

PROTOCOLLI DI FISSAZIONE E COLORAZIONE ISTOLOGICA CON REAGENTI A BASSA TOSSICITA'

Note tecniche per gli istologi appassionati

Lorenzo Conti, Milano¹

Introduzione

L'appassionato che voglia "lanciarsi" nella preparazione casalinga di preparati istologici deve fare i conti con il reperimento, uso, conservazione e smaltimento di sostanze chimiche che sono o potrebbero essere tossiche/cancerogene oppure irritanti/sensibilizzanti.

La routinaria preparazione dei vetrini istologici in un servizio ospedaliero di Anatomia Patologica comporta i seguenti passi:

1. fissazione del pezzo anatomico in formalina tamponata
2. disidratazione mediante la usuale scala ascendente degli alcoli (50%-70%-99%-alcolol assoluto)
3. chiarificazione² e impregnazione del pezzo con xilolo o toluolo (entrambe solventi della paraffina)
4. inclusione in paraffina o sostanze plastiche (resine acriliche tipo cianoacrilato, metilisocianato o metilmelacrilato, resine epossidiche tipo Araldite, ecc.)
5. taglio microtomico (od ultramicrotomico per la TEM – Trasmitted Electron Microscopy)
6. colorazione con coloranti istologici per microscopia a luce trasmessa od elettronici per la TEM – Trasmitted Electron Microscopy (tetrossido di osmio³, acetato di uranile⁴, piombo citrato, molibdato di ammonio, ecc.)
7. montaggio del coprioggetti⁵ mediante impiego di sigillanti trasparenti dispersi in toluolo o xilolo.

Tutto questo viene fatto ogni giorno in ospedale per diagnosticare malattie o anomalie dei tessuti.

Molte sostanze utilizzate in istologia sono tossiche, irritanti⁶ od ancora sensibilizzanti per reazioni allergiche da contatto; i rischi relativi all'uso professionale di reagenti in ambito istologico sono di varia natura e gravità'.

- **Azione cancerogena/mutagena:** La formalina tamponata e' il fissativo standard universalmente utilizzato in ambito istologico; e' una soluzione acquosa al 37% del gas formaldeide, scoperta nel 1859 da Buterlow e successivamente perfezionata da Ferdinand Blum nel 1886, inizialmente ideata quale antisettico per le ferite⁷; la successiva diluizione della formaldeide al 10% in acqua (formalina tamponata) e' utilizzata quasi ovunque per la fissazione/conservazione di tessuti biologici, anche a scopo museale; la formalina e' fortemente sospettata di avere una azione mutagena e cancerogena.⁸⁹ Alcuni coloranti come il giallo di acridina e l'arancio di acridina ed in genere i coloranti di tipo azo (R-N=N-R') o quelli contenenti gruppi aminici¹⁰ sono sospetti mutageni¹¹.

Anche i seguenti reagenti¹² per istologia sono fortemente sospettati di cancerogenicità:

Arsenico	Crystal violet
Auramina O	DAB (diamino-benzidine)
Fucsina basica/pararosaniline/Rosso base 9	Dimethyl formamide
Benzene	Dioxane
Coloranti a base di benzidina	Formaldeide
Nero di Chlorazol	Composti del Piombo
Cloroformio	Composti del Nickel
Sali di Cromo (acido cromico, dicromato di potassio)	Ossido di Propilene
Rosso Congo	Pyridine

- **Incendio/esplosione di materiale infiammabile:** in alcuni casi esiste il rischio di incendio od esplosione come ad esempio per l'uso dei solventi apolari, infiammabili anche a basse temperature di innesto¹³. Alcuni reagenti istologici, che potrebbero dare reazioni esplosive in particolari condizioni di conservazione (acido picrico^{14 15} esano, etere etilico), debbono essere maneggiati e conservati con particolare cura. Alcuni reagenti per istologia sono volatili, anche a bassa temperatura, e in caso di inclusione e montaggio del coprioggetti con xilolo o toluolo i vapori prodotti dalla manipolazione del vetrino sono tossici ed infiammabili¹⁶. L'etere etilico e la benzina rettificata (esano-miscela di isomeri) sono volatili a bassa temperatura e formano nubi di vapori infiammabili, non visibili, che si spandono nell'ambiente e vagano per metri sul pavimento¹⁷... Lo smaltimento improprio dei reagenti nella rete fognaria provoca danni ambientali; nel caso di solventi particolarmente volatili (etere etilico, toluolo, alcool assoluto anidro, esano, acetone) esiste un rischio di accumulo di vapori infiammabili nelle tubature.
- **Azione caustica:** Acidi forti come l'acido cloridrico, nitrico o solforico concentrato esplodono e schizzano dappertutto se diluiti in modo incongruo;¹⁸ L'acido acetico al 100% e' comunque caustico, anche, se di fatto, e' uno dei componenti dell'aceto. L'acido ossalico e l'acido fosfotungstico, sono tossici¹⁹ e blandamente caustici.
- **Tossicita' acuta e cronica:** dal punto di vista tossicologico una sostanza puo' dare effetti immediati (anche per una sola esposizione) -tossicita' acuta, effetti che di solito compaiono entro 14 giorni dalla assunzione²⁰, mentre la tossicita' cronica e' conseguente alla prolungata esposizione al composto, spesso con una piu' tardiva e sfumata comparsa dei sintomi²¹.

In ambito istologico alcune sostanze sono tossiche²² anche per livelli minimi di dispersione in aria o per contatto; i livelli di tossicita' per esposizione professionale in laboratorio (durata media di 8 ore di lavoro – TLV-TWA²³) per il tetrossido di osmio, il nitrato d'argento e il potassio dicromato e l'acido picrico sono di poche parti per miliardo²⁴. Questo deve fare riflettere perche' in assenza di sistemi di aspirazione ed evacuazione dei vapori/gas facilmente si raggiungono simili concentrazioni.

Megan Cartwright - 2013 I dieci “cattivi” del laboratorio – cosa vi possono fare?	
Cloroformio	Questo solvente volatile puo' irritare la cute, gli occhi ed i polmoni. Agisce inoltre come anestetico capace di deprimere il sistema nervoso centrale. Una volta penetrato nell'organismo viene convertito a fosgene, un gas altamente tossico usato come arma chimica nella prima guerra mondiale.
Formaldeide	Questo comune fissativo e' sospettato di essere un carcinogeno umano. Puo' causare dermatiti, sinusiti, asma.
Alcool metilico	Come altri solventi volatili il metanolo puo' facilmente entrare nell'organismo tramite i polmoni, la pelle, il tubo gastroenterico. Una volta penetrato nel corpo il metanolo si trasforma in acido formico che puo' causare acidosi metabolica ²⁵ e tossicità sulla retina sino a cecita'.

Figura 1 - da Megan Cartwright - Ten Bad Chemicals In The Lab and What They Do To You! -
<http://bitesizebio.com/10470/ten-bad-chemicals-in-the-lab-and-what-they-do-to-you/>
(modificato)

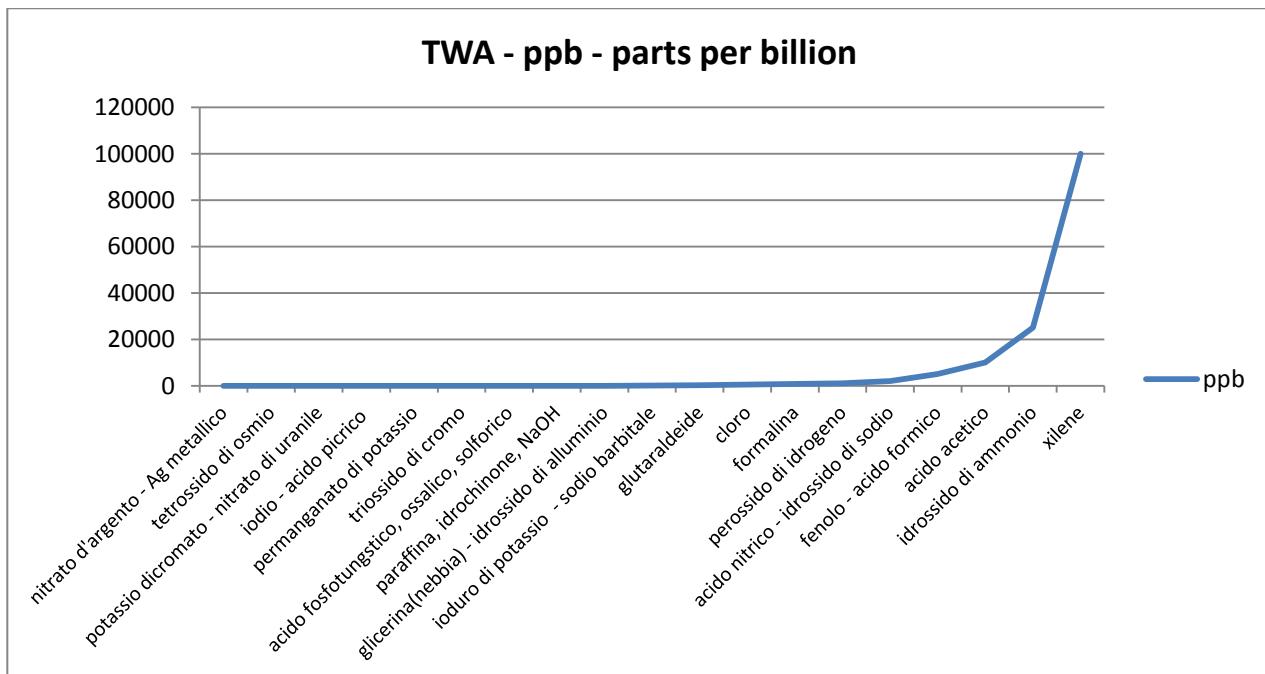


Figura 2 René J. Buesa: Histology safety: now and then - Annals of Diagnostic Pathology 11 (2007) 334–339 (modificato)

Per quanto attiene alla “microscopia per appassionati” Il web e' pieno di ricette per la preparazione e colorazione di preparati istologici che sono letteralmente “copiate” da protocolli professionali i quali, a differenza delle ricette per le torte o per la pizza, prevedono dei rischi; se utilizzate in laboratorio esse comportano l'uso di cautele e l'adozione sistemi di protezione individuali, cappe aspiranti, strumentazioni automatiche remotizzate, sistemi di evacuazione dei vapori e gas, sistemi di estintori a pioggia, smaltimento sicuro dei rifiuti, che sono difficilmente applicabili a casa propria. Dotazioni ritenute indispensabili in un reparto di Anatomia Patologica, quali guanti antitaglio, grembiuli impermeabili, maschere facciali, scarpe antinfortunistiche ed altro ancora non sono sempre disponibili a scuola o a casa. Adsorbenti chimici in polvere, utili in caso di sversamento, mezzi di barriera/contenimento delle perdite e macchine per il lavaggio automatico delle attrezature di laboratorio sono presenti in quasi tutti i laboratori, ma chi ne dispone a casa?

In caso di accidentale sversamento dei prodotti chimici, l'appassionato potra' probabilmente contare su mezzi di raccolta casalinghi, quali uno straccio, segatura o carta asciugamani, che andranno probabilmente a finire in pattumiera o nel water dopo la raccolta del liquido sversato. In Ospedale il taglio delle parti anatomiche fissate in formalina avviene con l'ausilio di sistemi di aspirazione dei vapori di formalina e anche il travaso della formalina da bidone a bidone avviene in locali separati e con operatori protetti da DPI (dispositivi di protezione individuale). I liquidi infiammabili sono conservati in armadi a prova di fiamma e in ambienti dotati di estintori automatici a pioggia. Il professionista ha sempre a disposizione dei DPI (dispositivi di protezione individuale) e adsorbenti che sono stati studiati per neutralizzare od inertizzare tutti i reagenti comunemente presenti in laboratorio. Lo smaltimento dell'adsorbente e' a cura della stessa ditta che gestisce lo smaltimento delle sostanze chimiche, quindi verra' manipolato da personale opportunamente addestrato. Le docce oculari, in caso di accidentale entrata di prodotti chimici nell'occhio, sono dotazione di routine in un ambiente di laboratorio.

Da quanto sopra evidenziato appare ovvio che sarebbe meglio che l'appassionato si astenesse da usare composti tossici o cancerogeni, anche in piccola quantita'. L' appassionato che voglia prepararsi dei vetrini biologici da osservare al microscopio non dovrebbe fare affidamento sui protocolli di fissazione-colorazione disponibili sul web, perche' essi sono destinati a professionisti che hanno a disposizione mezzi e conoscenze utili ad ovviare a eventuali problemi creati dalla manipolazione dei reagenti, a meno che non disponga delle medesime attrezzature di sicurezza di un laboratorio. Sul web esistono vere e proprie "encyclopedie"²⁶ delle innumerevoli colorazioni istologiche oggi effettuabili in laboratorio; i dati sono destinati ai professionisti, come ben specificato nella pagina di benvenuto, ma ovviamente sono di libero accesso.

Accade anche che i siti di divulgazione scientifica per hobbisti "copino" i protocolli di fissazione/colorazione destinati ai professionisti senza alcuna modifica. Alcuni esempi di "cattivi consigli" reperibili sul web (si omette il nome del suggeritore... per ovvi motivi) sono:

- Uso dell'alcool metilico (tossico) per la fissazione degli strisci ematici da colorare con May Grunwald Giemsa (MGG) o con coloranti fluorescenti
- Uso di xilene²⁷, toluene o benzene (tossici) per la chiarificazione, inclusione e montaggio del coprioggetto²⁸
- Uso del cloroformio (cancerogeno, hepatotossico, volatile) nella fissazione dei pezzi anatomici mediante fissativo di Carnoy
- Uso della formalina tamponata o non tamponata (cancerogena, irritante, sensibilizzante per allergie) per la fissazione dei pezzi anatomici
- Uso di sali di cromo, mercurio, fenolo come fissativi (tossicita' acuta e cronica)
- Uso del giallo od arancio di acridina (sospetti mutageni) per la fluorescenza
- Uso dell'acido picrico o della glutaraldeide (tossici) per la fissazione
- Uso di toluolo o xilolo (tossici) per la pulizia delle lenti del microscopio dall'olio da immersione e dal balsamo del canada

I dati di letteratura: reagenti a bassa tossicita' per uso professionale

In ambito professionale si e' cercato da tempo di ovviare alla tossicita' dei reagenti per istologia introducendo solventi e reagenti atossici o a bassa tossicita'. Anche in conseguenza dell'uso professionale di reagenti tossici si sono realizzati macchinari automatici per la fissazione, colorazione, montaggio del coprioggetti che sono remotizzabili e gestibili a distanza dall'operatore o addirittura in assenza di un

controllo umano. Molte procedure di laboratorio automatizzate sono realizzate di notte, quando in laboratorio non c'e' nessuno, non solo per avere i vetrini pronti la mattina seguente ma anche per eliminare una possibile fonte di malattia professionale. Tutti i professionisti che utilizzano reagenti chimici tossici o nocivi sono costantemente invitati ad usare i DPI (dispositivi di protezione individuale) previsti dalla normativa e sono obbligati a sottoporsi ad esami ematochimici e visite periodiche finalizzate a ricercare segni clinici di tossicita' cronica o di eventuale malattia professionale. L' appassionato invece opera in casa, spesso in bagno od in cucina, non avendo alcuna protezione e magari smaltendo i residui nella rete fognaria.

I reagenti atossici o poco tossici sono presenti sul mercato da decenni. Paradossalmente le "ricette" di istologia per appassionati sono le piu' pericolose perche' sono tratte da vecchi volumi impolverati e quindi non suggeriscono (proprio perche' vecchie) l'uso dei piu' recenti reagenti disponibili sul mercato.

Le fasi della preparazione di un vetrino per la microscopia ottica sono sotto elencate:

- 1. Fissazione del tessuto**
 - a. Decalcificazione**
- 2. Disidratazione, Chiarificazione, Inclusione in paraffina od inclusione in materie plastiche**
- 3. Taglio al microtomo o all'ultramicrotomo (TEM)**
- 4. Sparaffinazione delle fette**
- 5. Reidratazione**
- 6. Colorazione istologica in luce trasmessa ed in fluorescenza**
- 7. Disidratazione e impregnazione con solventi del montante del coprioggetto**
- 8. Montaggio del coprioggetto**

1) Fissazione del tessuto

Un pezzo anatomico, se lasciato a se stesso a temperatura ambiente, tenderebbe a marcire. Gli enzimi contenuti nei vacuoli cellulari e i batteri/muffe presenti nell'ambiente ne farebbero scempio in breve tempo, alterando in modo irreversibile la struttura che desideriamo osservare al microscopio. Ne consegue che la piu' importante azione orientata alla conservazione della citostruutura e' quella di "bloccare" l'evoluzione autolitica e putrefattiva del campione.

La fissazione e' quel processo che permette di conservare a tempo indefinito la struttura cellulare e tissutale del preparato. Le modalita' con cui un fissativo agisce sono le seguenti²⁹³⁰³¹:

- Alcune molecole inducono la formazione di legami trasversali (cross-link) tra le proteine insolubili, agendo anche sulle proteine solubili, creando legami intra ed intermolecolari tra proteine, proteine e DNA e all'interno degli stessi acidi nucleici . Formaldeide e Glutaraldeide agiscono in questo modo e sono definiti "fissativi additivi"³² – non coagulanti" perche' apportano molecole cross-linkanti
- Un altro modo per fissare i tessuti e' sottrarre acqua alle cellule, portando ad una precipitazione e coagulazione delle proteine. Alcool ed acetone sono agenti disidratanti ad azione fissativa di tipo coagulativo.

Il fissativo di routine piu' impiegato in assoluto nel laboratorio istologico e' la formalina tamponata, stabilizzata con alcool metilico per prevenire la formazione di polimeri. Essa e' gravemente sospettata di avere un effetto cancerogeno³³, e' irritante su cute e mucose, sensibilizza la cute alle allergie da contatto ed

ha la pessima abitudine di emettere vapori irritanti sulle vie aeree³⁴. L'odore pungente e' alquanto sgradevole e spesso induce lacrimazione e tosse. Da molti anni le industrie chimiche del settore stanno proponendo soluzioni fissanti che non abbiano gli stessi svantaggi della formalina, ma tutt'ora in istologia la formalina regna sovrana; molti fissativi prodotti dall'industria chimica e pubblicizzati come atossici sono venduti a bidoni, e di solito sono accessibili solamente ai professionisti, anche per via della problematica di acquisto all'ingrosso e fatturazione. La ricerca di sostituti atossici della formalina, acquistabili dal comune cittadino in modica quantita ed a basso prezzo, appare quindi deludente; la ricerca dei possibili sostituti richiede fantasia ed ingegno!

I marchi commerciali dei fissativi "atossici" proposti dall'industria sono numerosi; poiche' in genere sono coperti da brevetto (e poiche' di solito non sono facilmente ottenibili dagli appassionati in quantitativi limitati) essi non vengono citati nel presente articolo³⁵.

I fissativi "no brand" attualmente proposti al professionista come alternativa alla formalina e citati nella letteratura scientifica sono:

- Alcool etilico al 70% tamponato con tampone fosfato³⁶
- Miscele di alcool etilico, metilico e isopropilico³⁷
- Carnoy (alcool+cloroformio+acido acetico) o fissativo di Clarke³⁸
- Methacarn di Puchtler³⁹ (soluzione di metanolo, acido acetico, cloroformio)⁴⁰
- Acido acetico al 5%⁴¹
- Gliossale^{42 43} (o ethanediale) + alcool
- Acetone a 4°C⁴⁴
- Cloruro di cetilpiridinio (di solito associato a formalina tamponata)⁴⁵
- Zinco cloruro al 2-5%⁴⁶, spesso in miscele fissative, come sostituto meno tossico del mercurio cloruro
- Soluzione satura di sodio cloruro in forno a microonde⁴⁷
- Sodio cloruro in polvere⁴⁸
- Sodio cloruro in soluzione satura⁴⁹
- Miele^{50 51 52 53} e miscela di miele 20% + alcool 70% + acido acetico 10%⁵⁴
- Honey and Jaggery⁵⁵ (miele e zucchero di palma non raffinato),
- Melassa e zuccheri grezzi^{56 57 58}
- Gommalcacca in soluzione alcolica (Shellac alcoholic fixative solution)⁵⁹

Miscela di Carnoy 2⁶⁰ o Fluido di Clarke^{61 62}

- Alcool 100% 75 mL (od anche alcool 95%)
- Acido Acetico glaciale 25 mL

Preparare poco prima dell'uso – fissazione in poche ore per preparati in striscio sottile

La miscela di Carnoy originale (Carnoy 1) prevede l'uso del cloroformio oltre all'acido acetico e all'etanolo; Il cloroformio, composto che sino agli anni 40-50 veniva usato come anestetico inalatorio, non e' privo di tossicità; la sua tossicità sul fegato, rene⁶³, la sospetta cancerogenicità e la possibilità di scatenare aritmie durante l'anestesia chirurgica ha fatto sì che tale farmaco venisse del tutto abbandonato nelle sale operatorie.

Fissare adeguatamente un pezzo non e' cosa facile; la fissazione con solo alcool etilico (70%) determina una distorsione del pezzo^{64 65} ed un eccessivo indurimento al taglio microtomico. Anche l'acetone refrigerato a 4°C determina distorsione del pezzo. L'acido acetico al 5% puo' essere usato come fissativo in se', ma raramente viene usato da solo.⁶⁶ La miscela Carnoy sembra invece essere un fissativo adeguato per ottenere fette sottili di tessuto biologico.⁶⁷

Soluzioni alternative preparabili estemporaneamente: Anche i laboratori professionali non sempre si affidano alla industria chimica per ottenere fissativi alternativi alla formalina. In ambito professionale sono presenti "ricette" per la sostituzione "no brand" della formalina in laboratorio con preparati all'uopo autoprodotti⁶⁸; in un articolo scientifico e' citata la preparazione di una miscela fissativa di Polietilenglicole, alcool etilico, glicerolo e acido acetico + Tris⁶⁹ HCl tampone, una miscela di alcool etilico e gliossale, una miscela di zinco cloruro e zinco acetato, una di zinco cloruro e zinco trifluoroacetato;

I risultati ottenuti con tali preparazioni estemporanee sono stati ritenuti buoni sia dal punto di vista morfologico che immunoistochimico se comparati con le rispettive preparazioni prodotte dalla industria chimica. Altre preparazioni estemporanee in laboratorio sono:

- Preparazione estemporanea di una miscela fissativa simile a quelle del commercio: alcol etilico (65%-75% w/v), acqua distillata, glicerolo, polivinil alcool e carboidrati monomerici.⁷⁰
- Preparazione estemporanea di una miscela di Sali di zinco (zinco trifluoroacetato, zinco cloruro, zinco acetato e calcio acetato tamponata da Tris HCl 0.1 Molare)⁷¹

La fissazione del tessuto avviene sostanzialmente per due fenomeni: una denaturazione/coagulazione delle proteine⁷² ad opera di alcool, cloruro di mercurio, triossido di cromo, acido picrico, e una fissazione non coagulativa⁷³ (per formazione di ponti e legami intramolecolari ed intermolecolari nelle proteine del tessuto ad opera del fissativo)⁷⁴ da parte della formalina tamponata, tetrossido di osmio, bicromato di potassio, acido acetico.⁷⁵

Mezzi fisici: Anche i mezzi fisici, quali il calore o il freddo, sono utilizzati per la fissazione. Per la sezione di tessuti in istologia estemporanea (esame del vetrino mentre il paziente e' ancora in sala operatoria ed il chirurgo attende una rapida risposta dal patologo, per sapere come proseguire con l'escissione dei tessuti patologici) la rapida refrigerazione a bassa temperatura viene usata sia come metodo di taglio microtomico senza inclusione, sia come metodo di fissazione. Anche il calore puo' essere utilizzato come metodo di fissazione. In passato la fissazione di strisci batterici su vetrino "alla fiamma"⁷⁶ e la fissazione di sezioni sottili di tessuto (1-2mm) in acqua bollente per 1 minuto era stata proposta come metodo di fissazione rapida, specie per la colorazione di Gram e per le biopsie mammarie⁷⁷. Per utilizzare il calore quale metodo di fissazione oggi si preferisce usare un forno a microonde da laboratorio⁷⁸ e i metodi di fissazione mediante irraggiamento a microonde di solito raccomandati sono i seguenti (unicamente per sezioni sottili o piccoli pezzi biotecnici non eccedenti i 3 cm di spessore)⁷⁹:

1. "stabilizzazione con microonde" a cui puo' seguire una vera e propria fissazione con metodi chimici oppure una inclusione senza ulteriore fissazione – i pezzi sono immessi in soluzione fisiologica od altra soluzione isotonica e sottoposti ad irraggiamento a microonde per un breve periodo di tempo. Immediatamente dopo i pezzi sono inseriti in soluzione di etanolo al 70% - la temperatura di fissazione deve essere superiore a 60°C per potere essere efficace.
2. "fissazione assistita in microonde" con fissativi comuni – il pezzo e' immerso in formalina od altro fissativo e viene sottoposto ad irraggiamento con microonde. I prodotti specifici per uso in microonde contengono gliossale e non contengono formalina, cio' per ridurre i vapori nocivi.

I tempi e le temperature di fissazione in forno a microonde (forno professionale per laboratorio, non forni per uso casalingo!) variano a seconda dei fissativi utilizzati e a seconda del tipo di forno e del tipo di camera di processamento; molti siti di produttori di forni a microonde per uso professionale forniscono tempi e modalita' di fissazione ma essendo questi legati al tipo di forno e di camera di processamento appare inutile riportare i singoli protocolli di fissazione. A scopo informativo si riportano alcuni dati reperiti sul web⁸⁰ (attenzione! i fissativi citati nello schema seguente sono tossici).

Fissativo	Potenza (watt)	Tempo di fissazione (totale)	Vuoto
Glutaraldeide	150W	1 sec.	si
Formalina o Karnowsky ⁸¹	Primo step a 150W poi secondo step a 650W	1 sec poi 20 sec	si
Tetrossido di osmio	Primo step a 100W pi secondo step a 100W	6 sec poi 8 sec	si
Formaleide (TEM)	650W	40 sec	si

Sfortunatamente per l' appassionato i tempi sopra riportati sono relativi a forni professionali che hanno un sistema di dispersione uniforme delle microonde, camere di processamento disposte in modo accurato rispetto la fonte di irraggiamento, assenza di hot spots (punti caldi) generati dall'emettitore di microonde e sistemi di selezione della potenza irradiata. Un forno a microonde casalingo infatti eroga sempre la potenza massima possibile, ma la variazione della potenza totale avviene frazionando in "periodi" di tempo/irraggiamento il tempo totale di emissione delle microonde durante il programma cottura prescelto dall'operatore. I forni a microonde per uso professionale variano invece la potenza irradiata a prescindere dal tempo prescelto per il processamento. La irradiazione nei forni casalinghi non e' uniforme e vi sono zone di maggiore riscaldamento. Nei forni professionali da laboratorio, alcune camere ripiene di acqua sono poste vicino o attorno ai campioni da processare, per assorbire indesiderate distribuzioni zonali delle microonde; di solito la irradiazione avviene sotto vuoto oppure con sistemi di evacuazione dei vapori.

Secondo alcuni Autori^{82 83 84}, anche i forni a microonde per uso casalingo possono essere usati per la fissazione di tessuti a fini di microscopia, purché adeguatamente calibrati.

"...Both domestic and laboratory devices can be used to perform many of the procedures in a routine histology laboratory, but safety, reproducibility, and sample quality are important considerations when selecting the best device for your operation. The frequency of 2.45 GHz was selected for household microwave ovens because it is the frequency at which polar molecules, especially water molecules, respond strongly and the microwaves maintain good strength even at great depth. This capability is essential for cooking food and is also practical for histology laboratory work. Domestic microwave oven is quite economical than the laboratory oven and gives almost the same results as that of the latter one. Calibration of domestic ovens is essential for optimum results and the accuracy of the temperature probe, duration of cycle time, and net power levels at various settings must be determined before the oven is used to process tissues, where in the laboratory ovens are preprogrammed for various procedures..." "...Unlike domestic microwave ovens, the laboratory microwave oven does not produce hotspots or uneven heating in tissues due to the presence of magnetic stirrer kept beneath which provides an even field of irradiation. Toxic and flammable solvent vapors generated during processing cannot always be adequately vented from domestic ovens and present an ignition hazard if the electrical system is unprotected, unlike laboratory ovens wherein adequate ventilation is created for the escape of fumes..."⁸⁵

Va sottolineato pero' che, per ottimizzare la fissazione, il forno casalingo deve essere "calibrato" andando a ricercare la posizione degli hot spot presenti all'interno della camera del forno, proprio perche in questo tipo di forno l'irraggiamento non e' uniforme.

Vari protocolli di “calibrazione”⁸⁶ sono stati proposti, sia mediante l’uso di lampade fluorescenti per la ricerca degli hot spot sia mediante un “agar-saline-Giemsa tissue phantom” per la ricerca dei punti di maggiore irradiazione all’interno dei campioni introdotti nella camera del forno. Un protocollo professionale di verifica degli hot spot in forni a microonde per istologia viene qui riportato⁸⁷:

Neon Bulb Array.

Because our eyes can not sense microwaves, they appear invisible to us. A Neon Bulb Array is a tool that indirectly shows the nonuniformity of microwave power in a microwave oven. In principle, microwave irradiation increases the kinetic energy of the neon gas molecules. The neon bulbs glow orange where the microwave power is high enough to ionize the gas molecules (~5 mw/cm²). The neon bulb array is useful for determining the areas of uniform power, cycle time, and magnetron warm-up time in a microwave oven.

The Agar-Saline-Giemsa tissue phantom.

Agar-Saline-Giemsa tissue phantoms are used to simulate the size, shape, and absorbance characteristics of biological specimens to verify that the microwave oven will uniformly heat the specimens. Small agar phantoms (1 cm x 0.5 cm² blocks or 2 cm diameter by 0.3 cm thickness discs) that contain 0.002% commercial Giemsa stain are added to molten 2% agar in 0.9% sodium chloride. The Giemsa dyes respond to microwave heating by showing different colors at different temperatures. When ASG tissue phantoms are irradiated in an optimized microwave cavity, they show a uniform color change.

La calibrazione “casalinga” di un forno a microonde commerciale puo’ essere fatta con oggetti che evidenzino “visivamente” la posizione degli hot spot (punti caldi) all’interno della camera di irraggiamento; un metodo divertente e’ quello di disporre nella camera del microonde un piatto di pyrex con numerosi marshmallows o pezzi di cioccolato - quelli che fondono per primi sono localizzati sui punti caldi del forno- il vantaggio di tale tecnica e’ che dopo il test i dolci non bruciati si possono anche mangiare!⁸⁸

Per dare una ulteriore idea di come procedere per una fissazione casalinga con un forno a microonde commerciale si riportano i tempi e le temperature di fissazione indicati in alcuni articoli degli anni 80-90 già citati in bibliografia. (attenzione! i fissativi citati nello schema seguente sono tossici). Negli anni 90 infatti molti laboratori iniziavano una pionieristica ricerca sulla fissazione con microonde utilizzando i forni “per uso di cucina” disponibili a quei tempi.

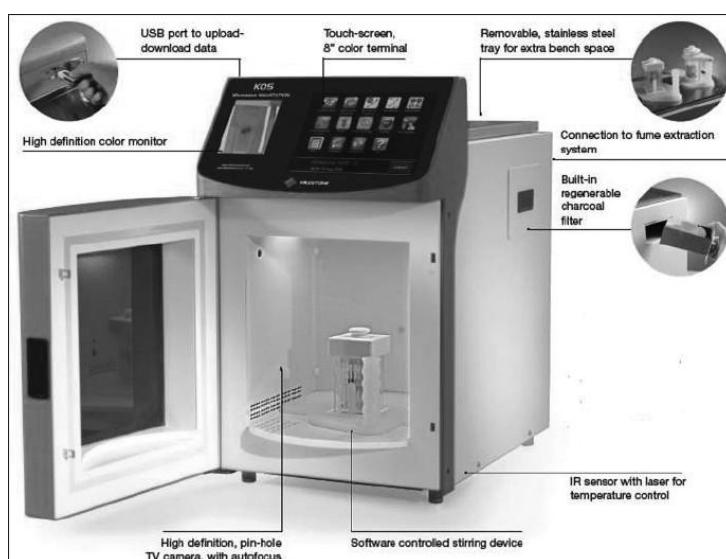


Figura 3 – tratto da Basavaradhy Sahukar Shruthi , Palani Vinodhkumar , Bina Kashyap , Padala Sridhar Reddy - Use of microwave in diagnostic pathology Journal of Cancer Research and Therapeutics Year : 2013 | Volume : 9 | Issue : 3 | Page : 351-55

Autore	Tipo di forno Tipo di camera di irraggiamento	Fissativo	Potenza (watt)	Tempo di fissazione	T° C	Vuoto
Heumann H G - Microwave-stimulated glutaraldehyde and osmium tetroxide fixation of plant tissue: ultrastructural preservation in seconds - Histochemistry (1992) 97:341-347	Sharp R-5975	5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 and 1% osmium tetroxide in veronalacetate buffer, pH 7.2.	microwave oven at power level 50 W, 6.5 ml of fixative solution, final	irradiation times between 32-34 s,	temperature between 40 ° C and 47 ° C	no
<u>Kayser K, Stute H,</u> <u>Lübcke J, Wazinski U,</u> Rapid microwave fixation -a comparative morphometric study. <i>Histochem J.</i> 1988 Jun- Jul;20(6-7):347-52.	commerciale	Tris buffer; buffered formalin (0.5%, 1%, 7%); 0.1 mol NaCl; distilled water; DMSO (1%, 10%, 20%); acetone (10%); methanol (50%, 80%, 100%); glutaraldehyde (2.5%)				no
Gary R. Login, and Ann M. Dvorak, - Microwave Energy Fixation For Electron Microscopy J Pathol 1985, 120:230- 243	Forno commerciale – Amana Radarange model RR- 8B (Amana Refrigeration, Inc., Amana, Iowa), A 300-ml water load preheated to the fixation temperature was placed in the left rear corner of the MW chamber.	Karnovsky Gruppo di controllo; Acqua distillata e Hank's buffered salt solution			Water and HBSS: Specimens were heated between 40 C and 55 ± 5 C in 6-9 seconds in a commercial MW oven. Karnowsky; Specimens were heated to 50 C in 15 seconds in a commercial microwave oven.	no
M E Boon, E Marani,I P J M Adriolo, J W Steffelaar G Th A M Bots,T L P Kok Microwave Irradiation Of Human Brain Tissue:Production Of Microscopic Slides Within One Day J Clin Path 1988;41 :590-593	Two types of microwave ovens were used: the domestic Miele oven M696 and the prototype microwave oven, designed especially for use in pathology laboratories (Model H2500; Polaron, Watford, UK).	The method comprises two hardening steps (microwave steps I and 2), and two fixation steps (one soaking step, and microwave step 3). formalin	The power setting was 25% (indicated as 150 W on the display of the Miele oven).	Our experiments showed that five minutes of microwave treatment of the formalin soaked tissue gives optimal fixation.	The temperature was programmed for 50°C.	no

Un altro metodo che utilizza un microonde per uso casalingo, senza sensore di temperatura ed evacuazione dei vapori (Bajaj microwave oven, model no: 2003 ETB) e' quello descritto da Kumar H et al⁸⁹ del dipartimento di patologia del "Dr. D. Y. Patil Medical College" a Pune, India. Il forno utilizzato e' un modello commerciale venduto in India, con le seguenti caratteristiche; 230 V, AC, 50 Hz, power input-1200 W (microwave), power output-800 W, Frequency 2450 MHz.

I reagenti (tranne la paraffina) sono scaldati in microonde con una potenza impostata del microonde al 40%, verificando la temperatura del reagente mediante un termometro a mercurio (ovviamente interrompendo la erogazione delle microonde ad ogni misurazione). I reagenti sono posti all'interno di normali beakers da laboratorio.

Il protocollo di fissazione, utilizzato nello studio di Kumar, e' ispirato ad un precedente lavoro di Kango e Deshmukh (Kango PG, Deshmukh R S. Microwave processing: A boon for oral pathologists. J Oral Maxillofac Pathol 2011) che a loro volta avevano utilizzato un modello di forno per uso casalingo (National microwave oven -Matsushita electric industrial Co Ltd, Made in Japan; Model no.: NN - 5208; Serial no.: N 09130085; Input- 1180 W, 5.2 A, 240 V, 50 Hz; Output- 600 W, 2450 MHz.)

Da notare come gli Autori abbiano avuto l'accortezza di porre vicino al beaker contenente i reagenti un beaker piu' grande (da 600 ml) contenente acqua; questo per assorbire le microonde riflesse e diminuire i rischi di un sovra riscaldamento dei reagenti.⁹⁰ La temperatura dei reagenti e' stata misurata ad intervalli regolari.

Kumar H et al. 2014				Kango et al 2011			
Bajaj microwave oven, model no: 2003 ETB				National microwave oven Model no. NN - 5208			
REAGENTE	TEMPO	TEMPERATURA	POTENZA	REAGENTE	TEMPO	TEMPERATURA	POTENZA
Alcool etilico 80%	10 min	Non riportata	40%	Alcool etilico 100%	15 min	45-58°C	I primi 5 minuti potenza bassa poi 10 min potenza media
Alcool etilico 100%	15 min	Non riportata	40%	Cloroformio	15 min	45-58°C	I primi 5 minuti potenza bassa poi 10 min potenza media
Alcool etilico 100%	15 min	Non riportata	40%	Paraffina	15 min	45-58°C	Primi 5 minuti potenza media poi 10 min potenza bassa
Cloroformio	5 min	Non riportata	40%				
Cloroformio + paraffina	5 min	Non riportata	40%				
Paraffina	5 min	Non riportata	40%				
Beaker da 250 ml e da 100 ml				Beaker da 600 ml e da 200 ml			

A commento di quanto sopra va sottolineato che questi protocolli sono proposti per un uso professionale in ambito istopatologico, utilizzando reagenti potenzialmente tossici (cloroformio) e volatili⁹¹.

a. Decalcificazione⁹²

I pezzi anatomici ricchi di calcio (osso, dente, ecc.) non possono essere tagliati con un comune microtomo a lama e quindi il pezzo anatomico deve essere privato del calcio. Il decalcificante puo' essere inserito nel fissativo, in modo da "saltare" una fase della preparazione del vetrino, oppure puo' essere applicato al tessuto gia' fissato in una seconda fase. La decalcificazione dell'osso avviene di solito mediante preparati contenenti EDTA o con soluzioni di acidi deboli o forti. La azione delcacidificante dell'EDTA (acido etilendiamminotratacetico) avviene per chelazione degli ioni calcio dalla superficie dei cristalli di idrossiapatite che formano l'osso. Le soluzioni acide contengono sino al 10% di acido nitrico o cloridrico, ma sono anche disponibili decalcificanti a base di acidi organici (acido formico). Non ci sono evidenze di tossicita' per EDTA se maneggiato in modo opportuno.

2) Disidratazione, Chiarificazione, Inclusione in paraffina od inclusione in materie plastiche

Il pezzo anatomico, una volta fissato, deve essere incluso in una sostanza che possa fungere da supporto meccanico per la parte anatomica che si deve tagliare (altrimenti il tessuto si deformerebbe sotto l'azione della lama, strappandosi). La lama del microtomo, per quanto estremamente tagliente, applica una forza tangente⁹³ al pezzo durante il suo procedere, esercitando una "compressione" sul pezzo che senza un "sostegno" da parte della paraffina provocherebbe strappi nel tessuto, specie se questi e' duro e fragile. Per

l'inclusione nella routine istologica vengono utilizzate cere sintetiche sviluppate appositamente dalla industria chimica (paraffine istologiche) che hanno temperature di fusione calibrate e resistenza variabile al progredire della lama da taglio. Le paraffine sintetiche sono inoltre ottimizzate per avere un'ottimale distensione della fetta nel bagno stendi fette.

Per includere un pezzo in un blocco di paraffina bisogna che il pezzo stesso sia del tutto privo di acqua; poiché il tessuto proviene di solito dalla fissazione in una soluzione acquosa di formaldeide (formalina) l'acqua presente nel pezzo deve essere rimossa completamente. Da qui il termine disidratazione⁹⁴. La eliminazione dell'acqua dal pezzo si ottiene di solito immergendolo per un tempo variabile⁹⁵ in una serie di soluzioni alcoliche a sempre minore contenuto di acqua sino all'alcool assoluto anidro.

La cosiddetta chiarificazione⁹⁶ consiste nella immersione, sino a che il pezzo sia totalmente intriso, in solventi per la paraffina; di solito il solvente utilizzato per la chiarificazione è il toluene o lo xilene, ma toluene e xilene sono tossici^{97 98}

Tossicita' dello xilolo (xylene)⁹⁹

Lo xilene è composto da una miscela di isomeri (m-xylene 40-65%, p-xylene 20%, o-xylene 20%) e da etilbenzene (6-20%) oltre che da altri solventi apolari in tracce (toluene, trimetilbenzene, fenolo, tiofene, piridina e sulfuro di idrogeno). In USA la Occupational Safety and Health Administration consente la esposizione del lavoratore a vapori di xilene in quantità non superiore a 100 ppm per un turno di lavoro di 8 ore (TLV-TWA). L'effetto tossico acuto dello xilene è soprattutto a carico del sistema nervoso centrale, con depressione della funzione cerebrale e comparsa di cefalea, stordimento, capogiri, vertigine, nausea e vomito. La esposizione cronica a vapori di xilene porta a cefalea, irritabilità, depressione, insonnia, agitazione, estrema stanchezza, tremori, difficoltà di concentrazione ed effetti sulla memoria a breve termine. Per livelli ambientali di 200 ppm compaiono irritazione di occhi, naso, gola, polmoni e difficoltà respiratoria. A livelli ancora maggiori si hanno compromissioni di fegato e rene, ma di solito compare prima una depressione del SNC (sistema nervoso centrale). Il contatto cutaneo con xilene determina secchezza della cute, dermatiti, irritazioni locali. Lo xilene è sospettato di determinare effetti fetotossici e mutageni.

Le misure preventive da adottare sono:

- 1) sostituzione con solventi meno tossici
- 2) ventilazione dei locali ed evacuazione dei vapori
- 3) uso di DPI (dispositivi di protezione individuale).

Senza dubbio la eliminazione dello xilene e la sua sostituzione con solventi meno pericolosi è la strada più sicura.

I prodotti sostitutivi più frequentemente utilizzati appartengono alle seguenti classi chimiche:

- Limonene
- Idrocarburi alifatici
- Idrocarburi aromatici
- Oli minerali

Di seguito si riporta una tabella che mostra la tossicità acuta e cronica dei principali solventi da laboratorio¹⁰⁰

Composti	Tossicità acuta	Tossicità cronica
Xilene	Congiuntivite, irritazione cutanea e nasale, eccitazione e poi depressione del SNC	Epatotossicità'
Toluene	Eccitazione del SNC e poi depressione	Danni cerebellari
Benzene	Eccitazione del SNC e poi depressione	Anemia aplastica e rischio di indurre leucemia
Cloroformio	Depressione del SNC ed aritmie cardiache	Danno epatico e renale da intermedio di metabolizzazione (foscene) – sospetto di cancerogenicità'
N-Esano (benzine rettificate)	Eccitazione del SNC e poi depressione	Neuropatia periferica, cardiotossicità',

Il livello massimo accettabile di xilene nell'aria per una esposizione professionale di 8 ore/die in laboratorio (TLV-TWA)¹⁰¹ è di 100 parti per milione.

I sostituti possibili dello xilene o toluene impiegati in laboratorio per la chiarificazione ed inclusione in paraffina sono:

- N-eptano¹⁰²
- 1,1,1 tricloroetano (in forno a microonde) come sostituto non infiammabile dello xilene¹⁰³
- Butildecanoato (Estisol 220)¹⁰⁴
- Solventi derivati dal petrolio¹⁰⁵ come kerosene, Shell X3B7122, Shellsol 1626
- Paraffina liquida¹⁰⁶
- Tricloroetano (1,1,1 trichloroethane (1,1,1 TCE), present in Inhibisol; 1,1,1 TCE and perchloroethylene components of CNP30 and Histosol; and trichloroethylene)¹⁰⁷
- Terpeni e terpenoidi¹⁰⁸
- D limonene¹⁰⁹
- Oli minerali tipo Drakeol 7 e Lukoil I 20° (Penreco, USA)¹¹⁰
- Isopropanolo^{111 112}
- Histosol¹¹³
- Miscela di 86% di olio vegetale e 14% di N eptano¹¹⁴
- Cedarwood Oil¹¹⁵ (olio di legno di ginepro della Virginia)
- Olio di oliva e/o cocco¹¹⁶
- Olio di oliva, carote, pino e rose¹¹⁷
- Olio minerale rettificato^{118 119}
- Propilene glicol metil etere (PGME)¹²⁰
- Miscela di olio minerale, alcool etilico e isopropilico¹²¹
- Miscela di olio minerale e alcool metilico¹²²
- Miscela di acetone e petrolio bianco¹²³
- Alcani – idrocarburi alifatici a catena lineare oppure idrocarburi isoparaffinici a catena ramificata od ancora idrocarburi naftenici (nafta, gasolio, petrolio bianco, Stoddard¹²⁴ Solvent, White Spirit¹²⁵, ecc.)

I preparati atossici oggi proposti dall'industria chimica per la inclusione in paraffina e sparaffinazione sono numerosi e altrettanto numerosi sono i nomi commerciali con cui vengono venduti. Alcuni di essi sono

miscele di idrocarburi alifatici + D limonene + emulsificanti + butilidrossianisolo (antiossidante); altri sono composti da solo terpene (D limonene o limonene miscela di isomeri DL); altri sono composti da acqua + surfactanti+ terpene, altri ancora da sole catene alifatiche di idrocarburi.¹²⁶

Alcuni solventi per la chiarificazione e sparaffinazione proposti dall'industria contengono alcani; la maggior parte deriva da nafta purificata a caldo; sono sostanzialmente idrocarburi naftenici, alifatici e isoparaffine¹²⁷

Paraffine¹²⁸

Le paraffine per uso istologico derivano dal petrolio e sono di solito addizionate di sostanze che ne modificano il punto di fusione e le caratteristiche di taglio (maggiore o minore durezza e tendenza a formare il nastro durante il taglio al microtomo¹²⁹). Le paraffine istologiche più moderne hanno additivi¹³⁰ che migliorano la distensione delle fette dopo taglio, la adesione delle fette al vetrino, la "tagliabilità" a spessori di pochi micron. L'appassionato potrebbe avere difficoltà a reperire la paraffina per uso istologico, almeno in quantitativi limitati.

Sul web sono presenti "ricette" per ottenere una discreta paraffina da taglio aggiungendo alla comune paraffina per candele della cera d'api purificata^{131 132}. La "ricetta" più sofisticata è quella di una miscela di paraffina al 95% e cera d'api al 5% (purificata mediante bollitura in acqua) a cui aggiungere un 10% di acido stearico¹³³.

La paraffina istologica non è tossica, ma gli additivi ed i solventi capaci di scioglierla possono esserlo. Poiché per includere un pezzo anatomico in paraffina bisogna che esso sia chiarificato ed impregnato in un solvente della paraffina (o delle sostanze plastiche in caso si voglia utilizzare un mezzo di inclusione più duro per il taglio ultramicrotomico), appare ovvio che anche la inclusione in paraffina possa sviluppare vapori tossici od irritanti se questa è contaminata da xilolo. L'inclusione del pezzo in paraffina (dopo che il pezzo è stato disidratato con alcool e chiarificato con xilolo/xilene, toluolo/toluene o altri solventi apolari) comporta l'immersione in paraffina fusa a temperature intorno ai 56-58°C. A queste temperature i solventi organici evaporano dando luogo a vapori irritanti o tossici. Evaporano altresì additivi e sostanze varie aggiunte alla paraffina.

Per quanto riguarda la inclusione in materie plastiche, la sostanza stessa od i suoi additivi e le sostanze utilizzate per la polimerizzazione della sostanza stessa possono essere tossiche, nocive od irritanti; anche in questo settore la letteratura scientifica sta proponendo soluzioni a minore tossicità.¹³⁴

3) Sparaffinazione delle fette

La fettina appena tagliata al microtomo deve essere privata della paraffina prima di potere colorare il tessuto perché i coloranti dissolti in acqua non potrebbero penetrare nel tessuto permeato dalla paraffina stessa (che come molti derivati del petrolio è idrofobica).

Anche in questo caso la tecnica "classica" prevede la immersione in xilolo per poter asportare la paraffina ancora adesa alla fetta appena tagliata al microtomo. Sostituti dello xilene sono gli idrocarburi alifatici, le isoparaffine, le miscele olio minerale/idrocarburi alifatici, le misture acqua+saponi per piatti alla temperatura di 90°C.¹³⁵ Riassumendo, le alternative di laboratorio allo xilolo presenti in letteratura sono:

- Miscela di alcool isopropilico e olio minerale¹³⁶
- Miscela di alcool etilico e olio minerale¹³⁷
- Uso di detergente per piatti in acqua distillata a 90°C^{138 139 140 141}

4) Colorazione istologica in luce trasmessa ed in fluorescenza

Colorazioni per luce trasmessa

Una fettina di tessuto sottoposta a fissazione e taglio microtomico, inclusa in paraffina, diafanizzata e montata su vetrino dopo l'eliminazione della paraffina stessa, se osservata al microscopio in luce trasmessa (senza l'utilizzo delle ben note tecniche di intensificazione del contrasto - contrasto di fase, DIC, campo scuro, ecc.) appare biancastra. Agli albori della microscopia gli scienziati si resero conto che un preparato "a fresco" o fissato ma non colorato non evidenziava molti dettagli e quindi non era del tutto ideale per un' approfondita indagine istologica ed anatomica. Nella seconda metà del 1800¹⁴² vennero introdotti i coloranti sintetici nel tentativo di aumentare il contrasto del preparato e per cercare di evidenziare le strutture istologiche non evidenti nel preparato diafanizzato; inizialmente essi erano limitati ai coloranti animali e vegetali allora disponibili (ematossilina, cocciniglia) ma l'avvento dell'industria chimica delle tinture per i tessuti (anilina) apri' l'orizzonte all'uso dei moderni coloranti istologici come oggi li conosciamo.

I coloranti istologici sono numerosi e al giorno d'oggi sono quasi tutti prodotti di sintesi. Raramente sono utilizzati da soli, ma spesso sono associati tra loro in metodiche di colorazione codificate da un nome preciso che le rende riconoscibili (Van Gieson, Gomori, Papanicolau ecc.). Di solito un colorante colora preferibilmente una componente cellulare/tissutale mentre un altro colorante evidenzia le altre strutture non colorate dal primo. In alcuni casi si associano anche quattro o cinque coloranti diversi (colorazione tricromica, quadricromica, pentacromica). Ogni metodica di colorazione (ne esistono numerosissime) e' utilizzata specificamente per evidenziare una data struttura/sostanza e molte colorazioni "classiche" riportano accanto al nome dell'ideatore il target di colorazione (Weigert per fibre elastiche, Masson per il connettivo, Giemsa per Helicobacter ecc.). Ne deriva che la scelta del metodo di colorazione dipende da quale struttura cellulare/subcellulare od ancora tissutale debba essere messa in evidenza. Nelle metodiche immunoistochimiche un colorante legato ad uno specifico anticorpo si leggerà a strutture cellulari (contro le quali e' stato prodotto l'anticorpo a cui e' "attaccato" il colorante) che si vogliono di volta in volta evidenziare.

Come già detto, la maggior parte dei coloranti per istologia deriva dalle aniline, coloranti sviluppati ad inizio del secolo per la tintura di stoffe e per lo sviluppo di farmaci sulfamidici¹⁴³. Le aniline sono classificate come composti tossici e sospetti cancerogeni¹⁴⁴.

La metodica di base, utilizzata per una prima "lettura" del preparato nei servizi di Anatomia Patologica, e' la classica colorazione Ematossilina Eosina (EE)¹⁴⁵. Se ben colorato un preparato in EE (Ematossilina Eosina) evidenzia pressoché tutte le strutture presenti, dando un primo orientamento sulla citostruttura e sulla anatomia microscopica del tessuto. La metodica Ematossilina Eosina si basa su di un colorante basico, la ematossilina¹⁴⁶, che ha affinità per le strutture acide (DNA-RNA, proteine della membrana cellulare, elastina, ecc.) ed un colorante acido, la eosina, che colora le strutture basiche della cellula, come le proteine citoplasmatiche, i mitocondri, il collagene, ecc. La ematossilina viene estratta dal legno di Campeggio (*Haematoxylon campechianum*) per bollitura¹⁴⁷. Il composto così ottenuto viene ossidato (con sali di iodio o mercurio) ad emateina ed ulteriormente stabilizzato con glicerina. La ematossilina tuttavia svolge il proprio potere colorante solo se associata ad un mordente; i mordenti più usati sono i sali di ferro e di alluminio, più raramente i sali di cromo, rame e l'acido fosfotungstico. Differenti sali metallici danno colorazione diversa, ma solitamente le ematossiline usate per la colorazione Ematossilina Eosina sono mordenzate con sali di alluminio, prendendo il nome di allume-ematossilina o emallume.

La colorazione con ematossilina puo' avvenire per sovra colorazione e successiva differenziazione¹⁴⁸ (metodo regressivo)¹⁴⁹ oppure per colorazione senza differenziazione e osservazione del preparato sino ad ottenimento di un tono di colore adeguato (metodo progressivo). Per motivi di tempo e praticita' solitamente si preferisce sovra colorare il preparato e poi "togliere" l'eccesso di colorante differenziando sino a risultato ottimale.

Le formulazioni della ematossilina sono varie decine¹⁵⁰ e prendono il nome dall'inventore. Le soluzioni ematossiliniche emalluminiche più usate in istologia¹⁵¹ sono:

1. Ematossilina di Mayer;
2. Ematossilina di Harris;
3. Ematossilina di Delafield;
4. Ematossilina di Carazzi;
5. Ematossilina di Ehrlich.
6. Ematossilina di Weigert;
7. Ematossilina di Heidenhain.

La ematossilina ferrica di Heidenhain colora oltre ai nuclei anche i contorni cellulari, i mitocondri, e le fibre muscolari striate e di solito si usa senza controcolorazione con eosina.

La colorazione citoplasmatica nella Ematossilina Eosina e' data dalla Eosina Y o tetrabromofluoresceina. Puo' essere in formulazione alcolica o acquosa. Anche per l'eosina vale la regola di colorare progressivamente osservando ogni volta il risultato ottenuto o sovra colorare e poi differenziare regressivamente¹⁵².

Emallume di Mayer (1896)	Emallume di Harris (1900)	Ematossilina di Gill (1974) ¹⁵³
Metodo regressivo	Metodo regressivo	Metodo progressivo
Portare le sezioni all'acqua	Portare le sezioni all'acqua	Portare le sezioni all'acqua
Immergere in ematossilina 5 minuti	Immergere in ematossilina 5 minuti	Immergere in ematossilina 3 minuti
Risciacquare in acqua di rubinetto	Risciacquare in acqua di rubinetto	Risciacquare in acqua di rubinetto
Differenziare in alcool acidificato (HCl 0,5-1% in etanolo 70%)	Differenziare in alcool acidificato (HCl 0,5-1% in etanolo 70%)	
Portare al blu con acqua di rubinetto od acqua e 0,1% ammoniaca	Portare al blu con acqua di rubinetto od acqua e 0,1% ammoniaca	Portare al blu con acqua di rubinetto od acqua e 0,1% ammoniaca
Colorare con eosina	Colorare con eosina	Colorare con eosina
Disidratare con etanolo; poi montare	Disidratare con etanolo; poi montare	Disidratare con etanolo; poi montare

Una metodica piu' semplice e rapida e' la seguente¹⁵⁴:

- sezioni in H₂O distillata
- Emallume acido di Mayer, filtrato (7')
- Lavare in H₂O corrente (10')
- Eosina [0.25 %], acidificata con qualche goccia di acido acetico (1')
- lavare in H₂O distillata (2')
- disidratare in etanolo 95° (4')
- disidratare in etanolo 100° (4') (*3 cambi*)
- chiarificare in xilolo (*3 cambi*)
- montare in mezzo d'inclusione

La Ematossilina Eosina non viene considerata dal Center for Disease Control and Prevention USA un colorante pericoloso.¹⁵⁵ Una ricerca bibliografica circa la esistenza di veri rischi per la salute correlati con l'uso di coloranti istologici non ha dato risultati, forse anche per il fatto che oggi nei reparti di anatomia patologica vengono estesamente utilizzati coloratori automatici che escludono il contatto diretto dell'operatore col colorante.

Colorazione con processazione in microonde

Anche il processo di colorazione puo' essere accelerato e facilitato¹⁵⁶ ponendo il vetrino in microonde. In realta' l'appassionato di microscopia non dovrebbe avere necessita' di accelerare i tempi di colorazione, perche', a differenza del patologo, egli non deve dare risposte rapide ai propri "pazienti"... Inoltre non va dimenticato che la qualita' di colorazione dei tessuti ottenibile con metodi rapidi e' di solito inferiore a quella dei metodi tradizionali. Tuttavia poiche' la colorazione del tessuto si basa sulla penetrazione del colorante all'interno del tessuto, la irradiazione con microonde accelera tale processo rendendo possibili colorazioni complesse in tempi brevissimi.¹⁵⁷

5) Montaggio del coprioggetti

La fetta di tessuto colorata, fatta precedentemente aderire al portaoggetto, deve essere protetta da una lamina sottilissima di vetro (vetrino copri oggetto) se si vuole conservare per lungo tempo il preparato. Il coprioggetto viene fatto aderire in modo permanente al preparato mediante l'apposizione di qualche goccia di un montante specifico, che dissecandosi sigilla tra coprioggetto e portaoggetto la fettina istologica colorata. Ovviamente l'indice di rifrazione del montante deve essere il piu' vicino possibile a quello del vetro (1,53). In passato il montante piu' utilizzato era il balsamo del canada¹⁵⁸ ma, a causa della propria autofluorescenza¹⁵⁹ e per via dell'ingiallimento e della progressiva acidificazione col passare del tempo, oggi tende a non essere piu' usato. I prodotti sostitutivi oggi sono numerosi¹⁶⁰. Il vetrino e la fetta colorata dovranno essere imbibite di un solvente (storicamente lo xilene, oggi il limonene) prima di introdurre le gocce di montante, al fine di diluirlo e renderlo piu' fluido e al fine di permettere la adesione uniforme del copri oggetto senza interposizione di bolle d'aria¹⁶¹. L'industria propone oggi montanti disciolti in limonene che evitano l'uso di xilolo come solvente del montante stesso. Anche in questo caso numerosi preparati "casalinghi" sono stati proposti^{162 163} per far aderire in modo permanente il copri oggetto al preparato.

Cosa usare?

Come si e' visto, i prodotti chimici a bassa tossicita' disponibili per un'attivita' non professionale nel campo dell'istologia in microscopia ottica sono numerosi. Inoltre molti di essi sono di facile reperibilita' e di basso costo. Il problema principale dell'appassionato, oltre alla possibile tossicita' dei prodotti, e' infatti la difficolta' di accedere a forniture di laboratorio che normalmente non sono vendute ai privati, o che anche nel caso siano vendute, sono usualmente fornite in quantita' eccessive per un uso casalingo.

Con la speranza di fare cosa gradita ai colleghi "istologi in casa propria" riporto in dettaglio i protocolli di fissazione, chiarificazione-inclusione e colorazione che sono reperibili nella letteratura scientifica.

1. Fissazione del tessuto

Miele

La miscela miele, alcool 70% ed acido acetico¹⁶⁴ e anche il miele puro^{165 166} sembrano essere un ragionevole sostituto della formalina. La formula che sembra essere piu' completa e' quella che addiziona miele al 20% della miscela ad alcool 70% ed acido acetico, in quanto sembra aggiungere all'effetto fissativo del miele la stessa formula del Carnoy 2. Anche il solo miele (secondo alcuni autori preferibilmente il miele filtrato e depurato da possibili inquinanti) in soluzione acquosa al 5-20% e' in grado di fissare adeguatamente i tessuti in un lasso di tempo di 24 ore¹⁶⁷.

Sodio cloruro

Sia in forma di polvere che di soluzione satura¹⁶⁸ il comune sale da cucina sembra essere un fissativo adeguato^{169 170} alla preservazione dei tessuti biologici. La preparazione di una soluzione satura di sodio cloruro e' alla portata di tutti e si ottiene sciogliendo 360g di sale in 1 litro di acqua distillata.¹⁷¹ La fissazione avviene in 24 ore.¹⁷²

Altre sostanze

Sarebbe interessante valutare l'effetto del cetilpiridinio, disinettante appartenente alla classe dell'ammonio quaternario, come fissativo istologico. Tale prodotto e' normalmente utilizzato nei collutori orali antiplacca alla concentrazione dello 0,045-0,1%¹⁷³, ma non esistono riferimenti bibliografici ad un suo uso "da solo" o in preparazioni per la igiene orale nella fissazione dei tessuti biologici a fini microscopici. Di solito in laboratorio non e' usato da solo, ma in associazione con la formalina 10% per la fissazione professionale dei preparati. Volendo evitare l'uso della formalina per la fissazione, esso andrebbe usato da solo.

Fissazione in microonde

Come gia' detto il microonde casalingo presenta il problema di una non uniforme distribuzione dell'irraggiamento e della impossibilita' di variare la emissione di potenza (watt), che e' sempre massima. Un ulteriore problema e' quello della mancanza di una sonda di temperatura da immergere nella soluzione, per evitare di superare la temperatura ottimale di fissazione che e' intorno ai 50-55°C. Tuttavia varrebbe la pena di provare a fissare i pezzi in soluzione satura di cloruro di sodio in microonde, associando l'azione del calore a quella fissativa del cloruro di sodio concentrato. Attenzione ad usare l'alcool al 100% in un forno casalingo senza evacuazione dei vapori infiammabili!

2. Chiarificazione, Inclusione in paraffina od inclusione in materie plastiche

Il limonene rappresenta “il meglio”, anche per i laboratori professionali; e’ facilmente reperibile sul mercato in taniche da 5 litri tra i prodotti del restauro di opere di antiquariato o come solvente di vernici e lacche, od ancora tra i prodotti della pulizia di superfici. Ha un costo non irrisorio, ma bisogna considerare che il consumo per un uso hobbistico e’ modesto.

Le paraffine ad uso istologico non sono facilmente reperibili; La “ricetta” proposta dalla letteratura scientifica consiste nel miscelare un 95% di paraffina e 5% cera d’api purificata mediante bollitura in acqua, a cui va aggiunto un 10% di acido stearico¹⁷⁴. Omettere l’acido stearico, in caso di irreperibilita’, comporta un lieve peggioramento della qualita’ di taglio. Un trucco facilmente applicabile e’ quello di raffreddare costantemente la superficie di taglio del blocchetto da inclusione con un cubetto di ghiaccio prima di iniziare a tagliare a spessore voluto. Una raccomandazione presente sul web e’ quella di utilizzare paraffine il piu’ possibile pure, anche quelle destinate alla fabbricazione hobbistica di candele decorative, ma comunque pure.

3. Sparaffinazione delle fette

La miscela sapone per piatti ed acqua alla temperatura di 90°C sembra essere un efficace sostituto dello xilene; peraltro il limonene, avendolo gia’ a disposizione per la chiarificazione ed inclusione, svolge egregiamente il suo lavoro anche per la sparaffinazione delle fette gia’ applicate al portaoggetti.

4. Colorazione istologica in luce trasmessa ed in fluorescenza

Le metodiche di colorazione “classiche” sono numerose e non facilmente sostituibili da prodotti alternativi, soprattutto perche’ sono funzionali alla evidenziazione di componenti tissutali e cellulari con metodiche di colorazione preordinati e riconosciuti da tutti gli istologi. Come gia’ detto la colorazione con Ematossilina/Eosina non viene considerata procedura a rischio dal CDC di Atlanta (“...Hematoxylin stain is not hazardous under Environmental Protection Agency regulations...”)¹⁷⁵. L’eosina viene oggi introdotta in prodotti disinfettanti da banco per uso umano che hanno sostituito il mercurocromo per via della tossicità dei sali di mercurio. Non cosi’ si puo’ dire di altri coloranti, specie quelli di tipo azo (R-N=N-R’) o quelli contenenti gruppi aminici¹⁷⁶, classificati come mutageni o cancerogeni¹⁷⁷ tra cui Auramina O, Fucsina basica, Ponceau 2R, Rosso Congo, Coloranti a base di Diaminobenzidina, Chlorazol Black E.

Esistono quindi coloranti atossici che l’ appassionato puo’ utilizzare a casa propria? La colorazione delle fette con tali coloranti fornisce all’osservatore dati chiari sulla composizione del tessuto e sulla citoarchitettura paragonabili ai metodi classici? Nel tentativo di rispondere a questa domanda si sono indagate le fonti web per trovare soluzioni alternative alle colorazioni istologiche tradizionali.

1. **Colorazione eosina/blu di metilene**¹⁷⁸: in questo articolo degli anni 20 sono riportate varie metodiche utili per colorare strisci o sezioni in paraffina. Una in particolare viene raccomandata per la colorazione di sezioni di tessuto biologico in paraffina (ad esempio tessuto nervoso).

Metodica di Lim	
Soluzioni	Tempi e metodo
Eosina 1% in alcool	Sparaffinare le fette
Blu di metilene soluzione acquosa 1%	Alcool 100%
	Porre nella soluzione alcolica di eosina per 1 minuto
	Lavare con acqua distillata o di rubinetto
	Porre nella soluzione acquosa di blu di metilene per 1 minuto
	Lavare con acqua; le fette devono apparire rossastre
	Asciugare il vetrino lasciando umido il solo tessuto biologico
	Sciacquare in alcool assoluto sino a differenziazione – se le fette non dovessero essere sufficientemente differenziate ripetere il lavaggio in alcool
	Xilolo ¹⁷⁹ e poi montaggio del coprioggetto

2. **Coloranti fluorescenti tratti da frutti, piante e fiori**,^{180 181 182} utilizzati per la colorazione di clamidospore fungine (succhi estratti da *Frangula alnus* – Frangola comune, *Rhamnus catartica* – Spino cervino, *Ribes alpina* – Ribes rosso, *Sambucus racemosa* – Sambuco rosso, *Viburnum trilobum* - Viburno, *Sorbus aucuparia* – Sorbo degli uccellatori, *Beta vulgaris* - Barbabietola)
3. **Coloranti vegetali** per la colorazione del collagene nei tessuti umani (estratto alcolico di *Pterocarpus osun*- Legno paduk, essenza utilizzata comunemente anche per i parquet.)
4. **Coloranti estratti da piante e fiori per la colorazione di sezioni istologiche vegetali**¹⁸³ - *Bixa orellana*, *Curcuma domestica*, *Lonchocarpus cyanescens* e *Pterocarpus osun*
5. **Estratto vegetale di *Pterocarpus Santalinus***¹⁸⁴ per la colorazione di preparati istologici
6. **Estratto alcolico di *Curcuma domestica***^{185 186 187} per la colorazione di tessuti umani
7. **Estratto di *Berberis pachyacantha Kochne*** per la colorazione di tessuti vegetali¹⁸⁸
8. **Estratto di *Curcuma Longa* per la colorazione istologica di sezioni di testicolo**¹⁸⁹
9. **Estratto di Black Plum fruit (*Syzygium cumini* - Jambul)**¹⁹⁰ per la colorazione di epatociti di ratto
10. **Estratto acquoso di corteccia di *Ceratonia Siliqua* (Carrubo)**¹⁹¹ nella colorazione di sezioni di fegato, polmone e rene
11. **Estratto di frutti di Gelso Nero**¹⁹² (*Morus nigra*) per la colorazione di vermi della famiglia *Fasciola* sp.
12. **Estratto di scorza dei frutti di Melograno**¹⁹³ (*Punica Granatum L.*) per la colorazione dei neuroni di ratto
13. **Estratto di Zenzero (*Zingiber Officinalis*)**¹⁹⁴ per la colorazione di fibre muscolari di ratto
14. **Estratto di *Rubia Tinctorum* (Robbia comune)**¹⁹⁵ per la colorazione di sezioni di cervelletto di ratto
15. **Estratti acquosi di piante e fiori per la colorazione di preparati istologici animali e vegetali**¹⁹⁶ (Henna: *Lawsonia inarmis*; Hibiscus: *Hibiscus rosa-sinensis*, Madder: *Rubia tinctorium L.*, Fire flame bush: *Butea monosperma*, Rose: *Rosa indica*, Bougainvillea: *Bougainvillea gala*)
16. **Estratti acquosi ed alcolici di piante e fiori per la colorazione di preparati istologici animali e vegetali**¹⁹⁷
17. **Estratto di frutti di *Melastoma malabathricum* Linn. (rododendro indiano)** per la colorazione di preparati vegetali¹⁹⁸

18. **Uso di estratti di Ibisco**^{199 200 201 202 203} (*Hibiscus Sabdariffa – Karkade’*) per la colorazione di sezioni istologiche di tessuti umani da biopsie
19. **Uso di estratti di Ibisco** (*Hibiscus sabdariffa Linn.*) per la colorazione di tessuti fungini²⁰⁴
20. **Estratto acquoso di fiori di Butterfly Pea** (*Clitoria ternatea L.*) per la colorazione di strisci ematici animali²⁰⁵
21. **Estratto acquoso e alcolico di Lawsonia inermis L. (Henne’)**²⁰⁶ come colorante cellulare della cuticola di cipolla²⁰⁷
22. **Estratto di Ibisco**²⁰⁸ *Hibiscus rosa-sinensis* per la colorazione di sezioni istologiche umane
23. **Estratto di noce di Cola** (*Cola Acuminata*)²⁰⁹ per la colorazione di sezioni istologiche di tessuti di ratto
24. **Metodica di colorazione Ematossilina Eosina e Zafferano**^{210 211 212 213 214 215} (in soluzione alcolica) per la evidenziazione del connettivo

Non va inoltre dimenticato che in farmacia sono reperibili in libera vendita prodotti da banco che potrebbero essere coloranti istologici potenziali, sicuri se utilizzati correttamente. Unica eccezione e' la cosiddetta tintura di iodio, non del tutto priva di tossicità:

- Violetto di genziana
- Blu di metilene
- Eosina (neo-mercurocromo)
- Tintura di Iodio

Come si e' visto, anche a livello professionale esiste il problema di reperire coloranti istologici naturali, sia per la loro minore tossicità, sia per il basso costo e per la facile reperibilità in loco, specie in paesi in via di sviluppo. Poiché, a differenza dei metodi classici di colorazione, tali coloranti vegetali non sono validati da anni di impiego nel settore della routine istologica, la loro efficacia diagnostica rimane ancora da verificare; tuttavia, data la facile reperibilità delle materie prime e la totale atossicità dei preparati, varrebbe la pena di sperimentare un poco, anche per definire l'efficacia nella evidenziazione delle varie strutture tissutali e cellulari. Sicuramente la innocuità delle soluzioni impiegate apporta il vantaggio di un uso casalingo senza pericoli.

Conclusioni

Anche a livello professionale esiste la problematica del reperimento di reagenti e sostanze per uso istologico a bassa tossicità, come dimostrano gli articoli reperiti nelle banche dati di letteratura scientifica. A maggior ragione l'istologo appassionato, lavorando a casa propria o in ambiente scolastico, dovrebbe essere cauto nell'utilizzo e conservazione di sostanze pericolose o tossico/nocive, anche perché in molti casi esistono validi sostituti.

Disclaiming

L'autore non raccomanda alcuna procedura o utilizzo di sostanza chimica citata nel presente articolo; scopo dello scritto e' unicamente informare l'appassionato di istologia delle nuove acquisizioni in tema di allestimento di preparati istologici con sostanze a bassa tossicità. L'utilizzo di qualsivoglia sostanza chimica "a domicilio" richiede cautele ancora maggiori rispetto un suo uso professionale e obbliga l'appassionato ad una corretta manipolazione e smaltimento dei reagenti a fine procedura. L'autore non ha interessi economici nella vendita, commercializzazione o cessione dei preparati o prodotti descritti nel presente articolo.

¹ Lorenzo Conti, Medico Chirurgo specialista in anestesia e rianimazione; avendo un lontano passato di tirocinante in un servizio di anatomia patologica ho mantenuto la passione per la microscopia ottica, preparando a casa i vetrini che amo osservare. La mia frequentazione, per motivi professionali, del Centro Antiveneni di Milano mi ha sensibilizzato alla problematica della tossicità acuta e cronica dei prodotti chimici ad uso domestico ed industriale. Questi presupposti ed una naturale curiosità per le novità in campo scientifico hanno spinto il sottoscritto a scrivere queste note per i microscopisti dilettanti, sperando di fare cosa gradita a chi voglia, come me, nutrire il proprio microscopio di vetrini freschi appena prodotti in proprio.

² Chiarificazione perché il pezzo immerso in xilolo diventa diafano, quasi trasparente, e pertanto cambia di aspetto "diventando più chiaro"

³"... Osmium tetroxide and glutaraldehyde are used as electron microscopy fixatives. Liquid and vapor components are strong fixatives and will quickly fix the skin, mucous membrane and eye tissues of laboratory personnel..." Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories - Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel - <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1.htm>

⁴"... Uranyl acetate, phosphotungstic acid, and ammonium molybdate are used as negative stains in the electron microscopy laboratory. All of these compounds contain heavy metals and are very toxic if inhaled, ingested or introduced through cuts or abrasions. Uranyl acetate is weakly radioactive, and powders need to be kept in a metal container. Phosphotungstic acid is corrosive and causes burns on exposed skin and mucous membranes. Ammonium molybdate is very dangerous in case of eye contact, ingestion, and inhalation..." Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories - Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel - <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1.htm>

⁵ Nei testi "classici" europei il termine anglosassone "montaggio del copioggetto" viene sostituito dal termine "chiusura del vetrino" che in passato veniva eseguito con la tecnica della lutaggio o lutazione - http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/preparati_vegetali.pdf

⁶ Soniya Adyanthaya and Maji Jose- Quality and safety aspects in histopathology laboratory - J Oral Maxillofac Pathol. 2013 Sep-Dec; 17(3): 402–407

⁷ Cecil H. Fox, Frank B. Johnson, John Whiting, And Peter P. Roller - Formaldehyde Fixation - The Journal Of Histochemistry And Cytochemistry - Vol. 33, No. 8, Pp. 845-853, 1985

⁸ "... Carcinogenicity : Formaldehyde is known to be a human carcinogen based on sufficient evidence of carcinogenicity from studies in humans and supporting data on mechanisms of carcinogenesis..." - <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/formaldehyde.pdf>

⁹ ..Harmful Effects on Workers : Formaldehyde is a sensitizing agent that can cause an immune system response upon initial exposure. It is also a cancer hazard. Acute exposure is highly irritating to the eyes, nose, and throat and can make anyone exposed cough and wheeze. Subsequent exposure may cause severe allergic reactions of the skin, eyes and respiratory tract. Ingestion of formaldehyde can be fatal, and long-term exposure to low levels in the air or on the skin can cause asthma-like respiratory problems and skin irritation such as dermatitis and itching. Concentrations of 100 ppm are immediately dangerous to life and health (IDLH)... - https://www.osha.gov/OshDoc/data_General_Facts/formaldehyde-factsheet.pdf

¹⁰ Ratna Padhi BS – Pollution due to synthetic dyes toxicity and carcinogenicity studies and remediation – Int. J. Environ. Sci. 3 (3) 940-955

¹¹ "...Chemicals including chloroform, chromic acid, dioxane, formaldehyde, nickel chloride and potassium dichromate and dyes such as auramine O, basic fuchsin and Congo red are carcinogenic..." - Soniya Adyanthaya et al. - Quality and safety aspects in histopathology laboratory- J Oral Maxillofac Pathol. 2013 Sep-Dec; 17(3): 402–407

¹² Safety in the Histology Laboratory Presented by Clifford M. Chapman - Technical Director - Strata Pathology Services Inc. - One Cranberry Hill Lexington, MA

¹³ Idem

¹⁴ L'acido picrico o 2,4,6 Trinitrofenolo nasce nel 1830 come esplosivo; la sostanza pura, nella forma secca è esplosiva per frizione e percussione. https://en.wikipedia.org/wiki/Picric_acid - rimane tuttavia inerte nella forma idratata

¹⁵ "... Many of the commonly-used organic solvents like diethyl ether, ethyl alcohol, methyl alcohol and acetone have flash points below 21°C and are highly flammable. Some have very low ignition temperatures and can even be ignited on contact with surfaces below red heat. Explosive chemicals are rare in histology, the primary example being picric acid. Certain silver solutions may become explosive upon aging and they should never be stored after use..." . - Soniya Adyanthaya et al. Quality and safety aspects in histopathology laboratory - J Oral Maxillofac Pathol. 2013 Sep-Dec; 17(3): 402–407

¹⁶ Lo xilolo ed il toluolo hanno punto d' infiammabilità, rispettivamente, di 25° e 6° celsius. Il toluolo ha una pressione di vapore di 2,9 Kilopascal alla temperatura di 20°C. - Hans Lyon et al: Non-hazardous organic solvents in the paraffin-embedding technique: a rational approach - Aliphatic monoesters for clearing and dewaxing: butyldecanoate - Histochemistry (1995) 103:263-269

¹⁷ Un mio amico laureato in chimica mi raccontava dell'innesco incendiario di una nube di etere etilico con conseguente accensione del vapore e piccola esplosione in laboratorio durante il travaso del liquido...

¹⁸ Aggiungere acqua all'acido forte è pericoloso perché la reazione esoergonica produce vapore e schizzi di acido ovunque

¹⁹ "... Methanol is toxic; chromic acid, osmium tetroxide and uranyl nitrate are highly toxic..." . - Soniya Adyanthaya et al.- Quality and safety aspects in histopathology laboratory- J Oral Maxillofac Pathol. 2013 Sep-Dec; 17(3): 402–407

²⁰ https://en.wikipedia.org/wiki/Acute_toxicity

²¹ https://en.wikipedia.org/wiki/Chronic_toxicity

-
- ²² Megan Cartwright - Ten Bad Chemicals In The Lab and What They Do To You! - <http://bitesizebio.com/10470/ten-bad-chemicals-in-the-lab-and-what-they-do-to-you/>
- ²³ TLV-TWA (*time-weighted average*): esprime la concentrazione limite, calcolata come media ponderata nel tempo (8 ore/giorno; 40 ore settimanali), alla quale tutti i lavoratori possono essere esposti, giorno dopo giorno senza effetti avversi per la salute per tutta la vita lavorativa. - https://it.wikipedia.org/wiki/Threshold_Limit_Value
- ²⁴ R.J. Buesa: Histology safety: now and then - Annals of Diagnostic Pathology 11 (2007) 334–339
- ²⁵ <http://emedicine.medscape.com/article/242975-overview> - Acidosis Metabolica: una alterazione del pH ematico che determina uno squilibrio del sistema acido base - *Methanol poisoning*: Methanol ingestion is associated with the development of a high-AG metabolic acidosis. Methanol is metabolized by alcohol dehydrogenase to formaldehyde and then to formic acid. Formaldehyde is responsible for the optic nerve and CNS toxicity, while the increase in AG is from formic acid and from lactic acid and ketoacid accumulation. Clinical manifestations include optic nerve injury that can be appreciated by funduscopic examination as retinal edema, CNS depression, and unexplained metabolic acidosis with high anion and osmolar gaps.
- ²⁶ <http://stainsfile.info/StainsFile/jindex.html>
- ²⁷ Kandyala R, Raghavendra SC, Rajasekharan ST. - Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. J Oral Maxillofac Pathol 2010;14:1-5
- ²⁸ "...Xylene and toluene have neurotoxic effects and benzene can affect blood...". - Soniya Adyanthaya et al.- Quality and safety aspects in histopathology laboratory- J Oral Maxillofac Pathol. 2013 Sep-Dec; 17(3): 402–407
- ²⁹ <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-1-the-process-of-fixation-and-the-nature-of-fixatives/>
- ³⁰ John D. Bancroft - Theory and Practice of Histological Techniques – Churchill Livingstone Elsevier edit. 2008
- ³¹ Nancy W. Troiano, Wendy A. Ciovacco, Melissa A. Kacena- The Effects of Fixation and Dehydration on the Histological Quality of Undecalcified Murine Bone Specimens Embedded in Methylmethacrylate - J Histotechnol. 2009 Mar 1; 32(1): 27–31.
- ³² <http://www.histosearch.com/histonet/Aug01/Re.Additivefixatives.html>
- ³³ Occupational Safety and Health Administration (OSHA): Formaldehyde fact sheet. 2002;U.S. Department of Labor.
- ³⁴ B. Dimenstein - A Pragmatic Approach to Formalin Safety in Anatomical Pathology - LABMEDICINE Volume 40 Number 12 December 2009
- ³⁵ Anche allo scopo di evitare un conflitto di interesse, il sottoscritto ritiene di non potere citare nominativi di ditte o di prodotti commerciali che potrebbero ingenerare equivoci circa la neutralità "commerciale" dello scrivente
- ³⁶ Candice Perry et al.- A Buffered Alcohol-Based Fixative for histomorphologic and Molecular Applications - J Histochem Cytochem May 24, 2016
- ³⁷ van Essen HF, Verdaasdonk MA, Elshof SM, de Weger RA, van Diest PJ - Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: influence on immunohistochemistry. J Clin Pathol. 2010 Dec;63(12):1090-4.
- ³⁸ http://www.dako.jp/08066_12may10_webchapter16.pdf - "...There are also many mixtures containing an alcohol (usually ethanol), formalin, acetic acid and 10% to 70% water, often called AFA or FAA or named for their inventors, who include Tellyesniczky (around 1900), Bodian (1930s) and Davidson (1940s). In an AFA mixture the chemical reactions of formaldehyde with proteins are not retarded by buffering to a near-neutral pH. All these alcoholic fixatives contain acetic acid, which produces characteristic patterns of coagulated nuclear chromatin, facilitating the recognition of cell types. Nuclei that have been in NBF for a week or more exhibit less pronounced patterns of chromatin..." .
- ³⁹ http://www.dako.jp/08066_12may10_webchapter16.pdf
- ⁴⁰ <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/fixatives/methacarn.htm>
- ⁴¹ <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/agents/aceticacid.htm>
- ⁴² http://docplayer.it/8426131_La-fissazione-dei-campioni-istologici-a-base-di-glossale-padova-25-26-settembre-2009 corso-di-aggiornamento-per-tecnici-di-laboratorio-biomedico.html
- ⁴³ Dapson RW- Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval. - Biotech Histochem. 2007 Jun;82(3):161-6.
- ⁴⁴ <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/agents/acetone.htm>
- ⁴⁵ John Ernest Scott - Cetylpyridinium Chloride as a Fixative for Glycosaminoglycans in Histologic Sections - Arch Dermatol. 1989;125(7):1002.
- ⁴⁶ http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/agents/zinc_chloride.htm
- ⁴⁷ A. Al-Saraj - Use of saturated sodium chloride solution as a tissue fixative - Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Vol. 24, No. 1, 2010 (53-58)
- ⁴⁸ Olszewski WL, Zolich D, Manokaran G, Tripathi MF- Sodium chloride fixation of tissues under field conditions in tropical countries. -J Immunol Methods. 2004 Jan;284(1-2):39-44.
- ⁴⁹ A. Al-Saraj Use of saturated sodium chloride solution as a tissue fixative Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Vol. 24, No. 1, 2010 (53-58)
- ⁵⁰ Ozkan N, Salva E, Cakalağaoğlu F, Tüzüner B - Honey as a substitute for formalin - Biotech Histochem. 2012 Feb;87(2):148-53-Epub 2011 Aug 23.
- ⁵¹ Lalwani V, Surekha R, Vanishree M, Koneru A, Hunasgi S, Ravikumar S - Honey as an alternative fixative for oral tissue: An evaluation of processed and unprocessed honey. - J Oral Maxillofac Pathol. 2015 Sep-Dec;19(3):342-7. "...Honey has been found to prevent autolysis as tissues put in it for up to 30 days did not show any sign of putrefaction and autolysis. The tissue hardening property makes it similar in action to fixatives which acts by hardening the tissues..."
- ⁵² Amita Singh, Santosh Hunasgi, Anila Koneru, M Vanishree, Surekha Ramalu, Vardendra Manvikar - Comparison of honey with ethanol as an oral cytological fixative: A pilot study - J Cytol. 2015 Apr-Jun; 32(2): 113–117

- ⁵³ Rajanikanth M, Ravi Prakash A, Sreenath G, Sonia Baishyam - NDVN Transit Fixatives: an Innovative Study - Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2015 Mar, Vol-9(3): ZM01-ZM03
- ⁵⁴ Al-Rawahi Y, Al-Hatmi M, Al-Mukhaini N, Al-Hashmi N, El-Hag A and Habbal O - Omani honey as a histological fixative - - College of Medicine and Health Sciences, Sultan Qaboos University, Muscat, Sultanate of Oman - 4th GCC conference for Medical Students Sultan Qaboos University 21-24 January, 2006 – “... a low concentration (20%) of ... honey was used, and additives were incorporated to enhance the rate of tissue penetration (70% alcohol) and to soften the tissues (acetic acid)...”.
- ⁵⁵ Shankargouda Patil, Roopa S. Rao, B. S Ganavi, and Barnali Majumdar - Natural sweeteners as fixatives in histopathology: A longitudinal study - J Nat Sci Biol Med. 2015 Jan-Jun; 6(1): 67–70. “... Equal bits of commercially available animal mucosae were preserved in 30% jaggery, 20% honey, and 10% buffered formalin (control) over 6 months at intervals. Following which, tissues were subjected to routine H and E, special stains - PAS and MT using standard operating procedures established in our group...”
- ⁵⁶ Shankargouda Patil, Premalatha B , Roopa S Rao, Ganavi B - Revelation in the Field of Tissue Preservation – A Preliminary Study on Natural Formalin Substitutes J Int Oral Health 2013; 5(1):31-38. "...Commercially available fresh goat meat (buccal mucosa) was bought and cut into five bits and each bit was placed in five different containers containing 10 % buffered formalin, distilled water, 20% honey, 20% sugar syrup & 30% jaggery syrup..."
- ⁵⁷ Patil S, Rao RS, Ganavi BS, Majumdar B - Natural sweeteners as fixatives in histopathology: A longitudinal study. J Nat Sci Biol Med. 2015 Jan-Jun;6(1):67-70..
- ⁵⁸ gli zuccheri ed il miele a basso pH si decompongono in aldeidi naturali che fissano il pezzo formando ponti molecolari tra gli aminoacidi delle proteine dei tessuti sottoposti a fissazione
- ⁵⁹ Ali Jamal A, Abd El-Aziz GS, Hamdy RM, Al-Hayani A, Al-Maghribi J - The innovative safe fixative for histology, histopathology, and immunohistochemistry techniques: "pilot study using shellac alcoholic solution fixative". Microsc Res Tech. 2014 May;77(5):385-93. doi: 10.1002/jemt.22356. Epub 2014 Mar 13.
- ⁶⁰ <http://www.k-state.edu/wgrc/Protocols/Cytogenetics/fixatives.html>
- ⁶¹ "... Clarke's fluid is a rapid fixative, and a 1-2 mm piece of tissue will usually be fixed within an hour or two, dehydration taking place at the same time. It is generally considered to be better than Carnoy's fluid for general morphology, with good nuclear preservation. It is suitable for smears. It is often used to fix cryostat sections for rapid diagnosis after they have been picked up on slides and before staining with H&E. One minute is usually adequate for this. Sections are either placed into the fixative before drying, or air dried then placed in the fixative. Either appears to be satisfactory..."
<http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/fixatives/clarke.htm>
- ⁶² <http://www.histosearch.com/histonet/Aug02/Re.CarnoysfixativellB.html>
- ⁶³ http://farmacia.unich.it/farmacologia/didattica/tossicologia/dia/solventi_bn.pdf
- ⁶⁴ <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/agents/ethanol.htm>
- ⁶⁵ Alcohol (ethanol or methanol) alone instantly coagulates proteins but causes considerable distortion of the micro-anatomy in pieces of animal tissue. - http://www.dako.jp/08066_12may10_webchapter16.pdf
- ⁶⁶ <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/agents/aceticacid.htm>
- ⁶⁷ Pereira MA, Dias AR, Faraj SF, Cirqueira Cdos S, Tomitao MT, Nahas SC, Ribeiro U Jr, de Mello ES. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. Histopathology. 2015 Feb;66(3):388-97. doi: 10.1111/his.12532. Epub 2014 Nov 10.
- ⁶⁸ Zanini et al. Evaluation of two commercial and three homemade fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible - Environmental Health 2012, 11:59 - <http://www.ehjournal.net/content/11/1/59>
- ⁶⁹ Il tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (o TRIS-HCl) è il sale dell'acido cloridrico e di un amminoalcol. Il TRIS in biochimica, biologia molecolare, microbiologia e per scopi farmaceutici è ampiamente utilizzato per preparare soluzioni tampone. - [https://it.wikipedia.org/wiki/Tris\(idrossimetil\)amminometano_cloridrato](https://it.wikipedia.org/wiki/Tris(idrossimetil)amminometano_cloridrato)
- ⁷⁰ Lily Pal, SK Shankar: Pathology laboratory in Formalin free system – www.pathoindia.com
- ⁷¹ Idem
- ⁷² Laboratory Histopathology - A Complete Reference - Edited by Anthony E Woods Roy C Ellis Churchill Livingstone 1994
https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing
- ⁷³ idem
- ⁷⁴ <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-1-the-process-of-fixation-and-the-nature-of-fixatives/>
- ⁷⁵ ftp://srv-72-160-dhcp-srv.celoria26-16000022-smfn_biodip.unimi.it/VARIE/TIROCINIO%20BIO%20SPER%201415/BIBLIO/metodi/tecniche%20microscopia.pdf
- ⁷⁶ <http://www.ch.unich.it/med/papers/microbiologia/CI%20MICROBIOLOGIA%20MEDICINA%20-%203a%20lezione%20colorazioni.pdf>
- ⁷⁷ <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/fix/fixalternates.htm>
- ⁷⁸ I forni a microonde da laboratorio contengono sonde di temperatura, permettono il controllo graduale della emissione di potenza, hanno sistemi di diffusione delle microonde e dispongono di evacuazione di fumi e vapori.
- ⁷⁹ In alcuni articoli scientifici tuttavia si trova cenno all'utilizzo di un forno a microonde casalingo per la fissazione; l'utilizzo di forni casalinghi avveniva con maggiore frequenza negli anni 80 quando i forni a microonde professionali per laboratorio erano ancora rari; oggi si preferisce utilizzare forni costruiti ad hoc per la istopatologia. Attualmente per fissazioni/colorazioni che emanino vapori o fumi tossici la procedura appare piu' sicura se eseguita in un forno a microonde da laboratorio che dispone sistemi di evacuazione dei fumi e vapori. - Microwave Energy Fixation for Electron Microscopy - Gary R. Login, and Ann M. Dvorak - Am. J Pathol 1985, 120:230-243 "...Specimens were heated to 50 C in 15 seconds in a commercial microwave oven..." - The Histochemical Journal June 1988, Volume 20, Issue 6, pp 347-352Rapid microwave fixation—a comparative morphometric study - K Kayser et al -

A fine structural study of microwave fixation of tissues EC Chew, DJ Riches, TK Lam, HJH Chan - Cell biology international reports Vol 7 Issue 2 pag 135-39 February 1983 - Login GR et al: Application of microwave fixation techniques in pathology to neuroscience studies: a review. J Neurosci Methods. 1994 Dec;55(2):173-82. J Neurosci Methods. 2013 Sep 30;219(1):20-6. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.07.002. Epub 2013 Jul 12. Utilizing commercial microwave for rapid and effective immunostaining. Owens K, Park JH, Kristian T

⁷⁹ <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-5-practical-procedures-to-optimise-quality-the-effects-of-heat-and-microwaves/>

⁸⁰ Ogni ditta produttrice pubblica i propri protocolli di fissazione che dipendono dal tipo di forno e di camera di fissazione; anche le ditte produttrici dei fissativi indicano tempi di fissazione in microonde variabili a seconda del composto chimico in essi contenuto. Non si ritiene opportuno fornire le fonti perche' i tempi di fissazione sono troppo variabili e quindi scarsamente applicabili in campo hobbistico.

⁸¹ Soluzione di Karnovsky: (https://en.wikipedia.org/wiki/Karnovsky_fixative) paraformaldeide, idrossido di sodio, glutaraldeide, tampone sodio cacodilato.

⁸² Basavaradhy Sahukar Shruthi , Palani Vinodhkumar , Bina Kashyap , Padala Sridhar Reddy - Use of microwave in diagnostic pathology Journal of Cancer Research and Therapeutics Year : 2013 | Volume : 9 | Issue : 3 | Page : 351-55

⁸⁴ Basavaradhy Sahukar Shruthi , Palani Vinodhkumar , Bina Kashyap , Padala Sridhar Reddy - Use of microwave in diagnostic pathology Journal of Cancer Research and Therapeutics Year : 2013 | Volume : 9 | Issue : 3 | Page : 351-55

⁸⁴ Kumar H, Kalkal P, Buch A, Chandanwale SS, Bamanikar S, Jain A. Role of microwaves in rapid processing of tissue for histopathology. Med J DY Patil Univ 2014;7:458-62 - "...Bajaj microwave oven, model no: 2003 ETB, serial no: G041MW0710061677, voltage-230 V, AC, 50 Hz, power input-1200 W (microwave), power output-800 W, Frequency 2450 MHz..."

⁸⁵ Idem "... The use of householdmicrowaveovens in the histology laboratory started slowly in 1980's, but today,they are commonly used to perform simple procedures such as specimen stabilization, staining, epitope retrieval, and some decalcification procedures.. However, the lack of control over temperature rise and an inability to maintain the temperature at a constant level in domestic ovens, led to the invention of laboratory-grade microwavedevices.."

⁸⁶ Login GR, Leonard JB, Dvorak AM - Calibration and standardization of microwave ovens for fixation of brain and peripheral nerve tissue. - Methods. 1998 Jun;15(2):107-17. A microwave oven can be calibrated for fixation when the following parameters are standardized: irradiation time; water load volume, initial temperature, and placement within the oven; fixative composition, volume, and initial temperature; and specimen container shape and placement within the oven. Using two recently developed calibration tools, the neon bulb array and the agar-saline-Giemsa tissue phantom, we report a simple calibration protocol that identifies regions within a microwave oven for uniform microwave fixation.

⁸⁷ http://www.ihcworld.com/_faq/histology-faq/fixation/f10.htm

⁸⁸ <http://blog.sciencegeekgirl.com/2009/01/04/things-to-do-in-a-microwave-find-your-microwave-hot-spots/> - Filmato Youtube: <https://youtu.be/SCFOqr9R-LY>

⁸⁹ Kumar H, Kalkal P, Buch A, Chandanwale SS, Bamanikar S, Jain A. Role of microwaves in rapid processing of tissue for histopathology. Med J DY Patil Univ 2014;7:458-62 – "All the reagents were directly heated in the microwave except paraffin. Paraffin was melted on the stove separately and then placed in the microwave. Whereas operating microwave for tissue processing, the microwave oven was set at 40% power. Recording the temperature of the reagents at the interval was done manually using an industrial mercury thermometer..."

⁹⁰ Kango PG, Deshmukh R S. Microwave processing: A boon for oral pathologists. J Oral Maxillofac Pathol 2011- "...The solutions are not covered with the lid because we had two jars: the first jar contained a 200 ml solution (alcohol or chloroform) along with the tissue inside, and the second one contained a water load of 500 ml and placed next to the first jar. In this way, We were able to control the excess heat , which was absorbed by the water..."

⁹¹ "...Xylene has a high boiling point and low microwavability, ie, it will take double the time for the same amount of reagent to get heated. Therefore, in this study, chloroform was used as a clearing agent for microwave tissue processing...." Va notato come gli Autori utilizzino il cloroformio (tossico e volatile) come agente chiarificante per la successiva impregnazione in paraffina. Sarebbe interessante valutare la "tenuta" del protocollo qualora si utilizzare il limonene.

⁹² <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-decalcification/>

⁹³ Ricordiamo che la lama da taglio puo' essere mantenuta perpendicolare all'asse maggiore del pezzo da tagliare, come nel caso dei microtomi rotativi, ma puo' anche essere tenuta anche inclinata ad un angolo variabile nei microtomi a slitta, specie nel caso di pezzi duri e fragili che rischierebbero di sbriciolarsi...

⁹⁴ In realta' nei laboratori la disidratazione con la scala degli alcoli e' solo uno dei vari metodi di disidratazione utilizzati prima della inclusione in paraffina; gli agenti per disidratazione impiegati dai professionisti sono il metanolo, l'isopropanolo, il 2-Ethoxyethanol o cellosolve, il diossano e il polietilenglicole, l'acetone, il tetraidrofuran, il 2,2 dimethoxypropane (DMP) ed il 2,2 diethoxypropane (DEP) ed infine il fenolo. - Laboratory Histopathology A Complete Reference Edited by Anthony E Woods e Roy C Ellis - Churchill Livingstone 1994 - https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing

⁹⁵ "... In the paraffin wax method, following any necessary post fixation treatment, dehydration from aqueous fixatives is usually initiated in 60%-70% ethanol, progressing through 90%-95% ethanol, then two or three changes of absolute ethanol before proceeding to the clearing stage... To minimise tissue distortion from diffusion currents, delicate specimens are dehydrated in a graded ethanol series from water through 10%-20%-50%-95%-100% ethanol... Duration of dehydration should be kept to the minimum consistent with the tissues being processed. Tissue blocks 1 mm thick should receive up to 30 minutes in each alcohol, blocks 5 mm thick require up to 90 minutes or longer in each change. Tissues may be held and stored indefinitely in 70% ethanol

without harm..." Laboratory Histopathology A Complete Reference Edited by Anthony E Woods e Roy C Ellis - Churchill Livingstone 1994 - https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing

⁹⁶ "...The term clearing arises because some solvents have high refractive indices (approaching that of dehydrated fixed tissue protein) and, on immersion, anhydrous tissues are rendered transparent or clear... Clearing is the transition step between dehydration and infiltration with the embedding medium. Many dehydrants are immiscible with paraffin wax, and a solvent (transition solvent, ante medium, or clearant) miscible with both the dehydrant and the embedding medium is used to facilitate the transition between dehydration and infiltration steps..." - Laboratory Histopathology A Complete Reference Edited by Anthony E Woods e Roy C Ellis - Churchill Livingstone 1994 - https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing

⁹⁷ Industrial grade xylene may contain nearly 25% of other solvents such as ethyl benzene, with traces of benzene, odorous mercaptans and hydrogen sulphide. Only the sulphur and benzene-free solvent-grade xylene should be used for histological purposes. - Laboratory Histopathology A Complete Reference Edited by Anthony E Woods e Roy C Ellis - Churchill Livingstone 1994 - https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing

⁹⁸ Reena Kandyala, Sumanth Phani C Raghavendra, and Saraswathi T Rajasekharan - Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures - J Oral Maxillofac Pathol. 2010 Jan-Jun; 14(1): 1-5.

⁹⁹ Kilburn KH, Seidman BC, Warshaw R - Neurobehavioral and respiratory symptoms of formaldehyde and xylene exposure in histology technicians. - Arch Environ Health. 1985 Jul-Aug;40(4):229-33. ... Disturbances of memory, mood, equilibrium, and sleep that occurred simultaneously with headache and indigestion, were experienced more frequently among women working in histology who had daily exposure to formaldehyde, xylene, and toluene than in unexposed female clerical workers working in the same hospitals. Neurobehavioral symptoms were accompanied by irritation of eyes, upper airways, and trachea. Formaldehyde exposure correlated better with neurobehavioral symptoms and with respiratory and mucous membrane symptoms than did exposure to xylene/toluene or to other agents..."

¹⁰⁰ http://farmacia.unich.it/farmacologia/didattica/tossicologia/dia/solventi_bn.pdf

¹⁰¹ TLV-TWA Threshold Limit Value – Time Weighted Average: esprime la concentrazione limite, calcolata come media ponderata nel tempo (8 ore/giorno; 40 ore settimanali), alla quale tutti i lavoratori possono essere esposti, giorno dopo giorno senza effetti avversi per la salute per tutta la vita lavorativa. - https://it.wikipedia.org/wiki/Threshold_Limit_Value

¹⁰² Stockert JC, López-Arias B, Del Castillo P, Romero A, Blázquez-Castro - Replacing xylene with n-heptane for paraffin embedding - A Biotech Histochem. 2012 Oct;87(7):464-7. Epub 2012 Aug 2..

¹⁰³ S.G. Temel et al : A simple and rapid microwave-assisted hematoxylin and eosin staining method using 1,1,1 trichloroethane as a dewaxing and a clearing agent- Biotechnic & Histochemistry - Volume 80, Issue 3-4, 2005

¹⁰⁴ Histochem Cell Biol. 1995 Apr; 103(4):263-9. Non-hazardous organic solvents in the paraffin-embedding technique: a rational approach. Aliphatic monoesters for clearing and dewaxing: butyldecanoate. Lyon H¹, Holm I, Prentø P, Balslev "...Butyldecanoate has only a slight odour, insignificant vapour pressure (<0.01 kPa at 20 °C), and does not present a fire hazard (flash point 134 °C). The introduction of this compound in the laboratory poses no health hazard, and the substance is biodegradable..."

¹⁰⁵ Laboratory Histopathology A Complete Reference Edited by Anthony E Woods e Roy C Ellis - Churchill Livingstone 1994 - https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing

¹⁰⁶ R J Buesa - Mineral Oil: the best xylene substitute for tissue processing yet? – The journal of hystotechnology 23;143 2000 "...mixture of ethanol, isopropyl alcohol and mineral oil at 45-50°C with vacuum and agitation..."

¹⁰⁷ idem

¹⁰⁸ Terpenes are isoprene polymers found in essential oils originally derived from plants, though some are now synthesised. They are the earliest transition solvents to be used in histology and include turpentine and oils of bergamot, cedarwood, clove, lemon, origanum and sandalwood - Laboratory Histopathology A Complete Reference Edited by Anthony E Woods e Roy C Ellis - Churchill Livingstone 1994 - https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing

¹⁰⁹ Buesa RJ, Peshkov MV - Histology without xylene. - Ann Diagn Pathol. 2009 Aug;13(4):246-56.

¹¹⁰ Idem

¹¹¹ Adediran Oa, Ibikunle De - Evaluation Of Isopropanol As A Better Alternative To Xylene In Tissue Processing By The Paraffin Wax Method - African Journal Of Cellular Pathology 6:54-59 (2016)

¹¹² R. M. Reeve - Isopropyl-Alcohol-Paraffin Methods for Plant Tissues - Stain Technology Volume 29, 1954 - Issue 2

¹¹³ Wish HI, Roy M, Piliero SJ. - A new organic solvent for use in the clearing of tissues. Anat Rec. 1980 Jul;197(3):283-8.

¹¹⁴ Wang Kunhua¹, Fan Chuming¹, Lai Tao, Yang Yanmei, Yang Xin, Zhang Xiaoming, Guo Xuezhong, Lai Xun- A Novel Non-Toxic Xylene Substitute (Sbo) For Histology - Afr J Tradit Complement Altern Med. (2012) 9(1):43-49 -

¹¹⁵ Sudip Indu, V. Ramesh, Priyanka Chakravarty Indu, Karthikshree V. Prashad, B. Premalatha, and K. Ramadoss J -Comparative efficacy of cedarwood oil and xylene in hematoxylin and eosin staining procedures: An experimental study - Nat Sci Biol Med. 2014 Jul-Dec; 5(2): 284-287. – "...The paraffin sections cleared by cedarwood oil were immersed in 8% cedarwood oil solution for about 4 h at room temperature and then subjected to microwave processing for about 1 min at 60°C. Following this the sections were washed in distilled water and subjected to conventional H and E staining procedure..."

¹¹⁶ Bruun Rasmussen B, Norring Hjort K, Mellerup I, Sether G, Christensen - Vegetable oils instead of xylene in tissue processing. - N.APMIS. 1992 Sep;100(9):827-31

¹¹⁷ Sugunakar Raju Godishala Swamy, Surapaneni Rateesh Kumar Nandan, Pavan G. Kulkarni, Thokala Madhusudan Rao, Pavan Palakurthy - Bio-Friendly Alternatives for Xylene – Carrot oil, Olive oil, Pine oil, Rose oil - - Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2015 Nov, Vol-9(11): ZC16-ZC18 - "...Forty different tissue samples were taken and fixed in 10% formalin. These tissues were subjected to different grades of alcohol (70%, 80%, 90% and absolute alcohol) for dehydration. After dehydration each cut

tissue section were placed in 5 glass jars containing Carrot oil, Olive oil, Pine oil, Rose oil and xylene for comparsion of different physical, chemical and clearing properties. The 5 glass jars containing different oils and xylene were placed in a Hot-air oven at 60°C for two cycles 45 minutes each..."

¹¹⁸ Premalatha BR¹, Patil S, Rao RS, Indu MJ Mineral oil--a biofriendly substitute for xylene in deparaffinization: a novel method. Contemp Dent Pract. 2013 Mar 1;14(2):281-6.

¹¹⁹ R J Buesa - Mineral oil: the best xylene substitutefor tissue processing yet? – the Journal of Histotechnology Vol 23 N 2 2000

¹²⁰ Chen CY, He T, Mao XL, Friis TE, Qin RH, Jian YT. A novel xylene substitute for histotechnology and histochemistry. Biotech Histochem. 2010 Aug;85(4):231-40.

¹²¹ René J. Buesa, Maxim V. Peshkov, - Histology without xylene- Annals of Diagnostic Pathology 13 (2009) 246–256

¹²² Idem

¹²³ Idem

¹²⁴ Stoddard solvent ,White spirit (UK) or mineral spirits (US) also known as mineral turpentine, turpentine substitute, petroleum spirits, solvent naphtha (petroleum), varsol,, or, generically, "paint thinner", is a petroleum-derived clear liquid used as a common organic solvent in painting and decorating.A mixture of aliphatic and alicyclic C7 to C12 hydrocarbons. https://en.wikipedia.org/wiki/White_spirit

¹²⁵ Acquaragia - https://en.wikipedia.org/wiki/White_spirit

¹²⁶ Idem

¹²⁷ Idem

¹²⁸ "...Paraffin wax is a polycrystalline mixture of solid hydrocarbons produced during the refining of coal and mineral oils... Wax hardness (viscosity) depends upon the molecular weight of the components and the ambient temperature. High molecular weight mixtures melt at higher temperatures than waxes comprised of lower molecular weight fractions. Paraffin wax is traditionally marketed by its melting points which range from 39°C to 68°C.... Tissue-wax adhesion depends upon crystal morphology of the embedding medium. Small, uniform sized crystals provide better physical support for specimens through close packing. Crystalline morphology of paraffin wax can be altered by incorporating additives which result in a less brittle, more homogeneous wax with good cutting characteristics. There is consequently less deformation during thin sectioning..." - Laboratory Histopathology A Complete Reference Edited by Anthony E Woods e Roy C Ellis - Churchill Livingstone 1994 - https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing

¹²⁹ "...The properties of paraffin wax are improved for histological purposes by the inclusion of substances added alone or in combination to the wax: improve ribboning: prolong heating of paraffin wax at high temperatures or use micro-crystalline wax increase hardness: add stearic acid decrease melting point: add spermaceti or phenanthrene improve adhesion between specimen and wax (alter crystalline morphology): add 0.5% ceresin, 0.1-5% beeswax, rubber, asphalt, bayberry wax, or phenanthrene..." - Laboratory Histopathology A Complete Reference Edited by Anthony E Woods e Roy C Ellis - Churchill Livingstone 1994 - https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing

¹³⁰"...Additives recently incorporated in proprietary waxes include the following: Piccolyte 115, a thermoplastic terpene resin added at the rate of 5%-10% to the infiltrating wax, or to the final investing paraffin wax to improve tissue support for thin sectioning and facilitate flattening and expansion of sections on the waterbath. Piccolyte mixtures cannot be used in certain models of fluid-transfer type tissue processors. Plastic polymers such as polyethylene wax, added to improve adhesion, hardness and plasticity. Polymer waxes are incorporated in the majority of proprietary histological paraffin wax blends presently available. Dimethyl sulphoxide (DMSO) added to proprietary blends of plastic polymer paraffin waxes reduces infiltration times and facilitates thin sectioning. DMSO scavenges residual transition solvent and probably alters tissue permeability by substituting for or removing bound water thus improving infiltration. Some individuals who handle DMSO-paraffin wax may experience an unpleasant and annoying oyster or garlic taste probably caused by DMSO metabolites. Possible health risks associated with the use of DMSO-paraffin wax are minimal if correct laboratory hygiene is practised..." - Laboratory Histopathology A Complete Reference Edited by Anthony E Woods e Roy C Ellis - Churchill Livingstone 1994 - https://www.researchgate.net/publication/260272795_Tissue_Processing

¹³¹ Embedding wax local preparation in laboratory. Method (A) 1. Paraffin wax (Candle) 1 Kg. 2. Bees Wax 25gm - Melt and filter Method (B) 1. Paraffin wax 1kg 2. Liquid paraffin 5-10 ml - <http://www.rajswasthya.nic.in/RHSDP%20Training%20Modules/Lab.%20Tech/Histo/Introduction.pdf>

¹³²".. I've used a homebrew mixture of 95/5 W/W household paraffin/beeswax for years and I was very pleased with the results..." <http://www.photomacrography.net/forum/viewtopic.php?p=184022&sid=403a2d1111b7f03ee9c0d01c385e7e54>

¹³³"... It is possible to cut 1-3 μ sections of rat tissue after passing it through ethanol and chloroform and infiltrating in a wax mixture consisting of 95% Shell Chemical Co. paraffin (MP 125-130° F) and 5% commercial beeswax (clarified by boiling with water and decanting), to which is finally added 10% of technical stearic acid (melted, and clarified by filtration). A potential disadvantage is the slow expansion of the section on the water flotation bath, due to a surface spreading effect of the contained stearic acid. This expansion can be minimised as follows: by adding 0.5% concentration of a secondary alkyl-aryl sulfonate detergent, such as Shell Chemical Co. Teepol, to the notation water; by keeping the temperature of the water at 45° C; by making sure that no section is left on the water for more than 30 sec; and by drying on chemically cleaned slides for 4-18 hr at 45° C., controlled to $\pm 2^\circ$. The spreading effect is advantageous in reticulo-endothelial studies, where overlap of cells needs to be reduced to a minimum, and thinly layered cytoplasm expanded..." - D. W. Menzies; Paraffin-Beeswax-Stearic Acid: An Embedding Mass for thin Sections Stain Technology Volume 37, Issue 4, 1962

134 P. O. Gerrits, L. Smid - A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections - Journal of Microscopy - Volume 132, Issue 1 October 1983 Pages 81–85

¹³⁵ Kandyala R, Raghavendra SC, Rajasekharan ST.- Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. J Oral Maxillofac Pathol 2010;14:1-5

¹³⁶ R J Buesa et al - Histology without xylene - Annals of diagnostic pathology 13(2009) – 246-256

¹³⁷ idem

¹³⁸ Idem – la metodica viene descritta come segue: The dishwashing soap solution (DWS) is prepared by dissolving 25 mL of household dishwasher soap in 1500 mL of distilled water for a 1.7% solution, but it could go up to 30 mL of soap for a 2.0% DWS. The protocol is as follows:1. The sections have to be totally drained before being dried in an oven at 60°C for at least 20 minutes as is usually done before staining. 2. The dried sections are placed in the DWS at 90°C for 1 minute. 3. Transfer to another container with DWS at 90°C for another minute. 4. Wash the slides in tap water at 90°C for 30 seconds. 5. Wash the slides in tap water at 90°C for another 30 seconds. 6. Wash the slides in tap water at 45°C for 30 seconds. 7. Place the slides in distilled water at room temperature and stain as usual. This dewaxing procedure lasts 3.5 to 4 minutes per batch of slides.

¹³⁹ J Lab Physicians. 2014 Jul-Dec; 6(2): 84–90. A comparative study to evaluate liquid dish washing soap as an alternative to xylene and alcohol in deparaffinization and hematoxylin and eosin staining Pinki Pandey, Alok Dixit, Aparna Tanwar, Anuradha Sharma, and Sanjeev Mittal – “1.7% liquid DWS was used as an alternative substitute for xylene and alcohol. - We used Vim liquid dish-washing soap (Hindustan Unilever Limited) in our study. It is easily available, cheap, safe, nontoxic and eco-friendly. Moreover, we are diluting only 25 ml of the liquid DWS in 1500 ml of distilled water. - Deparaffinization is a key point in the XAF method and was done using diluted 1.7% liquid DWS at 90°C.”

¹⁴⁰ Pinki Pandey, Alok Dixit, Aparna Tanwar, Anuradha Sharma, and Sanjeev Mittal - A comparative study to evaluate liquid dish washing soap as an alternative to xylene and alcohol in deparaffinization and hematoxylin and eosin staining - J Lab Physicians. 2014 Jul-Dec; 6(2): 84–90. “...Liquid DWS is a safe and efficient alternative to xylene and alcohol in deparaffinization and routine H and E staining procedure...”

¹⁴¹ Anuradha Ananthaneni et al: Efficacy of 1.5% Dish Washing Solution and 95% Lemon Water in Substituting Perilous Xylene as a Deparaffinizing Agent for Routine H and E Staining Procedure: A Short Study – Scientifica Volume 2014, Article ID 707310, 7 pages “...1.5% DWS (1.5ml dish washing solution in 98.5mL distilled water) and 95% DLW(95mL lemon water in 5mL of distilled water) were used as deparaffinizing agent...”

¹⁴² [http://www.treccani.it/enciclopedia/l-ottocento-biologia-microscopia-e-istologia_\(Storia-della-Scienza\)/](http://www.treccani.it/enciclopedia/l-ottocento-biologia-microscopia-e-istologia_(Storia-della-Scienza)/)

¹⁴³ <http://www.federica.unina.it/farmacia/chimica-farmaceutica-tossicologia-1/storia-chemioterapia-antinfettiva-organoarsenicali-penicillina/>

¹⁴⁴ <https://it.wikipedia.org/wiki/Anilina>

¹⁴⁵ <http://mhpl.facilities.northwestern.edu/files/2013/10/The-Science-and-Application-of-Hematoxylin-and-Eosin-Staining-6-5-2012.pdf>

¹⁴⁶ Haematoxylin or hematoxylin also called natural black 1 or C.I. 75290, is a compound extracted from the heartwood of the logwood tree (*Haematoxylon campechianum*). <https://en.wikipedia.org/wiki/Haematoxylin>

¹⁴⁷ <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/75290.htm>

¹⁴⁸ Differenziazione: Nella tecnica istologica, procedimento usato in alcuni metodi di colorazione, consistente nel sottoporre un preparato, colorato diffusamente, all'azione di un particolare solvente, capace di eliminare l'eccesso di colorante. - <http://www.treccani.it/vocabolario/differenziazione/>

¹⁴⁹ <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/hematoxylin/hxintro.htm>

¹⁵⁰ <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/hemindex.htm>

¹⁵¹ http://www.uniroma2.it/didattica/tecnistol/deposito/LEZ_2_-_ISTOMORFOLOGICHE.pdf

¹⁵² <http://stainsfile.info/StainsFile/stain/hematoxylin/h-and-e-eo.htm>

¹⁵³ Gill GW et al Acta Cytologica 18;300-311 1974

¹⁵⁴ http://www.uniroma2.it/didattica/tecnistol/deposito/LEZ_2_-_ISTOMORFOLOGICHE.pdf

¹⁵⁵ Hematoxylin stain is not hazardous under Environmental Protection Agency regulations. Drain disposal is recommended with the permission of local wastewater treatment authorities. Follow federal, state, and local regulations. - Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories - Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel - <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1.htm>

¹⁵⁶ Kayser K¹, Bubenzier J. Microwave-assisted staining procedures in routine histopathology. *Histochem J*. 1990 Jun-Jul;22(6-7):365-70.

¹⁵⁷ “...Staining of tissue sections and cell preparation is based on diffusion of dye into the tissue and its binding to the substrate. [9] Microwave irradiation has been beneficial for both. Microwave irradiation can be applied for accelerating routine, special, metallic, as well as immunofluorescent stains. [5] Staining methods that normally take minutes can be done in a microwave oven in seconds; those that take hours, in minutes; and those that take days or even weeks can be completed in a matter of hours using microwave techniques. The optimum temperature for most non-metallic stains is between 55° and 60°C and for metallic stains between 75°C and 95° C.,” Microwave-accelerated processing is as effective as slower traditional staining, reduces the time up to 70% and sections stain identically with several methods such as Periodic acid-Schiff's, Van Gieson, Congo red, Masson's trichrome, Alcian blue, Mayer's mucicarmine, and silver methods...” Basavaradhya Sahukar Shruthi, Palani Vinodhkumar, Bina Kashyap, Padala Sridhar Reddy - Use of Microwave in Diagnostic Pathology Journal of cancer Research and Therapeutics Year : 2013 | Volume : 9 | Issue : 3 | Page : 351-355

¹⁵⁸ Canada balsam is an oleoresin obtained from the bark of the fir *Abies balsamea* (.. anche da *Abies Canadensis...* NdA") (of the family Pinaceae), native to North America. The dried resin is freely soluble in xylene and other organic solvents - Ravikumar S, Surekha R, Thavarajah R. Mounting media: An overview. J NTR Univ Health Sci 2014;3, Suppl S1:1-8

¹⁵⁹ http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/misura.pdf - Ravikumar S, Surekha R, Thavarajah R. Mounting media: An overview. J NTR Univ Health Sci 2014;3, Suppl S1:1-8

¹⁶⁰ Ravikumar S, Surekha R, Thavarajah R. Mounting media: An overview. J NTR Univ Health Sci 2014;3, Suppl S1:1-8

¹⁶¹ "...There are many ways to mount the coverslip on slides, but whatever way works for one is fine as long as there are no air bubbles formed. A) Slide method B) Coverslip method - A) Slide method: An appropriate size of coverslip for mounting is selected and laid on the blotting paper. - One or two drop of mountant is placed on the slide containing section preferably in the middle to avoid trapping of air bubbles. - The slide is quickly inverted over the coverslip, one end is placed on the blotting paper and the other end slowly lowered until the mountant touches the coverslip. - The mountant spreads under the coverslip and slides and with the coverslip attached, is quickly inverted and the coverslip guided into place with a dissecting needle. Alternatively add the mountant on the slide as described, Place one end of the coverslip on the slide and with the aid of a dissecting needle; slowly lower the coverslip into position. - B) Coverslip method - Add the mountant on the coverslip in the center. - Bring the slide down (invert) to the coverslip and let the surface tension pull the coverslip. Use only enough mountant to fill the space on the coverslip/slide and not excess and this assessment comes with experience. Too little mounting media will cause air bubble at the edges of coverslip and one will be tempted to press down on the coverslip to ensure a tight seal. This pressure can crush or distort the three-dimension structures in the sample. Too much mounting media will make it messy and move the samples around and it can make the sample impossible to image at $\times 100$ due to the very short working distance of high magnification oil immersion objective lens. Air bubbles: If there is one odd air bubble it may be removed with gentle pressure but if there are many, instead of chasing with a dissecting needle and wasting time, put the slide back in xylene so that coverslip is separated and remount the section without air bubbles...." Ravikumar S, Surekha R, Thavarajah R. Mounting media: An overview. J NTR Univ Health Sci 2014;3, Suppl S1:1-8

¹⁶² <http://www.microbehunter.com/an-overview-of-mounting-media-for-microscopy/>

¹⁶³ <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artdec02/wdmount2.html> -

<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artmay10/wd-mount10.html> -

<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjan03/wdmount3.html> -

<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjun10/wd-mount10-2.html> -

¹⁶⁴ Al-Rawahi Y, Al-Hatmi M, Al-Mukhaini N, Al-Hashmi N, El-Hag A and Habbal O - Omani honey as a histological fixative -- College of Medicine and Health Sciences, Sultan Qaboos University, Muscat, Sultanate of Oman - 4th GCC conference for Medical Students Sultan Qaboos University 21-24 January, 2006

¹⁶⁵ Rahma Al-Maaini Phil Bryant: The Effectiveness of Honey as a Substitute for Formalin in the Histological Fixation of Tissue - Journal of histotechnology 29(3):173-176 · September 2006

¹⁶⁶ Rahma al Maaini Pjil Bryant - Honey as an Alternative to Formalin in the Demonstration of Connective Tissue Components – Journal of Histotechnology vol 31 2008 Issue 2 "...In this study, fresh goat tissues were preserved for 24 h in concentrations of honey ranging from 1% to 20% diluted with distilled water. ...tissues treated in 5%, 10%, and 20% honey at room temperature gave excellent demonstration of connective tissue components by all staining methods and were comparable to those obtained with formalin-fixed control tissues..."

¹⁶⁷ Idem. "... These results support the use of 10% honey as an alternative to formalin in the histological demonstration of connective tissues without the need for amendments to existing laboratory protocols..."

¹⁶⁸ Comparative Study Of The Effect Of Table Salt In 10% Formal Saline And Saturated Sodium Chloride Solution As Tissue Fixatives By Monsurat Titi Gbadamosi Department Of Human Anatomy Faculty Of Medicine Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria March, 2014

¹⁶⁹ Olszewski WL, Moscicka M, Zolich D, Machowski Z - Human keratinocyte stem cells survive for months in sodium chloride and can be successfully transplanted. - Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):525-6

¹⁷⁰ Olszewski WL, Moscicka M, Zolich D - Human skin preserved long-term in anhydric pulverized sodium chloride retains cell molecular structure and resumes function after transplantation. Transplantation. 2006 Jun 15;81(11):1583-8.

¹⁷¹ https://it.wikipedia.org/wiki/Soluzione_satura

¹⁷² "...The fixation was made immediately after the removal of the above mentioned organs for 24 hours ..." A. Al-Saraj - Use of saturated sodium chloride solution as a tissue fixative - *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, Vol. 24, No. 1, 2010 (53-58)

¹⁷³ <http://www.dentalcare.com/en-US/dental-education/continuing-education/ce317/ce317.aspx?ModuleName=coursecontent&PartID=2&SectionID=-1> -

¹⁷⁴ "... It is possible to cut 1-3 μ sections of rat tissue after passing it through ethanol and chloroform and infiltrating in a wax mixture consisting of 95% Shell Chemical Co. paraffin (MP 125-130° F) and 5% commercial beeswax (clarified by boiling with water and decanting), to which is finally added 10% of technical stearic acid (melted, and clarified by filtration). A potential disadvantage is the slow expansion of the section on the water flotation bath, due to a surface spreading effect of the contained stearic acid. This expansion can be minimised as follows: by adding 0.5% concentration of a secondary alkyl-aryl sulfonate detergent, such as Shell Chemical Co. Teepol, to the notation water; by keeping the temperature of the water at 45° C; by making sure that no section is left on the water for more than 30 sec; and by drying on chemically cleaned slides for 4-18 hr at 45° C., controlled to $\pm 2^\circ$. The spreading effect is advantageous in reticulo-endothelial studies, where overlap of cells needs to be reduced to a minimum, and thinly layered cytoplasm expanded..." - D. W. Menzies; Paraffin-Beeswax-Stearic Acid: An Embedding Mass for thin Sections - Stain Technology Volume 37, Issue 4, 1962

-
- ¹⁷⁵ Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories - Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel - <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1.htm>
- ¹⁷⁶ Ratna Padhi BS – Pollution due to synthetic dyes toxicity and carcinogenity studies and remediation – Int. J. Environ. Sci. 3 (3) 940-955
- ¹⁷⁷ Theory and Practice of Histological Techniques Di John D. Bancroft, Marilyn Gamble
- ¹⁷⁸ K. K. S. Lim -(From the Department of Physiology, Edinburgh University.) An Alcoholic Eosin and Methylene-Blue Staining Method. <http://jcs.biologists.org/content/joces/s2-63/252/541.full.pdf>
- ¹⁷⁹ ... ai tempi dello scrivente non veniva utilizzato il limonene...
- ¹⁸⁰ World J Microbiol Biotechnol (2012) 28:387–390 - Natural fruit extracts as non-toxic fluorescent dyes for staining fungal chlamydospores - Silva Vujanovic "...Fresh fruits were processed over the next 24 h and pressed using mortar and pestle to release each fruit's extract. Extracts were then filter-sterilized (0.2 lm) prior to adding lactic acid as outlined in Chau et al. (2010). Fruit extracts were mixed with lactic acid in a ratio of 1:1 (1 part extract: 1 part lactic acid) for fungal cell wall staining..."
- ¹⁸¹ Awwioro Og , Aloamaka Pc, Ojianya Nu, Oduola T, Ekpo Eo - Extracts of *Pterocarpus osun* as a histological stain for collagen fibres - African Journal of Biotechnology Vol. 4 (5), pp. 460-462, May 2005 - "...*P. osun* stem was dried, milled to obtain a fine powder and a red pigment extracted from the powder with 1 L of 70% ethanol at 78°C for 24 h. The alcoholic alkaline and acidic extracts were used to stain tissue sections.
- ¹⁸² Silva Vujanovic et al - Natural fruit extracts as non-toxic fluorescent dyes for staining fungal chlamydospores - World J Microbiol Biotechnol (2012) 28:387–390 "...Il succo ottenuto dai frutti del Viburno (Viburnum trilobum) e dal Ribes (Ribes Alpina e Ribes sp.) ha proprieta' coloranti in fluorescenza e fluoresce in radiazione ultravioletta con luce verde..."
- ¹⁸³ Akinloye, A.J., Illoh, H.C. & Olagoke, A.O. Screening of some indigenous herbal dyes for use in plant histological staining - Journal of Forestry Research (2010) 21: 81. Screening of some indigenous herbal dyes for use in plant histological staining
- ¹⁸⁴ A. Banerjee And A. K. Mukherjee - Chemical Aspects Of Santalin As A Histological Stain - Stain Technology Vol. 56 , Iss. 2,1981
- ¹⁸⁵ A.J. Akinloye, H. C. Illoh, A.O. Olagoke - Screening of some indigenous herbal dyes for use in plant histological staining - Journal of Forestry Research (2010) 21(1): 81
- ¹⁸⁶ O. G. Awwioro, S. K. Onwuka, J. O. Moody, J. M. Agbedahunsi, T. Oduola,O. E. Ekpo and A. A. Oladele - Curcuma longa extract as a histological dye for collagen fibres and red blood cells- *J. Anat.* (2007) 210 , pp600–603 "...Rhizomes of the Allepey cultivar of *C. longa* were collected fresh from the Medicinal Garden of the Drug Research and Production Unit (DRPU), Faculty of Pharmacy, Obafemi Awolowo University, Ile Ife, Nigeria, by J.M.A. The rhizomes were cut into small pieces and dried at 40 ° C for 48 h in an open air oven (Gallenkamp, UK). They were milled to a fine powder. Then, 1.5 kg of the powdered plant material was treated with 2 Liters of 70% ethanol in a Soxhlet extractor for 72 h. The extract was filtered and concentrated in vacuo at 50°C and finally dried in a desiccator to remove residual water. In total, 230 g (18.67% yield) of the crude ethanolic extract was obtained. "Crude ethanolic extract and column chromatographic fractions of the Allepey cultivar of *Curcuma longa* Roxb, commonly called turmeric (tumeric) in commerce, were used as a stain for tissue sections. - The stain was used as a counterstain after alum and iron haematoxylins. *C. longa* stained collagen fibres, cytoplasm, red blood cells and muscle cells yellow. It also stained in a fashion similar to eosin, except for its intense yellow colour.
- ¹⁸⁷ Sachin Kumar et al. Use of *Curcuma longa* L. extract to stain various tissue samples for histological studies. - Ayu. 2014 Oct-Dec; 35(4): 447–451 "...The rhizomes of *C. longa* were collected from Govind Ballabh Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, Uttrakhand, India. Rhizomes were then cut into small pieces and were dried. They were then milled to form fine powder using mixer- 15 g of this powdered plant material was weighed using electronic/digital weighing machine, which was then dissolved in 100 ml of 70% alcohol in a borosil beaker and was transferred to 5 ml borosil test tubes, which was then centrifuged in a centrifuge machine (REMI R4C LAB CENTRIFUGE) at 3000 rpm for 5 min and the supernatant was collected with the help of micropipettes in a coupling jar. Phytochemical evaluation of this supernatant (turmeric dye) which was used for staining various tissue structures revealed the presence of flavonoids, deoxy sugars and free anthraquinone. In our study, addition of mordant like potassium aluminum alum, acidic solution like 1% glacial acetic acid, alkaline solution like 1% ammonium hydroxide were also used, but none of these improve the staining qualities of *C. longa*. Hence, it was concluded that turmeric dye alone should be used as a stain. In order to standardize this turmeric dye various concentrations of turmeric powder (5 g, 10 g, and 15 g) were also used in 100 ml of 70% alcohol but out of all these only 15 g of turmeric powder in 100 ml of 70% alcohol provides the best result and hence this was employed for staining the tissue sections..."
- ¹⁸⁸ Hikmat Ullah Jan, Zabta Khan Shinwari And Khan Bahader Marwat - Influence Of Herbal Dye Extracted From Dry Wood Of Indigenous *Berberis pachyacantha* Kochne In Plant Histological Staining Pak. J. Bot., 43(5): 2597-2600, 2011.
- ¹⁸⁹ Bassey RB, Oremosu AA, Osinubi AAA. - *Curcuma Longa*: Staining Effect on Histomorphology of the Testes. Maced J Med Sci. 2012 Mar 15; 5(1):26-29. "...The dried leaves of *Curcuma longa* were ground to a powder using the electric and manual grinding machine. A smooth consistency was ensured to attain good surface areas for light brown. The dry powder of the plant was weighed using an electric weighing scale. These were then soaked in ethanol for 24 hours undisturbed. The extraction was preceded using the Soxhlet extractor. The extract was then transferred to a rotatory evaporator.... "The ethanolic extract of *Curcuma longa* was dissolved in 1% acetic acid in 70%. It was used to stain testes sections at concentrations of 0.2 g/ml for 15 minutes..."
- ¹⁹⁰ Papawee Suabjak Yong, Suppaluk Romratanapun, Natthawut Thitipramote - Extraction of Natural Histological Dye from Black Plum Fruit (*Syzygium cumini*) Journal of the Microscopy Society of Thailand 4 (1), 13-15 (2011)
- ¹⁹¹ Okpidu Ee., Okon Au., Oyadonghan Gp., Ogbodo La., Onyenekwe Ecn - Histological Study On The Staining Potentials Of Aqueous Extract Of *Ceratonia Siliqua* Bark- International Journal Of Basic, Applied And Innovative Research IJBAIR, 2012, 1(4): 151 - 154
- ¹⁹² Ehab Toussan and Bahija Al-Behbehani - Black mulberries (*Morus nigra*) as a natural dye for animal tissues staining - Animal Biology, Volume 61, Issue 1, pages 49 – 56

-
- ¹⁹³ Anneh Mohammad Gharravi, Mohammad Jafar Golalipour, Rostam Ghorbani, Mozaffar Khazaei- Natural Dye For Staining Atrocytes And Neurons Journal Of Neurological Sciences (Turkish) 2006, Volume 23, Number 3, Page(S) 215-218 "...Skin of pomegranate is collected, and dried in light. Dried skins added into boiling water. Concentrated juice of skin is cooled, and filtered..."
- ¹⁹⁴ Ayodeji Blessing Ajileye, Afroke Kingsley Iteire, Queen Bisi Arigi *Zingiber officinale* (ginger) extract as a histological dye for muscle fibers and cytoplasm Int J Med Sci Public Health. 2015; 4(10): 1445-1448 "...extracted with 90% ethanol, thereby giving rise to a crude extract, which was then used to counterstain the sections earlier stained with alum hematoxylin..."
- ¹⁹⁵ Gharravi, A.M. Staining of cerebellar cortex granular layer interneurons with natural dye of Madder - Cerebellum & Ataxias (2016) 3: 12.- "...Fresh roots of Madder collected from Gorgan province- north of Iran, cut into tiny bits of about 1 mm in diameter and dried in an open air and a very fine powder obtained. 5 g of the powder dissolved in 100 ml of water and iron alum. The mixtures boiled in a water bath for 5 min to completely dissolve the solutes, and obtain bright red dye..." "...Sections of groups 1, 2 and 3 were stained only with Madder for 2, 24 and 48 h respectively..."
- ¹⁹⁶ Korade Deepali¹, Sonawane Lalita², Mahale Deepika - Application of aqueous plant extracts as Biological stains - International Journal of Scientific & Engineering Research, Volume 5, Issue 2, February-2014 1586
- ¹⁹⁷ Araya Suebkhampet and Nattakarn Naimon - Using Dye Plant Extract for Histological Staining - J. Mahanakorn Vet. Med. 2014. 9(1): 63-78.
- ¹⁹⁸ M.S. Deepak, Philpose Omman - Use of dye extract of *Melastoma malabathricum* Linn. for plant anatomical staining - Acta Biologica Indica 2013, 2(2):456-460 "...Dye extract was prepared by crushing and squeezing the fruit pulp of *M. malabathricum* without using any solvents. Extract comes out due to squeezing was filtered with glass wool and collected. This extract was used as the source of natural stain. Natural mordants used in the present investigation are fruit extract of three plants *Garcinia camboja*, *Citrus aurantifolia* and *Averrhoa carambola*..."
- ¹⁹⁹ Esam M. A. Raheem, Abd-Alhafeez Osman Ibnouf, Osman Hashim Shingeray, Hamza JM Farah. Using of *Hibiscus Sabdariffa* extract as a natural histological stain of the skin. American Journal of Research Communication, 2015, 3(5): 211-216
- ²⁰⁰ Abd-Alhafeez Ibnouf, Esam AbdulRaheem, Mohamed Seed Ahmed, and Dalia Dahab. Assessment of staining quality of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*) on formalin-fixed paraffin-embedded renal tissue sections. Int J Cur Res Rev, 2014; 6 (21): 26-28.
- ²⁰¹ Abd-Alhafeez Ibnouf, Khalid Adam, Esam AbdulRaheem, and Ali Ageep. Staining of histological sections from the small intestine using Hibiscus Sabdariffa. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research, 2014; 3 (5): 01-03.
- ²⁰² Hashim EA. The use of watery extract of Kujarat flowers Hibiscus Sabdariffa as a natural histological stain. Iraqi J Med Sci, 2006; 5 (1): 29-33.
- ²⁰³ Egbujo, E. C.; Adisa O. J. & Yahaya, A. B. A study of the staining effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) on the histologic section of the testis. Int. J. Morphol., 26(4):927-930, 2008. "...The dried succulent red calyx of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) was purchased in the market and ground to powdery form using pestle and mortar, sieved and stored in a dry container. A measured quantity of the ground powder of Roselle was brought to boil in water, and mixed by shaking vigorously. This was allowed standing for 30 minutes, then filtered to obtain the coloured extract..."
- ²⁰⁴ S. Abubakar, A. B. Usman, V. Etim, O. Nnadi, C. Alaku. Application of Organic Dyes from Roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* linn) for Mycological Staining Indian J. Innovations Dev., Vol. 1, No. 9 (September 2012) "...Dried calyx of roselle was purchased from Gwagwalada (local market) in FCT, and ground to powder using pestle and mortar, then sieved and stored in a dry bottle. Twenty five grams aliquots of roselle calyx powder was weighed and poured into 2 conical flasks, each containing 125mls of water and the other containing 125mls of ethanol (1:5; w/v) Both the aqueous and ethanolic mixture were agitated using Innova 44 rotator shaker at 140rpm for 24hrs.Three grams of potassium alum were added as a mordant, after pH was taken and mixed by shaking vigorously, the two samples were filtered to obtain the colored extract..."
- ²⁰⁵ Suebkampet A et Sotthibandhu P – Effect of using aqueous crude extract from butterfly pea flowers (*Clitoria ternatea* L.) as a dye on animal blood smear staining – Suranaree J. Scie. Technolo. 19(1): 15-19
- ²⁰⁶ C.U. Aguoru et al. Comparative Staining Efficacy of Safranin and *Lawsonia inermis* L. Aqueous Ethanolic Leaf Extract on Epidermal Cells of *Allium cepa* L. (2015) / Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol. 2015, 2(4): 108-111 "...The leaves were sun dried for one week. The dried leaves were broken into pieces by pounding with pestle in a mortar. 50g of the dried leaves was weighed out using a digital scale. Extraction of stain was by maceration method. Cold extraction using ethanol was carried out by soaking the 50g leaf material in 500ml of ethanol for 48 hours in 500ml beaker with stopper. After 48 hours, filtration was carried out to obtain the filtrate. The filtrate was exposed to allow the ethanol to evaporate to obtain dry mass of *L. inermis* stain...."
- ²⁰⁷ Termine improprio ma molto usato nel settore della microscopia dilettantistica... di fatto e' un tessuto epidermico vegetale - http://www.scienzebiologiche.unina.it/Download/Schede_Lab_bio_veg.pdf
- ²⁰⁸ Sudheendra Udyavara Sridhara, Shashidara Raju, Aparna H. GopalKrishna, Vanishri C. Haragannavar, D. Latha, Reshma Mirshad - *Hibiscus*: A different hue in histopathology Journal of Medicine, Radiology, Pathology & Surgery Vol. 2:1 Jan-Feb 2016;2:9-11. "...*Hibiscus* calyces were sun dried and powdered. From this powdered form, alcoholic and water extracts were obtained. Alcohol extract was obtained by refluxing 40 g of powder in 500 ml of 95% ethanol for 3 h, and then cooled and filtered. The original pH of the alcoholic extract was 5.7. The aqueous extract was obtained by refluxing 50 g of powder in 600 ml of distilled water for 3 h, and then cooled and filtered. pH of the aqueous extract was 5.5.
- ²⁰⁹ S.A. Shehu et al : Kola nut (*Cola acuminata*) extract as a substitute to histological tissue stain eosin - Scientific Journal of Veterinary Advances (2012) 1(2) 33-37
- ²¹⁰ Erik Edston and Liv Gröntoft Saffron—A Connective Tissue Counterstain in Routine Pathology - Journal Of Histotechnology vol. 20 , Iss. 2,1997

²¹¹ Saffron – A Natural Dye of Uncommon Significance - Mary Faith Encarnacion Histotechnology Student Medical University of South Carolina Charleston, SC - <http://www.sakura-americas.com/getattachment/1c90bcde-590e-4541-aae0-04785eac3998/148>

²¹² <http://lists.utsouthwestern.edu/pipermail/histonet/2012-January/060289.html> "...Saffron is of course the dried stigmas of *Crocus sativus*. Safran du Gâtinais, commonly specified in old histology books, was apparently grown in a particular area of France near the Mediterranean...For histologic use, saffron is extracted with hot ethanol. Some people did seven extractions..."

²¹³ Theory and Practice of Histological Techniques - Di John D. Bancroft,Marilyn Gamble : "... Alcholic Saffron: Saffron du Gatinais 6g + Absolute alcohol 100 ml.." .

²¹⁴ M. Torzewski - Die Movat- Pentachromfärbung - *Mikroskopie, Jahrgang 2, Nr. 4/2015, S. 204–208* "...Safran du Gâtinais 6 g Safran du Gatinais (z. B. Chroma- Waldeck GmbH & Co.KG 5A-394) in 100 ml 100%igem Ethanol lösen und vor Gebrauch in luftdicht verschlossener Flasche für 48 Stunden bei 50 °C im Brutschrank extrahieren (unter Luftabschluss haltbar)..."

²¹⁵ <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/75100.htm> - The active colouring constituent of saffron is *crocin*, which is a di-gentabiose ester of crocetin, although the exact structure is not given. The dye is obtained from the stigmata of *Crocus sativus*, which are collected by hand, so the dye is expensive. Although used in the past for many purposes, today saffron is used primarily as a food colour and spice.