



SEAP

Calle Ancora, 3, 2º B
28045 MADRID
Tfno. y Fax 91 539 86 28
MAIL: SEAP@SEAP.ES



Programa de Garantía de
Calidad en Patología

Módulo de IHQ GENERAL
Ronda nº 9

Antígeno probado: TTF1

Tejido probado: Tiroides

Instrucciones: Los participantes fueron invitados a teñir con TTF1 la preparación remitida por el programa (tiroides fijado en formol al 10%, pH 7 durante 24 horas) y su propia preparación control, devolviendo ambas preparaciones para su evaluación.

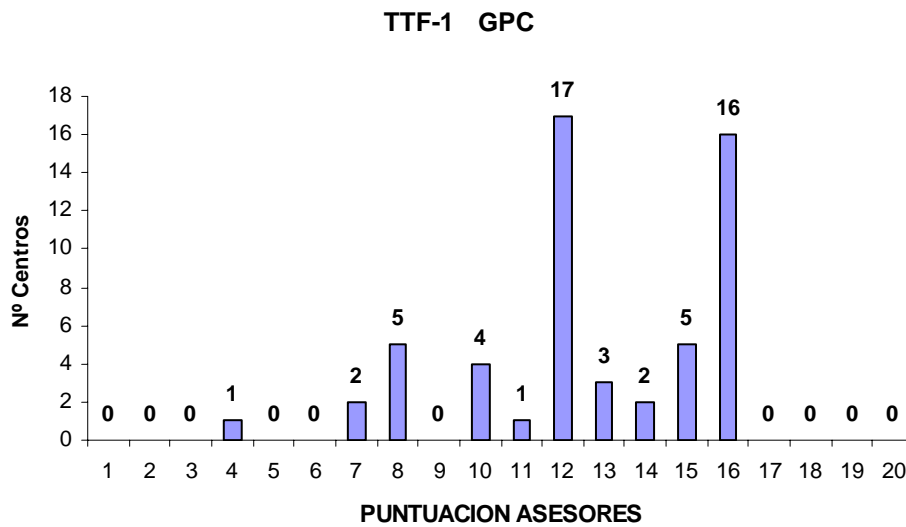
Número de laboratorios participantes:

- Remitidos: 94
- Contestados: 61 **GCP** (65%) y 61 (65%) **Control Local**

Un total de 33 centros no remitieron preparaciones. Cinco de ellos comunicaron que carecían del anticuerpo solicitado.

1.- Estudio de los controles remitidos por el programa GCP:

1.1 Evaluación de los asesores



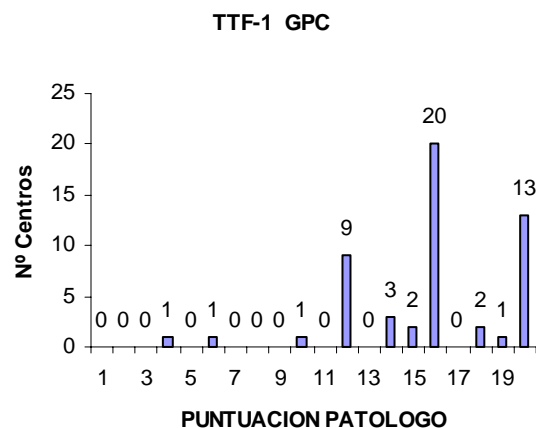
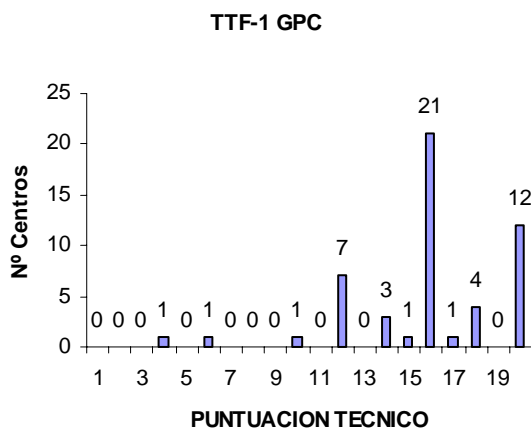
Una puntuación de 12 equivale a una calidad aceptable para el uso rutinario del anticuerpo. El 79% de las preparaciones superan este umbral.

Un 30 % del total obtuvieron una puntuación igual o superior a 16/20, siendo consideradas como de muy buena calidad.

De los 13 centros (21%) que no alcanzaron la puntuación mínima, 5 quedaron muy cerca del límite (10 - 11 puntos), siendo debido en general a problemas de tinción de fondo o tinción citoplasmática, así como tinción irregular, en ocasiones acompañada y probablemente debida a un excesivo pretratamiento.

Los casos que obtuvieron una puntuación igual o inferior a 8 presentaban además de esto, una tinción muy ligera, y en algún caso inexistente, de las células diana.

1.2 Resultados de la autoevaluación: El 90% de los técnicos y el 89 % de los patólogos participantes remitieron su valoración tanto de los controles GPC como del control local.



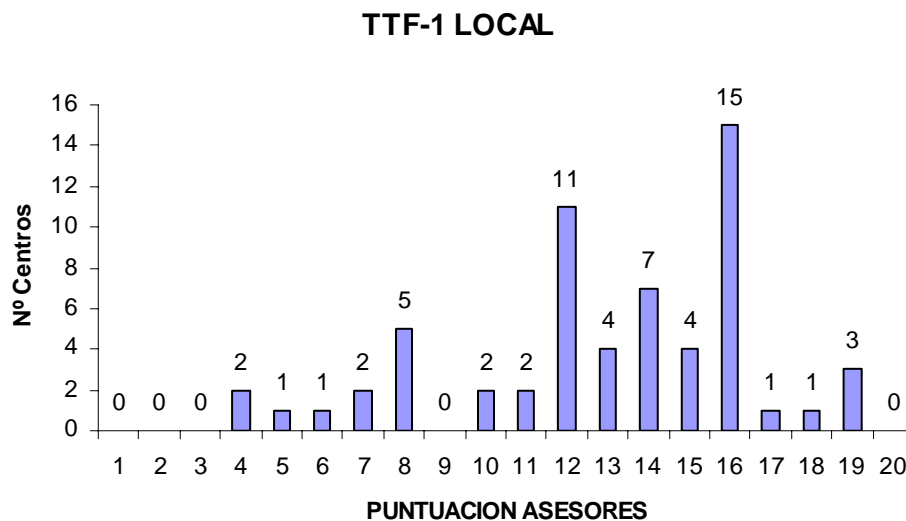
La percepción local sobre los resultados de la técnica es superior a la valoración de los observadores externos. El 71 % de los técnicos participantes adjudicaron a sus casos una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 67 % en el caso de los patólogos.

Probablemente esta diferencia sea debida a que en la rutina diaria no se valoran de la misma forma algunos artefactos técnicos y pequeñas deficiencias que, al no impedir la valoración conjunta de la prueba, se dan por válidos. En un programa de control de calidad, sin embargo, no pueden obviarse, lo que resta puntuación.

2.- Estudio de los controles de cada centro:

Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

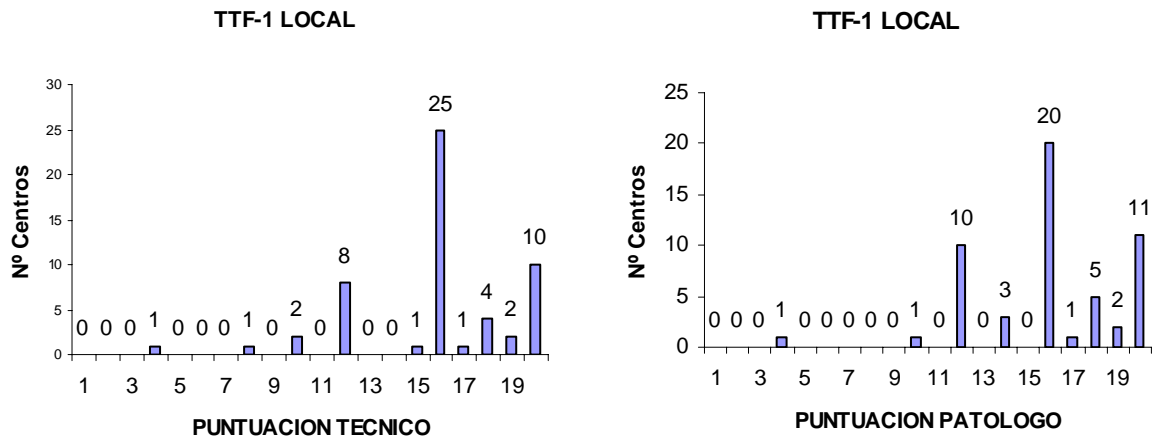
2.1. Evaluación de los asesores



Considerando que una puntuación igual o superior a 12 se considera aceptable, el 75 % de las preparaciones remitidas se consideraron como válidas para su uso habitual, con un 33% con una puntuación igual o superior a 16/20, consideradas como de muy buena calidad.

Estos resultados son similares a los obtenidos con el control GPC. Los principales problemas detectados han sido una alta frecuencia de pretratamiento excesivo, tinción irregular y fondo inespecífico o tinción citoplasmática.

2.2. Resultados de la autoevaluación



El 75 % de los técnicos participantes consideran que las pruebas tenían una puntuación igual o superior a 16/20. Este porcentaje era del 70 % en el caso de los patólogos.

3.-Inmunotinción óptima:

Se consideró una inmunotinción óptima a la que mostraba tinción nuclear uniforme, moderada o intensa, de las células epiteliales tiroideas y de las células C parafoliculares, con ausencia de tinción citoplasmática y de fondo inespecífico. Contraste adecuado, que permita una buena apreciación de la tinción nuclear. Ausencia de pretratamiento excesivo. Ausencia de artefactos técnicos.

4. - Anticuerpos y Métodos evaluados:

4.1. Anticuerpos Primarios:

De los 61 centros analizados, 54 utilizaron el clon 8G7G3/1 (proveedores DAKO, MD, BIOCARE, ZYMED, NEOMARKERS, ATOM, Diagnostic Biosystems, o sin especificar proveedor). Solo 6 centros usaron el clon SPT24 de Novocastra. Un centro no especifica el primario utilizado.

Las diluciones son muy variables (1:20, 1:25, 1:40, 1:50, 1:75, 1:100 y 1:200, o prediluido)

4.2. Recuperación antigénica:

Todos los centros usaron recuperación antigénica por calor, aplicando diferentes métodos y buffer de distintos pH (6, 6.4, 7.6, 8, 9, o las soluciones de recuperación de los sistemas automatizados).

- Baño
- Olla a presión
- Automatizada (Benchmark, Bond Max, LabVision)

- Microondas
- Autoclave

4.3. Detección:

De los centros estudiados, 42 usan método de detección por polímeros de diferentes proveedores. Cinco utilizan streptavidina-biotina-HRP. Los restantes no especifican.

4.4 Automatización:

51 de los 61 centros usan un sistema automatizado de inmunotinción. Diez centros no especifican o no usan automatización.

- Bond X/Bond Max
- Dako-Autostainer
- Dako Techmate 500
- Dako Techmate Horizon
- Ventana (Benchmark o Nexes)
- LabVision Autostainer
- Biogenex Optimax

5.- Controles utilizados

Los controles utilizados han sido pulmón (22) , tiroides (33) , o múltiple (1).

Entre los que utilizaron tiroides hay 3 tumores foliculares, 3 carcinomas papilares y un carcinoma medular.

En los de pulmón se utilizaron 10 adenocarcinomas y 2 carcinomas microcíticos.

6.-Mejores métodos (puntuación de 16/20 en las preparaciones del GCP):

Dieciseis centros obtuvieron una calificación de 16/ 20, por lo que los métodos que alcanzaron los mejores resultados son diversos, sin que pueda destacarse ningún elemento común a todos ellos, ni en cuanto a dilución ni a clon de Ac primario (8G7G3/1 o SPT24), Ac secundario, ni a buffer de recuperación antigénica (pH variable), sistema de automatización, etc. Por tanto, con cualquiera de los métodos habituales disponibles en un laboratorio pueden obtenerse buenos resultados.

Método: Polímero (ENVISION, Bond-X, NovoLink) IVIEW , Streptavidina.

Bloqueo: Agua oxigenada

Automatización: TechMate 500 Plus, BondMax, VENTANA BENCHMARK
TechMate Horizon, Autostainer.

Digestión enzimática: No

Recuperación antigénica: calor.

Anticuerpo primario: clon 8G7G3/1 y clon SPT24; durante 20- 30 minutos a T.A.

Cromógeno: DAB.

7.- Comentarios:

TTF1 es una proteína nuclear de 38 KDa que se identificó inicialmente en rata, como factor de transcripción específico de los genes tiroideos que regulan la producción de tiroglobulina y tiroperoxidasa. Posteriormente se identificó también en epitelio respiratorio, donde regula la secreción de surfactante, y en tejidos neurales, donde no se conoce su función.

La secuencia de TTF1 se encuentra altamente conservada en los mamíferos, por lo que se pudo aislar en cDNA tiroideo humano partiendo de la secuencia de proteína bovina, y presenta una identidad del 98% con la de rata y perro.

El patrón de expresión IHQ en pulmón y en tiroides es también similar entre humano y rata. En las células C parafoliculares de ambos también se expresa, en las que actúa como un factor de transcripción Ca^{++} dependiente, regulando la expresión de genes críticos en la homeostasis del calcio. Sin embargo, en rata se ha demostrado su presencia en glándula paratiroidea, mientras que en humano no se expresa en esta localización.

En las vías aéreas pueden distinguirse diferentes tipos celulares, según se trate de tracto proximal o distal, y su expresión de proteínas específicas: surfactante A, B o C y la proteína secretora de las células Clara (CCSP).

En pulmón fetal TTF1 se expresa desde la semana 11 en el epitelio respiratorio distal, donde activa la transcripción del gen del surfactante C. También se expresa células epiteliales alveolares tipo II, productoras de surfactante A y B, y en células no ciliadas del epitelio de las vías aéreas productoras de CCSP.

En adultos, el TTF1 se detecta en los neumocitos tipo II y en células no ciliadas del epitelio de los bronquiolos, no observándose en los neumocitos diferenciados tipo I ni en las células bronquiales ciliadas. Este patrón reproduce el de la expresión de surfactante A, B y C, y de proteína CCSP. El TTF1 se detecta también en carcinomas de células pequeñas, que no expresan surfactante, incluso en algunos (hasta un 36% según autores) de origen extrapulmonar, mientras que puede considerarse que no se expresa en adenocarcinomas y otros tumores extrapulmonares. Sin embargo, recientemente se han publicado casos de carcinoma colorrectal con positividad focal para TTF-1 usando el clon SPT24, no así con 8G7G3/1.

Aunque algunos autores han querido encontrar significado en la tinción citoplasmática observada ocasionalmente en algunos casos, hasta el momento se considera que es un hallazgo inespecífico y no debe tenerse en cuenta con fines diagnósticos (excepto en el caso de que se trate de tejido hepático, que invariablemente presenta tinción citoplasmática con el clon 8G7G3/1).

El TTF-1 puede resultar muy útil en el diagnóstico de neoplasias pulmonares por PAAF. El hecho de ser una tinción nuclear favorece su interpretación en extensiones celulares, y se puede aplicar incluso sobre extensiones ya teñidas con Papanicolau. Sin embargo se ha demostrado que con la utilización de extensiones previamente teñidas con Diff-Quik no se obtienen resultados fiables.

8.- Bibliografía Seleccionada

- Diagnostic Immunohistochemistry. David J. Dabbs. Ed. Churchill Livingstone. 2ª edición. 2006
- An Immunohistochemical Vademecum. Paul W Bishop. www.e-immunohistochemistry.info
- Gene structure and expression of Human Thyroid Transcription Factor-1 in respiratory epithelial cells. Ikeda K, Clark JC, Shaw-white JR, et al. J Biol Chem 1995 Vol 270, (14): 8108-8114.

- Expression of Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) in fetal and neonatal human lung. Sthelman M, Gray M and Whitsett J. *J Histochem Cytochem* 1996 Vol 44, (7): 673-678.
- Expression of Thyroid transcription Factor-1 in human C cells and medullary thyroid carcinomas. *Hum Pathol*. 2000 Mar; 31 (3): 386-93.
- TTF-1 is calcium modulated and coordinately regulates genes involved in calcium homeostasis in C cells. Suzuki K, Lavaroni S, Mori A et al. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec; 18 (12): 7410-22.
- Absence of TTF-1 expression in human parathyroid and pituitary glands. Mantovani G, Corbetta S, Rooli R et al. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Aug 20; 182 (1): 13-7.
- TTF-1 in pulmonary adenocarcinoma. Stenhouse G, Fyfe N, King G, et al. *J Clin Pathol* 2004; 57: 383-387.
- Positive immunostaining for thyroid transcription factor-1 in primary and metastatic colonic adenocarcinoma: a note of caution. Penman D, Downie I, Roberts F. *J Clin Pathol* 2006 Jun; 59 (6): 663-4
- Variable sensitivity and specificity of TTF-1 antibodies in lung metastatic adenocarcinoma of colorectal origin. Comperat E, Zhang F, Perrotin C et al. *Mod Pathol* 2005 Oct, 18 (10): 1371-6
- Incidence and significance of cytoplasmic thyroid transcription factor-1 immunoreactivity Bejarano PA, Mousavi F. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Feb; 127(2):193-5.
- Immunostaining for thyroid transcription factor-1 on fine-needle aspiration specimens of lung tumors: a comparison of direct smears and cell block preparations. Liu J, Farhood A. *Cancer*. 2004 Apr 25;102(2):109-14