



PERÚ

**Ministerio
de Trabajo
y Promoción del Empleo**

**Seguro Social de Salud
EsSalud**

SEGURO SOCIAL DE SALUD-ESSALUD

INSTITUTO DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS EN SALUD E INVESTIGACIÓN – IETSI

DIRECCIÓN DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS

SUBDIRECCIÓN DE EVALUACIÓN DE DISPOSITIVOS MÉDICOS Y EQUIPOS BIOMÉDICOS

**DICTAMEN PRELIMINAR N° 02 “EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LA
PRUEBA 2, 3, 5 – TRIFENIL TETRAZOLIO CLORURO (TTC) PARA EL DIAGNÓSTICO
Y LOCALIZACIÓN DEL INFARTO DE MIOCARDIO TEMPRANO”**

26 de Junio del 2018

EQUIPO REDACTOR:

1. Dr. Fabián Alejandro Fiestas Saldarriaga - Gerente de la Dirección de Evaluación de Tecnologías Sanitarias-IETSI-ESSALUD.
2. Lic. Gloria Elizabeth Gutierrez Núñez - Sub Gerente de Sub Dirección de Evaluación de Dispositivos Médicos y equipos Biomédicos. IETSI-ESSALUD.
3. Tec. Med. Jorge Maguiña – Evaluador de Tecnologías Sanitarias
4. Dr. Laura Larrea Mantilla - Medico Evaluador. Sub Dirección de Evaluación de Dispositivos Médicos y equipos Biomédicos. IETSI-ESSALUD
5. Dr. Cristian Aguilar Carranza- Médico Patólogo Clínico- INCOR
6. Dr. Alejandro Yabar Berrocal- Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del HNERM
7. Dra. Rosa Melendez Guevara – Jefe del Servicio del Departamento de Anatomía Patológica

CONFLICTO DE INTERÉS:

Los responsables del presente informe declaran no tener conflicto de interés de tipo financiero respecto a los instrumentos evaluados.



FUENTE DE FINANCIAMIENTO:

Seguro Social de Salud-EsSalud

CITACIÓN:

IETSI – EsSalud. Efectividad de la Prueba 2, 3, 5 – Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC) para el Diagnóstico y Localización Del Infarto de Miocardio Temprano. Dictamen Preliminar de Evaluación de Tecnología Sanitaria. Lima, Perú. 2018

ÍNDICE

Resumen Ejecutivo	4
Antecedentes	6
Metodología	7
Pregunta de investigación	7
Diseño de estudio	8
Criterios de elegibilidad	8
Criterios de exclusión.....	8
Búsqueda	8
Resultados	8
Resultados de estudios observacionales comparativos	9
Resultados de guías de práctica clínica	10
Discusión	11
Conclusiones.....	13
Referencias	14



Efectividad De La Prueba 2,3,5 – Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC) para el Diagnóstico y Localización del Infarto de Miocardio Temprano

Laura Larrea Mantilla,¹ Gloria E. Gutierrez Nuñez,¹ Cristian Aguilar Carrazna,² Alejandro Yabar Berrocal,³ Rosa Melendez Guevara,³ Fabian A. Fiestas Saldarriaga,¹

¹Instituto De Evaluación De Tecnologías En Salud E Investigación – IETSI. EsSalud.

²Servicio de Anatomía Patológica. INCOR. EsSalud.

³Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Nacional Guillermo Almenara Yrigoyen. EsSalud.

I. RESUMEN EJECTUTIVO

Antecedentes



Más del 80% de las muertes cardiacas súbitas se deben a enfermedad de arteria coronaria y consecuente infarto cardiaco. El examen post-mortem constituye el paso final para confirmar el diagnóstico clínico. Dado que los cambios microscópicos y macroscópicos del infarto de miocardio no se manifiestan hasta 24-48 horas después de la producción de la lesión isquémica miocárdica, el diagnóstico de muerte súbita por infarto agudo de miocardio resulta complicado, sobre todo cuando la muerte ha ocurrido dentro de las seis horas posteriores al infarto de miocardio. La presente revisión no sistemática de la literatura tiene como objetivo evaluar la efectividad basada en la sensibilidad y especificidad de la prueba 2,3,5 – Trifenil Tetrazolio de Cloruro (TTC) para diagnosticar adecuadamente la presencia y localización del infarto de miocardio temprano.

Metodología



Se realizó una búsqueda bibliográfica abierta de ensayos clínicos randomizados, estudios observacionales, series de casos, revisiones sistemáticas y meta-análisis, y guías de práctica clínica en las bases de datos Medline, LILACS, Cochrane Database, la base de datos “point of care” UpToDate, y el motor de búsqueda Google Scholar sin restricción de tiempo ni idioma.

Resultados

Se encontraron cinco estudios observacionales que evaluaron el desempeño diagnóstico de la prueba TTC. La sensibilidad ocupó un espectro desde los 63.6 al 100% y la

especificidad estuvo ubicada en el rango entre 89.3 y 100%. Los valores promedio calculados de sensibilidad y especificidad fueron 77.9% y 92.75% respectivamente.

Conclusiones

La prueba TTC ha demostrado tener buenos valores de sensibilidad y especificidad. Otros beneficios agregados son la rapidez, practicidad, fácil interpretación y su bajo costo.



II. ANTECEDENTES

El infarto al miocardio se define como la necrosis o muerte de las células del tejido muscular del corazón o miocardio debido a una isquemia prolongada.² El infarto al miocardio es una de las causas más comunes de muerte súbita en el mundo y se calcula que el 80% de todas estas muertes cardíacas son debidas a enfermedad coronaria aguda.¹ En el 25% de estos casos, la muerte ocurre abruptamente dentro de la primera hora del inicio de los síntomas clínicos y su identificación temprana se dificulta debido a que el músculo cardíaco tarda de 24 a 48 horas en evidenciar los cambios micro y macroscópicos característicos que ayudan a su identificación.^{1,2}



Como ayuda al diagnóstico, se puede obtener información de la historia clínica y las circunstancias de la muerte del paciente. Y aunque, pueden encontrarse mínimas evidencias microscópicas reconocibles en el corazón a partir de las seis horas de muerte, en ausencia de los cambios macroscópicos característicos, las áreas de corazón afectadas pueden perderse al tomar bloques al azar para realizar los exámenes patológicos.¹⁻³



Algunas tinciones histoquímicas con tintes “-azo” como el 2,3,5 – Trifenil Tetrazolio de Cloruro (TTC) o el Nitroazul de tetrazolio (NBT) ayudan a distinguir áreas de tejido infartado de áreas de tejido normal.⁴ Este método de diagnóstico se basa en el principio de que estas tinciones al hacer contacto con el tejido cardíaco normal, son enzimáticamente reducidas (por la enzima lactato deshidrogenasa) y cambian su coloración a rojo (en el caso del TTC) o azul. (en el caso del NBT) Por otro lado, el tejido miocárdico infartado ha perdido la integridad de su membrana celular y ha liberado su contenido enzimático al torrente sanguíneo, resultando en una depleción de las enzimas oxidativas “lactato deshidrogenasas” en el área afectada.² Por lo tanto, cuando el corazón bajo sospecha de haber sufrido un infarto se pone en contacto con TTC o NBT, éstas tinciones no son reducidas enzimáticamente permaneciendo incoloras.⁴

Históricamente, estudios en perros han demostrado que la coloración con TTC puede demarcar claramente la división entre el tejido normal y el tejido infartado si más de tres horas han pasado desde la oclusión arterial.⁵ De la misma manera estudios realizados en ratas han demostrado satisfactoriamente que la coloración TTC estima de manera muy

similar a la ecocardiografía el tamaño de la zona infartada en infartos inducidos en el laboratorio.⁶

Actualmente, aunque se viene utilizando la coloración TTC en diversos centros a nivel mundial para el diagnóstico temprano del infarto de miocardio, muchos autores coinciden en que no es del todo apropiado extrapolar los métodos confirmados en modelos animales a las muestras forenses de pacientes fallecidos bajo diversas condiciones clínicas y ambientales.⁷ Ante la necesidad de los departamentos de anatomía patológica de EsSalud por contar con pruebas de tinción rápidas que permitan un diagnóstico oportuno post-mortem del infarto de miocardio, el IETSI ha comisionado la presente revisión no sistemática de la literatura científica para evaluar en términos de sensibilidad, especificidad y precisión diagnóstica la prueba del TTC en su uso para diagnosticar adecuadamente la presencia de infarto de miocardio temprano.



III. METODOLOGÍA

Pregunta de investigación:

¿Cuál es la efectividad en términos de sensibilidad y especificidad del 2,3,5 – Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC) para el diagnóstico de infarto de miocardio post-mortem?



P	Piezas cardiacas correspondientes a casos de muerte súbita sospechosa de origen cardiaco
I	Coloración 2,3,5 – Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC)
C	Otras técnicas histopatológicas convencionales
O	Sensibilidad, especificidad, precisión diagnóstica

TABLA 1. Pregunta PICO elaborada por el equipo evaluador del IETSI y los Departamentos de Anatomía Patológica del INCOR y del HNGAY. P=población, I=intervención, C=comparador, O= "outcome" o desenlace.

Diseño de estudio:

El presente documento es la producción de una revisión narrativa de la literatura basada en la síntesis de la evidencia disponible más relevante al contexto de EsSalud.

Criterios de elegibilidad:

Ensayos clínicos aleatorizados, o no aleatorizados, estudios observacionales comparativos, (de cohorte prospectivos, transversales o retrospectivos) revisiones sistemáticas y meta-análisis que busquen evaluar la efectividad de la prueba 2,3,5 – Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC) para el diagnóstico y localización del infarto de miocardio temprano en casos de muerte súbita en comparación con otras técnicas histopatológicas convencionales. Adicionalmente, son elegibles las guías de práctica clínica y reportes de consenso de sociedades científicas que incluyan entre sus lineamientos la recomendación o contraindicación del uso de dicha prueba.

Criterios de exclusión:



Estudios realizados en modelos animales o no humanos, muestras de corazón en estado de descomposición, otras formas de diagnóstico en pacientes in vitro.

Búsqueda:



Para responder a las preguntas de investigación se realizó una búsqueda bibliográfica abierta en las bases de datos Medline, LILACS, Cochrane Database, la base de datos “point of care” UpToDate, y el motor de búsqueda Google Scholar. No se fijaron límites en cuanto a fecha de publicación o idioma. Se utilizaron las siguientes palabras clave: *coloring agents, TTC, 2,3,5 – triphenyl tetrazolium, formazan, myocardial infarction, diagnosis, post-mortem, pathology, staining and labeling, tetrazolium, humans, forensic, sudden death, postmortem, sudden cardiac death, dye test, TTC test.*

IV. RESULTADOS Y SÍNTESIS DE LA EVIDENCIA

Resultados de estudios observacionales comparativos

El estudio de Adegboyega et al.,⁸ evaluó la sensibilidad y especificidad del TTC en el diagnóstico de infarto agudo al miocardio. Los investigadores buscaron evaluar la correlación de la prueba de TTC con el examen por histología convencional en 638 corazones humanos obtenidos en necropsias consecutivas. De los 638 corazones examinados por TTC, 174 corazones se tiñeron positivos para infarto agudo de miocardio siendo confirmados por patología convencional 140 corazones. De los 464 casos restantes que dieron negativo, el examen patológico reveló 41 infartos agudos al

miocardio. Se obtuvo finalmente, una sensibilidad del 77,4% y una especificidad del 92,6%. El valor predictivo positivo fue 80.5% y el valor predictivo negativo fue 91.2%. La eficacia diagnóstica de la prueba TTC fue del 88% (pacientes identificados correctamente). Los autores concluyeron que los resultados de la prueba TTC es confiable, sensible y específico en el examen del corazón humano en la necropsia.

Revathi y cols.,³ evaluaron en el 2011 la utilidad de la tinción con TTC en el diagnóstico del infarto agudo al miocardio en 40 corazones humanos enteros (en lugar de utilizar piezas cortadas) correspondientes a casos de muerte súbita. Todas las piezas de corazón fueron embebidas en una solución que contenía TTC y para el cálculo de sensibilidad y especificidad se utilizó la tinción de Hematoxilina-Eosina. (HE) Tres de los 40 corazones resultaron positivos para infarto de miocardio. De los 37 corazones restantes, ninguno resultó ser positivo para infarto de miocardio con TTC ni con HE. El estudio pudo detectar casos positivos tan pronto como a las 8 horas y mostró una sensibilidad y especificidad del 100%. Se concluyó que la coloración con TTC es una herramienta importante en los casos de muerte súbita siendo incluso mejor en casos que se encuentran dentro de las 36 horas post-mortem.



El estudio de Bambhaniya et al.⁹ buscó demostrar la ayuda que TTC brinda al patólogo en el reconocimiento temprano de pequeños infartos en comparación con la tinción HE. El estudio se basa en la comparación de las tasas de diagnóstico macroscópico (TTC) y microscópico (HE) de infarto de miocardio. De un total de 130 casos, la coloración TTC fue positiva en 26 (20%) de los cuales 12 (46%) resultaron solo positivos para TTC mientras 14 (54%) resultaron positivos para TTC y HE. El total de tinciones positivas para HE fue de 17 (13%) de las cuales 3 (17%) fueron HE positivos, pero TTC negativos. El caso más tempranamente detectado fue a las 2 horas post mortem. En total 21 (16%) casos con un intervalo post-mortem <6 horas mostraron cambios isquémicos con TTC; mientras que ningún caso con in intervalo post-mortem de >12 horas dio positivo con TTC.



Lachica et al.¹⁰ evaluaron la eficacia de tres técnicas diferentes (TTC, HE y la tasa sodio/potasio) para el diagnosticar infarto de miocardio en 74 cadáveres en España. Para la prueba TTC se obtuvo una sensibilidad de 63. 6% y una especificidad de 96.2%

Finalmente, estudio realizado por Kotabagi et al.¹¹ en el año 2000 evaluó la utilidad de las técnicas TTC y Tinción Acridina Naranja (TAN) en 18 muestras de corazón clínicamente sospechosas de infarto de miocardio. Se consideraron 10 muestras de corazón provenientes de casos de muerte súbita de causa no cardiaca como controles negativos y 10 muestras en parafina con diagnóstico confirmado de infarto de miocardio como controles positivos. En cuatro casos, el tiempo de supervivencia después del inicio de los síntomas fue de entre 2 y 4 horas. En un caso, fue de 5 horas y media. De estos cinco casos, dos solo mostraron MI agudo, que se detectó solo con la coloración TAN. Dado que el único caso con un tiempo de supervivencia de 5½ horas mostró un infarto mucho más antiguo bajo tinción HE, la tinción TTC no cumplió ningún objetivo diagnóstico en el estudio. Sin embargo, ayudó en la evaluación de otros casos con infartos mucho más antiguos por medio de una mejor delineación del infarto y se reveló que el alcance de dichos infartos fue 1 mm más que el observado a simple vista antes de la tinción con TTC. Esto ayudó a tomar secciones de tejido para el estudio de HE de áreas que sufrían daño en las fronteras del infarto.



Estudio	Tamaño de muestra	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Adegboyega ⁸	638	77.4	92.6
Revathi ³	40	100	100
Bambhaniya ⁹	130	82.3	89.3
Lachica ¹⁰	74	63.6	96.2

Tabla 1. Valores de sensibilidad y especificidad reportados en cuatro de los cinco estudios incluidos. Para Bambhaniya et al. los valores de sensibilidad y especificidad no estuvieron reportados como tales, pero se calcularon con los datos numéricos reportados en el manuscrito.

Resultados de guías de práctica clínica

En la guía para el diagnóstico patológico de la enfermedad cardiaca isquémica aguda de la Organización Mundial de la Salud,¹² se recomienda el uso de la prueba TTC como herramienta de histoquímica con evidencia experimental en la categoría de “métodos enzimáticos” para el diagnóstico de muerte súbita sospechosa de infarto de miocardio con un intervalo post-mortem de media hora a 12 horas. Otra prueba también recomendada por la OMS en esta categoría con el mismo intervalo es el NBT.

V. DISCUSIÓN

Ante la sospecha de muerte de origen cardiaco, la identificación oportuna de la causa de la muerte ayuda en la administración de justicia, reclamos de indemnización laboral, seguros médicos y beneficios, además de proporcionar información epidemiológica para enmarcar las estadísticas y políticas de salud pública.

Se han encontrado en esta revisión, cinco estudios observacionales que estudian el desempeño de la prueba TTC.^{3,8-11} La búsqueda sistemática realizada para recabar los estudios relevantes para esta revisión ha arrojado en su totalidad estudios observacionales comparativos. Es importante notar que, los estudios de precisión diagnóstica, son precisamente aquellos estudios observacionales transversales cuyo objetivo es evaluar el desempeño de una prueba en determinada población.¹³ En general, la precisión diagnóstica de una prueba viene expresada por su sensibilidad y especificidad, de ahí que los criterios de elegibilidad de esta revisión son delimitados para incluir únicamente estudios que buscasen calcular dichos parámetros.

De los estudios obtenidos, tres reportaron valores de sensibilidad mientras que uno reportó datos numéricos con los que fue posible calcularla. (TABLA 1) Teniendo en cuenta la variabilidad de los tamaños de muestra, se obtuvo el promedio ponderado de los valores de sensibilidad de cada estudio para obtener un estimado *grosso modo* de la prueba TTC. La sensibilidad global fue de 77.9% y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\bar{x} = \frac{n_1(s_1) + n_2(s_2) + n_3(s_3) + n_4(s_4)}{n_1 + n_2 + n_3 + n_4}$$

Cálculo del promedio ponderado de sensibilidad, n= tamaño de muestra, s = valor de sensibilidad reportada en el estudio. Valores correspondientes a Adegboyeda et al., Revathi et al., Bambhaniya et al. y Lachica et al.

Aunque algunos autores consideran que el nivel mínimo aceptable de una prueba es alrededor del 80%,¹⁴ se debe considerar que los niveles aceptables de estos valores dependen de muchas variables más allá de los números como lo son la practicidad de la prueba o sus costos. Pareciera ser que de manera uniforme los autores de los estudios aquí presentados coinciden en declarar el buen desempeño, practicidad y rapidez de la prueba TTC. Por ejemplo, Bambhaniya⁹ mostró las ventajas de la coloración con TTC sobre la coloración HE, esto debido a que el TTC permite analizar cortes gruesos mientras que para HE es necesario realizar cortes histológicos que pueden o no abarcar el tejido

necrosado. El estudio realizado por Kotabagi et al.¹¹ ha podido establecer la utilidad de dos coloraciones (entre ellas TTC) para diagnosticar los infartos de miocardio de alrededor de dos horas de ocurridos, en la detección de infartos que son "invisibles" por tinción con HE y en el diagnóstico de los infartos más antiguos. Este estudio ha demostrado que la técnica para realizar la coloración TTC es bastante simple y fácil de realizar. Los reactivos requeridos no se encuentran, a juzgar por los autores, fuera del alcance financiero de ningún laboratorio de anatomía patológica de tamaño moderado y su interpretación tan sencilla no interpone ningún problema para los usuarios.



De la misma manera y con la ecuación antes descrita, se calculó el promedio ponderado de los valores de especificidad de los cuatro estudios que reportaron información (TABLA 1) obteniéndose una especificidad ponderada de 92.75%. La buena especificidad de esta prueba puede explicarse mediante el comportamiento de la enzima lactato deshidrogenasa y la capacidad de la prueba para detectar su presencia o ausencia. Mientras que tras un infarto de miocardio esta enzima tarda en desaparecer del tejido después de tan solo seis horas, se ha observado que en corazones no infartados esta enzima también desaparece, pero lo hace aproximadamente a las 60 horas si el corazón se encuentra refrigerado y a las 36 horas si se encuentra a temperatura ambiente.¹⁵ De ahí que, un resultado negativo con la prueba TTC nos brinde una muy alta probabilidad de haber descartado correctamente que la muerte haya sido producida por infarto de miocardio. Sin embargo, cabe resaltar que, debido al comportamiento de la enzima, la especificidad de la prueba irá decayendo conforme pasa el tiempo.



Dado que la capacidad de tinción del TTC declina a medida que aumenta el intervalo de tiempo post-mortem^{7,16} y que los estudios aquí presentados han demostrado que esta prueba tiene una muy buena capacidad de diagnóstico temprano, se recomienda que, para obtener el máximo beneficio, sea utilizada entre las 6 y 24 horas post-mortem, en compañía o no de HE. Pasadas las 24 horas, otras técnicas de diagnóstico como la tinción HE serían las más indicadas para llegar al diagnóstico.

Por otro lado, el cuerpo de evidencia aquí presentado posee las siguientes limitaciones (1) el escaso número de estudios recabados, (2) el poco tamaño de muestra de los estudios y (3) los diferentes comparadores utilizados para calcular la sensibilidad y

especificidad de la prueba TTC. Desde el punto de vista metodológico, el escaso número de estudios y su poco tamaño de muestra conllevan a generar gran imprecisión en los resultados. El ejemplo más saltante es el de Revathi, donde se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 100% en base a tan solo tres piezas de 130 que recibieron confirmación por el *gold standard*. En la misma manera, el uso de diferentes comparadores en los cinco estudios genera ambigüedad y sesgo pues no todos los comparadores poseen el mismo grado de error.¹³ Estas limitaciones parecen disminuir la validez de los estudios aquí incluidos, sin embargo, la prueba TTC ha demostrado en esta revisión ser una herramienta práctica, rápida, de bajo costo y con muy buena especificidad por lo que en términos de relevancia clínica confiere un beneficio al usuario.



El diagnóstico exacto y oportuno de la causa de muerte tiene implicaciones de alto alcance. El uso de pruebas rápidas y confiables, como el TTC, además de ayudar a resolver muchos problemas civiles y penales, especialmente cuando la muerte se ha producido bajo circunstancias sospechosas o desatendidas, proporciona claridad médica aliviando el sufrimiento de los familiares de la víctima cuando se demuestra que la muerte del paciente ha sido debida a una causa natural como el infarto de miocardio.

VI. CONCLUSIONES



De la revisión realizada se puede concluir que la literatura científica disponible se encuentra limitada a estudios observacionales comparativos incluyendo por lo general cohortes pequeñas y medianas. No obstante, el cuerpo de evidencia aquí presentado posee cierta uniformidad metodológica que se podría traducir en una buena extrapolación de sus resultados.

Se concluye que la coloración con 2, 3, 5 – Trifenil Tetrazolio Cloruro es sensible, específica, confiable y costo eficiente para el diagnóstico temprano de infarto al miocardio particularmente cuando es empleado por patólogos que tienen una buena comprensión de la evolución de los cambios patológicos que se desencadenan una vez ocurrido el infarto de miocardio.

Se aprueba la incorporación del dispositivo médico: 2, 3, 5 – Trifenil Tetrazolio Cloruro al Catálogo de Bienes Institucional.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shperling ID. Sarcomeres relaxation in the diagnosis of the early stage of myocardial infarction in sudden death. *Cor vasa*. 1986;(5)328-33
2. W.St.C Symmer's Systemic Pathology 3rd Edition Vol 10 Cardio vascular System, Part B Acquired Disease of the Heart, Ch- 3 p-34, 44
3. Shenoy R, Bakkannavar SM, Vidya M, Bhat A V, Mukesh K, Nayak V, et al. Identification of Myocardial Infarction in Human Autopsy Population Using TTC. *J Pharm Biomed Sci*. 2011;9(9):1-4.
4. Altman FP., Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem* 1976;9(3):1-56
5. Fishbein M, Meerbaum S, Rit J. Early phase acute myocardial infarct size quantification: Validation of the triphenyl tereazolium chloride tissue enzyme staining technique.
6. dos Santos L, Mello AFS, Antonio EL, Tucci PJF. Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: Correlation, agreements, and simplifications. *Brazilian J Med Biol Res*. 2008;41(3):199-201.
7. Kakimoto Y, Tsuruyama T, Miyao M, Abiru H, Sumiyoshi S, Kotani H, et al. The effectiveness and limitations of triphenyltetrazolium chloride to detect acute myocardial infarction at forensic autopsy. *Am J Forensic Med Pathol*. 2013;34(3):242-7.
8. Adegboyega P, Adesokan A, Haque A, Boot P. Sensitivity and specificity of triphenyl tetrazolium chloride in the gross diagnosis of acute myocardial infarcts. *Arch Pathol Lab Med*. 1997;121:1063-8.
9. Bambhaniya A, Upadhyay M, Trangadia M, Mehta R, Gupta B, Chaudhari K. Role of Triphenyl Tetrazolium Chloride to detect early myocardial ischemia in sudden death cases. *J Res Med Dent Sci*. 2015;3(1):54.
10. Laciha E., Villanueva E., Luna A., Comparison of different techniques for the postmortem diagnosis of myocardial infarction. *Forensic Sci Int* 1988 Jul-Aug; 38(1-2):21-6.



11. KOTABAGI, R., APTE, V., & PATHAK, P. (2000). POST MORTEM DIAGNOSIS OF EARLY MYOCARDIAL INFARCTION. *Medical Journal, Armed Forces India*, 56(2), 99–102. [http://doi.org/10.1016/S0377-1237\(17\)30121-1](http://doi.org/10.1016/S0377-1237(17)30121-1)
12. WHO Scientific Group. The Pathological diagnosis of acute ischaemic heart disease. WHO Tech Rep Ser 1970; 441:5-27
13. Bossuyt P, Leeflang M. Chapter 6: Developing Criteria for Including Studies. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy*. The Cochrane Collaboration, 2008; 2008.
14. Marôco, J. (2011). *Análise Estatística com o SPSS Statistics (5ª ed.)*. Lisboa: Report Number.
15. B Knight, In: Camps FE, Editor, *Myocardial Ischaemia-Recent advances in Forensic pathology*. 1969 : 20-34
16. Tsuruyama, Tatsuaki & Kakimoto, Yu. (2014). Forensic Diagnosis of Acute Myocardial Infarction: Application of Mass Spectrometry Review Article. *International Journal of Forensic Science & Pathology*. 2. 1-5. 10.19070/2332-287X-1400018.

