

GreenFix®: avaliação da morfologia em tecido mamário

A R Vieira¹, A T Martins², H Scigliano³ & R A Silva⁴

^{1,3,4} Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (CISA-ESTSP), Instituto Politécnico do Porto, Vila Nova de Gaia, Portugal

^{1,2} Serviço de Anatomia Patológica, Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, E.P.E., Porto, Portugal

² Grupo de Epigenética do Cancro - Centro de Investigação, Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, E.P.E., Porto, Portugal

¹ rita_svieir@gmail.com; ² a.teresamartins@gmail.com, ³ hms@estsp.ipp.pt, ⁴ ras@eu.ipp.pt

RESUMO

Na última década têm desenvolvido fixadores para substituição do formol que é tóxico para o homem. O principal objectivo foi avaliar microscopicamente a histomorfologia e as características tintoriais de tecido mamário fixado em GreenFix®, durante 24 e 72 horas, comparativamente ao fixado em formol, através da coloração de Hematoxilina-Eosina. Uma análise global da histomorfologia revelou existir uma diferença estatisticamente significativa entre a fixação pelo GreenFix® e pelo formol ($p=0,050$), tendo-se registado uma melhoria da coloração e detalhe nuclear nos tecidos fixados com GreenFix® durante 24 ($p=0,007$) ou 72 horas ($p=0,024$). O GreenFix® é um potencial substituto do formol na rotina histológica.

Palavras-Chave: Tecido mamário, Morfologia, Formol, GreenFix®

ABSTRACT

In the last decade fixatives to substitute the formaldehyde - that is toxic for man - have been developed. The main goal was to evaluate the morphology and histological dyeing features of breast tissue fixed by GreenFix® during 24 and 72 hours comparing to those fixed by formaldehyde, through hematoxylin-Eosin staining. A global analysis of histomorphology showed statistically significant difference between GreenFix® and formaldehyde fixation ($p=0,050$). An improvement on nuclear detail and staining was achieved by GreenFix® fixation during 24 ($p=0,007$) or 72 hours ($p=0,024$). The GreenFix® is a potential substitute of formaldehyde for histological routine.

Keywords: Breast tissue, Morphology, Formaldehyde, GreenFix®

1. INTRODUÇÃO

A fixação é uma das principais etapas da técnica histológica, que permite o estudo microscópico dos tecidos e o diagnóstico anatomopatológico.

Existe uma variedade de fixadores químicos com propriedades específicas, que apresentam vantagens e desvantagens, devendo a sua escolha ser adaptada ao estudo que se pretende efectuar. No global, os fixadores devem preservar a morfologia e os constituintes dos tecidos num estado semelhante ao *in vivo* para observação microscópica. Assim, os fixadores não devem retrair, distorcer ou endurecer excessivamente os tecidos, assim como diminuir as características tintoriais dos diferentes componentes teciduais ou destruir os epítomos antigénicos dos tecidos (Grizzle, 2008).

O fixador mais comumente utilizado nos laboratórios de histologia é uma solução aquosa de formaldeído a 4% tamponado, designada vulgarmente por formol a 10% tamponado.

A acção fixadora do formaldeído é devida, essencialmente, à reactividade espontânea do seu grupo aldeído com alguns grupos funcionais das proteínas, formando pontes metilénicas entre as proteínas adjacentes ou dentro da mesma proteína (Dapson, 2007a). Através do estabelecimento das pontes metilénicas, as proteínas intracelulares solúveis são ligadas às proteínas estruturais, tornando-se insolúveis e, conseqüentemente, não difundem durante o processamento e outros tratamentos subsequentes à fixação (Leong, 1994). A formação de um grande número de pontes metilénicas entre as diferentes proteínas presentes nas células e nos espaços intercelulares leva a um aumento da viscosidade e à retenção dos constituintes celulares, bem como à preservação das relações entre os diferentes componentes celulares (Leong, 1994). Por outro lado, a formação de pontes metilénicas pode levar à alteração de algumas características químicas dos componentes dos tecidos, comprometendo algumas colorações histoquímicas, bem como à alteração da conformação dos antigénios e à sua acessibilidade, comprometendo os estudos imunocitoquímicos (Dapson, 2007a; Horobin, 2008). Actualmente, existem vários métodos de recuperação antigénica que revertem os efeitos negativos da fixação pelo formol, sendo possível aplicar o estudo imunocitoquímico na rotina do laboratório de anatomia patológica hospitalar (Boenisch, 2006; O'Leary et al, 2009).

Apesar de o formol ser amplamente utilizado como fixador, vários estudos têm demonstrado uma associação entre a exposição ao formol e o desenvolvimento de neoplasias do tracto respiratório (Hauptmann et al, 2003). Em 2004, o formol foi classificado como reagente carcinogénico pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2004). Por este motivo, têm sido desenvolvidos vários reagentes alternativos ao formol (Buesa, 2008; Guellec et al, 2009; Hofman et al, 2009), que não comprometem a saúde do Homem. Estes reagentes podem conter componentes aldeídicos, que não o formol, ou podem ser alcoólicos (Buesa, 2008).

O GreenFix[®] é um fixador alternativo ao formol, não carcinogénico, em que o principal componente fixador é o glioxal. Esta molécula é um dialdeído, possuindo um mecanismo de fixação idêntico ao formaldeído (Dapson, 2007b). Alguns estudos demonstram que os tecidos fixados em glioxal ou em fixadores comerciais à base de glioxal apresentam características morfológicas semelhantes aos tecidos fixados em formol (Dapson, 2007b; Umlas et al, 2004). Adicionalmente, a fixação em glioxal assegura a qualidade das técnicas histoquímicas (Dapson, 2007b).

Até ao momento, os únicos estudos realizados para avaliação do GreenFix[®], como fixador de tecidos, foram efectuados pela empresa que o comercializa (Diapath).

O principal objectivo deste estudo foi avaliar a morfologia e as características tintoriais dos tecidos fixados pela solução recentemente comercializada, o GreenFix[®], comparativamente aos tecidos fixados pelo fixador de rotina histológica, o formol a 10% tamponado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

No presente estudo foram utilizadas quinze amostras de tecido mamário, provenientes de peças cirúrgicas de cirurgia mamária a pacientes do Instituto Português de Oncologia do Porto (IPOP), em que foi diagnosticado cancro da mama. As colheitas de tecidos realizadas para este estudo não interferiram com os procedimentos laboratoriais nem com a realização do diagnóstico final.

Após fixação, as amostras foram processadas automaticamente e incluídas em parafina, para se realizar um corte histológico, com 3 µm de espessura, de cada amostra. Durante o acto da inclusão foram registadas as medidas de cada fragmento (comprimento e largura) para se proceder ao cálculo da áreas do tecido e do respectivo índice de retracção, causado pelo agente fixador. Os cortes histológicos foram corados pela coloração de rotina, Hematoxilina e Eosina (HE), para se efectuar a avaliação microscópica da morfologia dos tecidos.

2.2 Fixação das amostras

De cada amostra de tecido mamário foram cortados quatro fragmentos de tecido com um comprimento, largura e espessura iguais. Após o registo das medidas de cada fragmento de tecido fresco (comprimento e largura) estes foram fotografados, tendo sido dois colocados em GreenFix[®] (Diapath, Itália) e os outros dois em formol a 10% tamponado para fixação à temperatura ambiente. O tempo de fixação de cada fragmento num dado fixador foi de 24 ou de 72 horas.

2.3 Avaliação

A avaliação do tecido mamário fixado com GreenFix[®] ou com formol foi realizada durante a inclusão, microtomia e por observação microscópica das preparações histológicas coradas pela coloração de rotina.

Os parâmetros avaliados durante a inclusão dos tecidos foram a retracção, distorção e dureza, enquanto na microtomia foi avaliada apenas a dureza do tecido.

A retracção dos tecidos causada pela fixação por um dado fixador e subsequente processamento foi avaliada através do índice de retracção, calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Índice de retracção} = 1 - \left[\frac{\text{área do tecido a fresco} - \text{área do tecido após processamento}}{\text{área do tecido a fresco}} \right]$$

A distorção e a dureza dos tecidos fixados em GreenFix[®] foram avaliadas comparativamente aos achados encontrados para esses parâmetros nos tecidos fixados com formol a 10% tamponando, tendo sido aplicada a seguinte escala ordinal: 0 – maior distorção ou dureza comparativamente à fixação em formol; 1 – distorção ou dureza semelhante à obtida pela fixação em formol; e 2 – menor distorção ou dureza comparativamente à fixação em formol.

A avaliação microscópica foi realizada, às cegas, por dois observadores especializados independentes, tendo em consideração parâmetros morfológicos (morfologia do tecido no global, distorção tecidular, detalhe nuclear e detalhe citoplasmático) e parâmetros relacionados com as características tintoriais das células (intensidade da coloração nuclear e da coloração citoplasmática). Para a avaliação de cada parâmetro foi aplicada a seguinte escala ordinal: 0 – fraca intensidade; 1 – intensidade razoável; e 2 – boa intensidade.

2.4 Análise Estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente no *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* para o Windows[®] versão 17.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Para averiguar se os valores de índice de retracção calculados para as diferentes amostras seguem uma distribuição normal, foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk*. A distribuição foi considerada normal para um nível de significância (α) de 0,05 quando $p \geq 0,05$. Para avaliar a significância das diferenças encontradas nos valores de índice de retracção dos tecidos fixados com fixadores diferentes, foi aplicado o teste T para amostras emparelhadas.

O teste de *Wilcoxon* para 2 amostras emparelhadas foi aplicado para verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre a qualidade da fixação obtida pelos diferentes fixadores, nomeadamente nos parâmetros distorção e dureza tecidular. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p \leq 0,05$. O mesmo teste foi utilizado para averiguar a concordância inter-observadores. As observações foram consideradas concordantes para um nível de significância (α) de 0,05 quando $p \geq 0,05$.

O teste de *Kruskal-Wallis*, teste estatístico não paramétrico para k amostras independentes, foi realizado para avaliar se existem diferenças estatisticamente significativas para um dado parâmetro, no global, da coloração Hematoxilina e Eosina. O teste de *Mann-Whitney*, teste estatístico não paramétrico para 2 amostras independentes, foi aplicado para averiguar se existem diferenças estatisticamente significativas entre fixadores ou tempos de fixação diferentes. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação macroscópica

A fixação pode levar a um endurecimento e retracção dos tecidos e a um dado grau de distorção quando a retracção da amostra não ocorre de uma forma homogénea.

Uma das formas de avaliar a retracção dos tecidos causada pela fixação é através do valor do índice de retracção, calculado a partir dos valores das medidas do tecido a fresco e após o período de fixação. Contudo, como os tecidos foram processados após a fixação e o grau de retracção dos tecidos que ocorre durante o processamento é influenciado pela fixação, no presente trabalho a medição dos tecidos fixados foi realizada após o processamento, nomeadamente no acto da inclusão dos tecidos. As diferenças entre os valores médios do índice de retracção encontradas para os tecidos fixados em formol e em GreenFix[®], durante 24 horas, não são estatisticamente significativas ($p=0,643$). Resultado semelhante não foi obtido para um tempo de fixação

de 72 horas, em que, no global, os tecidos fixados em formol apresentam um maior índice de retracção relativamente aos tecidos fixados em GreenFix[®] (p=0,036). O aumento do tempo de fixação dos tecidos em GreenFix[®] não leva uma maior retracção tecidual (p=0,226). Contrariamente, os tecidos fixados em formol durante 72 horas apresentam um índice de retracção superior ao encontrado nos tecidos fixados em formol durante 24 horas (p=0,027).

Além da medição dos tecidos no momento da inclusão, foi avaliada a dureza e a distorção dos tecidos fixados em GreenFix[®] em comparação com as encontradas para os tecidos fixados em formol. Uma análise da Tabela 1 mostra que a maioria dos tecidos fixados em GreenFix[®], durante 24 horas, apresenta uma distorção e dureza semelhante às encontradas nos tecidos fixados em formol, (p=1,000; p=0,317). Com um tempo de fixação mais prolongado (72 horas) os tecidos fixados em GreenFix[®] tendem a ficar mais duros e distorcidos comparativamente aos tecidos fixados em formol, sendo as diferenças encontradas estatisticamente significativas apenas para a dureza dos tecidos (p=0,025) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das frequências absolutas e relativas no âmbito das avaliações efectuadas no momento da inclusão dos tecidos fixados em GreenFix[®] durante 24 e 72 horas

Escala	Inclusão dos Tecidos			
	N (%)			
	24 horas		72 horas	
	Distorção	Dureza	Distorção	Dureza
0	2 (13,3)	0	5 (33,3)	5 (33,3)
1	11 (73,3)	14 (93,3)	9 (60,7)	10 (67,7)
2	2 (13,3)	1 (6,7)	1 (6,7)	0
p	1,000	0,317	0,102	0,025

p – valor prova obtido para um nível de significância (α) de 0,05 pelo Teste de Wilcoxon

A dureza dos tecidos fixados em GreenFix[®] foi também avaliada durante o processo de microtomia tendo esta sido semelhante à encontrada nos tecidos fixados em formol, quer às 24 horas (p=0,317) quer às 72 horas (p=0,157) de fixação.

3.2 Avaliação microscópica

A coloração pela HE permite a observação microscópica da morfologia dos tecidos e das células, sendo possível detectar, através desta coloração, alterações ao nível da arquitectura dos tecidos e da morfologia das células. O fixador utilizado no processo de fixação dos tecidos pode levar a alterações da arquitectura/morfologia dos tecidos e das suas características tintoriais, facto que pode dificultar o diagnóstico anatomopatológico.

No presente trabalho foram utilizados vários parâmetros para avaliar a histomorfologia (distorção tecidual, os detalhes nuclear e citoplasmático e a morfologia no geral) e as características tintoriais dos

As preparações histológicas coradas pela coloração HE foram avaliadas, tendo havido discordância inter-observador em dois parâmetros, nomeadamente na distorção tecidual e morfologia global do tecido. Após uma reavaliação desses dois parâmetros houve um consenso quanto à pontuação atribuída, sendo possível analisar os resultados por estatística inferencial. Através desta análise, verificou-se que as amostras possuem uma boa morfologia tecidual, independentemente do fixador e do tempo de fixação (p=0,752), resultado que é constatado pela observação da Figura 1.

Uma análise microscópica mais detalhada dos cortes histológicos mostrou a existência de distorção tecidual, sendo esta mais frequente nas amostras fixadas em GreenFix[®] do que a existente nas amostras fixadas em formol, tanto às 24 horas (p=0,049) como às 72 horas de fixação (p=0,015).

Aquando da observação microscópica, foi avaliada, também, a integridade dos eritrócitos (Figura 1). A fixação em GreenFix[®] não preserva os eritrócitos, como acontece com a fixação em formol a 10% tamponado (Figura 1). Este achado microscópico foi encontrado para o tempo de fixação de 24 horas (p=0,000) e de 72 horas (p=0,000).

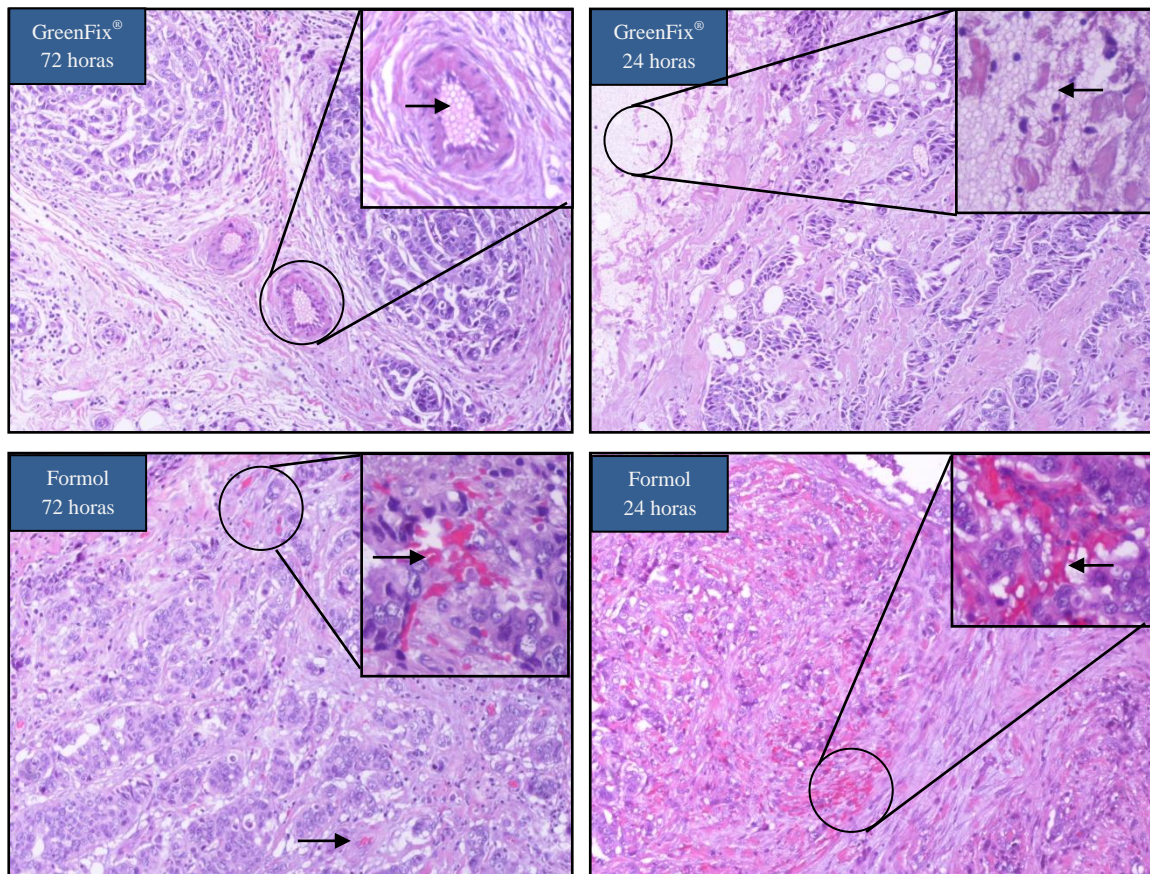


Figura 1. Cortes histológicos de tecido mamário fixado em GreenFix® e formol a 10% tamponado corados pela coloração de Hematoxilina e Eosina. Ampliação 100x. Imagem do canto superior corresponde à região delimitada por círculo ampliada 200x. As setas assinalam os eritrócitos.

No que concerne à morfologia da célula foram avaliadas as características nucleares e as citoplasmáticas.

As características nucleares, nomeadamente o detalhe e a intensidade da coloração nuclear, são fundamentais para a elaboração do diagnóstico anatomopatológico, nomeadamente para a identificação de células neoplásicas. Por este motivo, a análise das características nucleares foi realizada em conjunto, ou seja, para cada amostra foi efectuado o somatório das pontuações atribuídas aos parâmetros detalhe nuclear e intensidade da coloração nuclear. Através da análise estatística efectuada foi possível verificar que a fixação em GreenFix® preserva melhor as características nucleares das células, relativamente à fixação em formol (Figura 2), quer para uma fixação de 24 horas ($p=0,007$) e quer para uma de 72 horas ($p=0,024$).

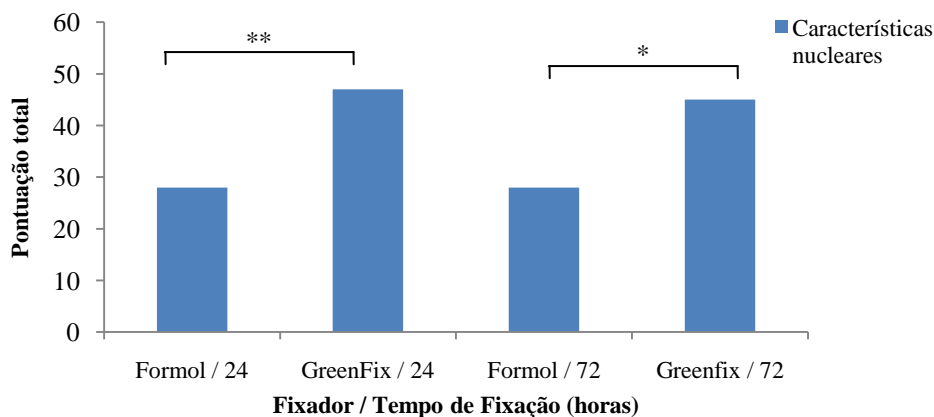


Figura 2. Pontuação total das amostras fixadas em GreenFix® ou Formol, para os tempos de fixação em estudo, quanto às características nucleares constatadas. ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$ pelo Teste de Mann-Whitney.

Relativamente às características citoplasmáticas, as células dos tecidos fixados em GreenFix[®] durante 24 horas apresentam melhor detalhe citoplasmático relativamente ao encontrado com a fixação em formol a 10% tamponado, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,026$). Resultado semelhante não foi encontrado para o tempo de fixação de 72 horas, onde não foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois fixadores ($p=0,439$). À semelhança do detalhe citoplasmático, a intensidade da coloração do citoplasma das células dos tecidos fixados durante 24 horas foi superior com a fixação em GreenFix[®] ($p=0,007$), não se verificando o mesmo durante 72 horas ($p=0,331$).

Uma boa visualização da morfologia celular só é possível através de uma boa coloração, a qual depende das características tintoriais dos tecidos. Para avaliar as características tintoriais dos tecidos efectuou-se o somatório dos dois parâmetros estudados, nomeadamente as intensidades nuclear e citoplasmática (Figura 3). Os tecidos fixados em GreenFix[®] durante 24 horas possuem uma coloração mais intensa comparativamente aos tecidos fixados em formol ($p=0,000$), facto que leva a um maior contraste e, conseqüentemente, a uma melhor visualização da célula.

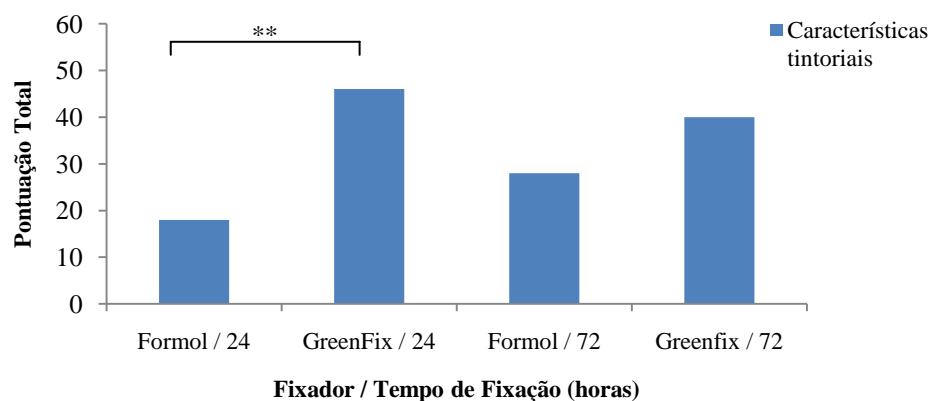


Figura 3. Pontuação total das amostras fixadas em GreenFix[®] ou Formol, para os tempos de fixação em estudo, quanto às características. $** p \leq 0,01$ pelo Teste de Mann-Whitney.

Por último, realizou-se o somatório de todos os pontos obtidos nos diferentes parâmetros avaliados durante a observação microscópica, com o intuito de verificar se a fixação dos tecidos em GreenFix[®] fornece uma qualidade geral equivalente à fixação em formol (Figura 4).

Por observação da figura 4 é possível constatar que a fixação em GreenFix[®] permite uma melhor visualização e preservação das características arquitectónicas/morfológicas e tintoriais dos tecidos do que a fixação em formol, independentemente do tempo de fixação ($p=0,05$). Esta diferença é visível apenas para o tempo de fixação de 24 horas ($p=0,007$).

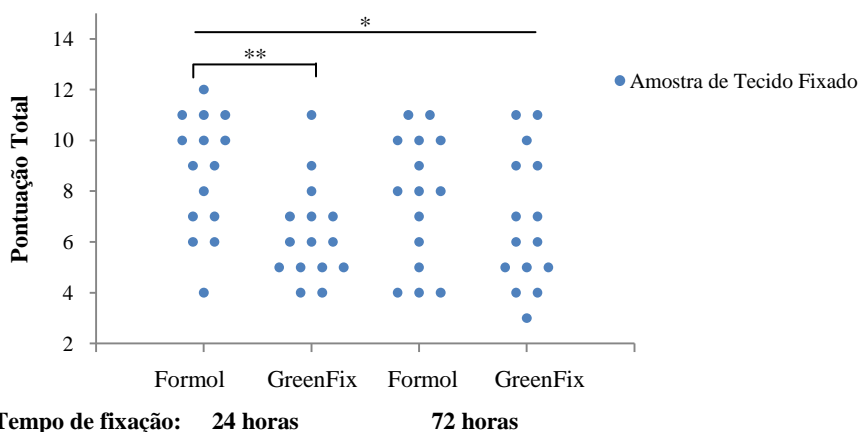


Figura 4. Distribuição da pontuação total de cada amostra fixada pelos diferentes fixadores e tempos de fixação. Pontuação obtida através do somatório dos pontos atribuídos aos diferentes parâmetros. $*p \leq 0,01$; $**p \leq 0,05$ para um nível de significância (α) de 0,05 pelo Teste de Mann-Whitney.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o fixador GreenFix[®], globalmente, preserva a histomorfologia e as características tintoriais dos tecidos melhor do que o formol, sendo um bom candidato para substituir o fixador de rotina, o formol, que foi considerado um agente carcinogénico pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2004). Adicionalmente, a retracção, distorção e dureza dos tecidos, causada pela fixação com o GreenFix[®], não dificultou os actos de inclusão e microtomia dos tecidos, sendo o grau encontrado para estes parâmetros semelhantes aos vistos para os mesmos tecidos fixados em formol.

Na maioria dos laboratórios de anatomia patológica os tecidos são fixados durante 24 horas, excepto aos fins-de-semana, que são fixados durante 72 horas, ou quando é necessária a colheita de novos fragmentos por a amostragem ser pouco representativa. Uma vez que o tempo de fixação pode influenciar algumas das características dos tecidos, neste estudo piloto foram estudados estes dois tempos de fixação (24 e 72 horas).

A retracção dos tecidos causada pela fixação em GreenFix[®] é semelhante nos dois tempos de fixação em estudo, sendo análoga ou inferior à provocada pelo formol. Quando a retracção dos tecidos não ocorre de uma forma homogénea, pode levar à distorção tecidular (Grizzle, 2008). A nível macroscópico, a distorção tecidular provocada pelos dois fixadores foi semelhante, o que permitiu uma fácil inclusão dos tecidos. No entanto, o prolongamento da fixação em GreenFix[®] torna os fragmentos mais endurecidos e com tendência a ficarem mais distorcidos. Apesar do tempo de fixação em GreenFix[®] aumentar a dureza dos tecidos, como visto entre os tempos de fixação de 24 e 72 horas, este aumento de dureza não se reflectiu na microtomia, tendo sido possível obter ténias com uma qualidade e rapidez semelhante à conseguida com os tecidos fixados em formol. No entanto, deve ser tido em conta que a amostra estudada corresponde a carcinomas mamários, a maioria dos quais apresentam acentuada reacção desmoplásica do estroma, que pode contribuir para a dita retracção. É o nosso objectivo avaliar este parâmetro em neoplasias mais “medulares”.

Os resultados obtidos na avaliação microscópica mostram que a qualidade dos tecidos fixados em GreenFix[®] é semelhante (tempo de fixação de 72 horas) ou superior (tempo de fixação de 24 horas) à obtida pela fixação em formol. A morfologia dos tecidos, encontrada nos dois tempos de fixação, foi semelhante para os dois fixadores, resultado já descrito em estudos com fixadores à base de glioal para tempos de fixação entre as 6 e as 24 horas (Lassalle et al, 2009; Titford et al, 2005; Umlas et al, 2004). Contudo, foi possível constatar por observação microscópica, que o GreenFix[®] não leva a uma retracção homogénea, provocando, na maioria das amostras, um certo grau de distorção tecidular, a qual não é detectada macroscopicamente.

As características do núcleo são um factor importante para a diferenciação de lesões benignas e malignas, assim como no prognóstico dos carcinomas mamários. A fixação em GreenFix[®] fornece um bom detalhe nuclear e intensidade da coloração nuclear, o que permite um aumento da sensibilidade do diagnóstico. Este achado vai de encontro aos resultados obtidos em estudos com fixadores a base de glioal (Lassalle et al, 2009; Titford, M; 2005).

Relativamente às características citoplasmáticas, a fixação em GreenFix[®] confere um aumento do detalhe e da intensidade da coloração do citoplasma relativamente ao conferido pelo formol, independentemente do tempo de fixação. Contudo, o prolongamento da duração da fixação em GreenFix[®] leva a uma perda da eosinofilia, que pode ter importância no diagnóstico de certas variantes de carcinoma mamário. Esta característica foi previamente observada por Dapson *et al*, para o fixador glioal, para tempos de fixação diferentes dos estudados (Dapson, 2007b).

Pelo exposto, o GreenFix[®] é um potencial fixador alternativo ao formol. No entanto, é necessário efectuar o mesmo estudo com outros tipos de tecidos, bem como estudos imunocitoquímicos e de biologia molecular, para averiguar se o GreenFix[®] constitui uma alternativa viável ao fixador de rotina, o formol.

AGRADECIMENTOS

Um ilustre agradecimento ao Professor Doutor Rui Henrique, Director do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, E.P.E., por disponibilizar os meios necessários para a realização deste estudo, particularmente as amostras biológicas.

Um particular agradecimento à Dra. Sandra Alves, à Dra. Marisa Suarez e à Dra. Filipa Vieira pelo apoio prestado na análise estatística, análise microscópica e laboratorial, respectivamente.

Um último agradecimento à Vidrolab2 por ter cedido o GreenFix[®] para a realização do estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boenisch T (2006). Heat-induced Antigen Retrieval: What Are We Retrieving? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54: 961–964.
- Buesa, R.J. (2008). Histology without formalin. *Annals of Diagnostic Pathology*, 12: 387-396.
- Dapson RW (2007a). Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotechnic & Histochemistry*, 82: 133-140.
- Dapson, R.W. (2007b) Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval. *Biotechnic & Histochemistry*, 82: 161-166.
- Guellec, S., Lacroix-Triki, M., Delord, J.P., Allal, C.B., Rochaix, P. (2009) Les nouveaux fixateurs tissulaires. *Revue Francophone des Laboratoires*, 408: 25-32.
- Grizzle, W., Fredenburgh, J., Myers R. (2008) Fixation of Tissues. In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. (6th edition). Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Hauptmann, M., Lubin, J.H., Stewart, P.A., et al (2003). Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries. *J Natl Cancer Inst*, 95:1615-23.
- Hofman, P. (2009) Quels fixateurs? Pour quelles indications? Principaux critères d'évaluation des méthodes alternatives à la fixation par le formol. *Revue Francophone des Laboratoires*, 408: 45-48.
- Horobin, R.E. (2008) How do Histological Stains Work? In: Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. (6th edition). Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Lassalle, S., Hofman, V., LLie, M., Gavric-Tanga, V., Brest, P., Havet, K., et al. (2009). Assesment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid Cancer and Nodule*, 19:1239-249
- O'Leary, T.J., Fowler C.B., Evers D.L., Mason J.T. (2009) Protein fixation and antigen retrieval: chemical studies. *Biotechnic & Histochemistry*, 84: 217–221.
- The International Agency for Research on Cancer (IARC). (2004). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxy-2- propanol. Vol 88.
- Titford, M. & Horenstein, M. (2005). Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology. *Arch Pathol Lab Med*, 129:502-506
- Umlas, J. & Tulecke, M. (2004). The Effects of Glyoxal Fixation on the Histological Evaluation of Breast Specimens. *Human Pathology*, 35: 1058- 1062.
- Woods, A.E., & Ellis, R. C. (1994). *Laboratory Histopathology: A Complete Reference*: Vol. 1. Edinburgh: Churchill Livingstone.