



**MESTRADO EM MEDICINA LEGAL E CIÊNCIAS FORENSES**  
2007 - 2009

**Diagnóstico Precoce de Enfarte Agudo  
do Miocárdio Utilizando Técnicas  
Imunohistoquímicas, sua Aplicação  
Forense**

**Dissertação realizada por:  
Sara Sofia Pereira Alves Coimbra Morais**



# **Diagnóstico precoce de enfarte agudo do miocárdio utilizando técnicas imunohistoquímicas, sua aplicação forense**

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Cristina de Mendonça

Sara Sofia Pereira Alves Coimbra Morais  
Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses  
2007/2009

"Somente quando de tudo desesperamos é que a esperança começa a ser a verdadeira força."

(Gilbert Keith Chesterton)

## RESUMO

Introdução - O enfarte agudo do miocárdio (EAM) é considerado a causa de morte natural mais comum. Em mortes potencialmente criminosas a presença de um enfarte recente pode ser relevante na determinação da causa ou como contribuindo para a morte. O anticorpo primário anti humano C9 tem sido utilizado em vários estudos por diversos investigadores, com os mais diversos resultados e com técnicas mais ou menos complexas no diagnóstico de enfartes recentes. A importância da mieloperoxidase no diagnóstico do EAM tem sido descrita em contexto clínico por vários autores.

Objectivos – Este trabalho tem como objectivos otimizar uma técnica de imunohistoquímica para o diagnóstico de enfarte do miocárdio recente (menos de 6 horas de evolução); determinar as alterações imunohistoquímicas do enfarte do miocárdio recente em amostras colhidas em cadáveres e elaborar um protocolo de uma técnica de imunohistoquímica, não só sensível para a observação de lesões recentes do miocárdio, como também em tecidos moderadamente autolisados.

Métodos - Foram analisadas 50 amostras de miocárdio provenientes de cadáveres autopsiados no Instituto Nacional de Medicina Legal (INML) Delegação de Centro, Serviço de Patologia Forense. Foram seleccionados os casos com informação de morte por enfarte do miocárdio, morte súbita natural, causa ignorada ou mesmo em casos que o patologista suspeite de EAM. Foram efectuadas duas técnicas imunohistoquímicas, uma com o anticorpo primário anti humano MPO e outra com o anticorpo primário anti humano C9. Foi efectuada a classificação e contagem das células por dois observadores.

Resultados - A marcação imunohistoquímica com o anticorpo primário anti humano C9 foi satisfatória, embora difícil de aferir, conseguindo-se visualizar os miócitos necrosados tal como consta da literatura. Como controlo interno positivo foram observadas artérias cuja camada subendotelial estava arterosclerosada podendo-se observar as diferentes classificações utilizadas: 0, +1, +2 e +3. A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti humano

MPO foi satisfatória, sendo possível a visualização das estruturas identificadas na literatura. Visualizaram-se correctamente os polimorfonucleares neutrófilos e foi possível a sua contagem, podendo-se observar as diferentes classificações utilizadas: 0, +1 e +2.

Discussão - O anticorpo primário anti humano C9 é um anticorpo ainda pouco estudado e necessita de ser testado num maior número de amostras e em condições controladas. É uma técnica com resultados contraditórios, pouco sensível, de difícil interpretação e classificação da imunomarcação; em alguns casos foi difícil haver concordância entre os dois observadores, pelo que não recomendamos que esta técnica seja utilizada como auxiliar no diagnóstico de EAM em fragmentos retirados de autópsias médico legais, como foi objecto desta investigação. A marcação imunohistoquímica para o anticorpo primário MPO foi adequada. A técnica protocolada foi fácil e rápida de executar, o anticorpo demonstrou ser sensível para diagnosticar este tipo de patologia, proporcionando uma correcta visualização dos polimorfonucleares neutrófilos em todos os casos que macroscopicamente se diagnosticou EAM, em alguns casos (n=13) onde se tinham suspeitas de EAM sem confirmação macroscópica ou por métodos de rotina e ainda em alguns casos de causa de morte ignorada.

Conclusão – Os objectivos deste trabalho foram alcançados. A técnica imunohistoquímica eleita foi a do anticorpo primário anti humano MPO sendo esta uma técnica reprodutível. A utilização do anticorpo primário C9 para o diagnóstico de EAM recente é matéria que carece de uma maior investigação.

## **ABSTRACT**

Introduction – Acute myocardial infarction (AMI) is now considered the most common cause of natural death. In probable criminal deaths, the presence of an a recent infarction can be a relevant factor in determining the cause of death, or as a contributor to death itself. The primary anti-human C9 antibody has been used by many researchers in studies showing various results and using more or less complex techniques in the diagnosis of recent infarctions. The relevance of myeloperoxidase in diagnosing MI has been described in clinical context by various authors.

Objectives – The aim of this project is to optimize an immunohistochemistry technique for the diagnosis of the recent myocardial infarction (less than 6 hours evolution); to determine the immunohistochemical changes of the recent myocardial infarction in samples collected on corpses and prepare a protocol covering an immunohistochemistry technique to aid visualization of recent myocardial lesions and moderately autolysate tissues.

Methods – 50 myocardial samples from autopsied corpses were analysed at the Instituto Nacional de Medicina Legal – INML (Forensic Medicine Institute), Centre Delegation, Forensic Pathology Service. We selected the cases with myocardial infarction, sudden death, cause of death unknown or even the cases where the pathologists suspected MI as being the cause of death. We used two immunohistochemical techniques, one using the primary anti-human MPO antibody and the other using the primary anti-human C9 antibody. Cells were classified and counted by two observers.

Outcomes – The immunohistochemical marking with the primary anti-human C9 antibody was satisfactory, although difficult to assess, and we were able to visualize the necrotic myocytes, as mentioned in literature. For the purpose of internal positive controls, we visualized arteries with atherosclerosed subendothelial layer, and showed the different classifications used: 0., +1. +2 and +3. The immunohistochemical marking with the primary anti-human MPO antibody was satisfactory, and we were able to visualize the structures identified

in literature. The polymorphonuclear neutrophils were visualized correctly and were counted, and showed the different classifications used: 0. +1 and +2.

Discussion – The primary anti-human C9 antibody has not yet been thoroughly studied and needs to be tested on a larger number of samples and in controlled environments. The results of this technique are contradictory, scarcely perceptible, the immunomarking is difficult to interpret and classify; in some cases, it was difficult to have the agreement of both observers and, therefore, we do not recommend this technique to be used as a MI diagnostic aid in fragments obtained from forensic autopsies, as in the case of this research. The immunohistochemical marking for the primary anti-human MPO antibody was adequate. The technique covered by the protocol was easy and quick to implement, the antibody proved to be sensitive in the diagnosis of this type of pathology, providing a proper visualization of the polymorphonuclear neutrophils in all the cases where microscope diagnosis revealed MI, in some cases (n=13) where MI was only suspected without the microscope confirmation or by means of routine methods, and even in some cases of death due to unknown cause.

Conclusion – The aims of this project were achieved. The immunohistochemical technique chosen was the primary anti-human MPO antibody, and this is a reproducible technique. The use of the primary anti-human C9 antibody in the diagnosis of recent acute myocardial infarction needs further research.

## **Palavras – Chave**

Enfarte agudo do miocárdio; imunohistoquímica; anticorpo primário; Complemento C9; Mieloperoxidase; necrose; polimorfonucleares.

# INDICE GERAL

<b>Resumo</b> .....	<b>II</b>
<b>Palavras-chave</b> .....	<b>VI</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>IX</b>
<b>Índice de quadros e tabelas</b> .....	<b>X</b>
<b>Índice de gráficos</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>XII</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Capitulo I</b>	
1.1- Introdução .....	1
1.2- Enquadramento teórico .....	2
1.2.1 - Patogenia do enfarte agudo do miocárdio .....	3
1.2.2 - Diagnóstico autóptico de enfarte agudo do miocárdio .....	4
1.2.3 - Diagnóstico Anatomo-Patológico .....	4
1.2.4 - Leucócitos, citocinas, proteína C reactiva, sistema de complemento, factor tecidual e moléculas de adesão .....	7
1.2.5- Métodos histoquímicos .....	7
1.2.6- Métodos de fluorescência .....	9
1.2.7- Métodos imunohistoquímicos .....	9
1.2.8- O complemento de ataque de membrana .....	10
1.2.9- A mieloperoxidase .....	10
1.3- Estudos recentes .....	11
1.4- Colheita de amostras .....	12
1.5 - Processamento histológico .....	13
1.5.1- Técnica imunohistoquímica .....	13
1.6- Objectivo do trabalho .....	14

## **Capítulo II**

### **Metodologia**

2.1- Tipo de estudo .....	15
2.2- Tratamento das amostras .....	15
2.3 - A técnica imunohistoquímica .....	15
2.3.1- Protocolo de imunohistoquímica para C9 (X197) .....	16
2.3.2 - Protocolo de imunohistoquímica para Mieloperoxidase .....	17
2.4 – Método de classificação da imunomarcação .....	18
2.5 – Ética .....	20

## **Capítulo III**

### **Resultados**

3.1- A técnica histológica .....	21
3.2- A marcação imunohistoquímica .....	22
3.3- Avaliação das lâminas .....	26

## **Capítulo IV**

### **Discussão**

4.1- Técnica histológica .....	33
4.2- Marcação imunohistoquímica – anticorpo primário C9 .....	34
4.3- Marcação imunohistoquímica – anticorpo primário MPO .....	35
4.4- Classificação da imunomarcação – C9 vs MPO .....	36

## **Capítulo V**

<b>Conclusão</b> .....	38
------------------------	----

<b>Bibliografia</b> .....	39
---------------------------	----

Anexo – fichas técnicas dos anticorpos e kits utilizados na marcação imunohistoquímica .....	47
--	----

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Técnica do trifeniltetrazólio .....	5
Figura 2 – Enfarte agudo do miocárdio. Coloração hematoxilina – eosina .....	8
Figura 3 – Miócitos necrosados com marcação com o anticorpo anti human C9 (contolo positivo para o anticorpo C9) 50x .....	21
Figura 4 – 0 - C9 controlo interno, vasos marcados, nenhuma célula marcada positivamente com o anticorpo C9 .....	22
Figura 5 – Uma única célula C9 positiva +1, 400x .....	23
Figura 6 – Várias células C9 positivas +2, 50x .....	23
Figura 7 – Vários grupos de células C9 positivas +3, 50x .....	24
Figura 8 – Neutrófilos marcados positivamente com o soro MPO, 50x .....	24
Figura 9 – Sem enfarte – 0 (nenhuma célula MPO positiva), 50x .....	25
Figura 10 – Enfarte recente +1 (menos de 1 hora até 6 horas) vários neutrófilos marcados positivamente com o anticorpo anti humano MPO, 400x .....	25
Figura 11 – Enfarte mais antigo +2 (de 6 a 12 horas) muitas células marcadas positivamente para o anticorpo anti humano MPO, 400x .....	26

## ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Sequência de alterações no enfarte do miocárdio .....	6
Tabela 1 – Grelha de avaliação anticorpo primário C9 .....	19
Tabela 2 – Grelha de avaliação anticorpo primário MPO .....	19
Tabela 3 – Tabela de avaliação do anticorpo primário C9 .....	27
Tabela 4 - Tabela de avaliação do anticorpo primário MPO .....	28

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação entre observadores para o anticorpo primário C9 .....	29
Gráfico 2 – Classificação final das lâminas para o anticorpo primário C9.....	30
Gráfico 3 – Comparação entre observadores para o anticorpo primário MPO .....	30
Gráfico 4 – Classificação final das lâminas para o anticorpo primário MPO .....	31
Gráfico 5 – Comparação das duas técnicas C9 e MPO .....	32

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

C9 – Complemento C9

DAB – 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloro TTC – Cloreto de Trifeniltetrazólio

EAM - Enfarte agudo do miocárdio

HE – Hematoxilina - Eosina

INML – Instituto Nacional de Medicina Legal

MAC – Complemento de ataque de membrana

MPO – Mieloperoxidase

## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Cristina de Mendonça pela inestimável orientação científica, dedicação, amizade e carinho prestadas em todas as fases deste trabalho.

Ao Professor Doutor Francisco Côrte-Real pelo incondicional apoio desde o início deste projecto.

À Dra. Ascensão Rebelo pela disponibilidade, paciência e pela mão amiga em todas as horas.

Ao Dr. César Santos, sem a sua indispensável ajuda e amizade não teria sido possível a realização da parte prática deste trabalho.

Aos Patologistas do Serviço de Patologia Forense da Delegação do Centro do INML por colherem as amostras necessárias para a elaboração deste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório e amigas Dra. Cláudia Freitas e Dra. Rita Certã que sem a sua colaboração este trabalho não seria concluído.

À Dra. Manuela Martins, Patologista do Hospital de São José, que sem o seu apoio e colaboração este trabalho não seria possível.

Ao Dr. Mário Oliveira, Director do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São José, por disponibilizar os recursos do laboratório para a realização deste trabalho.

Ao meu colega e amigo Dr. José Ferreira da Silva pelo apoio e ajuda na aquisição do material necessário à execução deste trabalho.

À Dra. Luísa Ganso colega, amiga e companheira desde o início deste projecto.

À D. Alzira pela paciência e amizade em todas as fases deste mestrado.

À Dra. Ana Maria Teixeira pelo incondicional apoio e amizade em todas as fases deste trabalho.

Ao meu marido e pais pelo apoio, amor e confiança habituais.

# Capítulo I

## 1.1 – INTRODUÇÃO

A temática da morte súbita por causas cardíacas há muito que vem a ser estudada, correspondendo em 1986 a 20% de todas as causas de morte nos países desenvolvidos, sendo que destas 88% eram provocadas por doença cardíaca<sup>53</sup>.

Em 1988, o enfarte agudo do miocárdio (EAM) já era considerado a causa de morte natural mais comum, correspondendo a 80% dos casos<sup>65</sup>.

A morte súbita é muitas vezes a única manifestação de doença coronária, sendo responsável por 50% de todas as mortes por doença cardiovascular em países desenvolvidos, segundo um estudo realizado em 1999<sup>23</sup>.

Estudos mais recentes indicam que cerca de 50% das mortes sujeitas a autópsia são de causa natural, sendo que grande parte corresponde a mortes súbitas. A doença coronária corresponde actualmente a 80% das mortes de causa cardíaca, estando a maioria destas mortes súbitas relacionadas com EAM<sup>47</sup>.

É sabido que o EAM pode ocorrer sem sintomas significativos,<sup>60</sup> que a idade de um enfarte é difícil de estabelecer em seres humanos, que a morte súbita pode ser causada por arritmia, e que a arritmia pode ser precipitada por stress físico ou emocional. Não tão conhecidos, no entanto, os processos patológicos que ocorrem no miocárdio e artérias coronárias nos últimos minutos ou horas antes da morte inesperada.

Em mortes potencialmente criminosas, a presença de um enfarte recente pode ser relevante na determinação da causa ou como contribuindo para a morte. Assim, é de extrema importância realizar um exame histológico completo, procurando evidências de lesão no miocárdio utilizando todos os métodos disponíveis.

Uma autópsia que demonstre um enfarte recente pode ter profundas implicações médico-legais. Num acidente de viação, ferroviário ou numa queda fatal de um avião, a prova da existência de uma lesão aguda do miocárdio no

maquinista ou no piloto, respectivamente, pode ser vital na investigação forense, tendo implicações legais relevantes<sup>26</sup>.

Numa autópsia médico-legal, mesmo que as lesões traumáticas observadas no cadáver sejam fatais e suficientes para provocar a morte, o EAM pode estar presente concomitantemente, podendo ser a principal contribuição para a produção destas lesões.

## 1.2 - ENQUADRAMENTO TEÓRICO

A definição universal de EAM indica que este deve ser diagnosticado quando existe evidência de necrose relacionada com isquémia e sugere que qualquer aumento nos biomarcadores de necrose dos cardiomiócitos no contexto deve ser diagnosticado como EAM<sup>1</sup>.

Existem dois tipos de enfarte do miocárdio, cada qual exibindo uma morfologia e significado clínico distintos. O tipo mais comum é o enfarte transmural, no qual a necrose isquémica envolve a totalidade, ou quase a totalidade, da espessura da parede ventricular no trajecto de uma única artéria coronária.

Este padrão de enfarte está usualmente associado a arteriosclerose coronária, ruptura de placa de ateroma e trombose. Em contraste, o enfarte subendocárdico (não transmural) consiste numa pequena área de necrose isquémica, ou de coagulação, limitada ao terço interno ou no máximo a metade da parede ventricular, estendendo-se amiúde lateralmente, para além do território de perfusão de uma artéria coronária.

No entanto, os dois tipos de enfarte estão intimamente relacionados, pois em modelos experimentais o enfarte transmural começa como uma zona de necrose subendocárdica, que se estende numa “frente de onda” através de toda a espessura da parede ventricular. Deste modo, um enfarte subendocárdico pode ocorrer como resultado da ruptura da placa de ateroma, seguida por trombo coronário, que se torna lisado antes que a necrose miocárdica se estenda através da espessura total da parede<sup>52</sup>.

### 1.2.1 – PATOGENIA DO ENFARTE AGUDO DO MIOCÁRDIO

Trombos, associados à presença de placas de ateroma, são a principal causa do EAM. Os trombos são originados por dois principais processos:

- 25% dos casos formam-se numa ulceração superficial do endotélio, sobre uma placa de ateroma.
- 75% dos casos são devidos a fissuras da placa de ateroma, resultando numa fenda profunda na placa rica em lipídios que potencia o desenvolvimento do trombo no lúmen, ou causa sangramento no corpo da placa e consequente balonização da mesma<sup>57</sup>.

Num caso típico, a seguinte sequência de eventos poderá ocorrer:

- O evento inicial é uma súbita modificação na morfologia da placa ateromatosa, isto é, hemorragia intraplaca, ulceração ou fissura.
- As plaquetas são expostas ao colagénio subendotelial e ao conteúdo necrótico da placa, levando à adesão, agregação, activação e libertação de adenosina-difosfato (ADP), com a instituição de uma massa de plaquetas. A massa de plaquetas pode dar origem à embolia ou potencializar a trombose oclusiva.
- Simultaneamente, a tromboplastia tecidual é libertada, activando a via extrínseca da coagulação.
- Plaquetas activadas e aderentes libertam factores plaquetários, predispondo à coagulação, favorecendo ao vasospasmo e somando-se à massa do trombo.
- Frequentemente, em questão de minutos, o trombo evolui para se tornar completamente oclusivo<sup>26</sup>.

Assim, quase todos os enfartes têm como origem lesões arteromatosas e suas complicações. Apenas alguns resultam de outro tipo de obstrução coronária, tal como poliartrite, outras vasculites, embolismos de vários tipos, estenose aórtica severa, algumas anomalias congénitas das artérias coronárias ou dos grandes vasos, aneurisma dissecante da aorta e tumores ou sarcoidose afectando os vasos coronários<sup>26</sup>.

## **1.2.2 - O DIAGNÓSTICO AUTÓPTICO DE ENFARTE DO MIOCÁRDIO RECENTE**

Clínica e epidemiologicamente, a morte súbita é definida como inesperada, que ocorrendo muitas vezes em poucas horas desde o início dos sintomas e sendo geralmente de causa natural.

Na investigação médico-legal, a morte súbita pode ser catalogada como funcional ou como lesional. Nesta, existem achados macroscópicos, histopatológicos (infiltração inflamatória no miocárdio com necrose das fibras musculares) ou bioquímicos suficientes para explicar a morte<sup>19</sup>.

A maior parte das vezes não é possível estabelecer a causa de morte como EAM pois este é muito difícil de detectar macroscopicamente nas primeiras 2 a 3 horas. Uma zona pálida amarelada detectada à secção do miocárdio não fixado pode ser suspeita de enfarte recente, assim como a reacção negativa ao TTC<sup>39</sup> (trifeniltetrazólio).

A maior parte dos EAM detectados nas autópsias estão localizados na parede posterior do ventrículo esquerdo, sendo a sua observação minuciosa de extrema importância. O aspecto edemaciado e hiperemiado do miocárdio pode também ser suspeito de enfarte, uma vez que estes fenómenos lhe são característicos nas primeiras duas horas<sup>36</sup>.

## **1.2.3 – O DIAGNÓSTICO ANÁTOMO-PATOLÓGICO**

A identificação precoce de EAM por patologistas constitui um problema difícil, em particular quando a morte ocorreu dentro de alguns minutos até algumas horas após o estabelecimento da lesão isquémica, pois as alterações morfológicas diagnosticáveis são tardias em relação à lesão real. Segundo alguns autores, os enfartes do miocárdio com menos de 12 horas de evolução são invisíveis ao exame macroscópico<sup>48</sup>.

É possível, no entanto, através de técnicas histoquímicas realçar a área de necrose. A imersão de cortes teciduais numa solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) concede uma coloração de “tijolo” ao miocárdio não

necrosado, ou seja, não enfartado onde as enzimas desidrogenases estão preservadas (Figura 1).

Sal de tetrazol + substracto + desidrogenase



Depósito de formazano em zonas normais

Como as enzimas desidrogenases estão depletadas na área de necrose isquémica ou de coagulação, a zona enfartada é revelada como uma zona pálida não corada pelo reagente, o que é especialmente evidente após a fixação quando o miocárdio não corado exibe coloração discretamente acastanhada. Após este período, a evolução das lesões é visível macroscopicamente. Em torno das 18 a 24 horas, a lesão pode ser identificada nos cortes mais espessos de rotina fixados com formol a 10%, inclusivamente aqueles não corados previamente com TTC, em decorrência da palidez ou da cor vermelho azulada gerada pelo sangue estagnado. De um modo progressivo, o enfarte torna-se uma área mais nitidamente definida, amarelada, algo amolecida, que em 10 dias a 2 semanas é margeada por uma zona hiperémica de tecido de granulação altamente vascularizada.



**Figura 1:** Técnica do Trifeniltetrazólio

Durante as semanas seguintes, a região lesada evolui para uma cicatriz fibrosa observada com uma coloração de rotina (hematoxilina- eosina) e mesmo a olho nu<sup>52</sup>.

Posto isto, e não sendo possível histopatologicamente observar as alterações microscópicas de necrose coagulativa por corantes teciduais rotineiros antes das 12 horas, e ser este o intervalo de tempo em que o enfarte do miocárdio levanta dúvidas para os patologistas forenses, é importante que novas técnicas sejam desenvolvidas neste sentido, como é o caso das técnicas de imunohistoquímica.

O músculo necrosado gera uma inflamação aguda e consecutivamente uma infiltração por polimorfonucleares neutrófilos, sendo mais proeminente após 2 a 3 dias, não sendo visualizável por corantes rotineiros antes disso. Depois os macrófagos removem os miócitos necrosados e a zona lesada é progressivamente substituída por tecido de granulação, que se vai tornando mais fibroso com o tempo, formando a cicatriz observável macroscopicamente (Quadro1).

Tempo	Histoquímica	Microscopia Óptica	Alterações Macroscópicas
0-1/2h	Diminuição das desidrogenases, oxidases, fosforilases e glicogénio. Diminuição do K e aumento do Na <sup>+</sup> e Ca <sup>++</sup>		
1-2h		Ondulações das fibras nas bordas	
4-12h		Início da necrose de coagulação, edema, hemorragia, início do infiltrado neutofílico	
18-24h		Necrose por coagulação, palidez (picnose dos núcleos, citoplasma eosinofílico)	Palidez
24-72h		Necrose de coagulação total com perda dos núcleos e estriações; intenso infiltrado intersticial de neutrófilos	Palidez, algumas vezes hiperémia

Quadro 1 – Sequência de alterações no enfarte do miocárdio<sup>52</sup>

#### **1.2.4 - LEUCOCITOS, CITOCINAS, PROTEINA C REACTIVA, SISTEMA DE COMPLEMENTO, FACTOR TECIDUAL E MOLÉCULAS DE ADESÃO**

Os leucócitos podem ser cativados por lesão tecidual (necrose ou isquémia), pela presença de LDL – colesterol oxidada, ou pela presença de um agente infeccioso na parede vascular. Uma vez activados, iniciam a produção de diferentes citocinas interleucinas, factor de necrose tumoral alfa e interferon gama. Especialmente, a interleucina-6 (Il6) estimula os hepatócitos a produzir RNAm para a produção de proteínas de fase aguda (fibrinogénio, proteína C reactiva, amiloíde sérico A). Entre as proteínas de fase aguda, a proteína C reactiva destaca-se por apresentar um tempo de vida plasmático curto (aproximadamente 19h) e a sua concentração plasmática exclusivamente relacionada à síntese nesse período. Através de técnicas imunohistoquímicas, a Proteína C reactiva tem sido também observada nos tecidos inflamados, no miocárdio enfartado e nas placas de arterosclerose. O seu papel biológico não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que é capaz de activar o sistema de complemento, intimamente relacionado aos estádios iniciais do processo de formação da placa de arterosclerose e, também, relacionado ao estímulo da síntese de factor tecidual pelos monócitos (efeito pró coagulante). As citocinas estimulam ainda a expressão de moléculas de adesão, contribuindo para a interacção entre monócitos e células endoteliais. Por outro lado, a proteína C reactiva também apresenta acção anti-inflamatória ao inibir a adesão de neutrófilos e células endoteliais através da inibição da expressão de L-selectina e ao inibir a produção de superóxido, pelos neutrófilos e estimular a síntese de antagonista do receptor de Il-1, pelos monócitos<sup>27,29</sup>.

#### **1.2.5 - MÉTODOS HISTOQUÍMICOS**

Na coloração de hematoxilina eosina (HE), o aumento da eosinofilia citoplasmática é um sinal precoce de lesão celular, parcialmente resultante do aumento da ligação da eosina pelas proteínas citoplasmáticas. Na coloração convencional a eosina é carregada negativamente (Figura 2). As ligações podem aumentar devido à grande exposição da carga positiva reactiva ao

longo das cadeias polipeptídicas após a sua desnaturação. A perda de basofilia citoplasmática normalmente reflecte a libertação e difusão dos polissomas das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, sendo considerada uma outra causa da eosinofilia.

A intensidade da eosinofilia aumenta por vezes uniformemente, mas com frequência é padrão na lesão avançada. É mais distintamente visto na coloração por HE e em cortes de congelação e pode ser realçado colocando um filtro verde na luz do microscópio óptico. Padrões de hiper cromasia podem ser observados, contudo tem um valor diagnóstico limitado. As alterações precoces não são habitualmente visíveis nas primeiras 8 a 12 horas após o presumível enfarte. Foi sugerida a utilidade da fucsina ácida na demonstração do enfarte do miocárdio precoce em experiência animal e humana, mas verificou-se que é inconsistente e inconstante<sup>4,26</sup>.

A coloração Hematoxilina/fucsina básica/ ácido pícrico foi usada para a demonstração da isquémia do miocárdio precoce mesmo em amostras com algum grau de autólise, mas os resultados obtidos por esta técnica demonstraram ser contraditórios e inconstantes, portanto não possuindo valor para diagnóstico<sup>4,26</sup>.

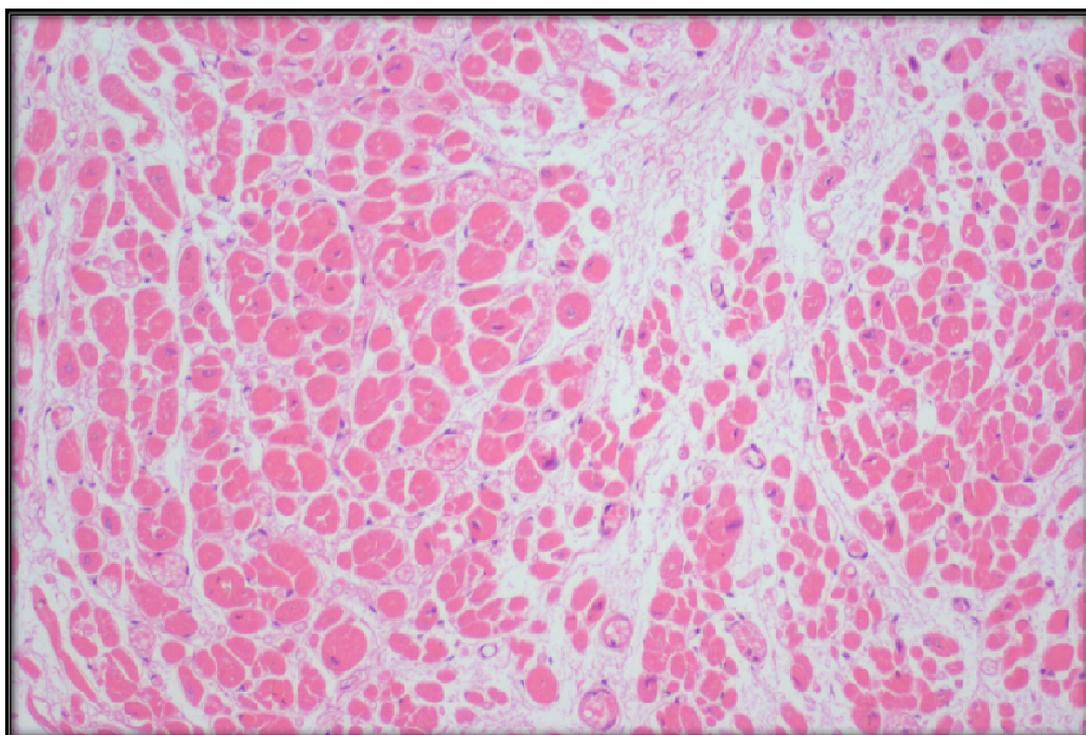


Fig.2- Enfarte agudo do miocárdio. Coloração hematoxilina – eosina

### **1.2.6 - MÉTODOS DE FLUORESCÊNCIA**

Os métodos de fluorescência têm sido aplicados para demonstrar enfartes recentes e degeneração do miocárdio em miocárdio humano e animal utilizando acridin Orange para corar amostras não fixadas seccionadas no crióstato.

A coloração acridin Orange cora secções de miocárdio intacto no crióstato mostrando uma fluorescência de cor castanho dourado, em contraste com uma coloração esverdeada com o aumento do tempo de isquémia. As áreas coradas com eosina em amostras incluídas em parafina mostram uma coloração de fluorescência verde azeitona, que muda para amarelo em tecidos lesados. A autólise post-mortem não parece ter um efeito significativo na fluorescência. A maior desvantagem dos métodos clássicos descritos é a falta de conhecimento acerca das reacções que provocam estas mudanças de coloração. Considerando as implicações legais não parece razoável a utilização de tais métodos de diagnóstico para questões forenses<sup>4,14,26</sup>.

### **1.2.7 - MÉTODOS IMUNOHISTOQUÍMICOS**

A imunohistoquímica apresenta bons resultados na Anatomia Patológica clínica e na patologia forense, tendo o crescente número de anticorpos existentes sido alvo de inúmeras publicações e de avanços no diagnóstico anatomopatológico. Também no diagnóstico do EAM recente têm sido testados vários anticorpos, tanto em amostras de origem humana como animal, marcadores de membrana como o colagénio IV e laminina, proteínas do citosqueleto celular como actina e desmina, moléculas de adesão como a vinculina, proteínas de membrana como a distrofina e muitos outros, sendo os resultados ou contraditórios ou as técnicas muito complexas de realizar<sup>13,26</sup>.

### **1.2.8 – O COMPLEMENTO DE ATAQUE DE MEMBRANA**

O primeiro indicador de lesão dos miócitos é a cariólise e o concomitante fluxo de polimorfonucleares neutrófilos à lesão. Este fenómeno começa por acontecer aproximadamente 6h após a isquémia, e é considerado diagnóstico de enfarte recente do miocárdio. Subsequentemente, a necrose de coagulação dos miócitos começa a ser evidente aumentando o número de células inflamatórias, que vai tornar o EAM evidente<sup>37</sup>.

As células inflamatórias compostas inicialmente por neutrófilos são quimicamente atraídas pelos factores C3a e C5a do complemento cascata<sup>24</sup>. À parte das propriedades vasoactivas e quimioestáticas directas destes componentes, o complemento cascata vai produzir o seu produto final, o complemento de ataque de membrana (MAC). Por se inserir no plasma das membranas das células alvo, o MAC cria poros transmembranares que vão por sua vez interferir com a homeostase das células, promovendo a lise osmótica das células afectadas. Por definição, C9/MAC – miócitos positivo são células necrosadas. Assim sendo, o complemento C9 joga com uma série de complementos de activação mediante lesão tecidular e mais especificamente lesão dos miócitos<sup>55</sup>.

Estudos recentes têm sugerido que a imunoreactividade do C9 poderia ser usada como indicador do enfarte recente do miocárdio<sup>15,17,45,48,55</sup>.

### **1.2.9 - A MIELOPEROXIDASE**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima contida nos grânulos primários (azurófilos) dos neutrófilos<sup>40</sup>. Mais de 95% da MPO está presente nos grânulos dos neutrófilos, existindo os restantes 5% nos monócitos circulantes; o gene da MPO está localizado no cromossoma 17<sup>8,63</sup>.

Esta enzima catalisa a oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e de um halogénio, constituindo a ligação peróxido de hidrogénio-halogénio-MPO um sistema altamente tóxico para os microrganismos. Os grânulos dos neutrófilos contendo MPO são libertados mediante estimulação por imunocomplexos, catecolaminas ou durante a morte

celular<sup>42</sup>. Dado corresponder a MPO circulante no plasma em grande percentagem à que provém dos neutrófilos e sendo libertada em situações de inflamação e necrose, talvez seja um marcador fiável em casos de EAM recente.

A MPO é responsável pela quase totalidade da actividade epinefrina oxidase do plasma que oxida a epinefrina a adrenocrómio<sup>38</sup>, num processo que envolve a geração de formas reactivas de oxigénio<sup>50</sup>.

A MPO encontra-se elevada nos casos de lesões coronárias que apresentaram fissura ou ruptura em pacientes com morte súbita por causas cardíacas. Várias evidências sugerem mecanismos de ligação entre a mieloperoxidase, tanto em quadros inflamatórios, como na doença cardiovascular<sup>11</sup>.

Os níveis plasmáticos de mieloperoxidase são preditores de risco de eventos cardiovasculares, existindo uma relação directa entre o aumento do nível desta enzima e seu potencial preditivo de ocorrência de EAM em fase inicial<sup>11</sup>.

A mieloperoxidase é um imunomarcador de neutrófilos e granulócitos, comum no diagnóstico anatomopatológico, importante no diagnóstico diferencial entre patologias de origem linfóide ou mielóide<sup>30</sup>.

Este anticorpo poderá ser muito importante na identificação dos neutrófilos presentes na lesão isquémica do miocárdio.

### **1.3 – ESTUDOS RECENTES**

O anticorpo primário anti human C9 tem sido utilizado em vários estudos por diversos investigadores, com os mais diversos resultados e com técnicas mais ou menos complexas. Num recente estudo, foi utilizado o imunosoro C9 em comparação com o anticorpo primário anti human CD15 que marca os leucócitos polimorfonucleares, monocitos e seus derivados<sup>6,59</sup>.

Baseado no facto de os leucócitos polimorfonucleares serem fortemente atraídos ao miocárdio enfartado durante as primeiras horas após a lesão<sup>41</sup>, as células positivas para o anticorpo primário anti human CD15 foram então contadas ao microscópio óptico por dois dos autores, em 3 campos com a objectiva de 10, incluindo as células contidas nos vasos<sup>39</sup>. Relativamente ao anticorpo primário anti human C9, os investigadores concluíram que este

apenas marcava algumas células, possivelmente aquelas onde o enfarte seria mais antigo, não retirando grandes conclusões referentes a este.

A importância da mieloperoxidase no diagnóstico do EAM tem sido descrita em contexto clínico por vários autores, concluindo que níveis iniciais elevados de MPO no plasma é factor de risco de EAM<sup>11</sup>.

A inflamação está ligada a resultados adversos nas síndromes coronarianas agudas. A mieloperoxidase é uma enzima abundante nos leucócitos, sendo elevada em lesões com ruptura nos pacientes com morte súbita cardíaca. Numerosas linhas de evidência sugerem ligações entre mieloperoxidase, inflamação e doença cardiovascular. A mieloperoxidase é um marcador que pode ser utilizado para identificar doentes com iminente risco de EAM, independentemente de evidência de necrose do miocárdio clinicamente<sup>35,38</sup>.

Assim, o anticorpo primário anti human MPO poderá ser um marcador útil no diagnóstico de EAM recente em cadáver em situações médico legalmente relevantes, nas quais a morte é aparentemente violenta, mas que correspondem de facto a morte de causa natural<sup>40,42,43</sup>.

#### **1.4– COLHEITA DAS AMOSTRAS**

Para a realização deste estudo as amostras foram colhidas em cadáveres autopsiados no Serviço de Patologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, com informação clínica de enfarte, morte súbita, morte de causa ignorada ou em casos que o patologista suspeite de EAM sem que macroscopicamente existam evidências, num intervalo de tempo até 24 horas pós-mortem. Este deve ser o intervalo de colheita uma vez que, num período de tempo mais alargado, haverá processos degradativos do tecido devido à autólise ou destruição dos antígenos necessários à marcação imunocitoquímica, devido à elevada exposição ao frio, nos casos em que os cadáveres aguardam pela autópsia conservados no frigorífico.

## **1.5 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO**

Os fragmentos de miocárdio colhidos devem ser imediatamente sujeitos a fixação, existindo vários fixadores capazes de uma preservação tecidular conveniente, onde se incluem os fixadores formaldeídicos, sendo o formaldeído tamponado a 10% considerado por vários autores como o fixador óptimo e o utilizado no nosso laboratório. Após a fixação, os tecidos serão sujeitos ao processamento histológico habitual para inclusão em parafina e cortados em secções finas para posterior coloração de rotina HE e marcação imunohistoquímica<sup>4</sup>.

### **1.5.1 – TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA**

Os fragmentos são seccionados no micrótomo em cortes histológicos de 3 micra. A marcação dos miócitos lisados é realizada com uma técnica imunohistoquímica utilizando o anticorpo primário anti human C9. Para a marcação dos polimorfonucleares neutrófilos é utilizado o anticorpo primário anti human MPO, sendo utilizado o método de amplificação de sinal baseado na peroxidase. A revelação em microscopia óptica é conseguida com 3,3 diaminobenzidina tetrahydrocloro (DAB)<sup>4,13</sup>.

## 1.6 – OBJECTIVO DO TRABALHO

Este trabalho tem como objectivo geral:

- Optimizar uma técnica de imunohistoquímica para o diagnóstico de EAM recente (menos de 6 horas de evolução)

Como objectivos específicos:

- Determinar as alterações imunohistoquímicas do EAM recente em amostras colhidas em cadáveres;
- Elaborar um protocolo de uma técnica de imunohistoquímica, não só sensível para a observação de lesões recentes do miocárdio, como também em tecidos moderadamente autolisados.

Esta nova técnica tem um notável interesse no diagnóstico do EAM considerado recente, no âmbito da Medicina Legal.

Deste modo pretende-se correlacionar os resultados obtidos com os de outros investigadores de modo a comparar diversas metodologias e comprovar a validade da técnica elegida.

A utilização da Mieloperoxidase como método de diagnóstico de EAM recentes em secções histológicas ainda não está descrita na literatura.

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGIA**

#### **2.1 - TIPO DE ESTUDO**

Trata-se de um estudo experimental descritivo, longitudinal onde foram analisadas 50 amostras de miocárdio proveniente de cadáveres autopsiados no Serviço de Patologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal. Foram seleccionados os casos com informação de morte por enfarte do miocárdio, morte súbita natural, morte de causa ignorada ou mesmo em casos que o patologista suspeite de EAM, com o objectivo da amostragem conter maioritariamente casos positivos de enfarte.

#### **2.2 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS**

Após a colheita, os fragmentos colhidos foram imediatamente fixados em formol tamponado a 10% e acondicionados num recipiente de tamanho apropriado às suas dimensões. À entrada no laboratório foram processados em concentrações crescentes de álcool, diafenizados em xilol e embebidos em parafina. Seguidamente, foram incluídos em parafina e cortados no micrótomo de correição Microm em secções finas de 3 micras. Finalmente foi feita uma lâmina de coloração de rotina HE de cada amostra.

#### **2.3 – A TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA**

Para o estudo imunohistoquímico foram obtidas secções finas com aproximadamente 3 micra dos fragmentos processados.

Foram utilizados os anticorpos primários anti humano C9 da Santa Cruz Biotechnology (complemento C9) e anti humano MPO Dako (mieloperoxidase). Como técnica de detecção/amplificação foi usado o sistema Dako REAL™ EnVision™ Peroxidase/DAB, coelho/rato. A revelação foi feita aplicando às secções o cromogéneo DAB da Dako (3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloro).

### **2.3.1 - Protocolo de imunohistoquímica para C9 (X197)**

1. Cortar secções histológicas das amostras de miocárdio (50 lâminas) a 3 micras e colocar as secções histológicas em lâminas adesivadas Menzel® – Glasser®, superfrost® plus;
2. Promover a adesão das secções histológicas às lâminas, na estufa (Memmert) 65°- 30 min;
3. Desparafinar com xilol VWR™ Prolabo e hidratar com álcool a 99° AGA (1min), 96° Proclinica (1min) e 70° Proclinica (1min);
4. Lavar em água destilada - 2min
5. Inibir a peroxidase endógena com peróxido de hidrogénio Merck® a 3% - 10 min.
6. Lavar em água corrente -2min. Passar por água destilada
7. Realizar a recuperação antigénica por alta temperatura com tampão Tris EDTA pH 9.0 Labvision em panela de pressão Hawkins –120s;
8. Promover o arrefecimento no tampão de recuperação- 10min.
9. Lavar em água corrente- 5min
10. Lavar em PBS/Tween 20 Dako -5min
11. Incubar com Anticorpo 1° mouse monoclonal antibody anti human C9 (X197) , Santa Cruz Biotechnology,INC; diluição 1:10- 60 min
12. Lavar em PBS/Tween 20 Dako – 2X 5min.
13. Incubar à temperatura ambiente com Dako REAL™ EnVisioN™ /HRP (ENV), Rabbit/Mouse do KIT Dako REAL™ EnVisioN™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse – 3 gotas, (35 min)
14. Lavar em PBS/Tween 20 -2x5 min
15. Revelar com Dako REAL™ DAB+ Chromogen e Dako REAL™ Substrate Buffer do KIT Dako REAL™ EnVisioN™ Detection System, Peroxidase/DAB+,Rabbit/Mouse- 2x 5min
16. Lavar em água da torneira
17. Contrastar com Hematoxilina de Harris Merck® -5 s
18. Azular em água corrente morna – 5 min
19. Lavar em água destilada
20. Desidratar com álcool 70° Proclinica, 96° Proclinica, 2x 99° AGA (1min) e montar com entellan Microm®.

### **2.3.2 - Protocolo de imunohistoquímica para Mieloperoxidase**

1. Cortar secções histológicas das amostras de miocárdio (50 lâminas) a 3 micras e colocar as secções histológicas em lâminas adesivadas Menzel® – Glasser®, superfrost® plus;
2. Promover a adesão das secções histológicas às lâminas, na estufa (Memmert) 65°- 30 min;
3. Desparafinar com xilol VWR™ Prolabo e hidratar com álcool a 99° AGA (1min), 96° Proclinica (1min) e 70° Proclinica (1min);
4. Lavar em água destilada- 2min
5. Inibir a peroxidase endógena com peróxido de hidrogénio a 3% Merck® - 10 min.
6. Lavar em água corrente -2min. Passar por água destilada
7. Lavar em PBS/Tween 20 Dako -5min
8. Incubar com Anticorpo 1º Monoclonal Mouse anti-human Myeloperoxidase clone MPO – 7 da Dako; com a diluição de 1:6000 - 30 min
9. Lavar em PBS/Tween 20 Dako – 2X 5min.
10. Incubar à temperatura ambiente com Dako REAL™ EnVisioN™ /HRP (ENV), Rabbit/Mouse do KIT Dako REAL™ EnVisioN™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse– 3 gotas, (35 min)
11. Lavar em PBS/Tween 20 -2x5 min
12. Revelar com Dako REAL™ DAB+ Chromogen e Dako REAL™ Substrate Buffer do KIT Dako REAL™ EnVisioN™ Detection System, Peroxidase/DAB+,Rabbit/Mouse- 2x 5min
13. Lavar em água da torneira
14. Contrastar com Hematoxilina de Harris Merck -5 s
15. Azular em água corrente morna – 5 min
16. Lavar em água destilada
17. Desidratar com álcool 70°Proclinica (1min), 96° proclinica (1min), 2x 99° AGA (1min) e montar com entellan Microm.

## 2.4 – MÉTODO DE CLASSIFICAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO

As células com marcação Imunohistoquímica com o anticorpo primário anti humano C9 foram avaliadas por 2 observadores no microscópio óptico com a objectiva de 10x (sendo um deles um patologista experiente em patologia cardíaca) e classificadas em 3 scores<sup>45,48,62</sup>:

0 – Nenhuma célula marcada de forma específica com o soro anti humano C9.

+1 – Uma célula isolada marcada com o soro anti humano C9.

+2 – Várias células marcadas ou pequenos grupos de células marcadas com o soro anti humano C9.

+3 – Muitos e grandes grupos de células marcadas com o soro anti humano C9.

Tendo como base que os polimorfonucleares neutrófilos são atraídos para as zonas de enfarte do miocárdio durante as primeiras horas, propõe-se verificar através da contagem do número de células com marcação com o soro anti humano MPO, a existência de enfartes recentes e estimar a sua idade relativa<sup>39</sup>.

As lâminas marcadas com o anticorpo anti humano MPO foram contadas manualmente pelos mesmos 2 observadores no microscópio óptico com a objectiva de 10x. As células positivas para MPO que se encontravam dentro dos pequenos vasos foram incluídas, células positivas para MPO que se encontram em “lagos” venosos ficaram excluídas. Foi feita a média entre as duas contagens em cada amostra. A contagem das células foi realizada em zonas de maior celularidade positiva especificamente para o anticorpo anti humano MPO em 3 campos e classificadas nos seguintes intervalos<sup>39</sup>.

0 – [0 ≤ MPO ≤ 20] - Casos sem enfarte (poucas células MPO positivas)

+1 – [21 ≤ MPO ≤ 40] - Casos com enfarte recente (menos de 1 hora até 6 horas)

+2 – [MPO ≥ 41] - Casos com enfarte menos recente (de 6 a 12 horas)

Os dados recolhidos das observações realizadas serão descritos nas seguintes tabelas (Tabelas 1 e 2).

Lâminas	C9			
	0	+1	+2	+3
1 2 (...)				

**Tabela 1** – Grelha de avaliação anticorpo primário C9

Lâminas	MPO		
	0 [0 ≤ MPO ≤ 20]	+1 [21 ≤ MPO ≤ 40]	+2 [MPO ≥ 41]
1 2 (...)			

**Tabela 2** – Grelha de avaliação anticorpo primário MPO

Todas as lâminas foram observadas pelos mesmos 2 observadores para os 2 anticorpos primários em estudo (anti humano C9 e anti humano MPO), sendo considerada a qualidade da imunomarcacão para assim se aferir a melhor técnica (sensibilidade do anticorpo, intensidade de marcação) e contabilizadas apenas as células marcadas de forma específica. O anticorpo anti humano C9 possui uma marcação citoplasmática em miócitos isquémicos<sup>48</sup> e o anticorpo anti humano MPO uma marcação de membrana dos polimorfonucleares neutrófilos<sup>6</sup>. A marcação inespecífica é um factor de má qualidade da técnica, que deve ser mínima para uma imunomarcacão com qualidade e rigor<sup>4,13</sup>.

Durante toda a experiência foram utilizados controlos positivos e negativos, ou seja, miocárdio não necrosado (controlo negativo) e miocárdio francamente necrosado (controlo positivo).

As lâminas foram posteriormente fotografadas com auxílio do microscópio óptico Olympus com câmara fotográfica acoplada Progres C3 da Jenoptik Germany.

Os resultados foram processados como auxílio do programa informático Tecplot.

## **2.5 - ÉTICA**

Foram salvaguardadas todas as questões éticas e legais na elaboração deste trabalho, tendo o mesmo sido, em fase de projecto, aprovado pelo Concelho de Ética da Faculdade de Medicina de Coimbra.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

Para facilidade da discussão, os resultados serão apresentados ponto a ponto iniciando-se com a descrição dos resultados da técnica histológica, seguida dos resultados da marcação imunohistoquímica com as respectivas fotografias, gráficos e da avaliação das tabelas dos dois anticorpos.

#### 3.1 – A TÉCNICA HISTOLÓGICA

Aplicando a técnica histológica descrita na metodologia, verifica-se que foi possível a preservação das amostras de modo adequado possibilitando a marcação imunohistoquímica.

Analisando as imagens dos cortes histológicos, pode-se observar uma boa preservação do miocárdio e uma boa marcação imunohistoquímica, sem artefactos (Figura 3).

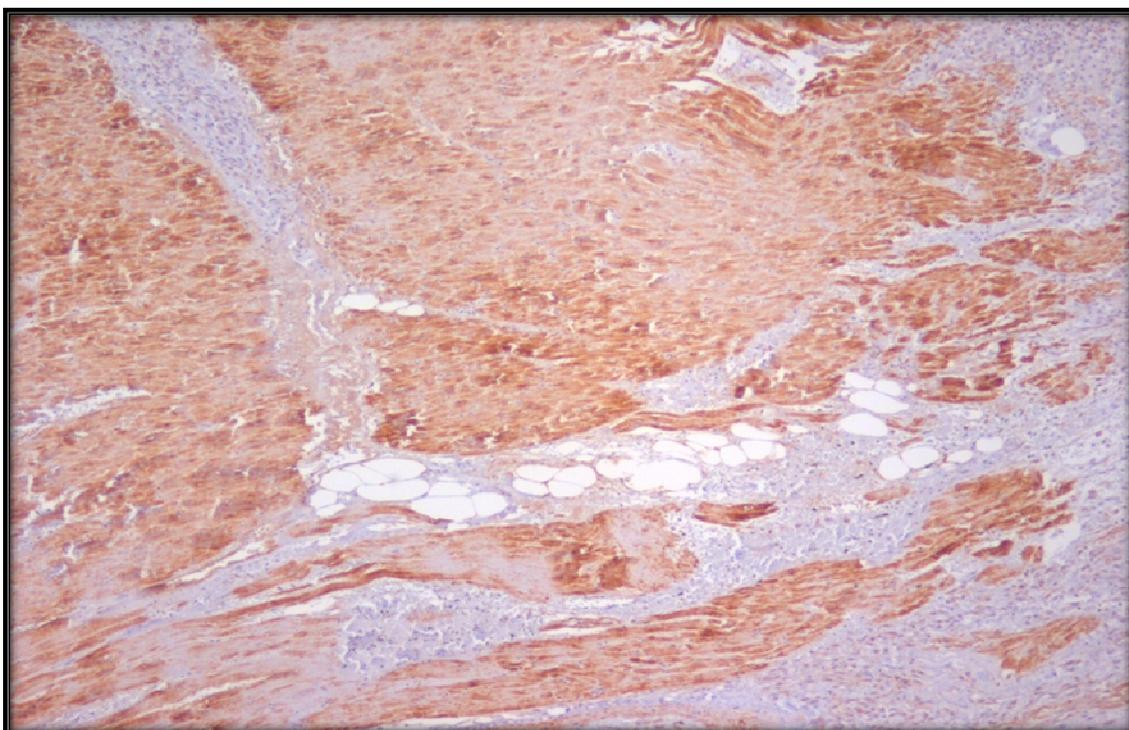


Fig.3 – miócitos necrosados com marcação com o anticorpo anti human C9 controlo positivo para o anticorpo C9, 50x.

### 3.2 - A MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

A marcação imunohistoquímica com o anticorpo primário anti humano C9 foi satisfatória e embora sendo difícil de aferir a técnica, conseguiu-se visualizar os miócitos necrosados tal como consta da literatura<sup>45,48,62</sup>. Como controlo interno positivo foram observadas artérias cuja camada subendotelial estava arterosclerosada. A deposição vascular parece estar relacionada com a idade do indivíduo e com o grau de arterosclerose<sup>62</sup>.

Nas imagens seguintes, podem-se observar as diferentes classificações utilizadas: 0 (Figura 4), +1 (Figura 5), +2 (Figura 6) e +3 (Figura 7)

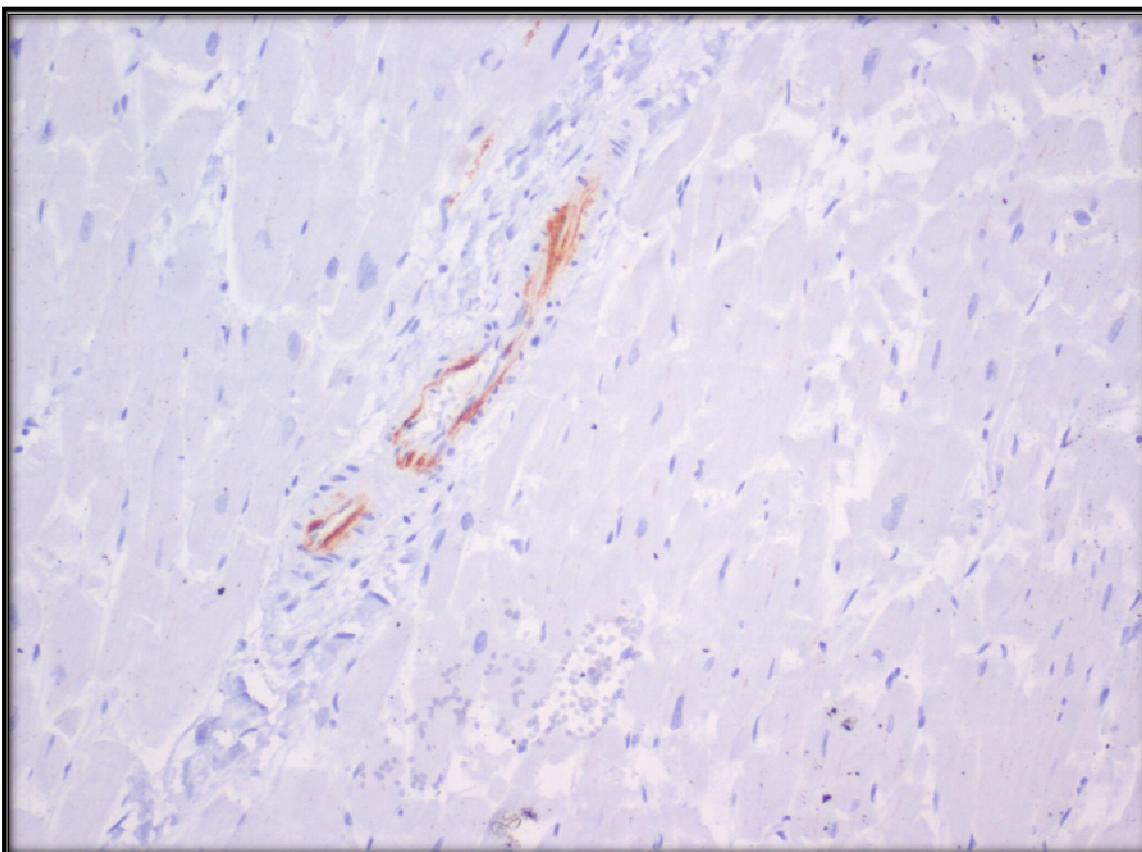
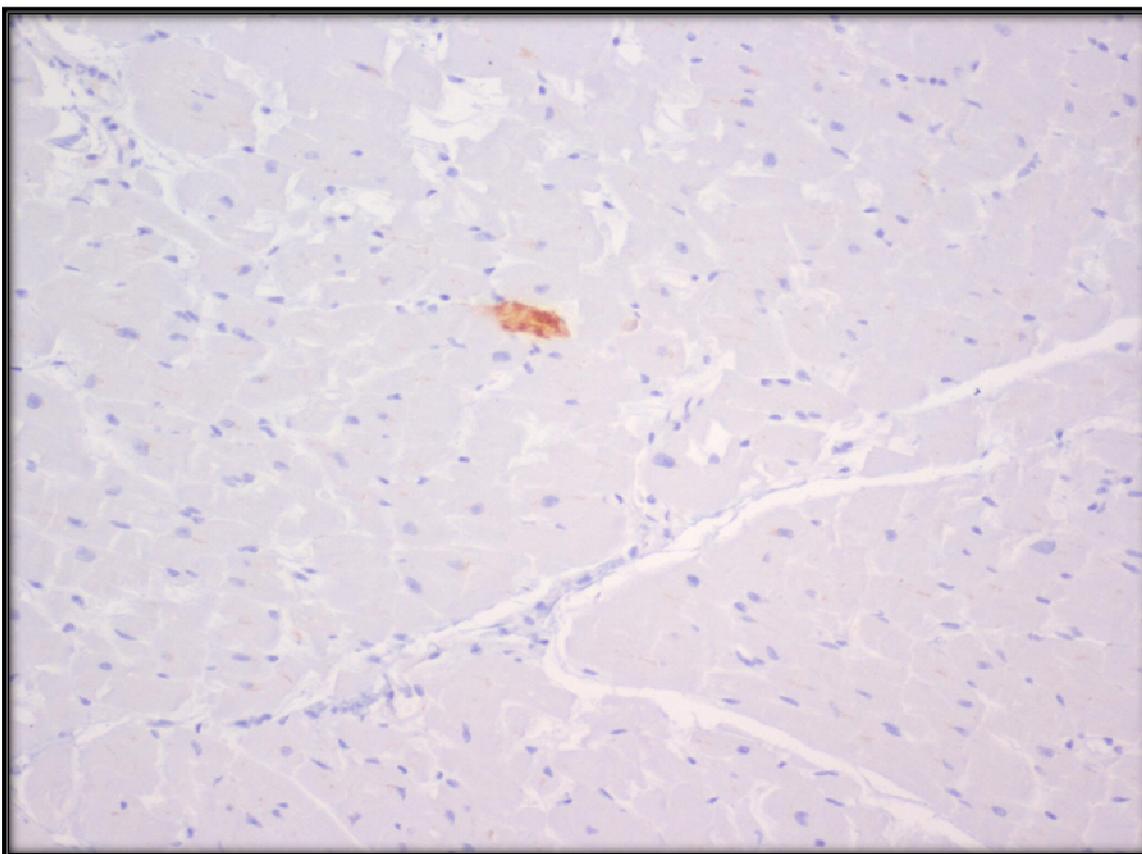
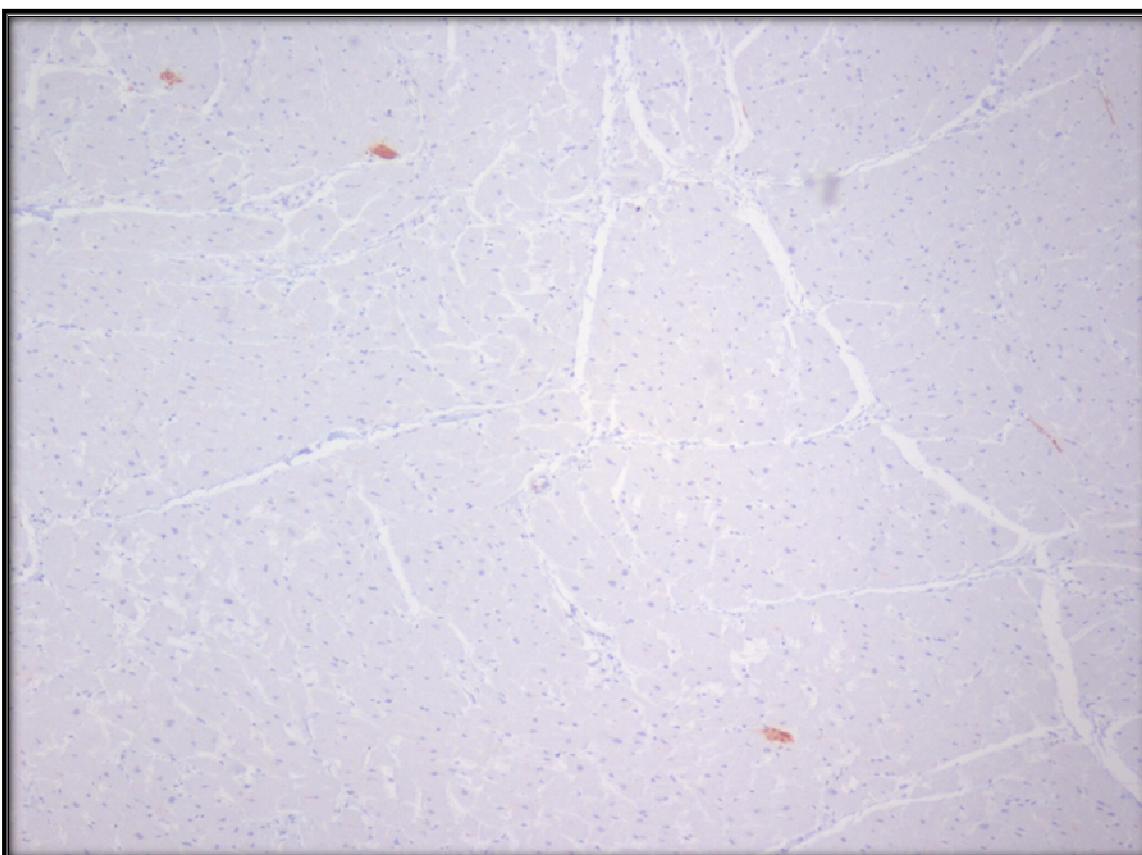


Fig.4 - 0 - C9 controlo interno vasos marcados, nenhuma célula marcada positivamente com o anticorpo C9, 400x



**Fig. 5** - Uma única célula C9 positiva - +1, 400x



**Fig.6** - várias células C9 positivas - +2, 50x

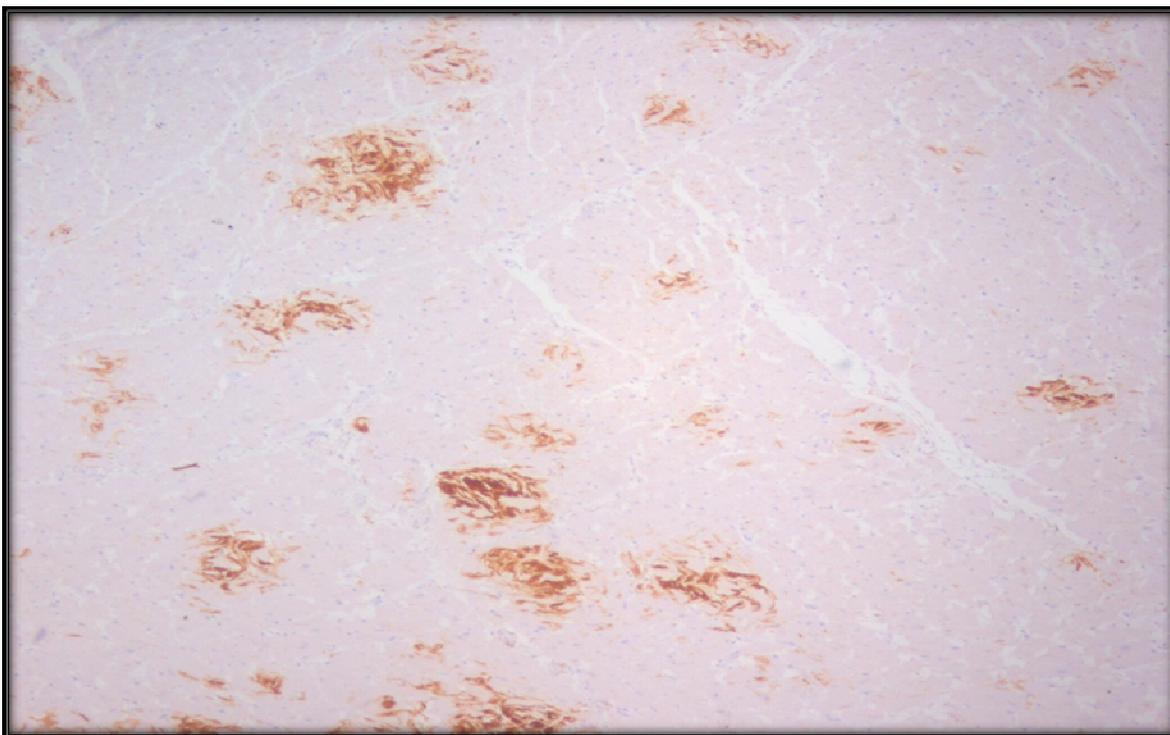


Fig.7 - Vários grupos de células C9 positivas - +3, 50x

A marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti humano MPO foi satisfatória, sendo possível a visualização das estruturas identificadas na literatura. Visualizaram-se correctamente os polimorfonucleares neutrófilos e foi possível a sua contagem (Figura 8).

Nas imagens seguintes, podem-se observar as diferentes classificações utilizadas: 0 (Figura 9), +1 (Figura 10) e +2 (Figura 11)

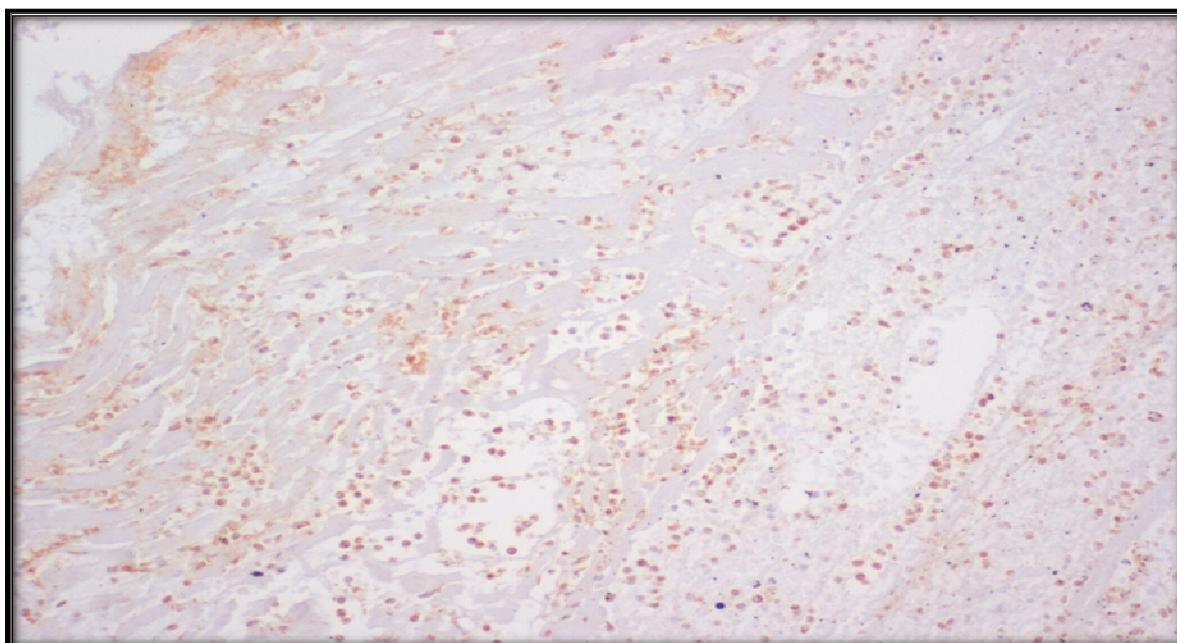
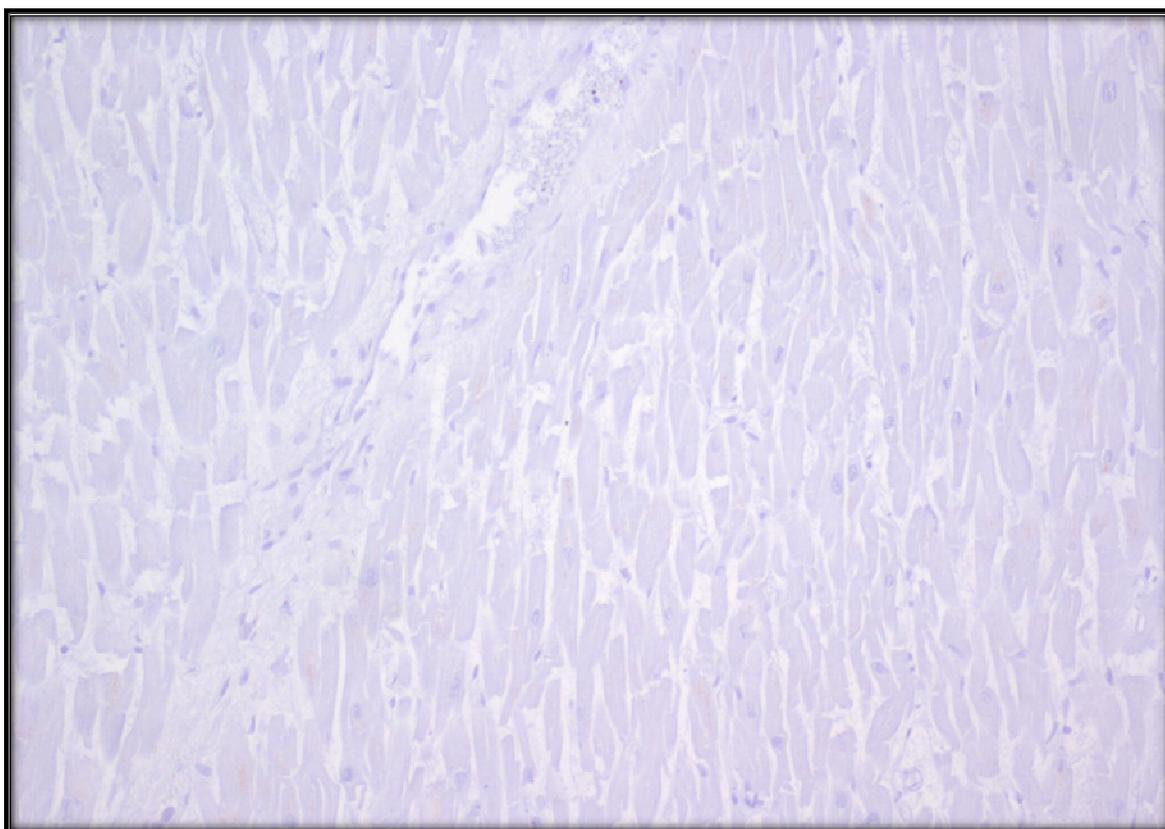
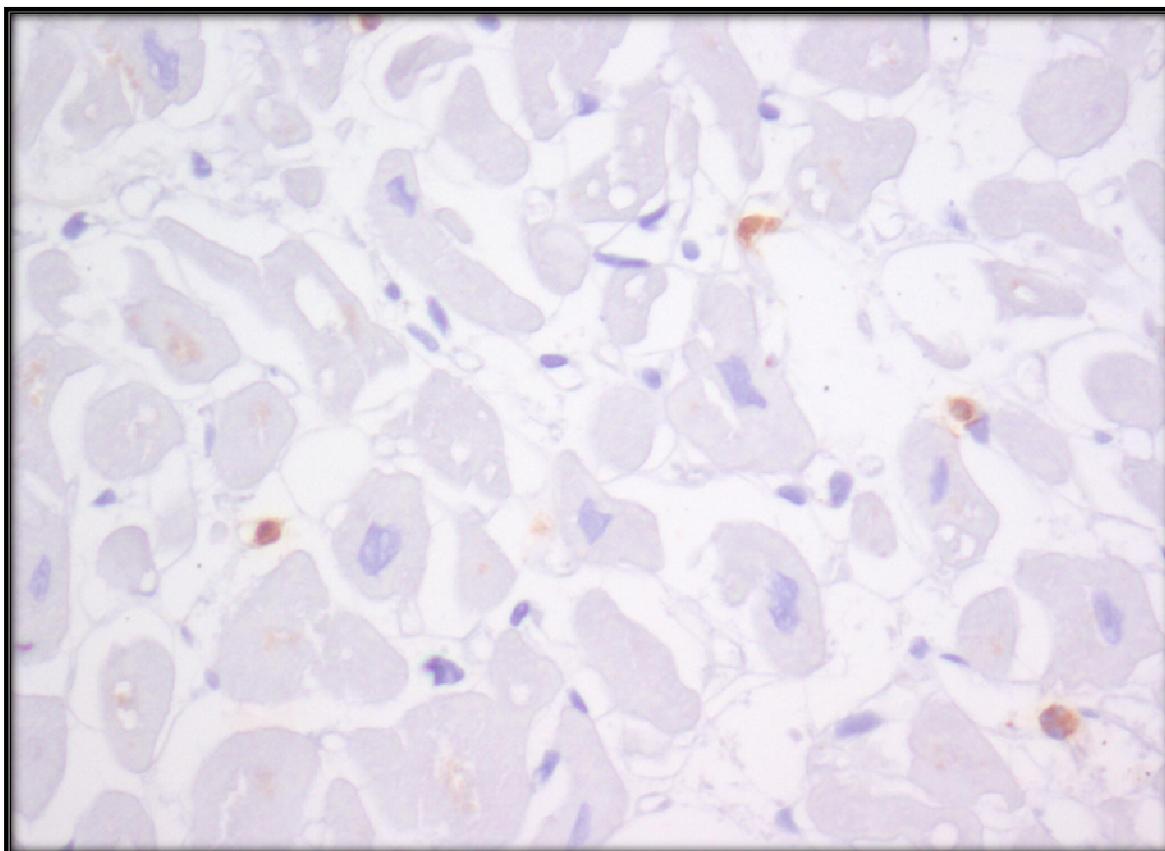


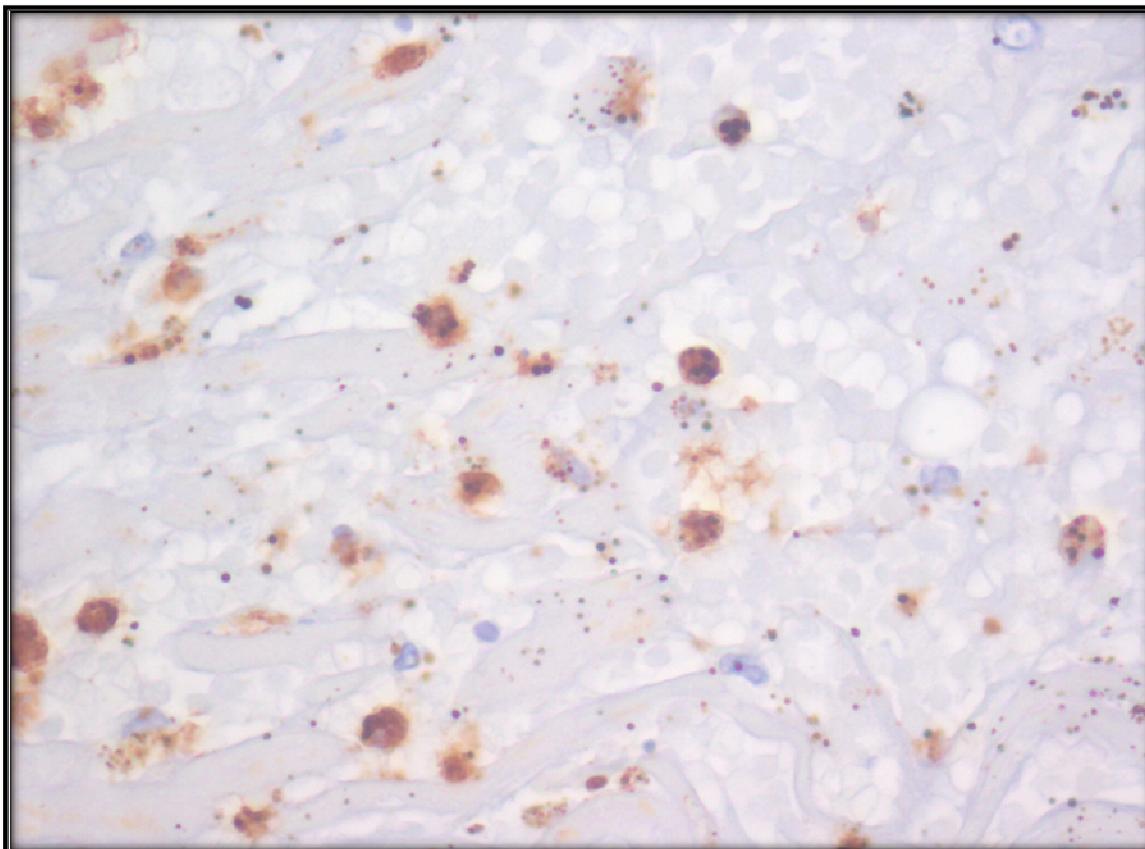
Fig.8 - Neutrófilos marcados positivamente com o soro MPO, 50x



**Fig.9** - Sem enfarte - 0 (nenhuma célula MPO positiva), 50x



**Fig.10** - Enfarte recente - +1 (menos de 1 hora até 6 horas) vários neutrófilos marcados positivamente com o anticorpo anti humano MPO, 400x.



**Fig.11** - Enfarte mais antigo +2 (de 6 a 12 horas) muitas células marcadas positivamente para o anticorpo anti humano MPO, 400x.

### **3.3 - AVALIAÇÃO DAS LÂMINAS**

Foi efectuada a avaliação das lâminas nos cortes histológicos. Para cada anticorpo foi elaborada uma tabela e preenchida segundo os critérios pré estabelecidos na metodologia pelos 2 observadores. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 3 e 4.

Lâminas	Anticorpo primário C9			
	0	+1	+2	+3
1	A		B	
2		A	B	
3			A B	
4			A B	
5	A	B		
6	A		B	
7	A B			
8	A B			
9	A B			
10	A B			
11	A B			
12	B	A		
13	B	A		
14			B	A
15			AB	
16		A B		
17	A B			
18		A	B	
19	A B			
20		B	A	
21	A		B	
22	A B			
23	A B			
24	A		B	
25	A	B		
26	A		B	
27			B	A
28	A B			
29			A B	
30				A B
31	B		A	
32	A B			
33	A B			
34		A B		
35	A B			
36				A B
37	A B			
38	A B			
39	A B			
40	A B			
41	A B			
42	A B			
43	A	B		
44	A B			
45	A B			
46				A B
47	A		B	
48			A B	
49				A B
50	A B			

A- Observador 1  
B- Observador 2

**Tabela 3** - tabela de avaliação do anticorpo primário C9

Lâminas	Anticorpo primário MPO		
	0 0-21	+1 21-40	+2 +41
1			A B
2	A B		
3	A B		
4		A	B
5	B	A	
6	A B		
7	A	B	
8			A B
9	A	B	
10	A B		
11	A	B	
12			A B
13		A B	
14	A B		
15		A B	
16			A B
17			A B
18	A	B	
19	A B		
20	A B		
21	A B		
22	A		B
23			A B
24		B	A
25		A B	
26		A B	
27			A B
28	A B		
29		A	B
30			A B
31		A B	
32			A B
33		A	B
34	A	B	
35			A B
36			A B
37			A B
38			A B
39	A	B	
40	A	B	
41	A B		
42			A B
43			A B
44			A B
45		A B	
46	A B		
47			A B
48		A B	
39			A B
50	A B		

A- Observador 1  
B- Observador 2

Tabela 4 – Tabela de avaliação do anticorpo primário MPO

Pela observação das Tabelas 3 e 4 é possível verificar que para o anticorpo primário C9 os dois observadores não estiveram de acordo na sua avaliação em 36% da amostra (n=18) – Gráfico 1.

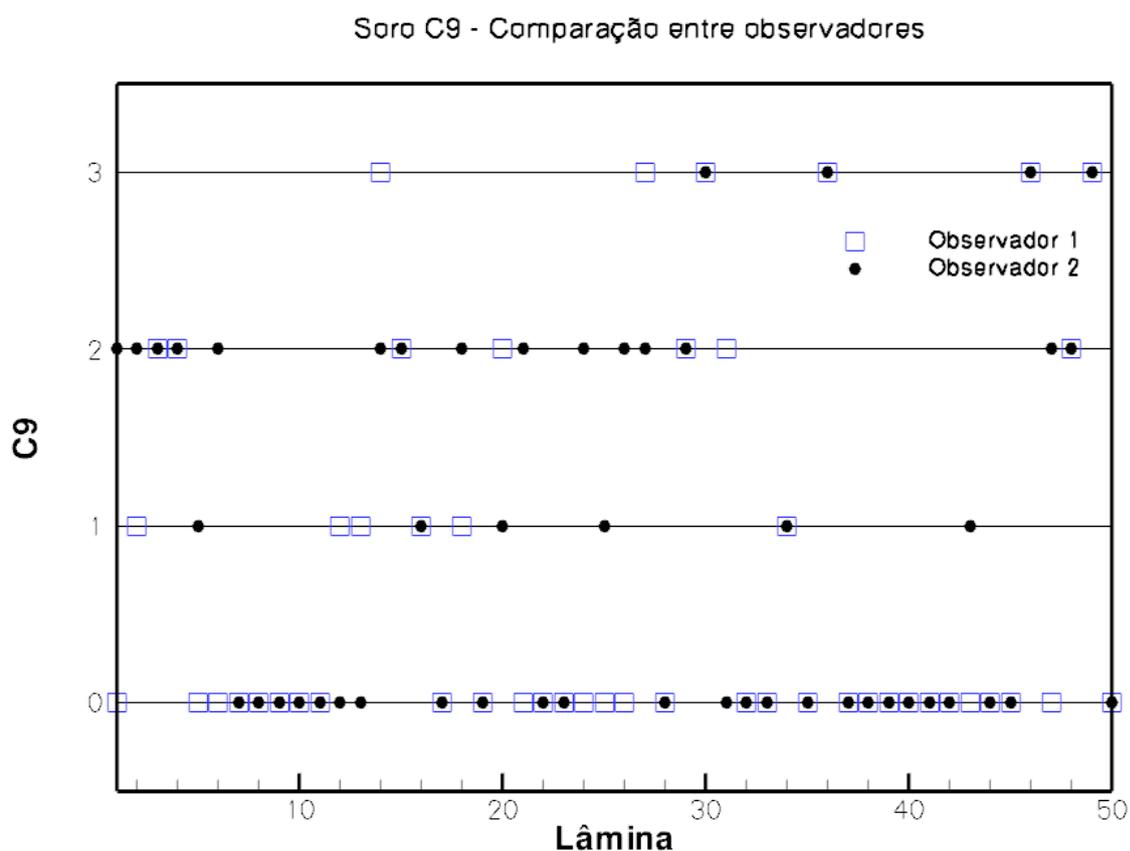


Gráfico 1 – Comparação entre observadores para o anticorpo primário C9

Nas lâminas em que a avaliação dos dois observadores divergiu, foi efectuada uma reavaliação. A avaliação final da amostra encontra-se representada no Gráfico 2.

Soro C9 - Classificação final

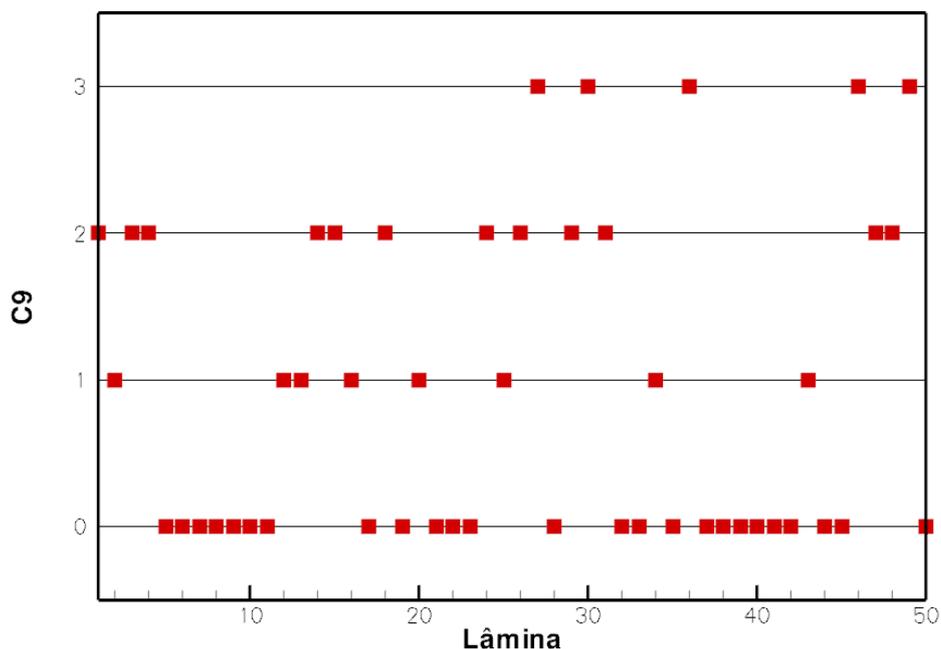


Gráfico 2 – Classificação final das lâminas para o anticorpo primário C9

Para o anticorpo primário MPO os dois observadores não estiveram de acordo nas suas avaliações em 24% da amostra (n=12) – Gráfico 3.

Soro MPO - Comparação entre observadores

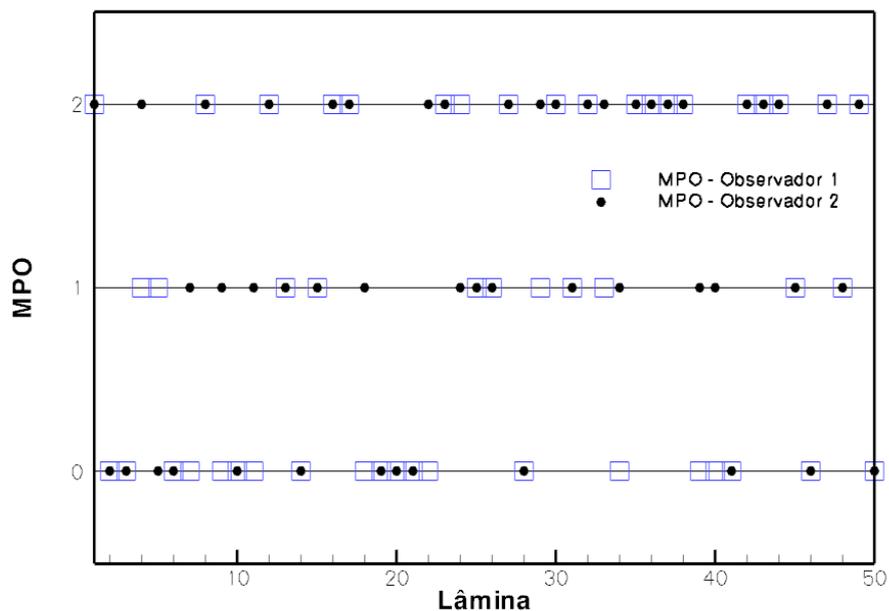


Gráfico 3 – Comparação entre observadores para o anticorpo primário MPO

Para o anticorpo primário MPO, nas lâminas onde a avaliação divergiu foi efectuada recontagem e calculada uma média entre as contagens dos 2 observadores. A avaliação final da amostra está representada no Gráfico 4

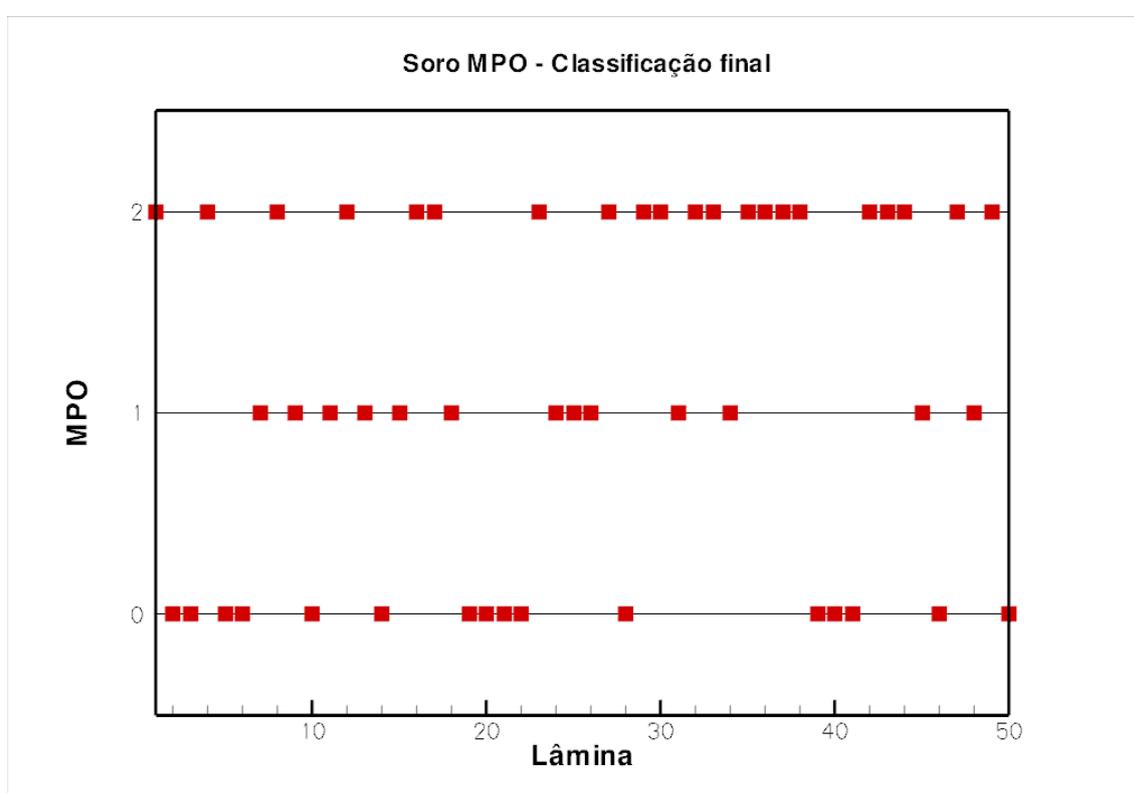


Gráfico 4 – Classificação final das lâminas para o anticorpo primário MPO

Foi efectuada a comparação de sensibilidade das duas técnicas, que se encontra representada no Gráfico 5

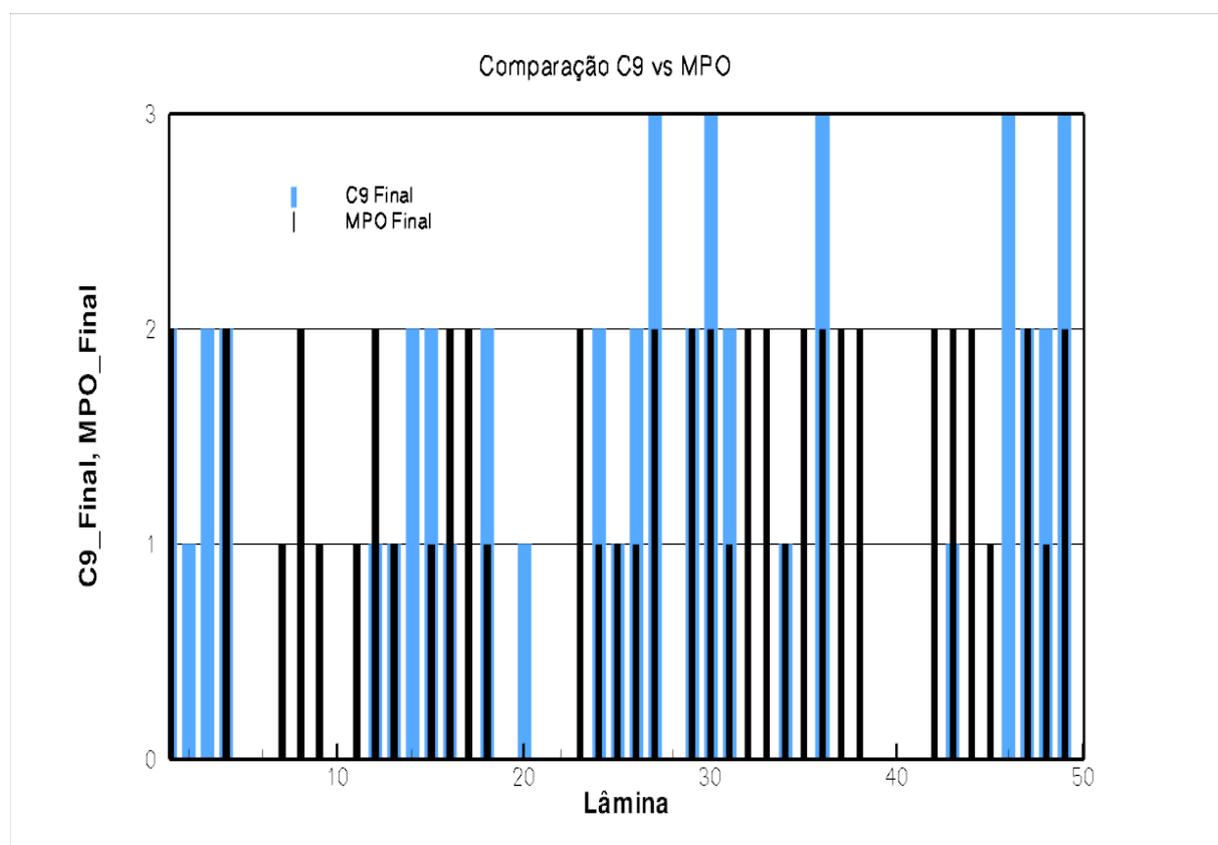


Gráfico 5 – Comparação das duas técnicas C9 e MPO

Pela observação dos Gráficos 2, 4 e 5 é possível verificar que as duas técnicas variam mais significativamente em 40 % da amostra (n=20) e concordam totalmente também em 40%, sendo que em 20% as técnicas estão de acordo parcialmente, ou seja, ambas identificam um enfarte mas classificam-no em grupos diferentes.

È também evidente no Gráfico 5 que o anticorpo primário C9 identificou como enfarte 25 casos que correspondem a 50% da amostra e o anticorpo primário MPO identificou 34, correspondendo a 68% da amostra.

## **CAPÍTULO IV**

### **DISCUSSÃO**

#### **4.1 – TÉCNICA HISTOLÓGICA**

Após avaliação dos cortes histológicos podemos verificar que, para ambos os anticorpos, foi possível a marcação imunohistoquímica, assim como a visualização das estruturas pretendidas sem presença de artefactos.

As amostras utilizadas neste procedimento experimental são provenientes de autópsias, sendo por essa razão mais difíceis de manipular. Na maioria das situações, os fragmentos já se encontravam com um elevado grau de autólise, o que dificultou o processamento. Assim, é possível que possa vir afectar uma correcta recuperação antigénica e introduzir um enviesamento dos resultados, uma vez que esta etapa é uma etapa crucial na técnica imunohistoquímica. Uma falha neste procedimento pode acarretar uma total ausência de marcação ou presença de fundo e artefactos da reacção. No entanto, foi possível ultrapassar estas dificuldades de modo a que a recuperação antigénica não viesse a afectar os resultados.

As secções histológicas retiradas de fragmentos de autópsia, mal preservados, soltam-se mais facilmente das lâminas, pelo que deverão ser sempre colocadas em lâminas adesivadas.

Todas as soluções utilizadas na execução das duas técnicas devem obedecer a concentrações rigorosas e protocoladas de forma criteriosa, de modo a maximizar a reprodutibilidade da técnica.

Todos os procedimentos protocolares destas técnicas são consequência do tipo de material em manipulação.

## **4.2 - MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA - ANTICORPO PRIMÁRIO C9**

O C9 (X197) é um anticorpo primário monoclonal de ratinho. Os anticorpos monoclonais são produzidos a partir de um único linfócito B que é clonado produzindo assim sempre o mesmo tipo de anticorpo. Ao contrário dos anticorpos policlonais que possuem diferentes especificidades e diferentes clones de anticorpos, os anticorpos monoclonais apresentam como vantagens a sua alta especificidade, afinidade, homogeneidade, facilidade de caracterização e sobretudo apresentam uma reduzida variabilidade de lote para lote, permitindo assim uma melhor qualidade da técnica. Na bibliografia consultada foram utilizados, para a mesma experiência, clones do anticorpo primário C9 policlonais de cabra, mas pelas razões acima apresentadas foi decidido usar nesta investigação um anticorpo monoclonal de ratinho.

Este protocolo foi elaborado de forma a obter os melhores resultados, feito de inúmeras experiências, fazendo variar diluições, tempos de incubação, recuperações antigénicas e soluções tampão, pelo que para obter os resultados apresentados foi necessário despende de mais de 3 meses para aferir a técnica. Este processo foi no entanto extremamente difícil, pois existem poucas referências sobre o anticorpo, a sua diluição, recuperação antigénica ou controlo positivo.

O anticorpo primário C9 ao longo da experiência demonstrou ser muito sensível a variações de temperatura ambiente. Como o laboratório onde foi realizada a imunomarcagem não apresenta climatização e como a experiência foi realizada tanto em períodos de verão como de inverno, esta acabou por ser influenciada provavelmente por este factor, tendo-se verificado alguns falsos negativos.

O anticorpo primário C9 é um anticorpo ainda pouco estudado e necessita de ser testado num maior número de amostras e em condições controladas. Concluimos portanto que é uma técnica com resultados contraditórios, pouco sensível, de difícil interpretação e classificação da imunomarcagem. Como se pode verificar, em muitos casos não houve concordância entre os dois observadores, devido à presença de marcação inespecífica pelo que não recomendamos que esta técnica seja utilizada como auxiliar no diagnóstico de

EAM em fragmentos retirados de autópsias médico legais, como foi objecto desta investigação.

#### **4.3 - MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA - ANTICORPO PRIMÁRIO MPO**

A marcação imunohistoquímica para o anticorpo primário MPO foi adequada.

A técnica protocolada foi fácil e rápida de executar, o anticorpo demonstrou ser sensível para diagnosticar este tipo de patologia, proporcionando uma correcta visualização dos polimorfonucleares neutrófilos em todos os casos que macroscopicamente se diagnosticou EAM, em alguns casos (n=13) onde se tinham suspeitas de EAM sem confirmação macroscópica ou por métodos de rotina e ainda em alguns casos de causa de morte ignorada.

Foi possível a sua contagem, apesar de nem sempre os dois observadores se encontrarem de acordo (em 12 casos), problema que foi contornado pelo facto de ter sido realizada de uma média das duas contagens. É importante salientar que as células marcadas especificamente com este anticorpo foram contadas uma a uma. Posto isto, foi possível classificar com sucesso a amostra nos intervalos propostos (Tabela 2), contagem esta que divergiu pela diferença de experiência dos dois observadores; recordemos que um dos observadores é um médico Patologista experiente em patologia cardíaca.

Este anticorpo poderá ser de grande utilidade no auxílio do diagnóstico do EAM recente, uma vez que os polimorfonucleares neutrófilos são detectados em número considerado significativo em menos de uma hora pós o estabelecimento da lesão isquémica, o que vai de encontro ao descrito por vários autores<sup>11,12,34,38,41</sup>, apesar de a amostra testada ser muito pequena (n=50).

Este anticorpo é utilizado na rotina hospitalar, estando por isso disponível em várias casas comerciais da área, sendo portanto de fácil acesso e de baixo custo. A técnica tem uma elevada reprodutibilidade e os resultados são fáceis de interpretar.

#### 4.4 – CLASSIFICAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO - C9 vs MPO

O anticorpo Primário C9 é classificado em 4 categorias segundo a maior parte da bibliografia consultada<sup>15,45,62</sup> (**0**, **+1**, **+2** e **+3**), sendo que o **0** é considerado um resultado negativo e **+3** descrito como positivo para vastas áreas de necrose isquêmica. Alguns autores<sup>15,45,62</sup> consideram que com a classificação **+1** já existe necrose isquêmica apesar de apenas uma única célula se encontrar marcada positivamente. Consideramos após a visualização das lâminas e das dificuldades sentidas em as classificar que se deveria considerar a classificação **0** e **+1** como resultado negativo, uma vez que uma única célula marcada positivamente será insuficiente para um diagnóstico de enfarte. Também as categorias **+2** e **+3** sugerimos que sejam avaliadas como uma só, tendo em consideração que ambas se referem a grupos de células marcadas especificamente com o anticorpo C9 diagnosticando zonas de enfarte.

Posto isto, este anticorpo apenas poderá dar indicação de presença ou não de necrose isquêmica no miocárdio e não serve como auxiliar na determinação da idade do enfarte, não apresentando por isso, na nossa opinião, aplicabilidade forense.

Sugerimos que a técnica protocolada seja repetida num maior número de casos com diagnóstico conhecido (com e sem EAM), utilizando a classificação proposta, ou seja, **0** para um resultado negativo, nenhuma célula marcada especificamente e **+** em casos positivos para necrose isquêmica que corresponde a vastas áreas marcadas especificamente como anticorpo primário C9, sendo portanto a classificação proposta constituída apenas por duas categorias.

Relativamente ao anticorpo primário MPO, a classificação proposta foi de 3 categorias tendo em consideração 3 intervalos referentes ao número de células positivas presentes em 3 campos de observação de 10x. Esta classificação foi proposta tendo em consideração o descrito na bibliografia<sup>39</sup> para um estudo semelhante, com um anticorpo com especificidades semelhantes.

Por analogia ao anticorpo primário C9, os intervalos foram classificados em **0**, **+1** e **+2**, categorias estas que permitem verificar o número de células marcadas positivamente para este anticorpo e classificar a imunomarcção com uma cronologia permitindo datar o enfarte como foi proposto.

Após a visualização de todas as lâminas da amostra e posterior tratamento de dados, consideramos a classificação que propomos adequada à técnica executada e com resultados fiáveis.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSÃO**

1. Pode-se concluir que os objectivos propostos para este trabalho foram alcançados.
2. A técnica eleita (anticorpo primário MPO) irá estar disponível em breve no laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal (Delegação do Centro), para utilização como método complementar no diagnóstico do EAM recente.
3. É uma técnica reproduzível e os resultados vão de encontro ao descrito empiricamente na literatura.
4. A utilização do anticorpo primário C9 para o diagnóstico de EAM recente é matéria que carece de uma maior investigação, sendo pertinente a sua aplicação em casos de arquivo com diagnóstico confirmado de EAM, de modo a retirar mais algumas conclusões sobre a sua utilidade.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Alpert JS, Thygesen K, White HD, et al. *Task force for the redefinition of myocardial infarction: Universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J. 2007; 28: 2525-2538; circulation, 2007; 116: 2634-2653; J Am Coll Cardiol, 2007;50: 2173-2195.
- 2- Azevedo M, *Teses, Relatórios e Trabalhos Escolares*, 4 ed. Lisboa, Universidade Católica Editora; 2004.
- 3- Axford-Gatley RA, Wilson GJ. *The "border zone" in myocardial infarction: electron microscopic study in the dog using electron-dense flow marker*. Am J Clin Pathol 1988; 131: 452-64.
- 4- Bancroft JD, Gamble M, *Theory and Practice of Histological Techniques*. 5 ed. 2002: Harcourt.
- 5- Berliner AB, Navab M, Fogelman AM, et al. *Atherosclerosis: Basic mechanisms-oxidation, inflammation, and genetics*. Circulation 1995; 91: 2488-96.
- 6- Bernstein ID, Andrews RG, Cohen SF, McMaster BE. *Normal and malignant human myelocytic cells identified by monoclonal antibodies*. J Immunol. 1982; 128:876-81.
- 7- Biasucci LM, Liuzzo G, Colizzi C, Rizzello V. *Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease*. Ital Heart J 2001;2:164-71.
- 8- Bos A, Vever R, Roos D. *Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes*. Biochim Biophys Acta 1987; 525: 37-44.

- 9- Borregaard N, Cowland JB. *Granules of the neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood* 1997; 89:3503-21.
- 10- Brauwald E, *Evolution of the management of acute myocardial infarction a 20th century saga. Lancet* 1998; 352: 1771-4.
- 11-Brennan, ML, e tal. *Prognostic value myeloperoxidase in patients with chest pain. N Engl J Med* 2003;349:1595-604.
- 12-Brown KE, Brunt EM, Heinecke JW. *Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. Am J Pathol* 2001; 159: 2081-88.
- 13- Dabbs JD, *Diagnostic immunohistochemistry.* Churchill Livingstone. 2002
- 14- Di Maio V, Dana S. *Manual de patologia forense.* Dias de Santos. 2003;37-47.
- 15- Doran JP, Howie AJ, Townend JN, Bonser RS, *Detection of myocardial infarction by immunohistological staining for C9 on formalin fixed, paraffin wax embedded sections. J Clin Pathol.* 1996 49: 34-37.
- 16- Estrela E. *Saber Escrever uma tese e outros textos*, 2 ed. Lisboa, publicações Dom Quixote, 2006; 16-21.
- 17- Ferreira MA, Owen HE, Howie AJ. *High prevalence of acute myocardial damage in hospital necropsy series, show by C9 immunohistology. J Clin Pathol.* 1998; 51:548-551.
- 18- Finkbeiner WE, Ursell Pc, Davis RL. *Autópsia em patologia atlas e texto.* 1ª ed. Roca, 2006.

- 19- Gisbert C, Villanueva C. *Medicina legal y toxicología*. 6ª edição. Masson, 2004.
- 20- Hansen SH, Rossen K, *evaluation of cardiac troponin I immunoreaction in autopsy hearts: a possible marker of early myocardial infarction*. *Forensic Sci Int* 1999; 99: 189-196.
- 21- Hougen HP, Valenzuela A, Lachica E, Villanueva E, *Sudden cardiac death: A comparative study of morphological, histochemical and biochemical methods*. *Forensic Sci Int* 1992; 52: 161-169.
- 22- Hu BJ, Chen YC, Zhu JZ. *Immunohistochemical study of fibronectin for postmortem diagnosis of early myocardial infarction*. *Forensic Sci Int* 1996; 78:209-217.
- 23- Kawamura T, Kondo H, Hirai, e tal. *Sudden death in the working population: A collaborative study in Central Japan*. *Eur Heart J* 1999; 20: 338-43.
- 24- Kilgore K, Lucchesi B. *The complement system in myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Cardiovasc Res* 1994; 28:437-444.
- 25- Knight B. *Investigation of sudden deaths from myocardial ischemia*. *Forensic Sci Int* 1976; 8:33-35.
- 26- Knight B, Sankko P. *forensic Pathology*. Third edition. Ed Arnold london, 2004; 492-511.
- 27- Koenig W, Sund M, Frohlich M, e tal. *C – Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men – results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992*. *Circulation* 1999; 99:237-42.

- 28- Lachica E, Villanueva E, Luna A. *Comparison of different techniques for the postmortem diagnosis of myocardial infarction*. Forensic Sci Int 1988; 38: 21-26.
- 29- Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, e tal. *C – Reactive proteins as a cardiovascular risk factor – more than na epiphenomenon?* Circulation 1999; 100:96-102.
- 30- Lanza F. *Clinical Manifestation of myeloperoxidase deficiency*. J Mol Med 1998; 76: 676-81.
- 31- Leadbeatter S, Wawman H, Jasani B. *Immunocytochemical diagnosis of early myocardial ischemic/hypoxic damage*. Forensic Sci Int, 1989; 40:171-180.
- 32- Libby P, Obonow R. *Braunwald's heart disease a textbook of cardiovascular medicine*, 8<sup>th</sup> ed. Elsevier. 2007.
- 33- Libby P. *Molecular bases of acute coronary syndromes*. Circulation 1995; 91:2844-50.
- 34- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 2002;105:1135-43.
- 35- Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, e tal. *Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease*. N Engl J Med 2000; 343:1139-47.
- 36- Lindal S, Smiseth AO, Mjos OD, Myklebust R, Jorgensen L. *Reversible and irreversible changes in the dog heart during acute left ventricular failure due to experimental multifocal ischemia*. Acta Path Microbiol Immunol Scand. Sect A 1986; 94: 177-86.
- 37- Lodge-Patch I. *the ageing of cardiac infarcts, and its influence on cardiac rupture*. Br Heart J. 1951; 13:37-42.

- 38- Matthews SB, Henderson AH, Campbell AK. The adrenochrome pathway: the major route for adrenaline catabolism by polymorphonuclear leucocytes. *J Moll Cell Cardiol* 1985; 17: 339-48.
- 39- Mortensen ES, Rognum TO, Straume B, Jorgensen L. *frequency of acute asymptomatic myocardial infarction and the estimate of infarct age in cases of abrupt sudden death observed in a forensic autopsy material*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008.
- 40- Moberg G, Lindmark G, Moberg L, Venge P. *The peroxidase activity and cellular content of granule proteins in PMN during pregnancy*. *Br J Haematol* 1983; 55: 701-8.
- 41- Mullane KM, Kraemer R, Smith B. *Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemia myocardium*. *J Phamacol Meth*. 1965; 14:157-67.
- 42- Nakamuta M, Ohashi M, Tanabe Y, Hiroshige K, Nawata H. *High plasma concentration of myeloperoxidase in cirrhosis: a possible marker of hypersplenism*. *Hepatology* 1993;18: 1377-83.
- 43- Naruko T, Ueda M, Haze K, et al. *Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes*. *Circulation* 2002;106:2894-900.
- 44- Núñez J, Núñez E, Bodí V, Sanchis J, Miñana G, et al. *Usefulness of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in ST segment elevation myocardial infarction*. *Am J Cardiol* 2008; 101: 747-752.
- 45- Offerman SR, Leers MPG, Suylen RJ, Nap M, Daemen AP, Theunissen PH. *Evaluation of the membrane attack complex of complement for the detection of a recent myocardial infarction in man*. *J Pathol* 2000; 191:48-53.

- 46- Ortmann C, Pfeiffer H, Brinkmann B. *Demonstration of myocardial necrosis in the presence of advanced putrefaction*. Int J Legal Med 2000; 114:50-55.
- 47- Payne J, et al. *Histopathology P. Formes in encyclopedia of forensic and legal medicine. Vol.II, 2005; 489-492.*
- 48- Piercecchi- Martin, *Immunostaining by complement C9: a tool for early diagnosis of myocardial infarction and application in forensic medicine*, Journal of Forensic Science 2000; 46(2): 328-24.
- 49- Pilzer, D., Grasser, O., Moskovich, O., Schifferli, J.A. and Fishelson, Z. *Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer*. Springer Semi Immunopathol 2005; 27: 375-387.
- 50- Powis G. *Hepatic microsomal metabolism of epinephrine and adrenochrome by superoxide-dependent and -independent pathways*. Biochem Pharmacol 1979; 28: 83-9.
- 51- Ribeiro-Silva A, Martin C, Rossi M. *Is Immunohistochemistry a useful tool in the postmortem recognition of myocardial hypoxia in human tissue with no morphological evidence of necrosis?*. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology. 2002; 23(1): 72-77.
- 52- Robbins S., *Patologia Estrutural e funcional; 5ª edição*, Guanabara 1996; 467-471.
- 53- Roberts WC, *Sudden cardiac death: Definitions and causes*. Am J Cardiol 1986;57: 1410-3.
- 54- Santos W, Mesquita E, Vieira R, Olej B, Coutinho M, Avezum A. *Proteína C reactiva e doença cardiovascular. As bases da evidência científica*. Arq Bras Cardiol, Vo. 80 (n.º4) 452-6, 2003; 452-56.

- 55- Saskia R, Offerman R, Leers M, Suylen R, Nap M, Daemen A, Theunissen P. *Evaluation of the membrane attack complex of complement for detection of a recent myocardial infarction in man.* J Pathol 2000; 191: 48-53.
- 56- Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, et al. *Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial.* JAMA 2001; 285:1711-8.
- 57-Stevens A, Lowe J, *Pathology*, second edition, Mosby, 2000; 174-179
- 58- Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. *Macrophage myeloperoxidase regulation by macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes.* Am J Pathol 2001;158:879-91.
- 59- Swerdlow SH, Wright SA. *A spectrum of Leu-M1 staining in lymphoid and hematopoietic proliferation.* Am J Pathol. 1986; 85:283-8.
- 60-Thaulow E, Erikssen J, Sandvik L, Erikssen G, Jorgensen I, Conh PF. *Initial clinical presentation of cardiac disease in asymptomatic men with silent myocardial ischemia and angiographically documented coronary artery disease (the Oslo ischemia study).* Am J Cardiol. 1993; 72:629-33.
- 61- Vargas SO, Sampson BA, Shoen FJ. *Pathologic detection of early myocardial infarction: A critical review of the evolution and usefulness of modern techniques.* Mod Pathol 1999;12: 635-45.
- 62- Vlaicu R, Niculescu F, Rus HG, Cristea A. *Immunohistochemical localization of the terminal C5b-9 complement complex in human aortic fibrosis plaque.* Arteriosclerosis 1985;57:163-77.
- 63- Winterbourn CC, Vissers MCM, Kettle AJ. *Myeloperoxidase.* Curr Opin Hematol 2000; 7:53-8.

- 64- Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed – Ali V. *inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?* *Arteriosclerosis* 2000; 148:209-14.
- 65- Zipes DP, Wellens HJJ. *Sudden cardiac death*. *Circulation* 1998; 98: 2334-51.
- 66- Zhang JM, Riddick L. *Cytoskeleton immunohistochemical study of early ischemic myocardium*. *Forensic Sci int* 1996; 80:229-38.
- 67- Zhang R, Brennan ML, Fu X, et al. *Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease*. *JAMA* 2001; 286:2136-42.