

Hubungan antara Ekspresi P16 dengan Respon Histologik Kemoterapi Neoadjuvan pada Osteosarkoma Konvensional

Dian Sari Oethia Vathonati, Nurjati Chairani Siregar, Puspita Eka Wuyung
Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia
Jakarta

Penulis korespondensi: dr. Nurjati Chairani Siregar, MS., PhD., SpPA(K).
Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta
e-mail: anisiregar@gmail.com diansariov@gmail.com

ABSTRAK

Latar belakang

Osteosarkoma merupakan tumor ganas primer tulang yang paling banyak ditemukan pada anak dan dewasa muda. Patogenesisnya melibatkan berbagai perubahan gen yang kompleks. Jalur utama yang berperan dalam patogenesisnya antara lain melalui jalur protein Retinoblastoma (RB). p16 bekerja sebagai *tumor suppressor* pada jalur RB dalam menghambat pembelahan sel tumor. Salah satu prognosis osteosarkoma dipengaruhi oleh respon histologik kemoterapi neoadjuvan. Kemoterapi dan p16 keduanya saling bekerja sama di dalam menghambat pembelahan sel dan memicu apoptosis. Hilangnya fungsi p16 berkaitan dengan progresivitas sel tumor. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui hubungan ekspresi p16 dengan respon kemoterapi neoadjuvan pada osteosarkoma konvensional.

Metode

Penelitian ini menggunakan desain potong lintang. Dilakukan pulasan imunohistokimia p16 pada setiap kasus biopsi sebelum kemoterapi neoadjuvan, kemudian dihitung persentase sel tumor yang positif. Ekspresi dikategorikan positif apabila inti sel tumor terpulau sedang atau kuat pada $\geq 30\%$ sel tumor. Hasil perhitungan dikelompokkan menjadi ekspresi positif dan negatif kemudian dikorelasikan dengan luas nekrosis reseksi tumor setelah kemoterapi neoadjuvan.

Hasil

Diperoleh 33 kasus osteosarkoma konvensional yang sesuai dengan kriteria inklusi. Ekspresi positif ditemukan 10 kasus (30,3%) dan ekspresi negatif 23 kasus (69,7%). Pada ekspresi positif, 6 dari 10 kasus memiliki respon kemoterapi baik dan pada ekspresi negatif, 21 dari 23 kasus memiliki respon kemoterapi buruk. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi imunohistokimia p16 berhubungan signifikan dengan respon histologik baik kemoterapi neoadjuvan ($p=0,004$).

Kesimpulan

Ekspresi p16 positif memiliki hubungan yang sejalan dengan keberhasilan respon histologik kemoterapi neoadjuvan pada osteosarkoma konvensional.

Kata kunci: Osteosarkoma konvensional, p16, respon histologik kemoterapi neoadjuvan

Association of P16 Expression WITH Neoadjuvan Chemotherapy Histological Response in Conventional Osteosarcoma

ABSTRACT

Background

Osteosarcoma is the most common primary malignant bone tumor in children and young adult. Its pathogenesis has been linked to alterations in several genes. The high percentage is found involving Retinoblastoma (RB) pathway. p16 plays as a tumor suppressor in RB pathway to control proliferation of the tumor cell. The degree of neoadjuvan chemotherapy histological necrosis response is related to prognosis of patients with osteosarcoma. Chemotherapy and p16 both synergic in inhibit the cell tumor proliferation and support apoptotic. Loss of p16 function is related to progressiveness of the tumor. The aim of this study was to investigate the relationship of p16 expression in pretreatment osteosarcoma to pathologic necrotic histological response after neoadjuvan chemotherapy.

Methods

This is a cross sectional study p16 staining was done and count the positive expression tumor cell in percentage. Positive was defined as strong and medium nuclear staining in 30% or greater. The samples is categorized into positive and negative expression then it is correlated into tumor necrotic area based on grade of Huvos.

Results

Samples consist of 33 cases. Positive staining was found in 10 cases (30.3%), 6 of 10 cases had good chemotherapy response. Negative staining was found in 23 cases and 21 of 23 cases had poor chemotherapy response. A significant association was noted between p16 expression and histological necrotic response to neoadjuvan chemotherapy ($p=0.004$).

Conclusion

The result showed that p16 expression associate significantly with histological necrotic response to neoadjuvan chemotherapy in conventional osteosarcoma ($p=0.004$).

Key words: conventional osteosarcoma, necrotic response to neoadjuvan chemotherapy, p16.

PENDAHULUAN

Osteosarkoma merupakan tumor ganas primer tulang yang paling banyak ditemukan pada kelompok anak dan dewasa muda. Di antara seluruh jenis tumor ganas pada anak, kasus osteosarkoma ditemukan sebesar 3-5% dan pada dewasa sekitar 1%.¹ Berdasarkan data seluruh tumor ganas tulang di Amerika Serikat, osteosarkoma menempati urutan pertama yaitu sebesar 35%.² Data arsip Departemen Patologi Anatomi RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo (RSCM) tahun 2013-2018, menunjukkan kasus osteosarkoma berada pada peringkat ke-13 (sebesar 1,4%) dari seluruh jenis tumor ganas.

Jenis osteosarkoma tersering adalah osteosarkoma konvensional.³ Diagnosis tumor ganas ini ditegakkan berdasarkan gambaran klinis, radiologi dan histopatologi.⁴ Prognosisnya dipengaruhi berbagai faktor, antara lain respon histologik setelah kemoterapi neoadjuvan.^{1,5} Penderita yang memiliki respon kemoterapi buruk beresiko lebih tinggi untuk terjadi kekambuhan dan memberikan kesempatan sel tumor yang resisten untuk metastasis.⁶

Setelah lebih dari 30 tahun kemoterapi menjadi protokol tatalaksana osteosarkoma, belum terlihat peningkatan angka harapan hidup bagi osteosarkoma yang berespon buruk. Angka harapan hidup selama 5 tahun untuk berespon baik mencapai 79-90%, sedangkan berespon buruk hanya 20-60%.⁷ Beberapa penelitian melaporkan jumlah kasus berespon buruk cukup bervariasi, Borys *et al*⁸ melaporkan osteosarkoma yang berespon buruk sebanyak 42%. Kosemehmetoglu *et al*⁹ melaporkan, 61,5% osteosarkoma memiliki respon buruk. Berdasarkan arsip Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM tahun 2013-2018 ditemukan 71% osteosarkoma derajat tinggi memiliki respon buruk. Akibat tingginya persentasi osteosarkoma yang berespon buruk disertai rendahnya angka harapan hidup, maka saat ini sedang diteliti berbagai penanda yang mampu memprediksi keberhasilan atau kegagalan respon kemoterapi yang diharapkan dapat memberikan informasi lebih awal kepada dokter klinis untuk menentukan strategi pengobatan yang paling efektif.^{8,9}

Osteosarkoma diperkirakan berasal dari *mesenchymal stem cells* atau *progenitor cells* yang menunjukkan berbagai derajat diferensiasi sel mesenkimal yang memproduksi matriks osteoid.^{4,10} Patogenesis, progresivitas tumor dan prognosisnya melibatkan berbagai perubahan

gen yang kompleks. Salah satu jalur yang penting dalam patogenesis dan progresivitas osteosarkoma adalah jalur protein retinoblastoma (RB) yang berfungsi sebagai *tumor suppressor*. Bila jalur tersebut mengalami gangguan, maka terjadi pembelahan sel yang tidak terkontrol.¹⁰ Jalur RB dipengaruhi oleh aktivitas p16, yaitu protein yang memiliki fungsi sebagai *tumor suppressor* dalam menghentikan pembelahan sel yang berlangsung dari fase G1 menuju fase S. Ekspresi p16 meningkat ketika sel sedang mengalami kerusakan atau pada saat terjadi mutasi onkogen sehingga proliferasi sel tumor dapat dihambat.¹¹

Beberapa penelitian melaporkan, pulasan imunohistokimia p16 positif berhubungan dengan respon kemoterapi yang baik. Righi *et al*¹² memperlihatkan ekspresi p16 secara statistik berhubungan bermakna dengan respon kemoterapi yang baik. Asioli *et al*¹³ melaporkan ekspresi p16 positif lebih banyak ditemukan pada osteosarkoma yang sensitif terhadap kemoterapi dan hilangnya ekspresi p16 berkaitan dengan prognosis yang lebih buruk. Bu *et al*¹⁴ dalam meta analisisnya melaporkan ekspresi p16 positif berhubungan dengan angka survival yang lebih tinggi.

Protein p16 sebagai *tumor suppressor* mempunyai peran penting dalam menghentikan siklus pembelahan sel tumor dengan menghambat ikatan Cdk4-cyclin D. Saat ini sedang diteliti berbagai terapi anti kanker yang dapat menggantikan fungsi p16 pada penderita dengan mutasi p16 antara lain *palbociclib* yang bekerja dengan menghambat ikatan Cdk4-cyclin D. Pada penderita yang mengalami metilasi p16, kadar protein p16 di dalam tubuh akan rendah. Terapi demetilasi pada AE1 (merupakan promotor hipermetilasi pada p16) bertujuan untuk memulihkan fungsi protein p16 telah berhasil diidentifikasi untuk menghambat pembelahan sel kanker.¹⁴

Penelitian ini untuk melihat ekspresi p16 dihubungkan dengan keberhasilan respon histologik kemoterapi neoadjuvan pada penderita osteosarkoma konvensional yaitu dengan menilai luas nekrosis massa tumor berdasarkan derajat Huvos.

METODE

Penelitian ini menggunakan desain penelitian potong lintang. Penelitian deskriptif dilakukan untuk melihat persentase karakteristik sampel dan deskriptif analitik untuk melihat hubungan ekspresi p16 terhadap respon kemo-

terapi neoadjuvan dan beberapa variabel lainnya (subtipe histologik, jenis kelamin, usia, lokasi tumor, ukuran tumor dan status metastasis). Data histopatologik diperoleh dari arsip Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM tahun 2013-2018. Pencarian kasus menggunakan kode morfologi M9180/3, M9181/3 dan M9182/3. Data klinik didapatkan dari formulir dan rekam medik RSCM. Kriteria inklusi meliputi kasus osteosarkoma konvensional yang masing-masing memiliki pemeriksaan histopatologik jaringan biopsi sebelum kemoterapi neoadjuvan dan jaringan reseksi setelah kemoterapi neoadjuvan. Kriteria eksklusi meliputi kasus dengan slaid maupun blok paraffin dan data rekam medis yang tidak lengkap.

Data klinik yang dikumpulkan meliputi jenis kelamin, usia, lokasi tumor, ukuran tumor, status metastasis dan jenis obat kemoterapi yang diberikan. Data histopatologik yang dikumpulkan meliputi subtipe osteosarkoma dan keberhasilan respon kemoterapi. Respon kemoterapi dikatakan baik bila nekrosis $\geq 90\%$ (Huvos derajat III dan IV) dan buruk bila $< 90\%$ (Huvos derajat I & II).

Dilakukan pulasan imunohistokimia p16 pada 33 kasus kemudian dipilih sejumlah area tumor pada slaid yang cukup mewakili untuk difoto. Masing-masing kasus dihitung banyaknya sel tumor terpulaskan positif pada 100 sel tumor dengan pembesaran 400x menggunakan program *Image G*, lalu hasil disajikan dalam bentuk persentase. Setiap kasus diambil 3 sampel. Hasil akhir nilai ekspresi positif setiap kasus diperoleh dengan menghitung rata-rata ekspresi yang positif dari ketiga sampel. Kriteria positif ditentukan berdasarkan sel tumor yang terpulaskan $\geq 30\%$, disertai inti sel tumor terpulaskan coklat dengan intensitas sedang atau kuat. Area tumor positif dapat memperlihatkan pola yang difus atau mosaik.

Dilakukan perhitungan statistik pada variabel kategorik dengan menggunakan uji *chi kuadrat* atau Fisher. Perhitungan menggunakan dua arah dan dikatakan bermakna statistik bila diperoleh $p < 0,05$.

HASIL

Berdasarkan data arsip Departemen PA FKUI/RSCM, ditemukan 33 kasus dengan rincian 5 kasus tahun 2013, 3 kasus tahun 2014, 6 tahun 2015, 3 kasus tahun 2016, 13 kasus tahun 2017 dan 3 kasus tahun 2018. Usia terbanyak adalah

< 40 tahun, yaitu 29 orang (87,8%). Diperoleh data bahwa regimen kemoterapi yang diberikan antara kelompok anak dan dewasa berbeda. Pada kelompok usia lanjut, didapatkan 4 kasus seluruhnya memperoleh regimen kemoterapi yang sesuai direkomendasikan, yaitu doxorubisin dan siplatin. Pada kelompok anak, tidak semua kasus memperoleh regimen kemoterapi yang direkomendasikan (Tabel 1).

Tabel 1. Persentase kelengkapan regimen kemoterapi pada kelompok anak.

	Regimen kemoterapi		Total
	Direkomendasikan (%)	Tidak lengkap (%)	
Kelompok anak	12 (41,4)	17 (58,6%)	29

Pada penelitian ini didapatkan sebagian besar kasus berjenis kelamin laki-laki (66,7%). Lokasi tersering tulang femur bagian distal (39,4%) dan lebih banyak ditemukan ukuran tumor lebih dari 8 cm (81,8%). Sebagian besar tidak ditemukan metastasis (51,5%). Subtipe histologik terbanyak adalah osteoblastik (63,6%). Sebagian besar memiliki respon kemoterapi buruk (75,8%) (Tabel 2).

Tabel 2 Karakteristik sampel penelitian.

Variabel	Jumlah (n=33)	Frekuensi (%)
Respon histologik kemoterapi		
- Baik		24,2
- Buruk	25	75,8
Subtipe histologik		
- Osteoblastik	21	63,6
- Kondroblastik	8	24,2
- Fibroblastik	3	9,1
- Giant cell rich	1	3,1
Usia		
- < 40 tahun	29	87,8
- ≥ 40 tahun	4	12,2
Jenis kelamin		
- Laki-laki	22	66,7
- Perempuan	11	33,3
Lokasi		
- Femur	13	39,4
- Tibia	11	33,3
- Humerus	3	9,1
- Lainnya (iliium, fibula, radius, talus)	6	18,2
Ukuran tumor		
- ≤ 8 cm	6	18,2
- > 8 cm	27	81,8
Status metastasis		
- Positif	16	48,5
- Negatif	17	51,5

PENELITIAN

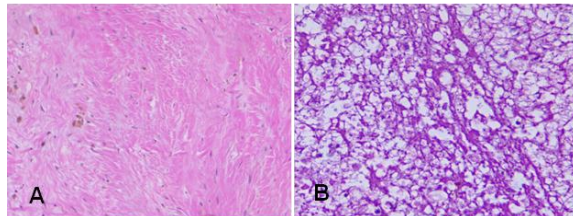
Hubungan antara Ekspresi P16 dengan Respon Histologik
Dian Sari Oethia Vathonati dkk

P-ISSN 0215-7284

e-ISSN 25279106

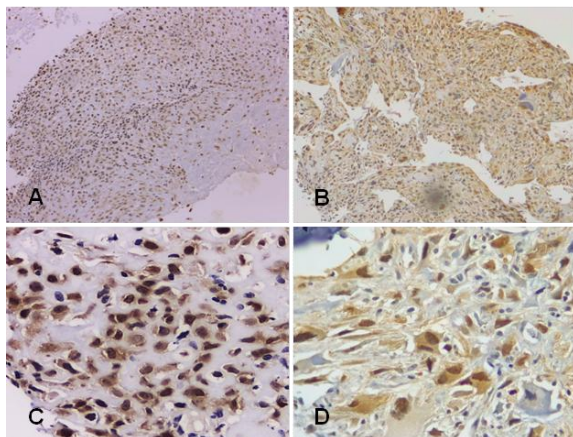
Terakreditasi KEMENRISTEKDIKTI/Sinta-3

Jaringan tumor yang respon terhadap kemoterapi terlihat sebagai area fibrotik, nekrotik atau berupa matriks osteoid yang *acellular* (Gambar 1). Sel tumor yang *viabile* tidak dapat ditemukan, atau ditemukan sel tumor yang telah mati dengan inti piknotik atau terfragmentasi.



Gambar 1. Ekspresi p16 negatif. A. Sitoplasma sel tumor terpulaskoklat tanpa pulasan positif pada inti; B. Inti maupun sitoplasma sel tumor tidak terpulaskoklat (pembesaran asli 100x).

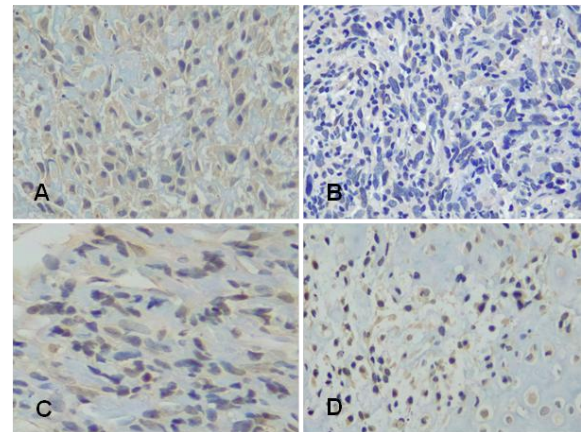
Hasil pulasan imunohistokimia p16 menunjukkan ekspresi positif pada 10 kasus (30,3%) dan ekspresi negatif 23 kasus (69,7%). Pada ekspresi positif, diperoleh gambaran inti sel tumor terpulaskoklat dengan intensitas sedang atau kuat. Intensitas sedang adalah pulasan berwarna coklat pada inti sel tumor, sedangkan intensitas kuat adalah pulasan berwarna coklat tua/coklat gelap pada inti sel tumor (Gambar 2).



Gambar 2. A dan B. Ekspresi p16 difus (pembesaran asli 100x) C. Inti sel tumor terpulaskoklat dengan intensitas kuat (pembesaran asli 400x). D. Inti sel tumor terpulaskoklat dengan intensitas sedang (pembesaran asli 400x).

Pada ekspresi negatif, ditemukan gambaran inti sel tumor yang tidak terpulaskoklat, namun dengan sitoplasma sel tumor yang terpulaskoklat. Pada kasus lainnya, ditemukan inti dan sitoplasma sel tumor yang tidak terpulaskoklat,

atau inti sel tumor yang ditemukan terpulaskoklat dengan intensitas lemah (Gambar 3).



Gambar 3. Ekspresi p16 negatif. A. Sitoplasma sel tumor terpulaskoklat tanpa pulasan positif di inti. B. Inti maupun sitoplasma sel tumor tidak terpulaskoklat. C&D. Sebagian inti sel tumor terpulaskoklat dengan intensitas lemah dan kurang dari 30% area tumor (pembesaran asli 400x).

Tabel 3. Hubungan variabel histopatologik dan klinik terhadap ekspresi p16.

Variabel	Ekspresi p16		Nilai P
	Negatif (%)	Positif (%)	
Respon histologik kemoterapi			0,004
Baik	2 (25)	6 (75)	
Buruk	21 (84)	4 (16)	
Subtipe histologik			0,433
Osteoblastik	16 (76,2)	5 (23,8)	
Lainnya (kondroblastik, fibroblastik, giant cell rich)	7 (58,3)	5 (41,7)	
Usia			0,289
<40 tahun	19 (65,5)	10 (34,5)	
≥40 tahun	4 (100)	0 (0)	
Jenis kelamin			0,430
Laki-laki	14 (63,6)	8 (36,4)	
Perempuan	9 (81,8)	2 (18,2)	
Lokasi			0,245
Distal femur	11 (84,6)	2 (15,4)	
Lainnya (tibia, humerus, ilium, fibula, radius, talus)	12 (60,0)	8 (40,0)	
Ukuran tumor			0,640
≤8cm	18 (66,7)	9 (33,3)	
>8cm	18 (66,7)	9 (33,3)	
Status metastasis			0,259
Positif	13 (61,3)	3 (18,8)	
Negatif	10 (59,8)	7 (41,26)	

Perhitungan statistik dengan menggunakan uji *Fisher*, memperlihatkan hubungan bermakna antara ekspresi p16 dengan respon kemoterapi neoadjuvan ($p=0,004$). Pada variabel

lainnya yaitu subtype histologik, status meta-stasis, lokasi tumor, ukuran tumor, usia dan jenis kelamin tidak diperoleh hubungan bermakna dengan respon kemoterapi neoadjuvan (Tabel 3).

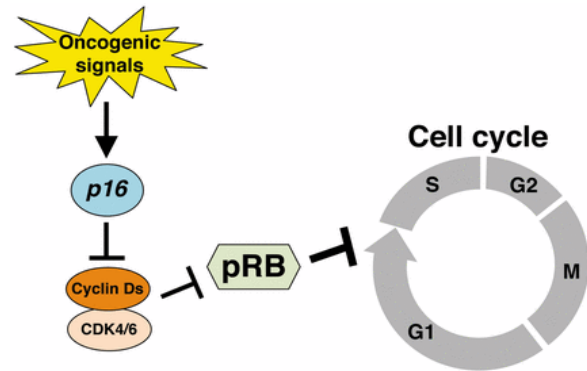
Pada hubungan variabel yang ditemukan bermakna, yaitu hubungan ekspresi p16 dengan respon kemoterapi neoadjuvan, selanjutnya dilakukan perhitungan prevalensi rasio (PR) untuk melihat kekuatan hubungannya. Pada penelitian ini diperoleh hasil, bahwa seseorang dengan ekspresi p16 positif kemungkinan memiliki hasil respon histologik kemoterapi baik sebesar 6,9 kali (Tabel 4).

Tabel 4. Hubungan ekspresi p16 dan respon histologik kemoterapi.

Variabel	Respon kemoterapi		PR (CI 95%)	p
	Baik (%)	Buruk (%)		
Ekspresi 16				
Positif	6 (60,0)	4 (40,0)	6,900 (1,672-28,480)	0,004
Negatif	2 (8,7)	21 (91,3)		

DISKUSI

p16 merupakan salah satu komponen yang terlibat dalam jalur RB. Jalur ini berperan di dalam menghentikan siklus pembelahan sel. Peran p16 yang berfungsi sebagai tumor suppressor, mengakibatkan kadar p16 tinggi pada inti sel tumor memberikan hasil respon kemoterapi yang baik.³ Ekspresi p16 positif pada inti sel tumor menunjukkan p16 sebagai *tumor suppressor* dalam kondisi teraktivasi untuk menghentikan siklus pembelahan sel akibat dari sinyal onkogen yang diterima. Siklus pembelahan sel tumor terhenti pada tahap G1 dan tidak dapat berlanjut ke tahap S (Gambar 4).^{15,16} P16 dan obat kemoterapi keduanya bekerja sama di dalam menghambat pembelahan sel tumor dan memicu apoptosis. Sehingga setelah pemberian kemoterapi neoadjuvan, diharapkan pada pemeriksaan reseksi tumor, tidak ditemukan atau sedikit sekali ditemukan sel tumor yang viabel. Sel tumor yang nekrotik menunjukkan sel tumor tersebut sensitif terhadap regimen kemoterapi.¹⁰



Gambar 4. Peran p16 pada jalur RB dalam menghambat siklus pembelahan sel.

Ekspresi p16 dapat dinilai dengan pemeriksaan imunohistokimia. Pada penelitian ini, diperoleh sampel sebanyak 33 kasus, 10 kasus di antaranya menunjukkan ekspresi p16 (30,3%). Angka ini ditemukan sedikit lebih rendah dibandingkan penelitian lain sebelumnya di benua Eropa, yaitu sebesar 36,2%-70,6%.^{12,17}

Pada penelitian ini didapatkan hubungan bermakna antara ekspresi p16 positif dengan keberhasilan respon histologik kemoterapi neoadjuvan. Tang *et al*⁸ melakukan meta analisis terhadap ekspresi p16 dan dikatakan ekspresi yang positif berhubungan dengan respon kemoterapi yang lebih baik. Borys *et al*⁷ dan Righi *et al*¹² melaporkan, sebagian besar ekspresi p16 memiliki respon kemoterapi baik (78,2% dan 69,4%) dan diperoleh hubungan yang bermakna antara ekspresi p16 dengan keberhasilan kemoterapi neoadjuvan. Righi *et al*¹² dan Kosmehmetoglu *et al*⁶ dalam penelitiannya mengatakan seseorang yang memiliki ekspresi p16 positif masing-masing akan memiliki kemungkinan 3 sampai 7 kali untuk mendapatkan hasil respon kemoterapi baik dibandingkan pada kasus dengan ekspresi p16 negatif. Pada penelitian ini diperoleh hasil ekspresi p16 positif akan mengalami kemungkinan respon kemoterapi yang baik sebesar 6,9 kali dibandingkan ekspresi p16 negatif. Namun perhitungan hasil ini mengalami keterbatasan karena rentang prevalensi rasio yang cukup luas (PR=1,672-28,480) yang dapat disebabkan karena jumlah sampel yang kecil.

Pada penelitian ini ditemukan 2 kasus yang menunjukkan ekspresi p16 negatif, namun memiliki respon histologik kemoterapi yang baik. Pada 1 kasus tersebut, ditemukan ukuran tumor sebesar 4 cm (yang merupakan ukuran tumor terkecil pada penelitian ini) dan subtipe histologiknya merupakan subtipe fibroblastik. Pada 1 kasus lainnya, ukuran tumor yang ditemukan adalah 9 cm dengan subtipenya adalah osteoblastik.

Ukuran tumor dan subtipe histologik pada beberapa penelitian dilaporkan menjadi faktor yang mempengaruhi hasil respon histologik kemoterapi neoadjuvan. Matos *et al*¹⁹ melaporkan ukuran tumor yang kurang dari 12 cm menunjukkan respon kemoterapi yang lebih baik serta secara statistik berhubungan bermakna dengan prognosis. Pada kasus dengan ukuran tumor kurang dari 12 cm, 63% kasus memiliki respon kemoterapi yang baik. Sedangkan ukuran tumor lebih dari 12 cm, hanya 24% memiliki respon kemoterapi baik.¹⁹

Bacci *et al*^{22,23} melaporkan bahwa subtipe histologik berhubungan bermakna dengan keberhasilan respon kemoterapi. Subtipe fibroblastik dan osteoblastik, dikatakan memiliki respon histologik yang lebih baik dibandingkan subtipe kondroblastik. Pada kelompok fibroblastik dan osteoblastik masing-masing memiliki respon kemoterapi baik sebesar 80% dan 57%, sedangkan subtipe kondroblastik sebesar 43%.^{22,33}

Pada penelitian ini diperoleh 23 kasus yang menunjukkan ekspresi p16 negatif, 21 kasus di antaranya memiliki respon histologik yang buruk. Ekspresi p16 negatif di inti, menunjukkan adanya perubahan genetik pada gen CDKN2A yang dapat berupa delesi homozigot, mutasi titik atau perubahan epigenetik seperti hipermetilasi.^{14,22} Asioli *et al*¹³ melaporkan ekspresi p16 negatif pada osteosarkoma konvensional memiliki resiko 9 kali untuk mengalami kegagalan respon kemoterapi. Maitra *et al*²³ mengatakan hilangnya ekspresi p16 pada osteosarkoma berhubungan bermakna dengan rendahnya angka harapan hidup.²³

Pada penelitian ini diperoleh 4 kasus yang menunjukkan ekspresi p16 positif, namun memiliki respon kemoterapi yang buruk. Tiga dari 4 kasus tersebut masing-masing menunjukkan subtipe kondroblastik dan 1 kasus menunjukkan subtipe osteoblastik. Osteosarkoma kondroblastik cenderung memiliki respon kemoterapi yang kurang baik dibandingkan subtipe osteo-

sarkoma konvensional lainnya.^{22,24} Hauben *et al*²⁵ melaporkan, bahwa subtipe kondroblastik memiliki keberhasilan respon kemoterapi yang paling rendah dibandingkan subtipe osteoblastik dan fibroblastik, sedangkan subtipe osteoblastik memiliki keberhasilan respon kemoterapi yang lebih rendah dibandingkan fibroblastik.

Pada penelitian ini ditemukan 1 kasus subtipe osteoblastik yang menunjukkan ekspresi positif namun memiliki respon kemoterapi yang buruk. Ukuran tumor tersebut besar, yaitu berukuran 20 cm. Sedangkan pada 3 kasus lainnya yang menunjukkan ekspresi positif namun memiliki respon kemoterapi buruk, masing-masing berukuran 25 cm pada 2 kasus dan 11 cm pada 1 kasus. Kosemehmetoglu *et al*⁶ melaporkan bahwa ekspresi p16 dan ukuran tumor yang lebih kecil memiliki hubungan bermakna dengan respon kemoterapi yang baik.

Pada penelitian ini, kasus yang seluruhnya menunjukkan ekspresi p16 positif namun memiliki respon yang buruk, ditemukan ada 4 kasus. Pada ke empat kasus tersebut semuanya hanya memperoleh regimen kemoterapi doksorubisin dan cisplatin saja tanpa pemberian ifosfamid. Sedangkan tidak ada 1 kasus pun yang mendapatkan ketiga regimen kemoterapi. Hal ini dapat menjadi salah satu faktor yang menyebabkan pada kasus dengan ekspresi positif, keberhasilan kemoterapi tidak dapat tercapai. Menurut *European Bone Over 40 Sarcoma Study*, regimen kemoterapi neoadjuvan yang direkomendasikan terdiri atas kombinasi doksorubisin, cisplatin dan ifosfamid.²⁶ Meta analisis yang dilakukan Fan *et al*²⁷ menunjukkan ifosfamid dapat meningkatkan angka keberhasilan respon kemoterapi dibandingkan dengan kelompok tanpa pemberian ifosfamid.

Sel tumor yang resisten terhadap obat kemoterapi neoadjuvan tidak hanya dipengaruhi oleh jalur RB saja. Beberapa faktor lain yang mempengaruhi resistensi osteosarkoma, antara lain berkurangnya kemampuan akumulasi obat, meningkatnya inaktivasi obat akibat molekul sulfur yang berlebihan, bertambahnya kemampuan sel untuk memperbaiki DNA yang rusak, dan yang paling utama adalah terjadinya perubahan ekspresi gen. Perubahan ekspresi gen dapat berupa onkogen atau *tumor suppressor genes*.²² Zhao *et al* dan Zhang *et al*²⁸ meneliti osteosarkoma dengan ekspresi BCL2 yang tinggi (yang berfungsi sebagai anti apoptosis), akan meningkatkan kemoresisten

terhadap doksorubisin. Begitu pula Gomes *et al* dan Park²⁹*et al* melaporkan bahwa P-GP yang tinggi pada membran sel tumor menyebabkan doksorubisin tidak terakumulasi dengan baik di intraseluler.

Pada penelitian ini tidak ditemukan hubungan bermakna antara ekspresi p16 dengan subtype histologik ($p=0,43$). Hal serupa juga dilaporkan oleh Borys *et al*⁷ dan Righi *et al*¹² yang mengatakan bahwa tidak ditemukan hubungan bermakna antara ekspresi p16 dengan subtype histologik. Hubungan tidak bermakna juga ditemukan antara ekspresi p16 dengan ukuran tumor primer ($p=0,64$), lokasi ($p=0,24$) maupun status metastasis ($p=0,26$). Hal serupa dilaporkan oleh Righi *et al*¹² bahwa tidak ditemukan hubungan bermakna antara p16 dengan ukuran tumor primer dan lokasi tumor. Begitu pula Axi *et al*⁶⁰ meneliti hubungan ekspresi p16 osteosarkoma dengan status metastasis dan diperoleh hasil tidak ditemukan hubungan bermakna antara ekspresi p16 dengan metastasis tumor.

KESIMPULAN DAN SARAN

Sebagai kesimpulan ekspresi p16 positif memiliki hubungan bermakna secara statistik dengan respons histologik kemoterapi yang baik. Ekspresi p16 dapat dipertimbangkan sebagai prediktor untuk menilai kemungkinan keberhasilan respons histologik kemoterapi neoadjuvan pada osteosarkoma konvensional.

Pada penelitian ini, meskipun ditemukan hubungan yang bermakna antara ekspresi p16 dengan keberhasilan respons kemoterapi neoadjuvan, namun masih terdapat keterbatasan dalam penelitiannya. Antara lain jumlah sampel yang digunakan masih kurang dari sampel minimal, sampel tidak dipisahkan berdasarkan kelompok usia mengingat regimen kemoterapi yang berbeda antara kelompok anak dan kelompok dewasa, hasil prevalensi rasio memiliki rentang yang masih lebar, sehingga kurang spesifik untuk menentukan angka yang paling tepat dalam menilai kekuatan hubungan, tidak semua sampel mendapatkan regimen kemoterapi ifosfamid.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mirabello L, Rebecca J, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the

- surveillance, epidemiology and end results program. *Cancer*. 2009;115:1531-43.
2. Rothe VE, Toepfer A, Salzmann M, Schauwecker J, Gollwitzer H, Rechl H. Primary malignant bone tumors. *Orthopade*. 2011; 40:1121-42.
3. Misaghi A, Goldin A, Awad M, Kulidjian AA. Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT J*. 2018; 4: 12.
4. Czerniak B. Intramedullary osteosarcoma. In: Dorfman HD, Czerniak B, editors. *Dorfman and Czerniak's bone tumors*. 2nd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2016. p 200-63.
5. Chui M, Kandel RA, Wong M, Griffin AM, Bell RS, Blackstein ME, *et al*. Histopathologic features of prognostic significance in high-grade osteosarcoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140:1231-42.
6. Man TK, Chintagumpala M, Visvanathan J, Shen J, Perlaky L, Hicks J, *et al*. Expression profiles of osteosarcoma that can predict response to chemotherapy. *Cancer Res*. 2005; 65: 8142-50.
7. Borys D, Canter RJ, Hoch B, Martinez SR, Tamurian RM, Murphy B, *et al*. P16 expression predicts necrotic response among patients with osteosarcoma receiving neoadjuvant chemotherapy. *Hum Pathol*. 2012; 43:1948-54.
8. Kosemehmetoglu K, Ardic F, Karslioglu Y, Kandemir O, Ozcan A. P16 expression predicts neoadjuvant tumor necrosis in osteosarcomas: Reappraisal with a larger series using whole sections. *Hum Pathol*. 2016; 50: 170-5.
9. Bu J, L Hi, Liu L, Ouyang Y, Guo H, Li X, *et al*. P16^{INK4a} overexpression and survival in osteosarcoma patients: a meta analysis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7: 6091-6.
10. Jaffe N. Historical perspective on the introduction and use of chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. In: Kleinerman ES, editor. *Current Advances in Osteosarcoma*. Switzerland: Springer; 2014. p.20-21.
11. Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16ink4a expression in tumors functional significance, clinical associations and future developments. *Cell cyle*. 2011; 10: 2497-503.
12. Righi A, Gambarotti M, Sbaraglia M, Sisto A, Ferrari S, Dei Tos AP, *et al*. P16 expression as a prognostic and predictive marker in high

- grade localized osteosarcoma of the extremities: an analysis of 357. *Hum Pathol.* 2016; 58:15-23.
13. Asioli S, Righi A, Rucci P, Tarsitano, Marchetti C, Bacchini P, *et al.* P16 protein expression and correlation. *Head & neck.* 2017; 39: 1825-31.
 14. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Leonart ME, Castellvi J, *et al.* p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene.* 2011; 30: 2087-97.
 15. Kotake Y, Naemura M, Mursaki C, Inoue Y, Okamoto H. Transcriptional regulation of the p16 tumor suppressor gene. *Anticancer Res.* 2015; 35: 4397-401.
 16. Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16^{INK4A} in archival human solid tumors. *Cancer Res.* 1995; 55: 6006-11.
 17. Robl B, Pauli C, Botter SM, Bode-Lesniewska B, Fuchs B, *et al.* Prognostic value of tumor suppressors in osteosarcoma before and after neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer.* 2015; 15: 379
 18. Tang Y, Yang C, Guo Z, Fu Y, Yu X, Liu B, *et al.* P16 protein expression as a usual predictive biomarker for neoadjuvant chemotherapy response in patients with high-grade osteosarcoma: A systematic meta-analysis under guideline of PRISMA. *Medicine (Baltimore).* 2017; 96: e6714.
 19. Wei S, Siegal GP. Bone-forming tumors. In: Wei S, Siegal GP, editors. *Atlas of bone pathology.* New York: Springer; 2013. p.53-7
 20. Bacci G, Bertoni F, Longhi A, Ferrari S, Forni C, Biagini R. Neoadjuvant chemotherapy for high-grade central osteosarcoma of the extremity. Histologic response to pre-operative chemotherapy correlates with histologic subtype of the tumor. *Cancer.* 2003; 97:3068-75.
 21. Bacci G, Mercuri M, Longhi A, Ferrari S, Bertoni F, Versari M, *et al.* Grade of chemotherapy-induced necrosis as a predictor of local and systemic control in 881 patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremities treated with neoadjuvant chemotherapy in a single institution. *EJC.* 2005; 41: 2079-85.
 22. He H, Ni J, Huang J. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review). *Oncol Lett.* 2014; 7: 1352-62
 23. Maitra A, Roberts H, Weinberg A, Geradts J. Loss of p16^{INK4a} expression correlates with decreased survival in pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer.* 2001; 95: 34-8.
 24. Vasquez L, Tarillo F, Sialer L. Analysis of prognostic factors in high grade osteosarcoma of the extremities in children: A 15 year single-institution experience. *Front Oncol.* 2016; 6:22.
 25. Hauben EI, Weeden S, Pringle J, Van Marck EA, Hogendoorn PC. Does the histological subtype of high-grade central osteosarcoma influence the response to treatment with chemotherapy and does it affect overall survival? A study on 570 patients of two consecutive trials of the European Osteosarcoma Intergroup. *Eur J Cancer.* 2002; 38: 1218-25.
 26. Carrle D, Bielack SS. Current strategies of chemotherapy in osteosarcoma. *Int Orthop.* 2006; 30: 445-51.
 27. Fan XL, Cai GP, Zhu LL, Ding GM. Efficacy and safety of ifosfamide-based chemotherapy for osteosarcoma: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 5925-32.
 28. Kamal AF, Widyawarman H, Husodo K, Hutagalung EU, Rajabto W. Clinical outcome and survival of osteosarcoma patients in Cipto Mangunkusumo Hospital: Limb salvage surgery versus amputation. *Acta Med Indones.* 2016; 48: 175-83
 29. Kager L, Zoubek A, Potschger U, Kastner U, Flege S, Bielack BK, *et al.* Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 2011-8.
 30. Ai-xi Y, Zhen-guang C, De-yin L. Expression and significance of oncoprotein p16 and fos in osteosarcoma. *Chinese J Cancer Res.* 2001; 13: 66-8.