

Analisis Ekspresi BRAF dan TERT pada Kasus *Papillary Thyroid* Carcinoma Berdasarkan Stratifikasi Risiko ATA

Cempaka Harsa Sekarputri, Ety Hary Kusumastuti, Gondo Mastutik

Departemen/SMF Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga/RSUD. Dr. Soetomo
Surabaya

Penulis korespondensi: dr. Ety Hary Kusumastuti, SpPA(K)

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga
Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47
Surabaya 60131.

e-mail: etty_pa@yahoo.com; dr.cempakaharsa@yahoo.co.id

ABSTRAK

Latar belakang

Papillary thyroid carcinoma (PTC) adalah jenis keganasan tiroid terbanyak, lebih 80% dari kanker tiroid. Rekurensi mencapai 30% kasus. BRAF dan TERT adalah marker yang berkaitan dengan sifat agresif pada kanker, yang keduanya terlibat pada patogenesis PTC dan telah menjadi target baru untuk terapi molekular. Sistem stratifikasi risiko ATA dinilai dapat menentukan risiko rekurensi pada PTC. Sampai saat ini belum ditemukan marker yang dapat digunakan untuk menentukan risiko rekurensi PTC. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis korelasi ekspresi BRAF dan TERT terhadap stratifikasi risiko ATA pada kasus PTC.

Metode

Metode penelitian yang dilakukan adalah analitik observasional dengan pendekatan *cross sectional* pada 56 sampel PTC varian klasik di SMF Patologi Anatomi RSUD. Dr. Soetomo periode Januari 2015-Desember 2017 dengan parameter ATA yang terbagi menjadi kelompok risiko rendah, risiko sedang, risiko tinggi. Ekspresi BRAF dan TERT dinilai dengan pulasan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal Santa Cruz. Korelasi antar variabel dianalisis dengan uji korelasi Spearman's rho.

Hasil

Pada penelitian ini didapatkan untuk masing-masing kelompok berdasarkan stratifikasi risiko ATA untuk risiko rendah sebanyak 13 sampel (23,20%), risiko sedang sebanyak 25 sampel (44,62%), dan risiko tinggi sebanyak 18 sampel (32,12%). Ekspresi BRAF ($p=0,004$) dengan nilai $r=0,374$ dan TERT ($p=0,032$) dengan nilai $r=0,287$ terhadap sistem stratifikasi ATA menunjukkan korelasi yang bermakna

Kesimpulan:

Ekspresi BRAF dan TERT menunjukkan korelasi signifikan terhadap stratifikasi risiko ATA pada kasus PTC varian klasik.

Kata Kunci: *papillary thyroid carcinoma*, BRAF, TERT, stratifikasi risiko ATA.

Analysis of BRAF and TERT Expressions in Papillary Thyroid Carcinoma Cases Based on ATA Risk Stratification

ABSTRACT

Background

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common malignancy in thyroid, accounting for more than 80% of all thyroid cancer. Recurrences of the disease reach 30% cases. It has been widely observed that BRAF and TERT is associated with aggressiveness behaviors in human cancer. Both are involved in the pathogenesis of PTC that may be used as targets for new therapies. American Thyroid Association (ATA) risk stratification can define the risk of recurrence in PTC. No marker has been found to determine the risk of PTC recurrence. The purpose of this study is to analyzed BRAF and TERT expression in ATA risk stratification system in PTC classic variant samples.

Methods

The methods of this study is an analytical observational study with cross sectional approach, conducted on 56 samples of PTC classic variant selected from Department of Anatomical Pathology Dr. Soetomo General Hospital between January 2015-December 2017 by determined criteria in ATA risk stratification groups of low risk, intermediate risk and high risk. The expression BRAF and TERT observed using immunohistochemical staining of Santa Cruz monoclonal antibody.

Results

The result for each group based on ATA risk stratification groups of low risk were 13 samples (23.20%), intermediate risk were 25 samples (44.62%) and high risk were 18 samples (32.12%).

The correlation was assessed with Spearman's rho correlation test. There is significant correlation BRAF ($p=0.004$) with a value of $r=0.374$ and TERT ($p=0.032$) with a value of $r=0.287$ for ATA risk stratification.

Conclusion

BRAF and TERT expression showed significant correlation to ATA risk stratification in classic variant PTC.

Key words: papillary thyroid carcinoma, BRAF, TERT, ATA risk stratification.

PENDAHULUAN

Kanker tiroid adalah keganasan pada kelenjar endokrin yang sering terjadi. *Papillary thyroid carcinoma* (PTC) adalah yang sering terjadi di antara beberapa subtipe histologis kanker tiroid, mencakup 80-90% dari keganasan tiroid.^{1,2} Kurang lebih 90% karsinoma tiroid berdiferensiasi dapat ditangani dengan reseksi bedah, namun PTC memiliki sifat biologis yang bervariasi luas dengan variabel-variabel klinikopatologi yang menandakan sifat agresif tumor. Risiko rekurensi yang didapatkan pada pasien PTC sebanyak 30%.³ Dengan rata-rata waktu yang diperlukan adalah 6 bulan hingga beberapa dekade kemudian. Beberapa faktor yang berhubungan dengan risiko kekambuhan adalah: metastasis kelenjar getah bening (KGB), varian histologis, ukuran tumor, *extra-thyroidal extension* (ETE), ekstensi ekstra-nodal, jenis kelamin laki-laki, dan usia di atas 45 tahun pada saat diagnosis.⁴

Tahun 2009, disusun revisi pedoman penanganan kanker tiroid oleh *American Thyroid Association* (ATA) yang memasukkan sistem stratifikasi risiko untuk memprediksi risiko rekurensi penyakit. Sistem ini, mengkategorikan pasien dalam risiko rendah, risiko menengah, dan risiko tinggi. Variabel-variabelnya mencakup ada/tidaknya metastasis lokal dan jauh, tingkat reseksi tumor, invasi tumor loko-regional, histologi, invasi vaskular, serta tingkat serapan pada I-131 (Iodipamide Sodium I -131).^{3,5} Stratifikasi risiko sangat penting untuk mengidentifikasi pasien dengan risiko rekurensi yang lebih tinggi, sehingga terapi lebih agresif dan pemantauan intensif dapat diimplementasikan.

Mutasi *B-Rapidly accelerating fibrosarcoma* (BRAF) memiliki prevalensi tinggi pada kanker-kanker dengan prognosis buruk (70%).⁷ Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa mutasi BRAF^{V600E} berhubungan dengan agresivitas PTC antara lain ekstensi ekstratiroidal, metastasis KGB, Stadium III dan IV, hilangnya sensitivitas terhadap iodine radioaktif, resisten terhadap iodine radioaktif, dan rekurensi tumor.⁸ Penelitian lain dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat PTC dengan BRAF^{V600E} positif, namun penelitian lain menghasilkan penemuan-penemuan yang kontroversial mengenai kegunaan BRAF^{V600E} sebagai indikator prognostik.⁹ Mutasi promotor *Telomerase reverse transcriptase* (TERT) menyebabkan aktivasi katalitik telomerase, berperan dalam imortalitas sel dan

tumorigenesis.¹⁰ Mutasi promotor TERT berhubungan dengan agresivitas kanker, seperti rekurensi dan angka mortalitas pada PTC.¹¹

Bila terjadi mutasi BRAF, maka dapat ditemukan mutasi TERT pada sekitar 12% kasus PTC dengan prognosis yang buruk yang berhubungan dengan sifat agresif dan metastasis tumor tiroid; walaupun TERT dalam menentukan diagnosis dan prognosis masih belum jelas.¹⁰

Standar emas untuk analisis mutasi BRAF adalah penilaian *deoxyribonucleic acid* (DNA). Beberapa metode lain yang dinilai telah sukses mengidentifikasi mutasi BRAF, adalah: *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR), *allele-specific PCR*, *high resolution melting analysis*, *pyrosequencing* dan *Sanger sequencing*. Walaupun terdapat keterbatasan, seperti proses pemeriksaan lebih rumit, waktu lebih lama, peralatan mahal, kebutuhan terhadap personel terlatih, kemungkinan kontaminasi dari komponen non-neoplastik, heterogenitas sampel, sehingga dapat menyebabkan hasil yang tidak terprediksi. Antibodi monoklonal terhadap protein BRAF yang terlibat pada mekanisme molekuler neoplasma berhasil diterapkan pada neoplasma tiroid,¹¹ yang memiliki sensitivitas 100% dan spesifisitas 82,2%.¹²

Kadar protein TERT pada tingkat seluler rendah namun dideteksi dengan pewarnaan imunohistokimia. Pada penelitian lain didapatkan bahwa imunohistokimia menggunakan antibodi TERT memiliki implikasi penting pada diagnosis kanker, prognosis serta sebagai indikator residu penyakit.¹⁴

Saat ini, belum ada biomarker molekuler dalam penggunaan klinis untuk memprediksi rekurensi. Oleh karena itu, biomarker untuk prognosis dan diagnosis rekurensi adalah subyek dari penyelidikan intens saat ini.⁶

Tujuan penelitian ini adalah menganalisa korelasi ekspresi BRAF dan TERT terhadap stratifikasi risiko ATA pada kelompok-kelompok kasus PTC varian klasik risiko rekurensi rendah, sedang, dan tinggi.

METODE

Sampel diperoleh dengan *total population sampling* dengan kriteria inklusi dan eksklusi dari spesimen *formalin-fixed paraffin-embedded tissue* yang berhasil dari bahan operasi PTC varian klasik di SMF Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo periode Januari 2015-Desember

2017. Kriteria inklusi adalah: (1) Sampel dengan data pendukung lengkap, (2) spesimen dari tumor primer, (3) ukuran tumor lebih dari 1 cm. Kriteria eksklusi berikut adalah: (1) blok parafin hilang atau rusak, (2) dari reevaluasi *slide*, gambaran tidak sesuai dengan morfologi PTC varian klasik, (4) spesimen dari *completion thyroidectomy*, *vries coupe* atau *second opinion*.

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekspresi *BRAF* dan *TERT*. Spesimen dipulas menggunakan teknik imunohistokimia dengan *BRAF* (antibodi monoklonal, dilusi 1: 150, klon F-7, *Santa cruz biotechnology, inc*) dan *TERT* (antibodi monoklonal, dilusi 1: 100, klon A-6, *Santa cruz biotechnology, inc*). Ekspresi *BRAF* dan *TERT* dievaluasi dengan mikroskop cahaya Olympus CX-31. *BRAF* dievaluasi menggunakan skala rasio berdasarkan prosentase sel-sel neoplastik yang terpulas kecoklatan per jumlah sel tumor yang tampak dalam satu lapang pandang. Hasil persentase dari seluruh lapang pandang dijumlahkan, kemudian dibagi rata dengan jumlah lapang pandang dalam satu spesimen slide. *TERT* dinilai menggunakan skala ordinal berdasarkan persentase area yang terpulas dan intensitas pulasan pada sel-sel neoplastik, dengan skoring: (1) <20% skor 1, (2) 21-50% skor 2, (3) > skor 50% 3. Intensitas pulasan diskoring: (1) lemah, (2) sedang, (3) kuat. Skor diperoleh dengan menjumlahkan persentase dan skor intensitas dengan skor minimum 2, maksimum adalah 6. Variabel dependen dari penelitian ini adalah stratifikasi risiko ATA. Sampel diamati dan dikelompokkan berdasarkan stratifikasi risiko ATA risiko rendah, risiko menengah, dan risiko tinggi menggunakan skala ordinal. Kriteria risiko rendah adalah; tumor primer tanpa ETE, reseksi *complete*, tanpa *lympho-vascular invasion* (LVSI), dengan atau/ tanpa metastasis KGB ≤5 atau diameter metastatis KGB ≤2 mm, tanpa metastasis jauh. Kriteria

risiko menengah adalah: tumor primer dengan ETE mikroskopik, reseksi *complete*, didapatkan LVSI, dengan metastatis KGB berjumlah >5 atau diameter metastatis KGB 2 mm-≤3 cm, tanpa metastasis jauh. Kriteria risiko tinggi adalah: tumor primer dengan ETE makroskopik, reseksi *incomplete*, dengan LVSI, diameter metastatis KGB >3 cm, dengan metastasis jauh KGB.

Ekspresi *BRAF* dan *TERT* diperoleh dari data primer melalui observasi dengan mikroskop cahaya Olympus CX-31, sedangkan stratifikasi risiko ATA diperoleh dari data primer dengan observasi dengan mikroskop cahaya Olympus CX-31 dan data sekunder dari rekam medis pasien. Pengamatan dilakukan oleh dua penilai.

Uji Kolmogorov-Smirnoff dilakukan untuk menilai normalitas data. Korelasi antar variabel dievaluasi menggunakan korelasi Spearman's rho, dengan $r=0,1-0,29$ (korelasi lemah), $r=0,3-0,49$ (korelasi sedang), $r \geq 0,5$ (korelasi kuat).

HASIL

Ekspresi *BRAF* dan *TERT* dievaluasi pada kelompok-kelompok kasus PTC varian klasik yang terbagi menjadi 3 kelompok sampel risiko rekurensi rendah, sedang dan tinggi berdasarkan stratifikasi risiko ATA. Pada penelitian ini didapatkan untuk masing-masing kelompok berdasarkan stratifikasi risiko ATA untuk risiko rendah sebesar 13 sampel (23,20%), risiko sedang sebesar 25 sampel (44,62%), dan risiko tinggi sebesar 18 sampel (32,12%). Beberapa karakteristik diamati dari sampel. Usia pasien berkisar 14-77 tahun. Rerata usia pada tiap kelompok, pada kelompok risiko rendah didapatkan rerata 45,07, kelompok risiko sedang 50,12, sedangkan pada kelompok risiko tinggi 49,66. Penderita PTC terbanyak adalah wanita sebesar 63,13%, sedangkan laki-laki sebesar 36,82%, hal ini menunjukkan perempuan dibanding laki-laki sebesar 1,71:1.

Tabel 1. Distribusi sampel berdasar usia dan jenis kelamin.

Jenis kelamin	Pria (36,82%)		Wanita (63,13%)		Total
	Usia ≤55 tahun	>55 tahun	≤55 tahun	>55 tahun	
Resiko rendah	3 / 56 (5,35%)	0 / 56 (0%)	9 / 56 (16,07%)	1 / 56 (1,78%)	13 (23,20%)
Resiko sedang	4 / 56 (7,14%)	5 / 56 (8,92%)	11 / 56 (19,64%)	5 / 56 (8,92%)	25 (44,62%)
Resiko tinggi	6 / 56 (10,71%)	3 / 56 (5,35%)	5 / 56 (8,92%)	4 / 56 (7,14%)	18 (32,12%)
Total	13 / 56 (23,20%)	8 / 56 (14,27%)	25 / 56 (44,63%)	10 / 56 (17,84%)	

Angka rekurensi yang didapatkan pada secara keseluruhan sampel penelitian ini adalah 17,85%, rekurensi pada kelompok risiko rendah

yaitu sebesar 15,38%. Pada kelompok risiko sedang terdapat 3 kasus rekurensi yaitu sebesar 12%. Didapatkan pula 5 kasus rekurensi pada

kelompok risiko tinggi yaitu mencapai 27,77%.
Stratifikasi risiko ATA mengandung berbagai parameter karakteristik tumor untuk

menilai derajat risiko rekurensi, antara lain adalah ETE, reseksi tumor, LVSI, metastasis KGB, serta metastasis jauh.

Tabel 2. Distribusi sampel berdasarkan parameter stratifikasi risiko ATA.

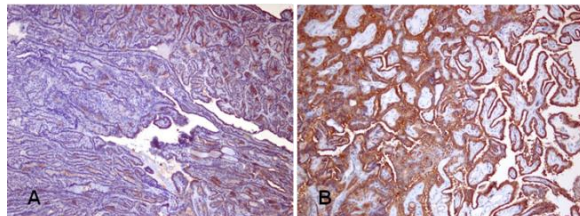
Stratifikasi risiko ATA	Risiko rendah	Risiko sedang	Risiko tinggi	Total
ETE				
(-)	13	8	3	24 / 56 (42,85%)
Mikroskopis	0	17	1	18 / 56 (32,14%)
Makroskopis	0	0	14	14 / 56 (25%)
Reseksi				
Complete	13	25	14	52 / 56 (92,85%)
Incomplete	0	0	4	4 / 56 (7,15%)
LVSI				
(-)	13	15	13	41 / 56 (73,21%)
(+)	0	10	5	15 / 56 (26,79%)
Metastasis KGB				
(-)	9	3	2	14 / 56 (25%)
Jumlah ≤5 atau Ø metastasis KGB ≤ 2mm	4	1	0	5 / 56 (8,92%)
Jumlah >5 atau Ø metastasis KGB 2 mm-3cm	0	21	6	27 / 56 (48,21%)
Ø metastasis KGB >3cm	0	0	10	10 / 56 (17,86%)
Metastasis jauh				
(-)	13	25	12	50 / 56 (89,28%)
(+)	0	0	6	6 / 56 (10,71%)

Korelasi ekspresi BRAF terhadap stratifikasi risiko ATA

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai rerata BRAF pada kelompok risiko rendah sebesar 62,31±18,213, pada kelompok risiko sedang 74,80±16,80, dan pada kelompok risiko tinggi 81,39±13,591. Secara keseluruhan didapatkan nilai rerata BRAF sebesar 74,02±17,41.

Tabel 3. Ekspresi BRAF.

Stratifikasi risiko ATA	N	Mean	SD	Median	Min	Maks
Risiko rendah	13	62,31	18,213	60,00	25	90
Risiko sedang	25	74,80	16,800	80,00	40	95
Risiko tinggi	18	81,39	13,591	82,50	45	100
Total	56	74,02	17,410	80,00	25	100



Gambar 1. Ekspresi BRAF terpusat coklat pada sitoplasma sel tumor, A: BRAF terpusat <50%, B: BRAF terpusat >50%

Korelasi di antara variabel-variabel dianalisa menggunakan statistik non parametrik uji korelasi Spearman's rho, dengan nilai r=0,1-

0,29 (korelasi lemah), r=0,3-0,49 (korelasi sedang), r>0,05 (korelasi kuat). (Tabel 5)

Tabel 4. Hasil uji korelasi Spearman's rho ekspresi BRAF berupa koefisien korelasi (r) dan signifikansi (p).

	Stratifikasi risiko ATA	
	r	p
BRAF (%)	0,374	0,004

*signifikansi <0,05 (2-tailed)

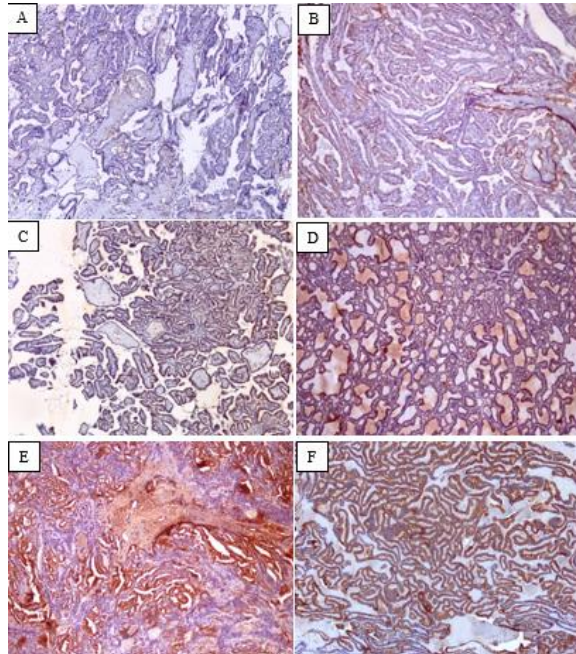
Uji korelasi antara dengan uji korelasi Spermans' rho BRAF dan ATA didapatkan hasil p=0,004(<0,05) yang menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara ATA dan BRAF. Kuat hubungan ATA dan BRAF adalah sebesar 0,374, koefisien korelasi bernilai korelasi sedang.

Korelasi ekspresi TERT terhadap stratifikasi risiko ATA

Nilai rerata TERT yang didapatkan pada kelompok risiko rendah sebesar 3,54±1,198, pada kelompok risiko sedang 3,96±1,428, dan pada kelompok risiko tinggi 4,56±0,922. Secara seluruhnya didapatkan nilai rerata TERT sebesar 4,05±1,271.

Tabel 5. Ekspresi TERT.

Stratifikasi risiko ATA	N	Mean	SD	Median	Min	Maks
Risiko rendah	13	3,54	1,198	3,00	2	5
Risiko sedang	25	3,96	1,428	4,00	2	6
Risiko tinggi	18	4,56	0,922	4,50	3	6
Total	56	4,05	1,271	4,00	2	6



Gambar 2. Ekspresi TERT terpusat coklat pada sitoplasma sel tumor. A. Skor TERT 2 (terpusat <20%, intensitas lemah); B. Skor TERT 3 (terpusat <20%, intensitas sedang); C. Skor TERT 4 (terpusat 21-50%, intensitas sedang); D. Skor TERT 4 (terpusat <20%, intensitas kuat); E. Skor TERT 5 (terpusat 21-50%, intensitas kuat); F. Skor TERT 6 (terpusat >50%, intensitas kuat).

Skor TERT menggunakan rasio ordinal, oleh karena itu digunakan uji statistik non parametrik Spearman's rho tanpa melakukan uji normalitas data. Korelasi diantara variabel-variabel dianalisis menggunakan statistik non parametrik uji korelasi Spearman's rho, dengan nilai $r=0,1-0,29$ (korelasi lemah), $r=0,3-0,49$ (korelasi sedang), $r>0,05$ (korelasi kuat). (Tabel 5)

Tabel 6. Hasil uji korelasi Spearman's rho ekspresi TERT berupa koefisien korelasi (r) dan signifikansi (p).

Skor TERT	Stratifikasi risiko ATA	
	r	p
	0,287	0,032

Uji korelasi antara dengan uji korelasi Spermans rho TERT dan ATA didapatkan hasil $p=0,032(<0.05)$, yang menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara ATA dan TERT. Kuat hubungan ATA dan TERT adalah sebesar 0,287, koefisien korelasi bernilai korelasi lemah.

DISKUSI

PTC merupakan tumor ganas epitel yang menunjukkan diferensiasi sel folikular dan karakteristik inti tertentu. Secara mikroskopis, ada dua tanda kardinal morfologi dari PTC varian klasik yaitu bentukan papilla dan perubahan inti. Papilla terdiri atas tangkai fibrovaskular yang tersusun dari jaringan ikat longgar dengan pembuluh darah dengan dinding tipis berbagai ukuran, tangkai dilapisi oleh sel epitel neoplastik. Inti dari sel PTC menunjukkan serangkaian abnormalitas yang diklasifikasikan dalam 3 kategori yaitu: (1) perubahan ukuran dan bentuk: inti membesar dan elongasi (2) iregularitas membran: kontur inti sangat tidak beraturan dan adanya *longitudinal groove* serta pseudo inklusi inti, yang menunjukkan adanya invaginasi sitoplasma yang dalam ke dalam inti (3) karakteristik kromatin: gambaran *ground glass* (inti seperti kosong, kromatin jarang dengan membran inti tipis).¹⁵

Tahun 2009, dilakukan revisi pedoman untuk penanganan kanker tiroid dari ATA yang memperhitungkan pula sistem stratifikasi risiko untuk memprediksi risiko rekurensi penyakit. Dengan sistem ini, pasien dikategorikan sebagai risiko rendah, risiko menengah, dan risiko tinggi. Variabel termasuk ada/tidaknya penyakit metastasis lokal dan jauh, derajat reseksi tumor, invasi tumor lokal-regional, histologi (lebih atau kurang agresif, seperti dibahas di atas), invasi vaskular, serta tingkat serapan yang terlihat pada paska terapi pemindaian seluruh tubuh, jika diberikan terapi I-131.^{3,16}

Distribusi sampel berdasarkan kelompok stratifikasi risiko ATA didapatkan jumlah sampel yang paling sedikit yaitu pada kelompok risiko rendah. Hal ini diduga karena pasien datang sudah dalam keadaan stadium lanjut. Usia pasien berkisar 14-77 tahun. Rerata usia pada tiap kelompok, pada kelompok risiko rendah didapatkan rerata 45,07, kelompok risiko sedang 50,12, sedangkan pada kelompok risiko tinggi 49,66. Penderita PTC terbanyak adalah wanita sebesar 63,13%, sedangkan laki-laki sebesar

36,82%, hal ini menunjukkan perbandingan pasien wanita dibanding laki-laki 1,71:1. Distribusi sampel tersebut sesuai dengan peneliti terdahulu yang menyatakan bahwa usia pasien rata-rata 20-50 tahun, walau individu kelompok usia lain dapat mengalami. PTC; prevalensi 2,9 pada wanita dibanding laki-laki.⁵ Hasil penelitian menunjukkan rekurensi pada kelompok risiko tinggi mencapai 27,77%, yang sesuai dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa rekurensi penyakit PTC sering dihubungkan dengan prognosis, dengan risiko rekurensi mencapai sekitar 30%.³

PTC meliputi beberapa jenis tumor dengan mutasi-mutasi gen melalui jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Mutasi pada BRAF^{V600E} memiliki porsi 60%, diikuti oleh (15%) tatanan kromosom yang menyebabkan ekspresi kinase yang berasal dari BRAF atau reseptor tirosin kinase seperti RET, *neurotrophic tropomyosin receptor kinase* (NTRK) dan *anaplastic lymphoma kinase* (ALK). Mutasi *Retrovirus-Associated DNA Sequences* (RAS) mencapai 13%, sedang 12% di antaranya belum diketahui mutasi penyebabnya. PTC varian klasik dengan mutasi BRAF, biasanya berkaitan dengan frekuensi tinggi kejadian metastasis KGB setelah tiroidektomi dan memiliki respon buruk terhadap terapi iodium-radioaktif. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan adanya asosiasi signifikan Mutasi BRAF^{V600E} dengan overekspresi protein BRAF.¹³

Mutasi promotor TERT yang sering didapatkan pada kromosom 5 C228T dan C250T, di mana C228T lebih dominan daripada C250T, dengan mutasi promotor TERT C228T sebanyak 9,7% dan mutasi promotor TERT C250T sebanyak 2,1% pada PTC.¹⁰ TERT adalah komponen katalitik dari kompleks telomerase, yang berperan penting untuk mempertahankan panjang lengan telomer kromosom, mencegah pemendekan telomer dengan mempertahankan pengulangan TTAGG pada ujung kromosom dan mengandung protein dengan aktivitas *reverse transcriptase*, sehingga sel kanker mendapatkan fungsi replikasi imortalitas serta menyebabkan proliferasi sel kanker tanpa melalui aktivitas telomer.^{5,18} Penelitian menyatakan bahwa pada pemeriksaan imunohistokimia menggunakan protein TERT menunjukkan mutasi promotor TERT berhubungan dengan agresivitas kanker, seperti rekurensi dan angka

mortalitas pada PTC, agresivitas pada melanoma, glioma, dan kanker kandung kemih.^{5,14,18.}

Korelasi ekspresi BRAF terhadap stratifikasi risiko ATA

Uji korelasi antara ATA dan BRAF dengan menggunakan uji korelasi Spearman's rho didapatkan hasil $p=0,004 (<0,05)$ disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara ATA dan BRAF. Kuat hubungan ATA dan BRAF adalah sebesar 0,374, yang artinya semakin tinggi stratifikasi ATA semakin besar nilai BRAF, dan kuat hubungannya berkorelasi sedang. Penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa BRAF^{V600E} terhubung dengan invasi tumor dengan menginduksi MMP (proteinase yang mendegradasi ECM dan menyebabkan invasi tumor), dan adanya overekspresi BRAF pada tumor dengan ETE.¹³

Tumorigenesis tiroid yang dimediasi oleh jalur MAPK melibatkan berbagai perubahan molekular luas yang bersinergi dan meningkatkan aktivitas onkogenik, seperti hipermetilasi dan hipometilasi. Berbagai upregulasi protein onkogenik dapat muncul. Termasuk beberapa *chemokine*, VEGF-A, (*Mesenchymal to Epithelial Transition*) MET, *nuclear factor-κB* (NF-κB), *matrix metalloproteinases* (MMPs), *prohibitin*, *vimentin*, HIF1α, *prokineticin 1* (PROK1 atau yang disebut sebagai EG-VEGF), *urokinase plasminogen activator* (uPA) dan reseptornya (uPAR), *transforming growth factor-β1* (TGFβ1) dan *thrombospondin 1* (TSP1). Protein ini menyebabkan proliferasi sel kanker, pertumbuhan, migrasi, memperpanjang kelangsungan hidup sel kanker, juga angiogenesis, invasi dan metastasis. Protein BRAF tidak hanya berfungsi sebagai pendukung struktural saja, namun memiliki dampak pada perilaku sel kanker termasuk viabilitas, proliferasi, adhesi dan motilitas.¹⁹

Invasi tumor dan metastasis membutuhkan degradasi proteolitik ECM dan membran basal oleh MMPs. MMPs merupakan *zinc-dependent endopeptidase* yang terbagi menjadi kolagenase, gelatinase, stromelysin dan matriksin berdasarkan spesifisitas komponen ECM. Salah satu keluarga MMP terlibat dalam pemecahan kolagen tipe I dan III, yang merupakan kolagenase interstitial. BRAF menginduksi ekspresi MMP-1 melalui aktivasi MAPK *pathway* diperantari signalling terhadap NF-κB, sehingga mutasi BRAF^{V600E} meningkatkan invasi

sel PTC. Ada beberapa penjelasan, yaitu peningkatan invasi tumor bisa disebabkan oleh aktivitas MAPK *pathway* dan aktivitas MAPK yang mempengaruhi migrasi sel dan metastasis melalui ekspresi integrin.²⁰

Korelasi ekspresi TERT terhadap stratifikasi risiko ATA

Uji korelasi antara ATA dan TERT dengan menggunakan uji korelasi Spearman's rho didapatkan hasil $p=0,032 (<0,05)$ disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara ATA dan TERT. Kuat hubungan ATA dan TERT adalah sebesar 0,287, yang artinya semakin tinggi stratifikasi ATA semakin besar nilai TERT, namun kuat hubungannya relatif lemah. Sistem skoring TERT yang digunakan dalam penelitian ini tidak didapatkan skor 0, dan dijumpai 2 sampel dengan hasil TERT negatif, namun karena tidak didapat skor 0 maka diberikan skor terendah yaitu skor 2; oleh karena itu, diperlukan modifikasi terhadap sistem skoring TERT.

Peningkatan ekspresi TERT memiliki peran dalam pertumbuhan tumor dan adanya ekspresi protein TERT merupakan indikasi prognosis buruk PTC. Mutasi TERT menyebabkan sifat agresif dan metastasis PTC. Perubahan ekspresi TERT memengaruhi kemampuan migrasi dan invasi sel PTC. EMT merupakan proses yang berkontribusi pada metastasis tumor dengan meningkatkan kemampuan migrasi dan invasi sel tumor. Adanya peningkatan ekspresi TERT dapat menyebabkan peningkatan mesenkimial marker berupa N-Cadherin dan Vimentin yang menyebabkan penurunan marker sel epitel E-Cadherin. EMT merupakan langkah kritis yang berperan dalam invasi dan metastasis kanker. N-cadherin memberikan hubungan yang kuat antara *matrix metalloproteinases* (MMPs) dan metastasis tumor. Penanda penting lain yang terlibat dalam angiogenesis dan metastasis invasi sel tumor adalah MMP-2, MMP-9 dan VEGF. Peran TERT adalah memengaruhi kemampuan sel dalam migrasi dan invasi.¹ Ekspresi BRAF dan TERT berkaitan dengan sifat agresif dari PTC terutama ETE dan metastasis yang merupakan bagian dari parameter stratifikasi risiko ATA untuk memperkirakan risiko rekurensi pada PTC.

KESIMPULAN

Ekspresi BRAF dan TERT terhadap stratifikasi risiko ATA pada kasus PTC varian klasik

menunjukkan korelasi signifikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bu R, Siraj AK, Divya SP, Kong Y, Parvathareddy SK, Al-Rasheed M, *et al.* Telomerase reverse transcriptase mutations are independent predictor of disease-free survival in middle eastern papillary thyroid cancer. *Int J Cancer.* 2018; 142(10): 2028-39. Available from: DOI: 10.1002/ijc.31225.
2. Vuong HG, Altibi AMA, Duong UNP, Ngo HTT, Pham TQ, Tran HM, *et al.* Role of Molecular Markers to Predict Distant Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma: Promising Value of TERT Promoter Mutations and Insignificant Role of BRAF Mutations-a Meta Analysis. *Tumor Biology.* 2017;39(10): 1-12. Available from: DOI: 10.1177/1010428317713913.
3. Czarniecka A, Wojeiechowska MO, Barcynski M. BRAF V600E mutation in prognostication of papillary thyroid cancer (PTC) recurrence. *Gland Surg.* 2016; 5: 495-505. Available from: DOI: 10.21037/gs.2016.09.09.
4. Bates MF, Lamas MR, Randle RW, Long KL, Pitt SC, Schneider DF, *et al.* Back so soon? -is early recurrence of papillary thyroid cancer really just persistent disease? *Surg.* 2018; 163: 118-23. Available from: DOI: 10.1016/j.surg.2017.05.028
5. Insilla AC, Proiettu A, Borrelli N, Macerola E, Niccoli C, Vitti P, *et al.* TERT promoter mutations and their correlation with BRAF and RAS mutations in a consecutive cohort of 145 thyroid cancer cases. *Oncol Lett.* 2018; 15: 1763-2770. Available from: DOI: 10.3892/ol.2017.7675.
6. Glover AR, Lee JC, Sidhu SB. Is there an accurate biomarker test for thyroid cancer recurrence on the horizon?. *Int J Endo Oncol.* 2014;1(1):3-5. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.217/ije.14.3>
7. Oikonomou E, Koustas E, Goulielmaki M, Pintzas A. (2014). BRAF vs RAS oncogenes: Are mutations of the same pathway equal? differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget.* 2014;5(23):11752-77. Available from: DOI:10.18632/oncotarget.2555
8. Illie MI, Lassalle S, Mira EL, Bonetaud C, Bordone O, Lespiner V, *et al.* Diagnostic

- value of immunohistochemistry for the detection of the BRAFV600E mutation in papillary thyroid carcinoma: comparative analysis with three DNA-based analysis. Mary Ann Liebert. 2014; 24: 858-66. Available from: <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0302>
9. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, *et al.* Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2006; 91: 3667-70. Available from: DOI:10.1210/jc.2005-2836
 10. Liu R, Xing M. (2016). TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2016; 23: R143-R55. Available from: DOI: 10.1530/ERC-15-0533.
 11. Rossi ED, Martini M, Capodimonti S, Cenci T, Straccia P, Angrisani B, *et al.* Analysis of immunocytochemical and molecular BRAF expression in thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2014; 122(7): 527-35. Available from: DOI: 10.1002/cncy.21416.
 12. Zhu X, Luo Y, Bai Q, Lu Y, Lu Y, Wu L, *et al.* Specific immunohistochemical detection of the BRAFV600E mutation in primary and metastatic papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2016; 100(1): 236-41. Available from: DOI: 10.1016/j.yexmp.2016.01.004.
 13. Silva RC, Paula HSC, Leal CBQS, Cunha EC, de Paula RCG, Alencar AG, *et al.* BRAF overexpression is associated with BRAFV600E mutation in papillary thyroid carcinomas. *Genet Mol Res*. 2015;14(2): 5065-75. Available from: DOI: 10.4238/2015
 14. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Shay JW. Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia*. 2001; 3(1): 17-26. Available from: DOI:10.1038/sj/neo/7900134
 15. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J. *WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon: IARC. 2017. p.81-91.
 16. Orbach GO. Risk stratification in differentiated thyroid cancer: An ongoing process. *Rambam Maimonides Med J*. 2016; 7: e0003. Available from: DOI: 10.5041/RMMJ.10230
 17. Fagin JA, Wells SA. (2016). *Biological and Clinical Perspective on Thyroid Cancer*. *N England J Med*. 2016; 375: 1054-67. Available from: DOI: 10.1056/NEJMra1501993.
 18. Liu R, Zhang T, Zhu G, Xing M. Regulation of mutant TERT by BRAFV600E/MAP kinase pathway through FOS/GABP in human cancer. *Nat Commun*. 2018; 9:579. Available from: DOI: 10.1038/s41467-018-03033-1.
 19. Xing, M. Molecular Pathogenesis and Mechanism in Thyroid Cancer. *Nat Rev Cancer*; 2013; 13: 184-99. Available from: DOI: 10.1038/nrc3431
 20. Palona I, Namba H, Mitsutake N, Starenki D, Podtcheko A, Sedliarou I, *et al.* BRAFV600E promotes invasiveness of thyroid cancer cells through nuclear factor kB activation. *Hokkaido: Endocrinology*. 2006; 147: 5699-707. Available from: DOI: 10.1210/en.2006-0400.