técnica é realizada em diferentes lâminas do mesmo órgão. Sem observar ao microscópio todas as lâminas, torna-se difícil interpretar qual a utilidade dos pedidos, nomeadamente nestes casos, porque não sabemos se todas as lâminas

daquele órgão têm presentes os achados que levaram ao estabelecimento da causa de morte ou relativos a outras patologias. Apesar de se poder compreender o interesse na realização das técnicas, é impossível prever se todas as repetições foram necessárias, ou se teria sido suficiente realizar as técnicas apenas numa lâmina.

Adicionalmente, os pedidos de técnicas complementares no contexto forense, não seguem obrigatoriamente as *guidelines* estabelecidas no contexto clínico de diagnóstico, o que pode levar a uma maior ou menor variabilidade de técnicas utilizadas, nas quais o anatomopatologista terá uma influência determinante. Assim sendo, é espectável que exista uma maior variação entre, não apenas o número, mas também os próprios protocolos pedidos, de acordo com o anatomopatologista que analisa cada caso. Para ultrapassar esta limitação, é necessário a adoção de *guidelines* adequadas e adaptadas ao contexto ML, que tenham em vista os objetivos principais de uma autópsia forense e que não estejam centrados no diagnóstico com intuito terapêutico.

A decomposição cadavérica pode ser um fator limitante na aplicabilidade de técnicas HQ e IHQ, uma vez que pode comprometer os seus resultados. Principalmente no contexto ML, que é mais suscetível a este tipo de situações, é necessário ter atenção às condições de preservação do cadáver e das amostras colhidas, antes observar as lâminas, porque a sua interpretação pode ser seriamente influenciada por este fator. (31)

Sendo a IHQ uma técnica que depende do estabelecimento de ligações entre proteínas, e que estas mesmas proteínas são degradadas ao longo do processo de decomposição, a utilização de imunomarcagem em tecidos em mau estado de preservação pode conduzir, não só à ausência de marcação, como também se pode verificar marcação inespecífica que pode conduzir a resultados menos fiáveis. (31)

Deste modo, torna-se necessário que seja realizada uma descrição do estado de conservação dos órgãos e do cadáver como um todo, para que a interpretação dos resultados se possa ajustar a cada contexto particular. Segundo Lesnikova et al. há tecidos que preservam a sua antigenicidade por períodos de tempo mais longos, como é o exemplo do tecido neural; enquanto tecidos epiteliais, pulmão e fígado, são afetados de forma mais rápida. Na presença de neoplasias malignas, as células que as compõem também têm tendência a iniciar rapidamente o processo de degradação. (31)

Quando as amostras em estudo já se encontram em avançado estado de decomposição, e caso seja necessário realizar um estudo IHQ, deve-se tentar recorrer a anticorpos que tenham sido estudados nestas condições, e que demonstraram resultados fiáveis. Nomeadamente, as citoqueratinas que são conhecidas pela sua fiabilidade, não produzindo marcação inespecífica. (32)

Outra limitação que não pôde ser abordada neste estudo, prende-se com realização de técnicas IHQ para caracterização de tumores. Muitas das vezes, e principalmente em casos de tumores em

estados avançados, ou com tratamentos já realizados, a caracterização tumoral terá sido realizada em vida, num contexto hospitalar. Assim sendo, quando já existe este tipo de informação, podemos verificar duas situações: [1] se a morte foi violenta, não estando relacionada com o tumor, e como este já foi caracterizado, não será necessário realizar técnicas para uma nova caracterização; ou [2] no caso de uma morte natural, em que a neoplasia possa ter contribuído para o óbito, a caracterização pode ser feita para confirmar os resultados obtidos em meio hospitalar (e descartar a hipótese de erro médico), mas apenas o essencial para garantir que os resultados coincidam, não sendo necessário utilizar marcadores preditivos de diagnóstico ou prognóstico. Como neste trabalho, não tivemos acesso a informações clínicas, não pudemos avaliar a pertinência da realização de todas as técnicas IHQ, neste tipo de situações.

No futuro, seria interessante analisar as informações clínicas disponíveis e compará-las com as técnicas realizadas no contexto forense, de forma a perceber se será possível reduzir o número de IHQ pedidas, nomeadamente em situações de neoplasias já conhecidas.

Outro estudo interessante será comparar os resultados dos marcadores IHQ mais utilizados e das técnicas HQ mais realizadas, em diferentes estados de decomposição cadavérica. Apesar de já existirem alguns estudos sobre esta matéria, é espectável que exista alguma variabilidade de resultados tendo em conta o anticorpo específico utilizado (marca, clone...), as soluções de recuperação antigénica e o próprio protocolo em vigor em cada local.

Tendo em conta a variedade de artigos disponíveis relativamente ao anticorpo C5b-9, seria também interessante testar o seu desempenho em contexto de identificação de EAM, em diferentes estados de preservação tecidual. De forma a comprovar a sua eficácia, e talvez implementar este protocolo no futuro, se se mostrar adequado à necessidades do INMLCF, I.P..

Estes estudos, e tantos mais, poderiam ser realizados no intuito de estabelecer *guidelines* específicas para aplicabilidade em contexto forense, no sentido de criar orientações mais específicas para este propósito, de forma a uniformizar a variabilidade de protocolos e anticorpos, permitindo, assim, tornar mais eficiente a análise histológica e a escolha das técnicas complementares.

A evolução científica aponta para um decréscimo das técnicas HQ e consequente aumento das técnicas IHQ, que apresentam uma sensibilidade bastante superior. Porém, o avanço tecnológico também pode ter impacto sua aplicabilidade, uma vez que alterações cardiovasculares, por exemplo, nas quais ainda são utilizados muitos protocolos HQ, poderão vir a ser estudadas de um ponto de vista imagiológico, com recurso a *Postmortem Computed Tomography Angiography*. (42)

6. Conclusão

Através deste trabalho podemos concluir que a aplicabilidade das técnicas HQ e IHQ no contexto ML é diferente do contexto clínico e, como tal, deve ter uma abordagem distinta, com maior ênfase na determinação da causa de morte, ao invés do diagnóstico com fins de prognóstico e terapêutica.

Ao analisar os casos da Delegação do Centro do INMLCF, I.P., podemos observar que as técnicas especiais têm um papel preponderante na caracterização de achados macro- e microscópicos (por H&E), mostrando-se menos úteis a evidenciar causas de morte, por si só. Ou seja, as técnicas essencialmente permitem complementar os resultados já observados na H&E, podendo ser muito importantes para determinar que a severidade das lesões encontradas é (ou não) suficiente para causar a morte, naquelas circunstâncias.

Observamos, ainda, que existe uma diferença na aplicabilidade das técnicas especiais de acordo com o tipo de morte. Em morte naturais, as técnicas conseguem contribuir com mais detalhes sobre a causa de morte do que nas mortes violentas, onde as técnicas são utilizadas mais no sentido de caracterizar patologias existentes, mas que não levaram ao óbito. Este facto verificou-se tanto nas técnicas HQ, como IHQ.

Podemos detetar a existência de 196 pedidos de técnicas aos quais foi atribuído o *score* “0”, muitas delas por não constar no relatório anatomopatológico qualquer descrição ou referência ao órgão onde foram realizadas. Apesar deste número não ser muito elevado, tendo em conta o número total de pedidos (n=1576), deverá ser sempre um objetivo diminuí-lo. Verificam-se, ainda, 784 técnicas às quais foi atribuído o *score* “1”, que está associado a procedimentos que não acrescentam informação diretamente relacionável com a causa de morte. Tendo em vista que o objetivo principal de uma autópsia ML é determinar a causa de morte, podemos considerar que foi realizado um elevado número de técnicas que não tiveram repercussões significativas para a conclusão do relatório ML.

Para diminuir estes números, sugere-se a criação de *guidelines* específicas para o contexto ML, nas quais sejam especificados os protocolos HQ e marcadores IHQ mais adequados, com vista no estabelecimento da causa de morte. Seria também importante estabelecer, em casos de neoplasias, quais os marcadores IHQ que mais fazem sentido na prática forense, uma vez que não se pretende cumprir os mesmos objetivos que na prática clínica, esclarecendo, ainda, em que situações se justifica, de facto, realizar esta caracterização e em quais casos não seria relevante

para o desfecho ML (por exemplo, quando as neoplasias já foram caracterizadas em vida, e não contribuíram para a morte).

Finalmente, seria importante ponderar a implementação de novos marcadores IHQ que permitam resultados fidedignos, mesmo perante avançados estados de decomposição, demonstrando especial relevância no contexto ML como, por exemplo, o C5b-9.

Bibliografia

1. KUMAR, Vinay; Abbas, Abul K. e Aster, Jon C. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease (10th Edition)*. Philadelphia : Elsevier, 2020. ISBN: 9780323609937.
2. DEY, Pranab. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Singapore : Springer, 2018. ISBN: 978-981-10-8252-8.
3. MESHER, Anthony L. *Junqueira's Basic Histology*. New York : Mc Graw Hill Education, 2018. ISBN: 1260026183 9781260026184.
4. CARSON, Freida L. *Histotechnology: A Self-Instructional Text* . Estados Unidos : American Society of Clinical Pathologists Press, 2020. ISBN: 978-089189-6760.
5. KIERNAN, J. A. *Histological and Histochemical Methods Theory and Practice (15th Edition)*. United Kingdom : Scion Publishing, 2015. ISBN: 978 1 907904 32 5.
6. DAY, Christina E. *Histopathology: Methods and Protocols (2014th Edition)*. New York : Springer Science, 2014. ISBN: 978-1-4939-1049-6.
7. FERRO, Amadeu. *Imunohistoquímica*. Lisboa : Amadeu Borges Ferro, 2014. ISBN: 978-989-20-5416-2.
8. OVALLE, William K. e Nahirney, Patrick C. *Netter's Essencial Pathology: With Correlated Histopathology (3rd Edition)*. Philadelphia : Elsevier, 2021. ISBN: 9780323694643.
9. DAKO DENMARK A/S, An Agilent Technologies Company. *Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods (6th Edition)*. California : Dako Denmark, 2009.
10. DABBS, David J. *Diagnostic immunohistochemistry: Theranostic and Genomic (3rd Edition)*. Philadelphia : Saunders Elsevier, 2010. ISBN: 978-1-4160-5766-6.
11. BUCHWALOW, Igor B. e Böcker, Werner. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Berlin : Springer, 2010. ISBN: 978-3-642-04608-7.
12. EZYAGUIRRE, Eduardo J.; Walker, David H. e Zaki, Sherif R. Immunohistology of Infectious Diseases. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 2006, doi:10.1016/B978-0-443-06652-8.50008-9, pp. 43-64.
13. DIMAIO, Dominick e DiMaio, Vincent J.M. *Forensic Pathology (2nd Edition)*. Florida : CRC Press, 2001. ISBN: 9781420042412.
14. SAUKKO, Pekka e Knight, Bernard. *Knight's Forensic Pathology (4th Editon)*. Florida : CRC Press, 2016. ISBN: 9780340972533.
15. BROMLEYA, Amy B. e Trotter, Martin J. Immunohistochemistry Utilization in Autopsy Pathology: A Canadian Experience. *Pathology – Research and Practice*. 4, 2011, Vol. 207, doi:10.1016/j.prp.2011.02.006, pp. 241-246.

16. DETTERMEYER, R. B. The Role of Histopathology in Forensic Practice: An Overview. *Forensic Science, Medicine and Pathology*. 3, 2014, Vol. 10, doi:10.1007/s12024-014-9536-9, pp. 401-412.
17. PARAI, Jacqueline L. e Milroy, Christopher M. The Utility and Scope of Forensic Histopathology. *Academic Forensic Pathology*. 3, 2018, Vol. 8, doi:10.1177/1925362118797602, pp. 426-451.
18. LAU, Gilbert e Lai, Siang Hui. Forensic Histopathology. *Forensic Pathology Reviews*. 2008, Vol. 5, doi:10.1007/978-1-59745-110-9_13, pp. 239-265.
19. MOLINA, D. Kimberly; Wood, Leisha E. e Frost, Randall E. Is Routine Histopathologic Examination Beneficial in All. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 1, 2007, Vol. 28, doi:10.1097/01.paf.0000257388.83605.0a, pp. 1-3.
20. FRONCZEK, Judith, et al. The Role of Histology in Forensic Autopsies: Is Histological Examination Always Necessary to Determine a Cause of Death? *F Forensic Science, Medicine and Pathology*. 1, 2014, Vol. 10, doi:10.1007/s12024-013-9496-5, pp. 39-43.
21. DE LA GRANDMAISON, Geoffroy Lorin; Charlier, Philippe e Durigon, Michel. Usefulness of Systematic Histological Examination in Routine Forensic Autopsy. *Journal of Forensic Sciences*. 2010, Vol. 55(1), doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01240.x, pp. 85-88.
22. LANGLOIS, Neil E I. The Use of Histology in 638 Coronial Post-Mortem Examinations of Adults: An Audit. *Medicine, Science and the Law*. 2006, Vol. 46(4), doi: 10.1258/rsmmsl.46.4.310, pp. 310-320.
23. DE-GIORGIO, Fabio e Vetrugno, Giuseppe. Is Histological Examination Always Necessary to Determine a Cause of death? Of Course It Is! *Forensic Science, Medicine and Pathology*. 2014, Vol. 10, doi: <https://doi.org/10.1007/s12024-014-9543-x>, pp. 477-478.
24. DE-GIORGIO, Fabia e Vertrugno, Giuseppe. Does the Principle of Cost/Benefit Analysis Apply to Forensic Pathology? *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. Setembro 2010, Vol. 31(3), doi: 10.1097/PAF.0b013e3181dfc976, p. 300.
25. BANCROFT, John D.; Layton, Christopher e Survana, Kim S. *Bancroft'S Theory And Practice Of Histological Techniques (5th Edition)*. London : Elsevier, 2001. ISBN-13: 978-0443064357.
26. N ORAH, O Rotim e Abdulkareem, FB. The Use of Special Stains in Liver Biopsy Interpretation: Implications for the Managment of Liver Disease in Nigeria. *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 4, 2016, Vol. 19, DOI: 10.4103/1119-3077.183309, pp. 523-529.
27. JONG, S. de, et al. Monitoring Cardiac Fibrosis: a Technical Challenge. *Netherlands Heart Journal*. 1, 2012, Vol. 20, doi: 10.1007/s12471-011-0226-x., pp. 44-48.
28. OUYANG, Jie, et al. Utility of Desmin and Masson's Trichrome. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 1, 2010, Vol. 3, PMID: 19918333, pp. 98-105.
29. FITZGERALD, Seán, et al. Correlation of Imaging and Histopathology of Thrombi in Acute Ischemic Stroke with Etiology and Outcome. *Journal Neurointerv Surgery*. 3, 2019, Vol. 63, PMID: 30514073, pp. 292-300.

30. SCHEAR, Matthew J. e Beatty, Brian Lee. A Histological Investigation into the Correlation of Central Retinal Artery Atherosclerosis with the Systemic Circulation. *The Anatomical Record*. 8, 2014, Vol. 297, doi: 10.1002/ar.22945, pp. 1430-1434.
31. LESNIKOVA, Iana, et al. Usability of Immunohistochemistry in Forensic Samples With Varying Decomposition. *American Journal of Forensic Medicine Pathology*. 3, September 2018, Vol. 39, doi: 10.1097/PAF.0000000000000408, pp. 185-191.
32. JUDKINS, Alexander R., et al. Sensitivity and Specificity of Antibodies on Necrotic Tumor Tissue. *American J Clin Pathol*. 3, 1998, Vol. 110, doi: 10.1093/ajcp/110.5.641, pp. 641-646.
33. CELL MARQUE. *Cell Marque Tissue Diagnostics: Immunohistochemistry Reference Guide*. Alemanha : Merk KGaA, 2018.
34. LEONG, Anthony S-Y., Cooper, Kumarasen e Leong, F. Joel W-M. *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology (2nd Edition)*. s.l. : Greenwich Medical Media, 2002. ISBN: 9781841101002.
35. SHINDE, Arti V. e Frangogiannis, Nikolaos G. Fibroblasts in Myocardial Infarction: a Role in Inflammation and Repair. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014, Vol. 70, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.015, pp. 74-82.
36. BEJARANO, Pablo A., et al. Thyroid Transcription Factor-1, Thyroglobulin, Cytokeratin 7, and Cytokeratin 20 in Thyroid Neoplasms. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 3, 2000, Vol. 8, doi: 10.1097/00129039-200009000-00004, pp. 189-194.
37. BARRANCO, Rosario e Ventura, Francesco. Immunohistochemistry in the Detection of Early Myocardial Infarction: Systematic Review and Analysis of Limitations Because of Autolysis and Putrefaction. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2, 2020, Vol. 28, doi: 10.1097/PAI.0000000000000688, pp. 95-102.
38. ORTMANN, C.; Pfeiffer, H. e Brinkmann, B. Demonstration of myocardial necrosis. *Int J Legal Med*. 1, 2000, Vol. 114, doi: 10.1007/s004140000140. PMID: 11197628., pp. 50-55.
39. SHINDE, Arti Vi e Frangogiannis, Nikolaos G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 70, 2014, 10.1016/j.yjmcc.2013.11.015.
40. KOVANEN, Petri T.; Kaartinen, Maija e Paavonen, Timo. Infiltrates of Activates Mast Cells at the Site of Coronary Atheromatous Erosion or Rupture in Myocardial Infarction. *Circulation*. 5, 1995, Vol. 92, doi:10.1161/01.cir.92.5.1084, pp. 1084-1088.
41. THOMSEN, Holger e Held, Hannelore. Susceptibility of C5b-9(m) to Postmortem Changes. *International Journal of Legal Medicine*. 6, 1994, Vol. 106, doi: 10.1007/BF01224773, pp. 291-293.
42. MARGIOTTA, Gabriele, et al. Medico-Legal Aspects of Pulmonary Thromboembolism. *Advances in Internal Medicine*. 2016, Vol. 906, doi:10.1007/5584_2016_130, pp. 407-418.
43. RO, Ayako, et al. Pulmonary thromboembolism: overview and update from medicolegal aspects. *Legal Medicine*. 2, 2008, Vol. 10, doi:10.1016/j.legalmed.2007.09.003, pp. 57-71.

44. MANSUETO, Gelsomina, et al. The dating of thrombus organization in cases of pulmonary embolism: an autopsy study. *BMC Cardiovascular Disorders*. 1, 2019, Vol. 19, doi:10.1186/s12872-019-1219-8, p. 250.
45. BARRANCO, Rosario e Ventura Francesco. Immunohistochemistry in the Postmortem Diagnosis of Sepsis: A Systematic Review. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 8, 2020, Vol. 28, doi:10.1097/PAI.0000000000000790, pp. 571-578.
46. TSOKOS, Michael. Immunohistochemical detection of sepsis-induced lung injury in human autopsy material. *Legal Medicine*. 2, 2003, Vol. 5, doi:10.1016/s1344-6223(03)00010-5, pp. 73-86.
47. STASSI, Chiara et al. Post-Mortem Investigations for the Diagnosis of Sepsis: A Review of Literature. *Diagnostics*. 10, 2020, Vol. 10, doi:10.3390/diagnostics10100849, p. 849.
48. GUTJAHR, Ewgenija e Madea, Burkhard. Inflammatory reaction patterns of the lung as a response to alveolar hypoxia and their significance for the diagnosis of asphyxiation. *Forensic Science International*. 2019, Vol. 297, doi:10.1016/j.forsciint.2019.02.026, pp. 315-325.
49. BARRANCO, Rosario; Bonsignore Alessandro e Ventura, Francesco. Immunohistochemistry in Postmortem Diagnosis of Acute Cerebral Hypoxia and Ischemia: A Systematic Review. *Medicine*. 25, 2021, Vol. 100, doi:10.1097/MD.00000000000026486, p. e26486.
50. MANSUETO, Gelsomina et al. A Clue on the Skin: A Systematic Review on Immunohistochemical Analyses of the Ligature Mark. *International Journal of Environment Research and Public Health*. 4, 2022, Vol. 19, doi:10.3390/ijerph19042035, p. 2035.
51. LEGAZ, Isabel Pérez et al. Diagnosis of Vitality in Skin Wounds in the Ligature Marks Resulting From Suicide Hanging. *American Journal of Forensic Medicine Pathology*. 3, 2017, Vol. 38, doi:10.1097/PAF.0000000000000322, pp. 211-218.