

**DISERTASI**

**PERAN miRNA-221 dan miRNA-222 TERHADAP RESISTENSI DAN  
KEKAMBUHAN PASCA TERAPI TAMOKSIFEN PADA PENDERITA  
KANKER PAYUDARA SUBTIPE LUMINAL**

**THE ROLE OF MIRNA-221 AND MIRNA-222 ON RESISTANCE AND  
RECURRENCE AFTER TAMOKSIFEN THERAPY IN PATIENTS  
WITH LUMINAL SUBTYPE BREAST CANCER**



**ALFIAH AMIRUDDIN**

**C013171018**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2021**

**DISERTASI**

**PERAN mRNA-221 DAN miRNA-222 TERHADAP RESISTENSI DAN  
KEKAMBUHAN PASCA TERAPI TAMOKSIFEN PADA PENDERITA  
KANKER PAYUDARA SUBTIPE LUMINAL**

*The Role of miRNA-22 and 221 miRNA on Resistance and  
Recurrence After Tamoksifen Therapy in Patient With Luminal  
Subtype Breast Cancer*

Disusun dan diajukan  
Oleh

**Alfiah Amiruddin**  
C013171018

*Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran  
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin  
pada tanggal, 28 Desember 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*



Menyetujui  
Promotor,

**Prof. dr. Muh. Nasrullah Massi, Ph.D, Sp.MK**  
Nip. 19670910 199603 1 001

Co. Promotor

**Associate. Prof. Nani Harlina Md Latar, Ph.D**

Co. Promotor

**Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS-FICS**  
Nip. 19551019 198203 1 001

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,

**dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)**  
Nip. 19700821 199903 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin,

**Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed**  
Nip. 19661213 199503 1 009



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
FAKULTAS KEDOKTERAN

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN**

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297  
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

**PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI**

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Alfiah Amiruddin  
NIM : C013181018  
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran  
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

Peran miRNA-221 dan miRNA-222 terhadap Resistensi Terapi Tamoxifene Pada Penderita Kanker Payudara Subtipe Luminal

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 23 November 2021

Yang menyatakan,

Alfiah Amiruddin

## ABSTRAK

**ALFIAH AMIRUDDIN.** Peran *mi-RNA-221* dan *mi-RNA-222* terhadap Resistensi Terapi Tamoxifene pada Penderita Kanker Payudara Subtipe Luminal (dibimbing oleh Muh. Nasrum Massi, Nani Harlina, dan Asadul Islam).

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui peran ekspresi *mi-RNA-221* dan *mi-RNA-222* pada pasien kanker payudara tipe luminal setelah terapi *tamoxifene*.

Penelitian ini menggunakan desain kasus kontrol dengan subjek penelitian pasien kanker payudara subtipe luminal yang telah menjalani terapi endokrin minimal satu tahun. Kelompok kasus termasuk pasien yang memiliki kekambuhan lokal atau metastatis, sedangkan kelompok kontrol adalah pasien yang tidak. Penelitian ini dilakukan selama periode Oktober 2018 sampai dengan September 2019. Kuantifikasi *mi-RNA-221/222* diuji dengan menggunakan *real-time* PCR. Data dianalisis menggunakan Mann Whitney U dan ROC.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada ekspresi *mi-RNA-221* ( $p=0,005$ ), tetapi tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada ekspresi *mi-RNA-222* ( $p=0,07$ ). Ekspresi *mi-RNA-221* dalam PR(+) dan PR(-) ( $p=0,25$ ), Ki-67 (tinggi) dan (rendah) ( $p=0,60$ ), LVI (+) dan (-) ( $p=0,14$ ), tahap 2/3 ( $p=0,14$ ), sedangkan ekspresi *mi-RNA-222* pada PR(+) dan PR(-) berturut-turut ( $p=0,52$ ), Ki-67 (tinggi) dan (rendah) ( $p=0,56$ ), LVI (+) dan (-) ( $p=0,19$ ), tahap 2/3 ( $p=0,33$ ). Hasil analisis kurva ROC menunjukkan bahwa *mi-RNA-221* dan *mi-RNA-222* dapat memprediksi resistensi *tamoxifene* ( $p=0,03$ ) dengan sensitivitas 60,00% dan spesifitas 83,33%. Jadi, tidak ada hubungan antara variabel patologi klinis dengan *mi-RNA-221* dan *mi-RNA-222*. Ekspresi *mi-RNA-221* secara statistik berbeda secara signifikan dalam resistensi *tamoxifene*, tetapi tidak signifikan dalam kekambuhan. Sementara itu, ekspresi *mi-RNA-222* tidak signifikan secara statistik pada resistensi *tamoxifene*, tetapi signifikan dalam kekambuhan. *mi-RNA-221* dan *mi-RNA-222* dapat bertindak sebagai prediktordalam memprediksi resistensi dan kekambuhan *tamoxifene*.

Kata kunci: *mi-RNA-221*, *mi-RNA-222*, *tamoxifene*, kanker payudara, subtipe Luminal.



## ABSTRACT

**ALFIAH AMIRUDDIN.** *The Role of miRNA-221 and miRNA-222 on Tamoxifene Therapy Resistance for Breast Cancer Patients with Luminal Subtype* (Supervised by Muh. Narum Massi, Nani Harlina, and Asadul Islam)

The purpose of this study is to determine the role of miRNA-221 and miRNA-222 expression in luminal type breast cancer patients after tamoxifene therapy. Breast cancer is the second leading cause of cancer death in women. High mortality rate in Indonesia is due to cancer metastases and resistance to therapy. Cancer cells are often resistant to tamoxifene therapy. The reason is because there is involvement of miRNA-221 and miRNA-222, which cause an increase in proliferation and survival of cancer cells and decrease apoptosis.

This study used a case-control design using luminal subtype breast cancer patients who had undergone endocrine therapy for at least one year. The case group included patients who had local recurrence or metastases whereas the control group was patients who did not. This research was conducted in the period October 2018-September 2019. MiRNA-221 quantification was tested using real-time PCR. Data were analyzed using MannWhitney U and ROC.

The results show that there is a significant difference in the expression of miRNA-221 ( $p=0.005$ ) but there is no significant difference in the expression of miRNA-222 ( $p=0.07$ ). Expression of miRNA-221 in PR(+) and PR(-) ( $p=0.25$ ), Ki67 (high) and (low) ( $p=0.60$ ), LVI (+) and (-) ( $p=0.14$ ), stage 2/3 ( $p=0.14$ ), while the expression of miRNA-222 in PR(+) and PR(-) respectively ( $P=0.52$ ), Ki67 (high) and (low) ( $p=0.56$ ), LVI (+) and (-) ( $p=0.19$ ), stage 2/3 ( $p=0.33$ ). ROC curve analysis shows that miRNA-221 and miRNA-222 could predict tamoxifene resistance ( $p=0.03$ ) with sensitivity of 60.00% and specificity of 83.33%.

So it can be concluded that there is no relationship between clinical pathology variables with miRNA-221 and miRNA-222. MiRNA-221 expression is statistically significantly different in tamoxifene resistance but not significant in recurrence. Meanwhile, the expression of miRNA-222 is not statistically significant in tamoxifene resistance but significant in recurrence. MiRNA-221 and miRNA-222 can act as predictors in predicting tamoxifene resistance and recurrence.

**Keywords:** *miRNA-221, miRNA-222, Tamoxifene, Breast Cancer, Luminal Subtype*



## PRAKATA

Assalamu alaikum warahmatullahi wabarakatuh. Alhamdulillah, segala puji serta syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat merampungkan sebuah disertasi yang berjudul "*Peran miRNA-221 Dan miRNA-222 Terhadap Resistensi Serta Kekambuhan Pasca Terapi Tamoksifen Pada Penderita Kanker Payudara Subtipe Luminal*".

Disertasi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan disertasi ini masih terdapat berbagai kelemahan yang perlu diperkuat dan kekurangan yang perlu dilengkapi. Oleh sebab itu dengan penuh kerendahan hati penulis mengharapkan masukan, koreksi serta saran untuk mencapai hasil yang lebih baik.

Dengan tersusunnya disertasi ini, penulis tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada **Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK** selaku Ketua Tim Promotor, yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membimbing, memberikan ilmu, inspirasi dan motivasi hingga penelitian beserta hasilnya dapat dituangkan dalam bentuk sebuah disertasi.. Penulis juga menghaturkan terima kasih kepada **Assc. Prof Nani Harlina Md Latar, Ph.D** dan **Prof. DR.dr.Asadul Islam, Sp.BS(K) FICS** selaku co-promotor, yang turut memberikan bimbingan, arahan dan bantuan hingga disertasi ini dapat rampung sesuai yang diharapkan.

Penulis turut mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. **Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A.** selaku Rektor Universitas Hasanuddin Makassar;
2. **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.** selaku Direktur Program Pasca sarjana Universitas Hasanuddin Makassar;

3. **Prof. dr. Budu, Sp.M (K), M.Med, Ph.D** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar;
4. **dr. Agussalim Bukhari, M.Clin.Med, Sp.GK, Ph.D** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin Makassar;
5. Seluruh Tim penguji: **Dr.dr.Noorwati Sutandyo, Sp.PD-KHOH, Prof.dr.Syarifuddin Wahid, Ph.D, Sp.F(K), Prof.dr.Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok, Prof.dr.Mochammad Hatta, Ph.D,Sp.MK(K), DR.dr.Ilhamjaya Patellongi, M.Kes** atas waktu dan kesempatannya dalam menguji, memberi arahan dan masukannya agar disertasi ini menjadi lebih baik.
6. Kepada **dr. Susi Margareta**, MPH dan dr, Liman Harjono masing-masing selaku Direktur Rumah Sakit Mitra Keluarga Kemayoran, Jakarta dan Direktur Rumah Sakit Royal Taruma, Jakarta yang telah memberikan dukungan dan izin untuk melakukan penelitian ini dengan menggunakan pasien dari Rumah Sakit Mitra Keluarga Kemayoran serta Rumah Sakiat Royal Taruma Jakarta
7. Staf Laboratorium HUM-RC Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, **Ibu Handayani Halik, S.Si, M.Kes** atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian.
8. Staf S3 Kedokteran Universitas Hasanuddin (**Bapak Akmal, S.Sos, MAP, Bapak Abdul Muin Amd.FT dan Bapak Rahmat**) atas bantuannya selama penulis menjalani masa studi.
9. Semua teman-teman seperjuangan pada program studi S3 Ilmu Kedokteran angkatan 2017 (2), yang selalu memberikan motivasi, dorongan, dan informasi-informasi kepada peneliti sehingga peneliti dimudahkan selama masa studi.
10. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian, atas perhatian, perkenan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya disertasi ini. Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya untuk seluruh partisipan penelitian yaitu kepada

para penderita dan kontak serumahnya yang telah berkenan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini.

Dengan memperhatikan dan mengikuti bimbingan, arahan dan perbaikan dari tim promotor serta penguji, penulis mengharapkan disertasi ini dapat bermanfaat bagi para pembacanya.

Makassar, 15 Januari 2022

Alfiah Amiruddin

## DAFTAR ISI

SAMPUL	
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI .....	iv
ABSTRAK .....	v
ABSTRACT .....	vi
PRAKATA .....	vii
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR SINGKATAN .....	xvi
BAB I Pendahuluan	
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	8
C. Tujuan Penelitian .....	9
D. Hipotesis Penelitian .....	10
E. Manfaat Penelitian .....	10
BAB II Tinjauan Pustaka	
A. Tinjauan Umum Kanker Payudara .....	13
B. Tinjauan Umum Peran Estrogen Receptor alpha (E $\alpha$ ) .....	30

C. Terapi endokrin pada Kanker Payudara .....	31
D. Jenis Terapi Endokrin .....	33
E. Mekanisme Terapi Hormonal .....	35
F. Pemantauan Respon Terapi Hormonal .....	36
G. Resistensi terhadap Terapi Hormonal .....	37
H. Mekanisme Terapi Hormonal .....	39
I. Peran ER $\alpha$ dalam Resistensi terhadap Tamoksifen .....	42
J. Peran GPR30 terhadap Resistensi Tamoksifen .....	45
K. microRNA.....	60
L. Kerangka Teori Penelitian .....	71
M. Kerangka Konsep .....	72
<b>BAB III Metode Penelitian</b>	
A. Desain Penelitian .....	74
B. Tempat dan Waktu .....	74
C. Populasi dan Subjek Penelitian .....	74
D. Perkiraan Besar Sampel .....	75
E. Kriteria Penelitian .....	76
F. Cara Kerja Penelitian .....	76
G. Alur Penelitian .....	81
H. Variabel Penelitian .....	81
I. Definisi Operasional .....	82
J. Manajemen dan Analisis Data .....	83
K. Etika Penelitian .....	83

**BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN**

A. Hasil .....	84
B. Pembahasan .....	97

**BAB V. PENUTUP**

A. Kesimpulan.....	122
B. Saran.....	122

DAFTAR PUSTAKA .....	124
----------------------	-----

LAMPIRAN.....	133
---------------	-----

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2.1</b> Penilaian <i>grading breast cancer</i> berdasarkan modifikasi <i>Elston &amp; Ellis</i> .....	11
<b>Tabel 2.2</b> Klasifikasi molekular subtipe kanker payudara .....	25
<b>Tabel 4.1</b>	
Tabel.4.2 Analisis korelasi antara miRNA-221 dengan variabel lain	86
<b>Tabel 4.2</b> <i>Predictive ability of miR-221 to predict tamoksifen resistance and recurrence</i> .....	94

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2-1.</b> Perubahan epitel normal payudara hingga menjadi Kanker .....	12
<b>Gambar 2-2.</b> Distribusi lima kanker terbanyak pada perempuan di dunia .....	13
<b>Gambar 2-3.</b> Gen ER $\alpha$ dan beberapa domain fungsionalnya.....	29
<b>Gambar 2-4.</b> Struktur kimia beberapa obat golongan SERMs .....	32
<b>Gambar 2-5.</b> Fungsi ERA dalam Transkripsi Gen yang Dihambat oleh Tamoksifen atau Aromatase Inhibitor .....	34
<b>Gambar 2-6.</b> Pemberian terapi hormonal dan pemantauannya .....	35
<b>Gambar 2-7.</b> Mekanisme molekuler resistensi terhadap tamoksifen ...	43
<b>Gambar 2-8.</b> Skema pengiriman sinyal melalui jalur GPR30 .....	52
<b>Gambar 2-9.</b> Biogenesis microRNA .....	61
<b>Gambar 2-10.</b> Klaster gen pre-miR-221 dan pre-miR-222 di kromosom X .....	67
<b>Gambar 2-11.</b> Beberapa MiRNA yang mengatur pensinyalan ERA pada tumor payudara.....	68
<b>Gambar 2-12.</b> Bagan kerangka teori penelitian .....	69
<b>Gambar 2-13.</b> Bagan kerangka konsep penelitian .....	70
<b>Gambar 4-1.</b> Ekspresi miRNA-221 antara kelompok kasus dan kelompok kontrol .....	83
<b>Gambar 4-2.</b> Ekspresi miRNA-221 antara kelompok kekambuhan dengan tidak mengalami kekambuhan .....	84

<b>Gambar 4-3.</b> Korelasi analisis miRNA-221 dengan kelompok resistensi tamoksifen dengan variabel <i>clinical pathology</i> .....	87
<b>Gambar 4-4.</b> Ekspresi miRNA-221 antara kelompok kasus dan kontrol	88
<b>Gambar 4-5.</b> Ekspresi miRNA-222 antara kelompok kekambuhan dengan tidak mengalami kekambuhan .....	89
<b>Gambar 4-6.</b> Korelasi analisis miRNA-221 dan miRNA-222 dalam memprediksi resistensi tamoksifen dan kekambuhan.....	95

## DAFTAR SINGKATAN

AF	:	activation function
AI	:	aromatase inhibitor
CDK	:	cyclin dependent kinase
c-myc	:	cellular-myc
CT	:	cycle treshold
CTC	:	circulating tumor cells
ctDNA	:	circulating tumor DNA
DNA	:	deoxyribonucleic acid
DBD	:	DNA binding domain (DBD)
EGFR	:	epidermal growth factor receptor
EMT	:	epithelial-mesenchymal-transition
ER	:	estrogen receptor
ESR1	:	gen estrogen receptor 1
ERK	:	extracellular signal regulated kinase
FC	:	fold change
FNAB	:	fine needle aspiration biopsy
HBD	:	hormone binding domain
HER-2	:	human epidermal growth factor receptor-2
MAPK	:	mitogen activated protein kinase
MMP	:	matrix metalloproteinase
miRNA	:	microRNA

MRI	:	magnetic resonance imaging
mRNA	:	messenger RNA
miRNPs	:	miRNA containing ribonukleoprotein particles
PI3K	:	phosphatidyl-inositol-3 kinase
PTEN	:	phosphatase and tensin homolog
PR	:	progesterone receptor
RISC	:	RNA induced silencing complex
RNA	:	ribonucleic acid
RSKD	:	Rumah Sakit Kanker Dharmais
RT-PCR	:	real time polymerase chain reaction
SERM	:	selective estrogen receptor modulator
SERD	:	selective estrogen receptor down regulators
SIRS	:	Sistem Informasi Rumah Sakit
TAM	:	tamoksifen
TIMP	:	tissue inhibitor of metalloproteinase
UTR	:	untranslated region

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Kanker payudara merupakan kanker terbanyak yang diderita kaum perempuan yaitu sekitar 25 % dari total kasus kanker pada perempuan di seluruh dunia. Kanker payudara juga menjadi penyebab kematian tertinggi akibat keganasan pada perempuan di seluruh dunia dengan perkiraan sekitar 521.900 kasus pada tahun 2012. Pada tahun 2020, prevalensi kanker pada pria dan wanita di dunia, paling besar ditempati oleh kanker payudara yaitu sebesar 11,7%. Di Asia, insidensnya mencapai angka 45,4%. Pada wanita, kanker payudara merupakan kanker yang paling sering didiagnosis dan menjadi penyebab utama kematian akibat kanker, diikuti oleh kanker kolorektal dan kanker paru-paru. Di Indonesia sendiri berdasarkan data Globocan 2020, kanker payudara telah menempati urutan pertama sebagai penyebab kanker pada pria maupun wanita sebesar 16.6% dengan dominasi pada perempuan yaitu sebesar 30.8%.(1)

Menurut data yang dihimpun oleh Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) Indonesia, pada tahun 2008 kanker payudara telah menempati urutan pertama penderita rawat inap di seluruh Rumah Sakit di Indonesia. Angka tersebut terus meningkat hingga menembus angka 8.082 kasus (18,4 %), kemudian diikuti oleh kanker leher rahim sebanyak 4.544 kasus (10,3 %).

Demikian pula data dari rekam medis Rumah Sakit Kanker Dharmais (RSKD) Jakarta yang melaporkan bahwa pada tahun 2010 kanker payudara merupakan kanker terbanyak yang menjalani pengobatan di RS Kanker Dharmais, Jakarta.

Dari sejumlah data yang telah berhasil dihimpun menunjukkan bahwa sekitar 40%-70% penderita kanker payudara di Indonesia datang ke fasilitas kesehatan dalam kondisi stadium lanjut. Berbagai faktor turut berperan serta dalam keterlambatan mendapatkan terapi yang sesuai. Beberapa diantaranya adalah faktor ekonomi, ketakutan akan efek samping kemoterapi, radioterapi, kecacatan yang sifatnya permanen serta banyaknya pengaruh terapi alternatif yang membuat para penderita memilih untuk diam lalu mencari terapi di luar jalur medis.

Data GLOBOCAN tahun 2012 melaporkan bahwa sekitar 522.000 perempuan meninggal akibat kanker payudara pada tahun tersebut.

Kanker payudara dapat menyerang siapa saja tanpa memandang usia, jenis kelamin, status ekonomi serta pendidikan. Prevalensi kanker payudara pada perempuan mendekati 100 kali lebih banyak dibandingkan dengan laki-laki. Namun pada kenyataannya, sebagian besar penderita kanker payudara pada laki-laki mengalami keterlambatan dalam diagnosis.

Prognosis dan kemampuan ketahanan hidup penderita kanker payudara ikut ditentukan oleh beberapa faktor diantaranya tipe kanker, stadium, kecepatan dan ketepatan terapi serta lokasi geografi penderita. Di negara-negara Barat tingkat ketahanan hidup penderita kanker payudara

cukup tinggi yaitu sekitar delapan dari sepuluh perempuan di Inggris yang terdiagnosis menderita kanker payudara memiliki ketahanan hidup minimal lima tahun. Sementara di negara-negara berkembang termasuk Indonesia tingkat ketahanan hidup masih terbilang rendah. Hal ini sangat dipengaruhi oleh kondisi dan stadium penyakit saat penderita pertama kali terdiagnosis mengidap kanker payudara.

Pada penderita kanker payudara yang masih terbatas pada jaringan payudara, tingkat ketahanan hidup minimal lima tahun dapat mencapai angka sekitar 97 %. Namun angka tersebut akan menurun drastis menjadi 17 % jika sel kanker ditemukan telah bermetastasis ke organ lain (stadium IV). Tingginya angka mortalitas pada penderita kanker payudara umumnya disebabkan oleh kanker yang telah bermetastasis dan terjadinya resistensi terhadap terapi sistemik.

Seiring dengan perkembangan ilmu kedokteran, saat ini telah tersedia berbagai modalitas terapi untuk kanker payudara. Pembedahan tetap menjadi modalitas utama pada stadium dini yang dapat dikombinasikan dengan modalitas lain seperti radioterapi, kemoterapi dan terapi antiestrogen (hormonal) untuk meningkatkan keberhasilan pengobatan. Belakangan ini terapi target juga telah mengambil peran yang penting pada pengobatan kanker payudara terhadap penderita dengan hasil Her2 positif.

Pemilihan terapi kanker payudara ditentukan oleh beberapa faktor klinis seperti stadium penyakit, status hormonal, adanya invasi sel-sel ganas ke dalam pembuluh darah dan limfe termasuk keterlibatan kelenjar

getah bening serta subtipe histopatologi yang terangkum dalam bentuk laporan histopatologi dan imunohistokimia.

Seiring dengan berjalannya waktu serta kemajuan di berbagai bidang dalam dunia kedokteran maka pedoman penatalaksanaan terbaru mengenai indikasi diseksi kelenjar getah bening aksila, radiasi *whole-breast* menggunakan hipofraksinasi, akselerasi radiasi dan juga terapi sistemik untuk penderita kanker payudara dengan reseptor hormon positif dalam konteks terapi adjuvan dan metastatik juga telah memasuki era yang cukup menggembirakan.<sup>3</sup>

Adanya pemahaman bahwa kanker payudara merupakan penyakit yang berhubungan dengan hormon, maka berbagai penelitian telah dilakukan dan hasilnya menunjukkan bahwa hormon estrogen nampaknya memiliki peran penting dalam dunia kedokteran khususnya dalam hal bedah payudara.

Berbagai cara dan metode diterapkan untuk mengontrol keberadaan hormon estrogen dalam hubungannya dengan penyakit kanker payudara. Beberapa metode yang tersedia saat ini berupa tindakan pembedahan (oovorectomy) yang bersifat permanen maupun dengan beberapa cara non operatif lainnya berupa penggunaan obat anti estrogen yang merupakan salah satu terapi sistemik selain obat kemoterapi.

Sebagaimana diketahui bahwa hormon estrogen berperan penting dalam patogenesis kanker payudara yang bekerja melalui reseptor estrogen. Pemberian terapi hormonal pada penderita kanker payudara

didasarkan pada ekspresi reseptor estrogen alfa (ER $\alpha$ ) dan atau reseptor progesterone yang didapatkan melalui pemeriksaan imunohistokimia (IHK). Dari hasil pemeriksaan imunohistokimia diketahui bahwa sekitar 70% kanker payudara memiliki reseptor estrogen alpha ( ER $\alpha$ ).<sup>4</sup>

Dengan demikian diharapkan bahwa pemberian terapi hormonal akan mampu mengurangi kadar estrogen atau menghambat transduksi signal melalui ER. Saat ini beberapa jenis terapi hormonal telah tersedia meliputi golongan obat yang termasuk *selective estrogen receptor modulator* (SERM, contoh tamoksifen), *selective estrogen receptor down regulators* (SERD, contoh *fulvestrant*) dan aromatase inhibitor (AI, contoh *anastrozole*).<sup>5</sup>

Tamoksifen sendiri telah diberikan selama lebih dari tiga dekade pada penderita kanker payudara stadium dini yang memiliki ER $\alpha$  sebagai terapi hormonal (endokrin) ajuvan dengan manfaat meningkatkan ketahanan hidup yang bermakna.<sup>6</sup> Namun pada kenyataannya, hingga saat ini resistensi terhadap tamoksifen masih sering ditemukan dalam berbagai kasus..<sup>7</sup> Sel-sel kanker seringkali menjadi resisten terhadap tamoksifen sehingga mengurangi keberhasilan terapi dan menimbulkan kekambuhan yang berakhir sebagai kanker payudara metastatik atau stadium lanjut. Data yang ada menunjukkan bahwa hingga saat ini sebagian besar kematian akibat kanker payudara diakibatkan karena kekambuhan penyakit dan resistensi terhadap terapi utamanya yang bersifat sistemik.

Berbagai hipotesis terkait resistensi terapi telah dikemukakan

sebelumnya.. Berdasarkan waktu terjadinya, resistensi terhadap terapi hormonal dapat terjadi sejak awal (*de novo*) setelah diagnosis ditegakkan (resistensi intrinsik) atau terjadi selama pemberian terapi hormonal (resistensi didapat). Meskipun telah tersedia obat-obat baru yang lebih kuat, tetapi resistensi terhadap terapi hormonal masih saja terjadi dan merupakan masalah besar dalam penatalaksanaan kanker payudara.<sup>8</sup>

Beberapa kemungkinan yang telah dipikirkan sebagai penyebab terjadinya resistensi terhadap terapi sistemik pada penderita kanker payudara., satu diantaranya adalah keterlibatan dari *miRNA*.

miRNA merupakan ekspresi molekul *noncoding RNA* berukuran kecil (16-29 nukleotida) yang dikenal sebagai *microRNA (miRNA)*. Hingga saat ini, miRNA ditengarai memiliki peran penting dalam mekanisme terjadinya resistensi sel kanker terhadap obat anti hormonal. Dalam hubungannya dengan resistensi, miRNA akan menurunkan ekspresi protein produk gen targetnya dengan cara menekan proses translasi atau mendegradasi *messenger RNA (mRNA)*. Studi pada kultur sel kanker payudara MCF-7 memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan profil ekspresi miRNA antara sel-sel yang sensitif dan yang resisten terhadap tamoksifen.<sup>9</sup> Ditengarai terdapat puluhan bahkan ratusan miRNA yang berbeda di antara sel-sel yang sensitif dan resisten, sebagian menunjukkan peningkatan regulasi (*upregulation*), sedangkan lainnya mengalami penurunan regulasi (*downregulation*).<sup>10</sup>

Dari sejumlah miRNA yang ada saat ini, miRNA-221 dan miRNA-222

merupakan yang terbanyak menjalani penelitian dalam hubungannya dengan resistensi terhadap terapi hormonal pada kanker payudara. Peningkatan ekspresi kedua miRNA tersebut dihubungkan dengan terjadinya resistensi terhadap terapi *tamoksifen* dan *fulvestrant*.<sup>9,11</sup> Target penting yang diatur oleh miRNA-221 dan miRNA-222 antara lain adalah jalur pensinyalan keluarga CipKip (p21, p27, p57), ER $\alpha$  dan PTEN.<sup>12</sup> Regulasi jalur-jalur pensinyalan tersebut berujung pada peningkatan proliferasi dan kesintasan sel kanker payudara serta menurunnya apoptosis sel. Cara kerja miRNA-221 dan miRNA-222 pada gen ER $\alpha$  (*ESR1*) adalah dengan mengikat langsung regio *3'-untranslated region* (UTR) gen *ESR1*.<sup>9,11</sup> Meskipun demikian, miR-221 tampaknya juga bekerja di beberapa gen target lainnya pada kanker payudara positif ER $\alpha$ . Ini dapat terlihat bahwa ekspresi miR-221 secara bermakna lebih tinggi dibandingkan pada kanker payudara negatif ER $\alpha$ .<sup>13</sup> Peningkatan ekspresi miR-221 yang cukup tinggi ketika pertumbuhan sel kanker mungkin dimaksudkan untuk menekan gen inhibitor *cyclin dependent kinase* (CDK) *p27* sehingga memicu proses siklus sel dan proliferasi sel.<sup>14</sup> Penelitian lain pada kultur sel-sel kanker payudara memperlihatkan bahwa penekanan ekspresi miR-221 dan miR-222 dengan pemberian anti-miR-221 dan anti-miR-222 secara bermakna meningkatkan sensitifitas sel-sel kanker payudara positif ER $\alpha$  terhadap tamoksifen sehingga viabilitas sel-sel kanker akan menurun. Efek ini diduga berhubungan dengan peningkatan ekspresi *tissue inhibitor of metalloproteinase-3* (TIMP3) akibat penurunan

ekspresi miR-221 dan miR-222.<sup>15</sup> Temuan ini dapat menjadi acuan bagi strategi terapi anti-miRNA untuk kanker payudara di kemudian hari.

Sebagian besar penelitian menggunakan sampel jaringan untuk memeriksa tingkat ekspresi miRNA. Namun saat ini, ekspresi miRNA juga dapat ditemukan dalam sirkulasi darah. Deteksi miRNA dalam sirkulasi sebagai *biomarker* memiliki banyak karakteristik yang menguntungkan, seperti mudah diperoleh, non-invasif, *cost-effective* dan sangat stabil dalam perubahan pH maupun suhu, termasuk dalam cairan tubuh seperti serum dan plasma.<sup>16</sup> Penelitian mengenai profil miRNA berpotensi menghasilkan berbagai terapi baru. Beberapa penelitian sebelumnya memperlihatkan bahwa modifikasi ekspresi miRNA ternyata berhasil mengembalikan sel kanker yang telah resisten pada suatu obat dapat menjadi sensitif kembali. Oleh karena itu, dengan mengetahui ekspresi miRNA yang berkaitan dengan resistensi sel kanker terhadap terapi tamoksifen, diharapkan dapat menjadi petunjuk yang bermakna sebelum pemberian terapi hormonal pada penderita kanker payudara subtipe luminal yang mengekspresikan miRNA tersebut.

## **B. Rumusan Masalah**

Saat ini berbagai obat telah digunakan dalam pengobatan kanker payudara termasuk tamoksifen meskipun pada kenyataannya hanya sebagian penderita yang memberikan respons pengobatan yang baik.

Sejumlah biomarker dapat membedakan respons terapi pada pengobatan kanker sehingga diharapkan akan dapat meningkatkan

kelangsungan hidup penderita kanker. Sejauh ini, penanda miRNA dalam serum untuk memantau respons terhadap pengobatan kanker payudara masih terbilang minim meskipun telah dikembangkan dan menjalani uji validasi secara bertahap. Di Indonesia publikasi penelitian mengenai profil miRNA pada keganasan jumlahnya relatif masih terbatas. Mengingat potensi peran miRNA yang dapat membantu menunjukkan resistensi terhadap terapi tamoksifen pada penderita kanker payudara, maka perlu dilakukan penelitian terhadap peran miR-221 dan miR-222 pada penderita kanker payudara subtipe luminal yang mendapatkan terapi tamoksifen.

Berdasarkan latar belakang diatas dapat ditarik rumusan masalah: Bagaimana peran miRNA-221 dan miRNA-222 pada penderita yang mengalami resistensi dan kekambuhan setelah terapi tamoksifen pada penderita kanker payudara subtipe luminal

### **C. Tujuan Penelitian**

#### **1. Tujuan Umum**

Untuk mengetahui peran miRNA-221 dan miRNA-222 terhadap resistensi dan kekambuhan pasca terapi tamoksifen pada penderita kanker payudara subtipe luminal.

#### **2. Tujuan Khusus**

- a. Mengetahui hubungan miRNA-221 dan miRNA-222 dengan beberapa variabel klinikopatologi pada penderita yang mengalami resistensi dan kekambuhan pasca terapi tamoksifen pada

penderita kanker payudara subtipe luminal.

- b. Mengetahui tingkat ekspresi miRNA-221 dan miRNA-222 pada penderita yang mengalami resistensi dan kekambuhan pasca terapi tamoksifen pada penderita kanker payudara subtipe luminal.
- c. Mengetahui kemampuan miRNA-221 dan miRNA-222 sebagai prediktor resistensi dan kekambuhan pasca terapi tamoksifen pada penderita kanker payudara subtipe luminal.

#### **D. Hipotesis Penelitian**

1. Adanya hubungan antara peningkatan ekspresi miRNA-221 dan miRNA-222 dengan variabel-variabel klinikopatologi pada penderita yang mengalami resistensi dan kekambuhan setelah terapi hormonal pada penderita kanker payudara subtipe luminal
2. Tingkat ekspresi miRNA-221 dan miRNA-222 tinggi pada penderita yang mengalami resistensi dan kekambuhan setelah terapi hormonal pada penderita kanker payudara subtipe luminal
3. miRNA-221 dan miRNA-222 sebagai prediktor resistensi dan kekambuhan pasca terapi tamoksifen pada penderita kanker payudara subtipe luminal

#### **E. Manfaat Penelitian**

##### **1. Manfaat Akademik**

Hasil penelitian akan menambah pengetahuan tentang peran

miRNA-221 dan miRNA-222 dalam protokol pengobatan kanker payudara. Jenis-jenis miRNA yang terdeteksi berkaitan dengan resistensi terhadap tamoksifen akan menjadi sumbangan pengetahuan yang berharga bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan penerapannya termasuk penyusunan model baru prediktor respons tamoksifen pada kanker payudara subtipe luminal. Penelusuran jalur sinyal biologis yang dipengaruhi oleh *miRNA* sehingga menjadikan sel kanker resisten terhadap pengobatan tamoksifen dapat menjadi dasar penelitian biomolekular.

## **2. Manfaat Layanan Kesehatan**

Dengan mengetahui ekspresi miRNA yang berkaitan dengan resistensi terapi Tamoksifen, diharapkan dapat berperan dalam penentuan keputusan agar pemberian tamoksifen menjadi lebih rasional. Hasil penelitian dapat dijadikan tambahan acuan untuk menjelaskan manfaat dan risiko kepada penderita kanker payudara yang akan menjalani terapi tamoksifen.

## **F. Kebaruan**

Pada penelitian ini menggunakan ekspresi miR-221 dan miR-222 secara bersama sebagai prediktor resistensi terapi hormonal pada kanker payudara subtipe luminal. Resistensi sel kanker terhadap terapi dievaluasi secara biomolekular dengan menggunakan biopsi cairan (*liquid biopsy*). Umumnya pemeriksaan miRNA menggunakan sampel biopsi jaringan. Penggunaan serum sebagai biopsi cairan akan memudahkan pemeriksaan tindak lanjut penderita karena tidak invasif sehingga dapat dilakukan

secara serial dan berulang dalam rentang waktu tertentu.

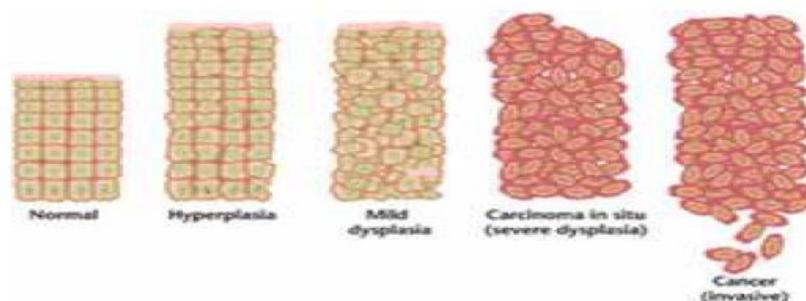
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tinjauan Umum tentang Kanker Payudara

##### 1. Kanker Payudara

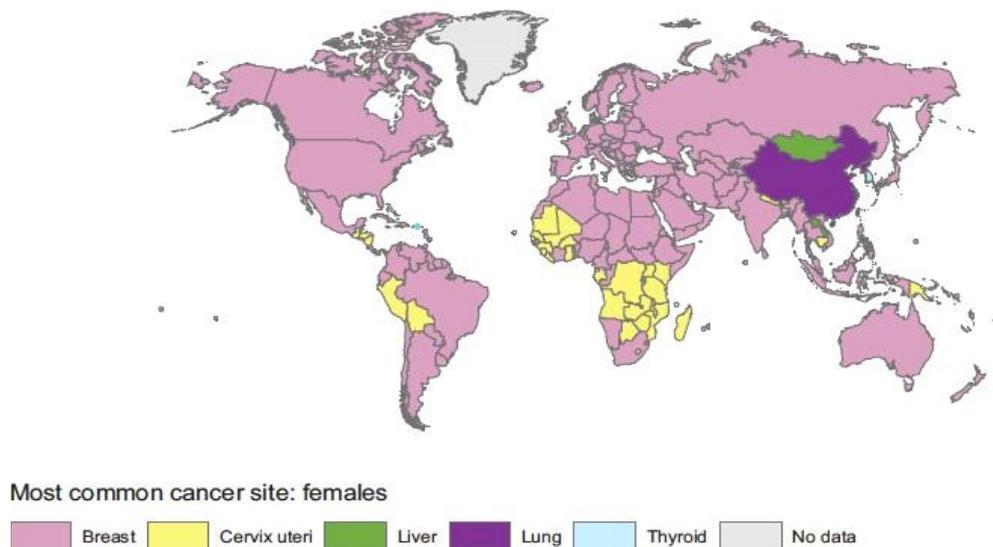
Tumor merupakan penyakit genetik yang kompleks, melibatkan kelainan struktural dan kelainan ekspresi gen (*coding dan noncoding*). Selama hampir tiga dekade, perubahan protein yang mengkode onkogen atau *tumour-suppressor genes* dianggap sebagai penyebab tumorigenesis. Tumor ganas adalah sekelompok sel-sel kanker yang dapat tumbuh dan berkembang pada jaringan dan bisa menyebar ke organ lain dari tubuh. Kanker payudara merupakan keganasan yang berasal dari sel kelenjar, saluran kelenjar dan jaringan penunjang payudara, tidak termasuk kulit payudara. Kanker payudara dimulai dari sel-sel yang melapisi saluran (*ductalcancers*). Sebagian dimulai dari sel-sel yang melapisi lobulus (*lobular cancers*), dan juga dapat dimulai dari jaringan lain. Penyakit ini menyerang sebagian besar perempuan meskipun pria dapat juga menjadi sasaran meskipun dalam prosentasi yang kecil.



**Gambar 2-1. Perubahan epitel normal payudara hingga menjadi kanker.**

## 2. Epidemiologi

Kanker payudara merupakan salah satu penyakit keganasan pada perempuan di dunia yang juga menjadi penyebab utama kedua kematian akibat kanker pada perempuan. Penyakit ini terbanyak menyerang perempuan di Amerika Utara, Eropa, dan Oceania (Australia dan Selandia Baru), sedangkan di Asia, kanker terbanyak adalah kanker payudara dan kanker serviks uteri (Gambar 2-1).<sup>17</sup> Data dari GLOBOCAN 2012 mendapatkan kasus baru kanker payudara pada perempuan sebanyak 1.671.100 orang dengan angka kematian sebanyak 521.900 orang di seluruh dunia. Sebagian besar kematian terjadi di negara-negara yang berpendapatan rendah atau menengah.<sup>18</sup>



**Gambar 2-2. Distribusi lima kanker terbanyak pada perempuan di dunia.**

### **3. Etiologi dan Faktor Risiko**

Hingga saat ini penyebab kanker payudara diyakini sebagai multifaktorial yang diantaranya berhubungan dengan pola makan, faktor reproduksi, dan hormon. Kanker payudara adalah penyakit masyarakat makmur yang telah memperoleh "gaya hidup Barat", yang ditandai dengan diet tinggi kalori yang kaya akan lemak dan protein hewani, dikombinasikan dengan kurangnya aktifitas fisik.

#### **a. Hormon endogen**

Ada banyak bukti dari studi epidemiologis yang telah dilakukan bahwa hormon steroid (androgen, estrogen, progesteron) memiliki peran penting dalam perkembangan kanker payudara. Tingkat kejadian kanker payudara meningkat lebih tajam pada usia sebelum menopause (sekitar 8% per tahun) dibandingkan setelah menopause (sekitar 2% per tahun), ketika sintesis estrogen dan progesteron berhenti dan produksi ovarium androgen menurun secara bertahap. Bukti yang berkembang menunjukkan adanya hubungan yang kuat dan konsisten antara kadar estrogen dan testosteron pada wanita pascamenopause dan resiko terjadinya kanker payudara. Data prospektif gabungan menunjukkan bahwa terdapat hubungan positif antara kadar hormon estrogen dan terjadinya kanker payudara. Pada wanita premenopause, konsentrasi folikel total dan folikel estradiol bebas yang lebih tinggi dikaitkan dengan peningkatan risiko terjadinya kanker payudara, demikian halnya dengan konsentrasi testosteron yang lebih tinggi, tetapi bukan progesteron atau globulin pengikat hormon seks (SHBG).

Konsentrasi prolaktin yang tinggi juga dikaitkan dengan peningkatan risiko kanker payudara pada wanita baik yang pre maupun pasca menopause terutama jika dikaitkan dengan kanker payudara positif-*ER*.

#### **b. Hormon eksogen**

Kontrasepsi oral sebelumnya diyakini bahwa dapat meningkatkan risiko kanker payudara karena mengandung kadar estrogen dan progesterin (progesteron sintesis yang menyerupai progesteron) yang tinggi melebihi yang diproduksi selama siklus ovulasi normal.

#### **a. Adipositas**

Hubungan antara tingkat adipositas dan kanker payudara tergantung pada status menopause. Pada populasi industri yang makmur dengan tingkat kanker payudara yang tinggi, ukuran adipositas tubuh berbanding terbalik dengan risiko kanker payudara premenopause, tetapi berhubungan positif dengan risiko kanker payudara pada mereka yang telah menopause.

#### **b. Aktifitas fisik**

Hubungan antara aktifitas fisik dan risiko kanker payudara telah dinilai oleh *IARC*, yang menyimpulkan bahwa tingkat aktifitas yang tinggi dikaitkan dengan penurunan risiko terjadinya kanker payudara. Bukti untuk efek dosis-respons ditemukan pada sebagian besar studi yang sudah dilakukan.. Sebagian besar penelitian berfokus pada kanker payudara pascamenopause, meskipun juga ditemukan beberapa bukti yang menunjukkan efek perlindungan dari aktivitas fisik pada penyakit kanker payudara pre-menopause. Bukti terbaru menunjukkan bahwa manfaat

aktifitas fisik tidak tergantung pada ras atau etnis. Perlindungan terbesar untuk terjadinya kanker payudara telah dilaporkan dialami oleh perempuan yang mempertahankan aktifitas fisiknya secara konsisten dari menarche hingga kehidupan dewasa.

#### **c. Nutrisi**

Terdapat bukti bahwa terjadi penurunan risiko kanker payudara pada individu yang memiliki pola diet sehat, meskipun analisis yang terbaru pada studi kohort dengan populasi yang besar tidak menemukan adanya bukti peningkatan risiko kanker payudara terkait dengan pola makan yang tidak sehat. Demikian halnya dengan asupan tinggi buah dan sayuran, nampaknya tidak terkait dengan penurunan risiko kanker payudara dalam penelitian terbaru.

#### **d. Alkohol**

Konsumsi alkohol secara konsisten dikaitkan dengan peningkatan moderat dalam risiko kanker payudara. Menurut hubungan dosis-respons (jumlah minuman per hari), bahkan tingkat konsumsi yang rendah dikaitkan dengan peningkatan risiko. Bukti menunjukkan bahwa asupan alkohol yang tinggi atau kadar folat dalam darah yang tinggi dapat menurunkan risiko.

#### **e. Merokok**

Menurut laporan *USA Surgeon General 2004* tentang konsekuensi kesehatan dari merokok menunjukkan tidak terdapat hubungan sebab

akibat antara merokok aktif dan kanker payudara. Demikian pula, data gabungan dari 53 studi epidemiologis menunjukkan tidak ada hubungan antara merokok dan kanker payudara di antara wanita yang tidak minum alkohol. Namun, bukti tambahan yang substansial telah terakumulasi dalam dekade terakhir, dan tinjauan yang dilakukan pada tahun 2009 oleh gugus tugas Kanada menyimpulkan bahwa perokok aktif secara kausal berhubungan dengan kanker payudara pra dan pascamenopause. Lebih lanjut, gugus tugas ini menyimpulkan bahwa perokok pasif secara kausal terkait dengan kanker payudara pre-menopause., Tetapi data tersebut tidak cukup kuat untuk dijadikan kesimpulan pada kanker payudara postmenopause.

**f. Faktor genetik berkontribusi terhadap insiden kanker payudara.**

Diperkirakan sekitar 5% dari semua kasus kanker payudara dan sekitar 25% dari kasus yang terkait genetik didiagnosis pada usia muda (< 30 tahun). Faktor genetik yang paling sering menjadi penyebab terjadinya kanker payudara yaitu adanya mutasi gen. Sulit untuk mengetahui berapa besar peran dari faktor risiko untuk menyebabkan munculnya kanker payudara. Sebagian perempuan yang memiliki satu atau lebih faktor risiko tetapi tidak terkena kanker payudara, sementara yang lain tidak memiliki faktor risiko yang jelas (selain karena faktor jenis kelamin dan usia) tetapi terkena kanker payudara.

Beberapa faktor risiko kanker payudara antara lain:

**a. Jenis kelamin**

Perempuan lebih berisiko seratus kali terkena kanker payudara dibandingkan pria. Hal ini disebabkan karena pria hanya memiliki sedikit hormon estrogen dan progesteron dibandingkan perempuan, yang dapat memicu berkembangnya kanker payudara.

#### **b. Usia**

Risiko terkena kanker payudara meningkat seiring dengan bertambahnya usia yang terus akan meningkat setelah usia 30 tahun sampai rentang usia 45-50 tahun. Sekitar 1 dari 8 kanker payudara invasif ditemukan pada perempuan berusia kurang dari 45 tahun, sementara sekitar 2 dari 3 kanker payudara invasif ditemukan pada perempuan usia 55 tahun atau lebih.

#### **c. Riwayat keluarga**

Riwayat keluarga yang menderita kanker payudara merupakan faktor risiko utama. Mereka yang memiliki riwayat keluarga kanker payudara berisiko dua kali lipat terkena kanker payudara. Sekitar 15% perempuan yang menderita kanker payudara ternyata memiliki anggota keluarga yang juga mengalami kanker payudara. Dari angka yang ada saat ini, dilaporkan bahwa sekitar 5-10 % kasus kanker payudara dikaitkan dengan mutasi gen (perubahan abnormal ) yang diturunkan dari ibu atau ayah. Memiliki satu kerabat tingkat pertama (ibu, saudara perempuan atau anak perempuan) dengan kanker payudara membuat seorang perempuan memiliki risiko dua kali lipat terkena kanker payudara. Memiliki dua kerabat tingkat pertama

yang menderita kanker payudara akan meningkatkan risiko sekitar 3 kali lipat.

#### **d. Ras dan etnis**

Perbedaan etnis merupakan faktor lain yang mempengaruhi prevalensi kanker payudara. Sebagai contoh di Amerika Serikat, kanker payudara lebih banyak menyerang orang kulit putih. Perbedaan ini kemungkinan besar disebabkan oleh faktor gaya hidup dan kondisi sosial. Wanita yang memiliki pendidikan, pekerjaan dan tingkat ekonomi yang lebih tinggi memiliki risiko yang lebih besar terkena kanker payudara disebabkan oleh pola reproduksi mereka termasuk kehamilan pertama. Perbedaan etnis dalam hal subtipe reseptor estrogen dan progesteron juga menjadi faktor penting yang mempengaruhi terjadinya kanker payudara.

##### 1) Jaringan payudara yang padat

Payudara terdiri dari jaringan lemak, jaringan fibrosa, dan jaringan kelenjar. Seseorang dikatakan memiliki jaringan payudara yang padat (seperti yang terlihat pada mammogram) ketika mereka memiliki lebih banyak jaringan kelenjar dan fibrosa serta jaringan lemak yang lebih sedikit. Perempuan dengan jaringan payudara yang padat memiliki risiko lebih tinggi terkena kanker payudara dibandingkan perempuan dengan payudara kurang padat.

##### 2) Periode menstruasi

Perempuan yang memiliki siklus menstruasi yang panjang memiliki risiko yang lebih besar untuk menderita kanker payudara .

Utamanya mereka yang mengalami menarche awal tetapi mendapat menopause yang lebih lambat .

### 3) Paritas dan riwayat reproduksi

Jumlah paritas yang banyak (multipara) erat kaitannya dengan penurunan resiko kanker payudara. Perempuan yang tidak memiliki anak atau kelahiran hidup anak pertama setelah usia 30 tahun memiliki risiko kanker payudara yang lebih tinggi. Kehamilan yang dialami berulang kali dan hamil pada usia muda mengurangi risiko kanker payudara. Sebaliknya usia kehamilan pertama yang lebih tua mempunyai risiko lebih tinggi terkena kanker payudara. Kehamilan akan mengurangi jumlah siklus menstruasi seseorang, yang mungkin menjadi alasan untuk efek ini.

## **4. Gejala dan tanda**

Skrining menggunakan mammogram telah meningkatkan jumlah kasus kanker payudara yang terdeteksi sebelum menimbulkan gejala apapun. Namun, masih ada beberapa jenis kanker payudara yang tidak terdeteksi oleh mammogram. Gejala yang paling umum dari kanker payudara adalah adanya benjolan atau massa yang tidak nyeri dan massa padat dengan tepi yang tidak teratur. Kanker payudara dapat juga berupa massa yang lembut, berbatas tegas serta sangat nyeri. Oleh karena itu, adanya massa di payudara akan mengharuskan seseorang untuk segera ke dokter yang akan membantu dalam mendiagnosis masalah dari penyakit yang ada.

Kemungkinan tanda-tanda lain dari kanker payudara berupa pembengkakan seluruh atau sebagian dari payudara, iritasi kulit atau dimpling, nyeri payudara atau puting, retraksi puting (lipatan puting), kemerahan atau penebalan pada puting dan kulit payudara serta keluarnya cairan dari puting selain ASI.

## **5. Penegakan diagnosis**

Terdapat beberapa faktor prognostik yang digunakan untuk menilai kelangsungan hidup penderita kanker payudara. Saat ini beberapa faktor prognostik telah digabungkan ke dalam klasifikasi *TNM* atau yang terbaru dengan *Nottingham Prognostic Index (NPI)*. Keduanya sangat baik dan membantu para klinisi sebagai prediktor dalam memperkirakan kelangsungan hidup penderita kanker payudara. Penentuan stadium dengan menggunakan sistem *TNM* berdasarkan atas ukuran tumor primer, keterlibatan kelenjar getah bening regional, dan adanya metastasis. Sedangkan untuk sistem *NPI* berdasarkan atas ukuran tumor, grading, dan keterlibatan kelenjar getah bening. Identifikasi faktor prognostik yang berhubungan dengan metastasis atau potensi pertumbuhan tumor primer dapat membantu dokter dalam menentukan terapi adjuvan dan memprediksi kelangsungan hidup penderita. Adapun faktor prognostiknya yaitu :

### **a. Klasifikasi berdasarkan *grading* histopatologi**

Histologi adalah ilmu yang mempelajari anatomi sel dan jaringan organisme secara mikroskopis. Analisis histologi dilakukan dengan memeriksa irisan tipis dari jaringan di bawah mikroskop cahaya (mikroskop optik) atau mikroskop elektron. Setelah urutan prosedur teknis untuk persiapan jaringan (*fiksasi, dehidrasi, clearing, infiltrasi, embedding, sectioning, dan staining*), gambar histologi dapat dihasilkan dengan teknik pencitraan yang berbeda-beda, didasarkan pada analisis manual atau otomatis yang dapat dilakukan untuk mendeteksi jaringan yang abnormal. *Grading* histopatologi umumnya dianggap sebagai standar terbaik untuk diagnosis klinis kanker, identifikasi target terapeutik dan prognostik.

*Grading* tumor secara histopatologi didasarkan pada derajat diferensiasi dari jaringan tumor. Pada kanker payudara, mengacu pada evaluasi semikuantitatif, karakteristik morfologi dan merupakan metode yang relatif sederhana dan murah. Irisan jaringan tumor diwarnai dengan *HE*, dinilai oleh ahli patologi anatomi yang terlatih dengan menggunakan protokol standar.

*Grading* tumor berbeda dengan stadium kanker. Stadium kanker mengacu pada ukuran dan/ atau batas lokasi tumor primer dan apakah sel kanker telah menyebar di dalam tubuh. Stadium kanker didasarkan pada faktor-faktor seperti lokasi tumor primer, ukuran tumor, keterlibatan kelenjar getah bening regional (penyebaran kanker ke kelenjar getah bening di dekatnya), dan adanya penyebaran baik lokal maupun jauh . Sedangkan *grading* tumor merupakan deskripsi tumor yang didasarkan pada

bagaimana kondisi abnormal sel-sel tumor dan jaringan tumor yang terlihat di bawah mikroskop.

Hal ini merupakan indikator kecepatan pembelahan sel termasuk kemampuan untuk mengalami penyebaran. Jika sel-sel tumor dan susunan jaringan tumor mendekati sel-sel dan jaringan normal maka tumor ini disebut "berdiferensiasi baik" (*well-differentiated*). Tumor ini cenderung tumbuh dan menyebar lebih lambat dari tumor yang "berdiferensiasi buruk" (*undifferentiated/ poorly differentiated*) yang memiliki lebih banyak sel-sel abnormal dan sedikit atau bahkan tidak memiliki struktur jaringan normal.

Analisis manual histopatologi jaringan pada saat ini masih tetap menjadi cara utama untuk mengidentifikasi jaringan kanker yang sangat ditentukan oleh keahlian dan pengalaman masing-masing ahli patologi anatomi..

*Invasive carcinoma NST* dan semua *invasive breast carcinoma* lainnya secara rutin akan menjalani penentuan *grading* berdasarkan penilaian bentuk tubulus/ kelenjar, pleomorfisme inti dan jumlah mitosis (lihat tabel 2.1.) Penilaian *grading* histologi ini menggunakan modifikasi *Elston & Ellis*.

**Tabel 2.1.** Penilaian *grading breast cancer* berdasarkan modifikasi *Elston & Ellis*

Karakteristik	Skor
Bentuk tubulus dan kelenjar <input type="checkbox"/> Sebagian besar tumor (>75%) <input type="checkbox"/> Sedang (10- 75%) <input type="checkbox"/> Sedikit atau tidak ada (<10%)	1 2 3
Pleomorfisme inti <input type="checkbox"/> Sel kecil, teratur, <i>uniform</i> <input type="checkbox"/> Sedikit peningkatan	1 2 3
Jumlah mitosis	1-3

Bergantung pada area bidang mikroskop	
<b>Grading akhir</b>	
<b>Grading 1</b>	Total skor 3-5
<b>Grading 2</b>	Total skor 6 atau 7
<b>Grading 3</b>	Total skor 8 atau 9

b. Klasifikasi berdasarkan stadium (sistem TNM)

Mamografi merupakan metode *imaging baseline* untuk mendeteksi kanker payudara pada wanita yang berusia > 40 tahun. Dari mamografi, kanker payudara invasif terlihat sebagai massa yang berbatas tidak tegas atau *speculated*, dengan atau tanpa kalsifikasi. *Ultrasound* sendiri merupakan pilihan alat diagnosis untuk wanita yang berusia <40 tahun. *Magnetic resonance imaging (MRI)* merupakan metode yang paling sensitif untuk mendeteksi kanker payudara, tetapi penggunaannya hanya terbatas untuk menskrining wanita dengan risiko terkena kanker payudara yang sangat tinggi (misalnya *carrier* mutasi gen *BRCA1* atau *BRCA2*). Sistem yang paling banyak digunakan secara luas untuk menentukan *staging* kanker payudara adalah sistem *TNM* yang dipublikasikan oleh *American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC)*.

## 6. Klasifikasi Molekular Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan penyakit kanker pertama yang diklasifikasikan menjadi beberapa subtype secara molekuler. Klasifikasi molekular ini penting diketahui dan dipahami karena saat ini respons suatu terapi senantiasa dikaitkan dengan klasifikasi tersebut. Dengan

menggunakan teknologi gene microarray, karakteristik molekuler kanker payudara dapat dibagi berdasarkan status estrogen receptor (ER), progesteron receptor (PR), dan HER2/neu receptor.

Klasifikasi yang ada saat ini memiliki dua tujuan utama, yaitu untuk memperkirakan prognosis penyakit serta menentukan jenis terapi spesifik yang harus diberikan kepada penderita kanker payudara yang membutuhkan terapi antihormonal.<sup>19,20</sup> Awalnya pemeriksaan tersebut bersifat tidak praktis digunakan dalam klinis sehingga dibutuhkan pemeriksaan tambahan berupa pulasan imunohistokimia untuk mengetahui karakteristik molekuler tumor yang ada.

Perkembangan terakhir menunjukkan adanya kesepakatan berupa konsensus St Gallen yang mengusulkan untuk memakai empat pulasan imunohistokimia dalam mengklasifikasikan tumor payudara, yaitu *estrogen receptor* (ER), *progesteron receptor* (PR), *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) dan Ki-67.<sup>21</sup> Dengan menggunakan keempat petanda molekuler tersebut, kanker payudara dibagi menjadi 4 sub tipe yaitu luminal A, luminal B, HER2, dan *triple negative* (Tabel 2.1).

**Tabel 2.2. Klasifikasi molekuler sub tipe kanker payudara**

	<b>Definisiklinikopatologis</b>
Luminal A	ER dan/atau PR positif HER2 negatif KI-67 rendah (<14%)
Luminal B	Luminal B (HER2 negatif) ER dan/atau PR

	positif HER2 negatif
	Ki-67 tinggi
	Luminal B (HER2 positif) ER dan/atau PR positif Ki-67 berapa pun
	R2 overekspresi atau amplifikasi
	HE
	ER dan PR negatif
	HER2 overekspresi atau amplifikasi
HER2 positif (non-luminal)	ER dan PR negatif
Triple negative ( <i>basallike</i> )	<u>HER2 negatif</u>

Tumor dalam kelompok ER $\alpha$ + dan/atau PR+ (tumor luminal) berasal dari sel-sel luminal duktus mamaria. Tumor kelompok ini merupakan kandidat terapi endokrin baik yang dilakukan secara bedah (ovariektomi) atau secara kimiawi (aromatase inhibitor, *luteinizing hormone releasing hormone agonists*) atau penyekatan fungsi atau ekspresi ERA (anti estrogen). Tumor luminal A diketahui memiliki prognosis paling baik dengan angka kekambuhan paling rendah selama pengamatan tindak lanjut 12 tahun.<sup>22</sup>

Kelompok HER2+ merupakan 15-20% dari semua kanker payudara. Tumor-tumor ini adalah target untuk terapi anti-HER2 atau pensinyalan HER2, seperti *trastuzumab*, *pertuzumab*, dan *lapatinib* (inhibitor tirosinkinase). Sekitar setengah dari tumor dalam kelompok HER2+ juga

mengekspresikan ERA dan/atau PR sehingga juga dapat menerima terapi endokrin. Tumor ER $\alpha$ + /HER2+ biasanya responsif terhadap terapi endokrin meskipun angkanya lebih sedikit dan lama responsnya lebih pendek dibandingkan tumor-tumor ER $\alpha$ + /HER2-.<sup>23</sup>

Sekitar 15% kanker payudara adalah tumor *triple negative* yang tidak memiliki target molekular untuk diterapi. Nama lainnya adalah tumor “*basal-like*” karena diduga berkembang dari sel-sel basal duktus mamaria dan terdiri dari 3 kelompok terpisah (basal, metaplastik, apokrin).<sup>24</sup> Terapi utama pada kelompok ini adalah kemoterapi karena terapi endokrin biasanya tidak menghasilkan respons yang bermakna.<sup>6</sup>

Penelitian pada penderita kanker payudara di Yogyakarta Indonesia, memperlihatkan pola yang agak berbeda. Sebagian besar penderita termasuk dalam subtipe luminal A (41,3%), tetapi pada posisi kedua adalah subtipe *triple negative* (25,5%). Subtipe HER2 ada di posisi ketiga (19,4%) dan luminal B paling sedikit (13,8%).<sup>25,26</sup> Stratifikasi ini memiliki implikasi prognosis karena ketahanan hidup penderita dapat berbeda menurut subtipe yang ada.

Dengan adanya penggolongan kanker payudara maka diharapkan lebih memudahkan dalam hal pemberian terapi yang sesuai bagi penderita kanker payudara saat ini. Berkaitan dengan hal tersebut, belakangan ini taksonomi molekular kanker payudara kini mulai digunakan untuk meningkatkan akurasi diagnosis kanker payudara sehingga menjadi dasar individualisasi rejimen terapi. Salah satu aplikasi yang tersedia saat ini

adalah pemeriksaan *multigen* (*oncotypeDX*) dalam memprediksi kekambuhan kanker payudara dengan status kelenjar getah bening yang negatif yang mendapat terapi tamoksifen.

Saat ini klasifikasi subtype kanker payudara telah memasuki babak baru dengan berkembangannya *miRNA signatures* dengan teknologi yang menyerupai *gene expression signatures*. Diharapkan dalam beberapa waktu mendatang *profiling* dengan miRNA dapat digunakan sebagai indikator prognostik yang lebih baik sehingga akan mampu menjadi dasar dalam pemberian terapi yang lebih spesifik dan akurat. Profil ekspresi miRNA berpotensi meningkatkan ketepatan klasifikasi *genomic signatures* karena akurasi profil miRNA lebih unggul dibandingkan dengan profil RNA messenger (mRNA).

## **B. Tinjauan Umum tentang Peran *Estrogen Receptor alpha* (ER $\alpha$ )**

Estrogen berperan penting dalam patogenesis kanker payudara melalui *estrogen receptor alpha* (ER $\alpha$ ) di nukleus yang menghasilkan rangsang kuat untuk proliferasi sel-sel kelenjar payudara.<sup>27</sup> Molekul ER normal mengandung regio amino-terminal yang mengandung domain *activationfunction-1* (AF-1) yang tidak tergantung ligan (A-B), domain pengikat DNA atau DNA binding domain (DBD) di bagian tengah (C), domain *hinge* (D) dan domain *hormone binding domain* (HBD) yang berisi domain *activation function 2* (AF-2) tergantung ligan (E), dan karboksil terminal (F) (Gambar 2-2).<sup>28</sup>



**Gambar 2-3. Gen ERAdan beberapa domain fungsionalnya.**

Molekul ER $\alpha$  adalah suatu faktor transkripsi yang bekerja pada inti sel (nukleus) setelah mendapat rangsangan mitogenik dan ketahanan hidup sel-sel kanker payudara. Adapun mekanisme pensinyalan estrogen dapat terjadi melalui dua cara, yaitu genomik dan nongenomik, tergantung pada lokasi ER dalam sel.<sup>29</sup> Pada mekanisme genomik, ER inaktif berada di sitoplasma dan menjadi aktif ketika berikatan dengan ligan (estrogen) lalu masuk ke nukleus. Di nukleus ER berikatan di gen-gen yang memiliki sekuens pengikat estrogen yaitu *estrogen response element* (ERE) di regio promotor gen tersebut sehingga aktif melakukan transkripsi gen. Sebagian kecil ER berada di membran plasma dan menghasilkan pensinyalan estrogen non-genomik.<sup>30</sup> Mekanisme ini berlangsung sangat cepat (dalam hitungan detik) dan mengatur berbagai proses seluler seperti proliferasi, kesintasan (*survival*), apoptosis dan diferensiasi sel-sel, termasuk kanker payudara.<sup>29</sup>

Ekspresi ER $\alpha$  antara lain diatur oleh beberapa mikroRNA, yang bekerja di beberapa gen target tidak hanya pada gen *ESR1* (ER $\alpha$ ). Beberapa miRNA yang terlibat langsung dalam mekanisme umpan balik untuk aktivasi atau inhibisi jalur pensinyalan estrogen/ ERA antara lain adalah miR-206, miR- 221/ miR-222, miR-17 dan miR-27a, serta miR-375.<sup>31</sup>

### C. Terapi Endokrin pada Kanker Payudara

Penatalaksanaan kanker payudara didasarkan pada stadium penyakit, histopatologi, dan klasifikasi molekular. Secara umum, kanker payudara stadium dini dapat menjalani pembedahan untuk membuang tumor primer. Selanjutnya, sesuai indikasi penderita dapat menjalani terapi tambahan seperti radioterapi, kemoterapi dan terapi hormonal.

Terapi endokrin telah menjadi terapi ajuvan standar untuk kanker payudara pascamenopause yang ER positif.<sup>45</sup> Namun, pedoman terkini dari *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) masih menganjurkan ajuvan kemoterapi di samping terapi endokrin untuk kanker payudara dini yang positif di kelenjar getah bening.<sup>3</sup>

Terapi endokrin ajuvan dianjurkan diberikan minimal 5 tahun. Meta-analisis terbaru pada 62,923 penderita kanker payudara dini dengan ER-positif yang mendapat 5 tahun terapi endokrin dan masih bebas penyakit (*disease-free*) memperlihatkan risiko rekurensi yang cukup besar pada tahun ke-5 sampai ke-20. Risiko absolut kekambuhan jauh pada kanker payudara T<sub>1</sub>N<sub>0</sub> adalah 10% untuk *low-grade disease*, 13% untuk *moderate-grade disease*, dan 17% untuk *high-grade disease*. Risiko untuk kekambuhan mana pun atau kanker payudara kontralateral adalah 17%, 22%, dan 26%, berturut-turut.<sup>32</sup>

Pada penderita kanker payudara yang mendapat terapi tamoksifen ajuvan, hasil uji klinik secara acak memperlihatkan adanya manfaat jika

dilakukan perpanjangan waktu terapi endokrin ajuvan. Dalam uji MA-17, penderita kanker payudara dini pascamenopause dengan reseptor hormon positif yang mendapat tamoksifen ajuvan 4,5 – 6 tahun diacak untuk mendapatkan terapi lanjutan dengan *letrozole* atau plasebo.<sup>33,34</sup> Setelah *follow-up* dengan median 64 bulan, terdapat perbaikan *disease-free survival* (DFS) (*hazard ratio* [HR] = 0,52; interval kepercayaan [IK] 95% = 0,45–0,61) dan *overall survival* (OS) (HR = 0,61; IK 95% = 0,45 – 0,61) pada kelompok yang mendapat *letrozole* dibandingkan dengan plasebo.<sup>35</sup>

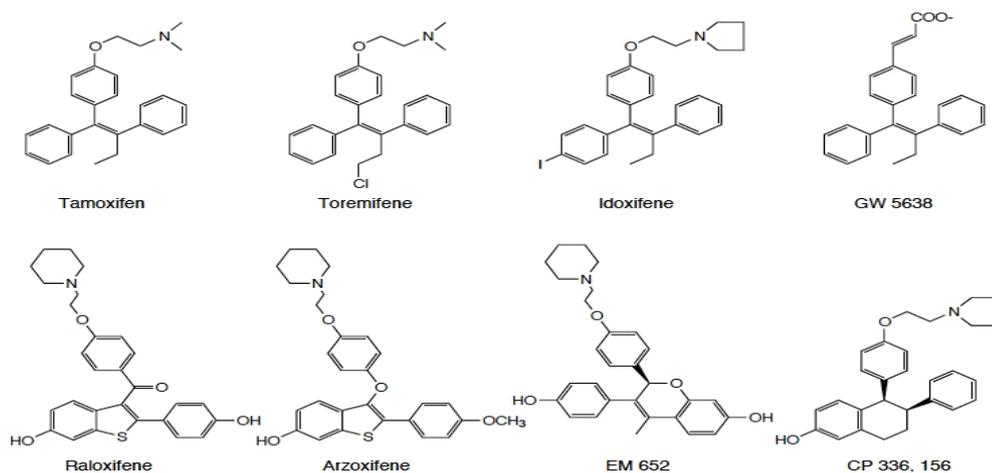
Studi ATLAS mengacak penderita kanker payudara pre -menopause dan pascamenopause untuk mendapat terapi tamoksifen 5 tahun atau 10 tahun. Analisis hasilnya pada 6.846 penderita dengan ER+ memperlihatkan bahwa pemanjangan terapi ajuvan sampai 10 tahun menurunkan risiko kekambuhan dan mortalitas terkait kanker payudara.<sup>36</sup> Risiko kekambuhan pada tahun ke-5 sampai ke-14 adalah 21,4% pada kelompok tamoksifen dibandingkan 25,1% pada kelompok kontrol (penurunan kekambuhan absolut sebesar 3,7%). Selain itu, terjadi pula penurunan insidensi kanker payudara kontralateral dan mortalitas pada kelompok yang mendapat tamoksifen selama 10 tahun. Namun sayangnya, hal ini juga diikuti dengan peningkatan efek samping risiko kanker endometrium dan emboli paru.

#### **D. Jenis Terapi Endokrin**

##### **1. Antiestrogen: SERMs dan SERDs**

Antiestrogen adalah obat-obatan yang bekerja terutama pada reseptor untuk menyekat atau berkompetisi dengan estrogen endogen untuk

mengaktivasi ER $\alpha$ . Tamoksifen (TAM) adalah senyawa antiestrogenik non-steroid yang merupakan trans-isomer derivat *trifeniletilen* dengan rumus kimia *[Z]-2-[4-(1,2-diphenyl-1-butenyl)-phenoxy]-N,N-dimethyl-ethanamine*. TAM merupakan antiestrogen pertama yang digunakan di klinis dan bekerja sebagai agonis parsial,<sup>37</sup> karena dapat memperlihatkan sifat agonis atau antagonis yang bersifat spesifik pada jaringan dan spesies. Tamoksifen bekerja sebagai agonis pada uterus tetapi memiliki efek antagonis pada payudara.<sup>38</sup> Selektivitas TAM dalam menghasilkan respons memunculkan istilah *selective estrogen receptor modulator* (SERM). Obat-obat lain dalam kelompok SERMs yang sudah digunakan adalah *raloxifene* dan *toemifene* (Gambar2-3).



**Gambar 2-4. Struktur kimia beberapa obat golongan SERMs.<sup>39</sup>**  
**2. Aromatase Inhibitor**

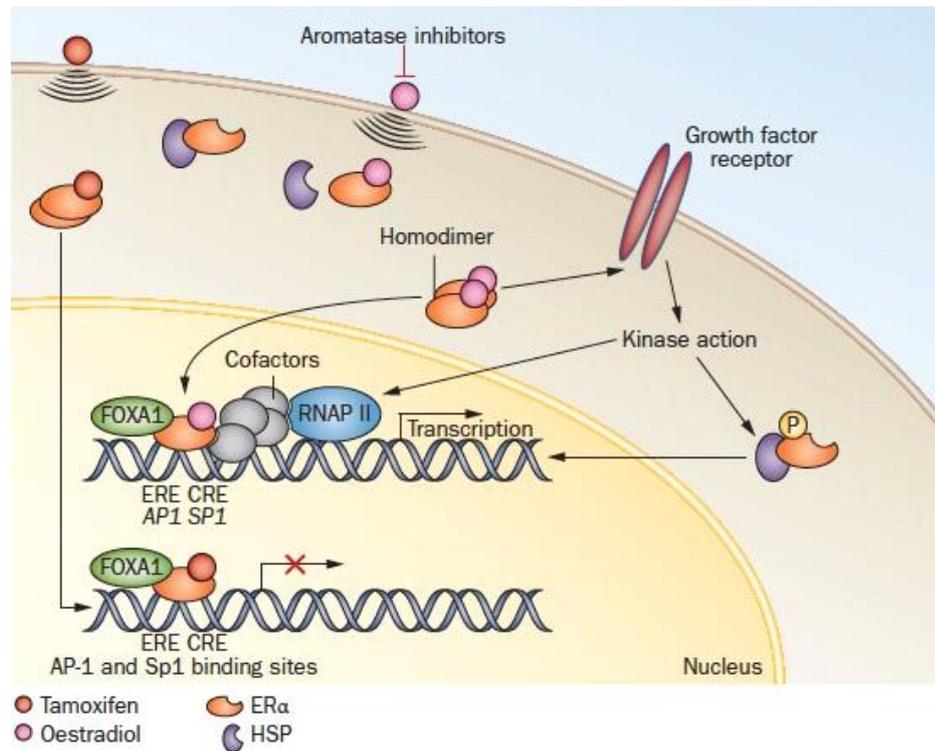
Estrogen merupakan hormon steroid yang disintesis dari androgen dengan bantuan enzim aromatase (CYP19). Sejak pubertas sampai menopause, lokasi utama produksi estrogen terjadi pada ovarium. Setelah

menopause, produksi estrogen di ovarium akan mengalami penurunan, tetapi meskipun demikian estrogen masih dapat diproduksi melalui jaringan lain, seperti jaringan lemak bawah kulit, otot, serta kelenjar adrenal. Tanpa memandang status menopause, tumor payudara mengandung kadar  $17\beta$ -estradiol yang tinggi, sehingga ini dapat menjelaskan mengapa terapi antiestrogen dan aromatase inhibitor dapat bekerja dengan baik pada kanker payudara pascamenopause yang memiliki ER $\alpha$ .<sup>40</sup>

Obat-obatan yang menghambat kerja enzim aromatase (aromatase inhibitor) meliputi inhibitor yang *reversible (non steroid)*, yaitu *letrozole* dan *anastrozole*, serta inhibitor yang *irreversible (steroid)*, yaitu *exemestane*.

#### **E. Mekanisme Terapi Hormonal**

Terapi hormonal ditujukan untuk melawan efek pertumbuhan sel tumor yang dipicu oleh estrogen (estradiol) dengan perantaraan ER $\alpha$ . Estradiol berikatan dengan ER $\alpha$  dan kemudian masuk ke nukleus untuk berikatan dengan sekuens *estrogen response element (ERE)* di DNA sehingga memicu proliferasi sel. Tamoksifen bekerja dengan cara inhibisi kompetitif pada ER $\alpha$  sehingga tidak terbentuk kompleks ER $\alpha$  dan ERE (Gambar 2-4).

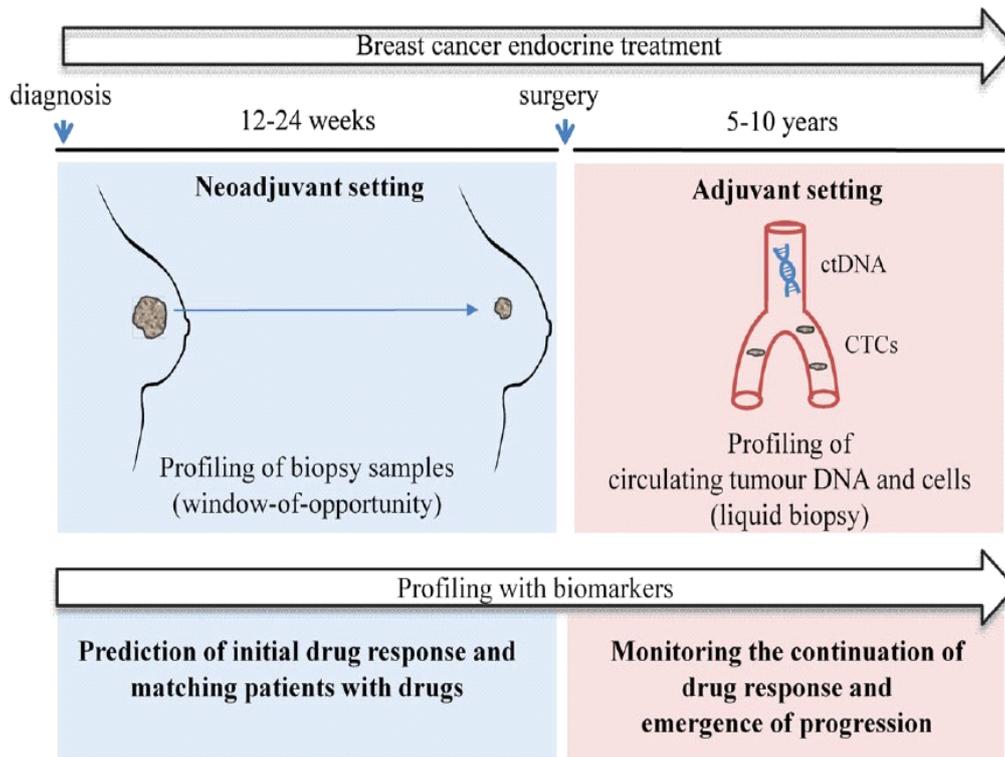


**Gambar 2-5. Fungsi ER $\alpha$  dalam Transkripsi Gen yang Dihambat oleh Tamoksifen atau Aromatase Inhibitor.<sup>41</sup>**

**Keterangan:** AP-1: *transcription factor activator protein 1*; CRE: *cAMP-responsive element*; ER $\alpha$ : *estrogen receptor  $\alpha$* ; ERE; *estrogen-responsive elements*; FOXA1: *forkhead box protein A1*; HSP: *heat shock protein*; RNAP II: *RNA polymerase II*; Sp1: *specificity protein 1*.

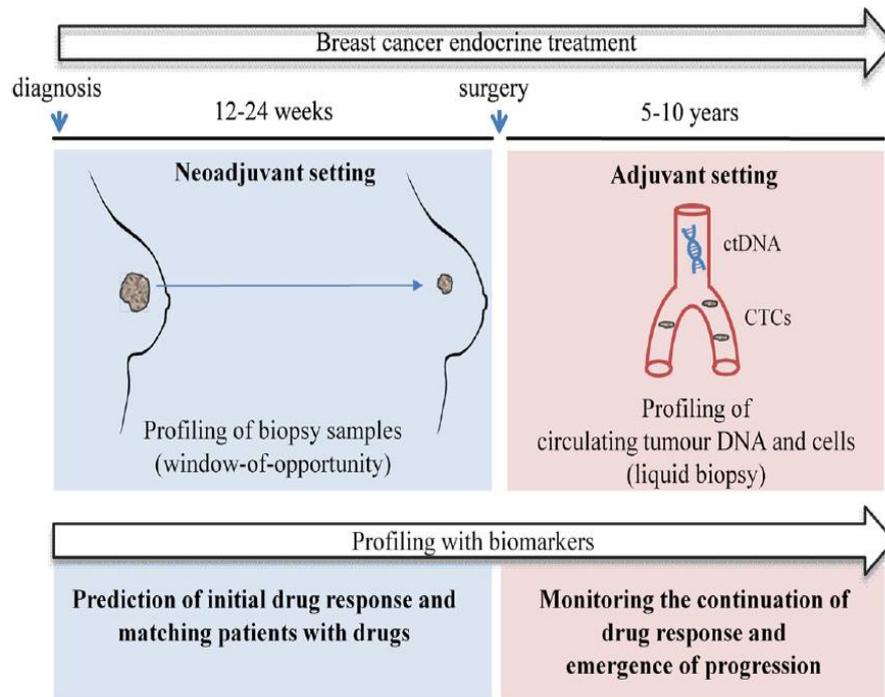
## F. Pemantauan Respons Terapi Hormonal

Terapi hormonal dapat diberikan sebagai terapi ajuvan ataupun neoajuan. Pemantauan respons terapi neoajuan lebih mudah dilakukan karena berlangsung dalam jangka pendek. Sebaliknya, terapi ajuvan diberikan setelah operasi minimal selama 5 tahun sehingga pemantauan harus dilakukan dalam jangka panjang (Gambar 2-5). Oleh karena itu diperlukan pemeriksaan yang efektif untuk memprediksi respons terapi dan juga untuk menentukan prognosis penderita.



**Gambar 2-6. Pemberian terapi hormonal dan pemantauannya.**  
Keterangan: ctDNA: *circulating tumor DNA*; CTC: *circulating tumor cells*

Pada penderita yang menjalani terapi neoajuvan, perangai tumor dapat diperiksa dari sampel biopsi. Sementara respons terapi dapat dinilai sejak 3 sampai 6 bulan terapi, sebelum dilakukan operasi. Perangai tumor saat diagnosis dapat dipakai untuk memprediksi respons awal terapi endokrin. Dalam konteks terapi ajuvan setelah operasi, profil tumor diperiksa secara non-invasif dengan biopsi cair (*liquid biopsy*). Pemantauan dapat dilakukan dengan mencari *circulating tumor cells* (CTCs) dan *circulating tumor DNA* (ctDNA). Keberadaan sel tumor atau DNA sel dalam darah menunjukkan kemungkinan terjadi perburukan penyakit dan menjadi prediktor yang cukup baik pada penderita yang menjalani terapi endokrin.<sup>42</sup>



**Gambar 2-6. Pemberian terapi hormonal dan pemantauannya.**  
 Keterangan: ctDNA: *circulating tumor DNA*; CTC: *circulating tumor cells*

## G. Resistensi terhadap Terapi Hormonal

### 1. Resistensi primer (*de novo*) dan sekunder (didapat)

Tamoksifen merupakan terapi hormonal yang paling banyak digunakan untuk kanker payudara ER positif.<sup>43</sup> Namun, beberapa penderita yang mendapat terapi endokrin akan mengalami resistensi sehingga terjadi rekurensi dan perburukan penyakit. Meta analisis pada 10,645 penderita kanker payudara ER+ menyimpulkan bahwa pemberian tamoksifen dalam 0 – 4 tahun pertama mampu menurunkan angka rekurensi sampai separuhnya (risiko relatif [RR] = 0,53;  $p < 0,00001$ ). Dalam 10 tahun, angka kekambuhan turun sekitar 39% (RR = 0,61;  $p < 0,00001$ ). Namun, setelah 10 tahun hampir tidak ada penurunan kekambuhan (RR = 0,97) sehingga

tampaknya tidak ada manfaat lebih lanjut setelah tahun ke-10.<sup>44</sup>

Resistensi yang muncul pada kekambuhan tumor merupakan masalah klinis yang rumit. Namun, resistensi terhadap terapi hormonal dapat terjadi kapan saja, sejak awal diagnosis sebelum terapi (resistensi primer) atau setelah terapi (resistensi sekunder). Definisi resistensi terbaru dari *European School of Oncology* (ESO) dan *European Society of Medical Oncology* (ESMO) adalah:<sup>45</sup>

**Resistensi primer:** relaps ketika masih dalam 2 tahun pertama terapi endokrin ajuvan, atau *progressive disease* (PD) dalam 6 bulan terapi endokrin sebagai lini pertama untuk kanker payudara metastatik, ketika masih dalam terapi endokrin.

**Resistensi sekunder (didapat):** relaps ketika masih dalam terapi endokrin ajuvan tetapi setelah 2 tahun pertama, atau relaps dalam 12 bulan setelah menyelesaikan terapi endokrin ajuvan, atau PD  $\geq$  6 bulan setelah memulai terapi endokrin untuk kanker payudara metastatik, ketika masih dalam terapi endokrin.

Tidak adanya ekspresi ER $\alpha$  adalah faktor terpenting kegagalan respons terapi endokrin dan merupakan mekanisme utama terjadinya resistensi *de novo*. Dalam hal ini, ditemukan metilasi aberan pada CpG *islands* yang menyebabkan kegagalan ekspresi gen ER $\alpha$  (*ER $\alpha$  silencing*).<sup>46</sup> Namun, sekitar 30% tumor ER+ bersifat resisten terhadap terapi hormonal pada saat diagnosis. Mekanisme resistensi ini belum jelas, tetapi tumor-tumor ER+ yang responsif terhadap hormon memang memiliki perangai klinis yang

berbeda-beda meskipun mengekspresikan kadar ER yang sama.<sup>47</sup>

Hilangnya ekspresi ER $\alpha$  diduga berperan pula pada terjadinya resistensi didapat. Namun, diketahui bahwa penderita kanker payudara ER $\alpha$ + yang awalnya sensitif terhadap tamoksifen tidak serta merta menjadi ER $\alpha$ - ketika mengalami resistensi terhadap tamoksifen. Ekspresi ER $\alpha$  negatif dilaporkan hanya tampak pada 17% penderita yang mengalami resistensi didapat.<sup>48</sup> Selain itu, sekitar 20% penderita yang resisten tamoksifen pada akhirnya responsif terhadap terapi lini kedua dengan aromatase inhibitor atau *fulvestrant*. Temuan-temuan ini memberi kesan bahwa mayoritas penderita dengan resistensi sekunder terhadap tamoksifen masih mengekspresikan ER.

## **H. Mekanisme Resistensi Terapi Hormonal**

### **1. Mutasi gen *ESR1***

Mutasi gen *ESR1* yang mengekspresikan ER $\alpha$  dapat memengaruhi respons terhadap terapi anti-estrogen. Namun, mutasi ini jarang terjadi pada kanker payudara primer sehingga mungkin peranannya tidak besar dalam resistensi terhadap obat-obatan golongan SERMs. Kebanyakan mutasi yang terdeteksi, terjadi pada penderita kanker payudara yang memiliki ER negatif.

Mutasi gen *ESR1* akan menyebabkan ER $\alpha$  menjadi hipersensitif dalam meningkatkan pengikatan protein-protein ko-aktivator pada kadar estrogen yang rendah.<sup>49</sup> Namun, belum diketahui berapa banyak mutasi gen *ESR1*

yang terjadi pada kanker payudara primer.

Penelitian selanjutnya mengkonfirmasi bahwa mutasi ER $\alpha$  berperan penting dalam perburukan penyakit pada kanker payudara yang awalnya memiliki ER positif. Analisis mutasi ER $\alpha$  diperlukan dan penting dalam membuat keputusan tentang terapi hormonal pada penderita kanker payudara ER positif yang mengalami kekambuhan.<sup>50</sup>

## **2. Perubahan epigenetik**

Modifikasi atau perubahan epigenetik adalah perubahan ekspresi gen tanpa mengubah urutan DNA (bukan mutasi genetik). Modifikasi epigenetik sering kali merupakan proses enzimatik yang dapat dipulihkan dengan pemberian inhibitor epigenetik. Di dalam nukleus, DNA untai ganda dikemas padat menjadi kromosom. Untuk itu, DNA digulung pada suatu kompleks protein histon sehingga terbentuk struktur nukleosom yang menjadi unit dasar kromosom dan mudah diakses ketika terjadi proses transkripsi. Derajat gulungan DNA menentukan apakah struktur kromatin ini “terbuka untuk transkripsi” (*euchromatin*) atau “tertutup untuk transkripsi” (*heterochromatin*). Keseimbangan antara *euchromatin* dan *heterochromatin* ditentukan oleh regulasi epigenetik, yang memungkinkan sel-sel mengatur ekspresi gen dan perubahan fungsi biologisnya.<sup>51</sup>

Modifikasi epigenetik terdiri dari metilasi DNA, modifikasi protein histon dan perubahan ekspresi miRNA. Dalam hal resistensi terhadap tamoksifen pada kanker payudara luminal ER+, mekanisme yang terjadi antara lain

adalah metilasi DNA pada jalur pensinyalan ER dan regulasi sel punca kanker payudara.<sup>51</sup>

## **2. Mekanisme Lainnya**

Mekanisme resistensi tamoksifen pada kanker payudara berikutnya adalah interaksi antara ER dan *growth factor receptor* (GFR).<sup>52</sup> Modifikasi ER $\alpha$  pasca transkripsi juga dipertimbangkan sebagai salah satu mekanisme resistensi TAM.<sup>53</sup> Banyak faktor yang menyebabkan resistensi terhadap tamoksifen; antara lain perubahan-perubahan ekspresi gen yang terlibat dalam fenomena *multidrug resistance* (MDR).<sup>54,55</sup> Salah satu mekanisme yang diduga berperan pada MDR adalah penurunan akumulasi obat intraselular yang disebabkan penurunan *influx* obat melalui ekspresi berlebihan transporter *efflux* obat seperti *P-glycoprotein* (P-gp/MDR1), *multidrug resistance associated protein* (MRP) atau *breast cancer resistance protein* (BCRP).<sup>56,57</sup> Berbagai mekanisme resistensi terhadap tamoksifen dirangkum dalam Gambar 2-6.

### **I. Peran ER $\alpha$ dalam Resistensi terhadap Tamoksifen**

Peran utama terapi hormonal adalah untuk mengurangi ligan endogen yang dapat mengaktivasi reseptor estrogen. Anti estrogen mencapai tujuan ini dengan cara inhibisi kompetitif sedangkan aromatase inhibitor menghambat biosintesis estrogen di perifer. Ligan alamiah yang paling kuat mengikat ER $\alpha$  adalah 17 $\alpha$ -estradiol yang terdapat dalam konsentrasi tinggi

pada tumor payudara. Oleh karena ER $\alpha$  adalah target utama anti estrogen (secara langsung) dan aromatase inhibitor (secara tidak langsung), maka adanya ER $\alpha$  dalam tumor merupakan indikator utama kemungkinan terjadinya respons terapi yang bermanfaat. Reseptor estrogen diekspresikan oleh dua gen yaitu *ESR1* untuk ER $\alpha$  dan *ESR2* untuk ER $\beta$ . Keduanya ada pada kanker payudara, tetapi bentuk yang dominan adalah ER $\alpha$ .

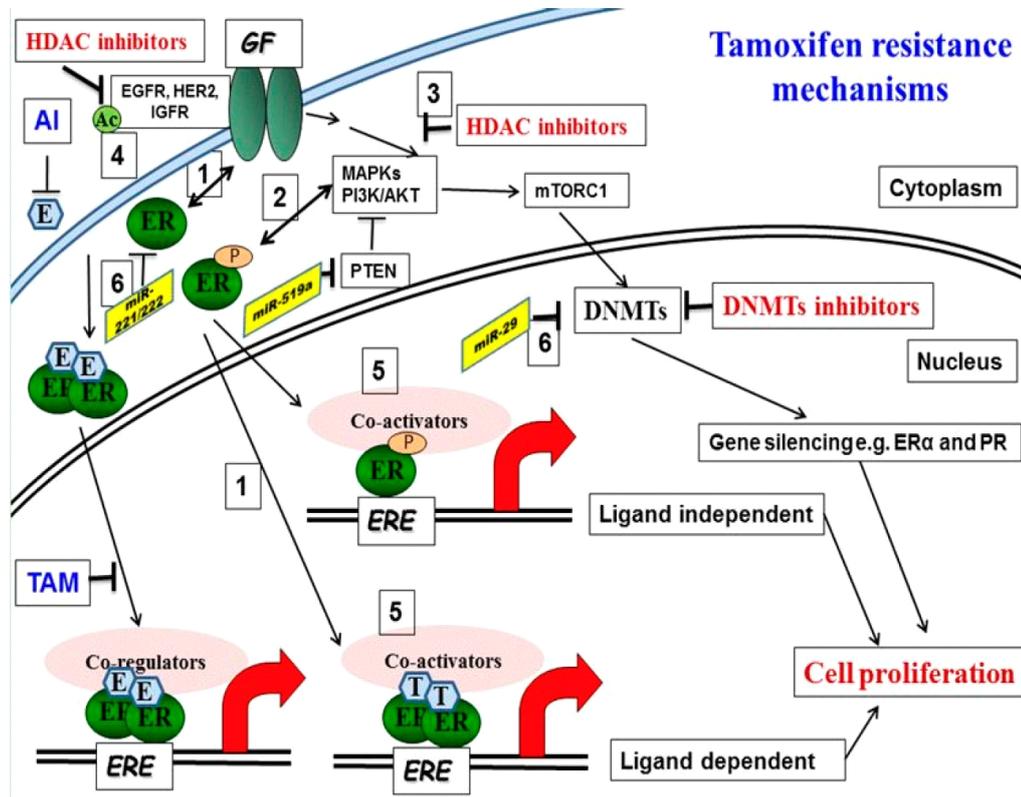
Sesuai dengan mekanisme kerja ER $\alpha$ , maka perannya dalam resistensi tamoksifen juga terjadi di dua kompartemen sel, yaitu di membran dan di nukleus (Gambar 2-6). Di membran sel, ER $\alpha$  bekerja sama dengan *growth factor receptor* (GFR) yang dikenal dengan *cross-talk*. Meningkatnya kerja sama ER dan GFR di membran membuat tamoksifen menjadi agonis. Sebagai suatu SERM, Tamoksifen seharusnya bekerja sebagai antagonis estrogen pada jalur pensinyalan genomik yang mengikat ER $\alpha$  di nukleus. Hal ini terjadi pada resistensi Tamoksifen yang diperantarai varian ER- $\alpha$ 36 yang berada di membran sel.<sup>58</sup> Ikatan ER membran dan TAM kemudian mengaktifasi jalur pensinyalan di hilirnya seperti *extracellular signal-regulated kinase 1 dan 2* (ERK 1/2), termasuk jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan jalur *phosphatidylinositol-3-kinase/Ak-strain transforming* (PI3K/Akt) – *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) yang berperan dalam proliferasi dan kesintasan (*survival*) sel.<sup>59</sup> Di jalur ini ER diaktivasi dengan cara penambahan gugus fosfat (fosforilasi). Reseptor yang teraktivasi dapat

masuk ke nukleus dan mengikat ERE baik secara langsung tanpa ligan (*ligand-independent*) atau dengan mengikat Tam (*Tam-bound complex*). Ikatan Tam-ER di ERE merupakan aktivitas agonis Tam yang memicu transkripsi gen tanpa pengaruh estrogen.

Selain ER, reseptor faktor pertumbuhan yang memiliki domain *receptor tyrosin kinase* (RTK), seperti *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *heregulin-2* (Her-2), dan *insulin-like growth factor receptor* (IGFR) juga dapat mengalami asetilasi dan fosforilasi sehingga menjadi aktif dan memicu jalur pensinyalan proliferasi serta kesintasan sel. Hal ini juga bermanifestasi secara klinis sebagai kegagalan atau resistensi terhadap terapi endokrin. Namun, pemberian inhibitor *histone deacetylases* (HDAC) dapat mengurangi asetilasi GFR serta fosforilasi MAPK dan Akt.<sup>60</sup>

Peran ER $\alpha$  dalam terjadinya resistensi tamoksifen juga dipengaruhi ekspresi mikroRNA, antara lain miR-221/ miR-222 yang mengalami peningkatan regulasi dan miR-29 yang mengalami penurunan regulasi. Salah satu peran miR-221 dan miR-222 adalah menekan ekspresi ER $\alpha$  sehingga tidak terbentuk ER $\alpha$  fungsional.<sup>61</sup> Keluarga miR-29, terutama miR-29b secara umum berfungsi sebagai supresor tumor.<sup>62</sup> Namun, miR-29 dapat mengalami perubahan regulasi ekspresi tergantung sensitivitas sel-sel kanker terhadap Tamoksifen. Dalam hal ini, ER $\alpha$  bertanggung jawab atas pengaturan transkripsi miR-29 oleh Tamoksifen.<sup>63</sup> Modifikasi epigenetik, khususnya metilasi DNA juga berperan dalam kanker payudara.<sup>64</sup> Proses ini diperantarai oleh enzim DNA metil transferase

(DNMT) yang ekspresinya dipengaruhi oleh miR-29.<sup>62</sup>



**Gambar 2-7. Mekanisme molekuler resistensi terhadap tamoksifen.**<sup>51</sup>Keterangan: (1) Peningkatan ER *bidirectional* atau *cross-talk* dengan reseptor faktor pertumbuhan (GFR) mengubah tamoksifen menjadi agonis. (2) Aktivasi kinase dihilir, termasuk ERK1,2 *mitogen-activated proteinkinase* (MAPK) dan AKT, memfosforilasi kedua ER dan protein aksesornya. (3) Penghambatan HDAC mengurangi fosforilasi MAPK dan AKT. (4, 5) Asetilasi EGFR memicu fosforilasi dan aktivasi reseptor tirosin kinase (RTK). Akibatnya, kompleks ko-represor dengan *nuclear corepressor* (NcoR) dinonaktifkan dan dilepaskan dari kompleks promotor terikat Tam. Sebagai gantinya, direkrut kompleks koaktivator *amplified in breast 1* (AIB1) yang terfosforilasi/ teraktivasi. Hal ini menyebabkan peningkatan aktivitas agonis tamoksifen pada transkripsi gen. (6) microRNA yang terlibat dalam resistensi tamoksifen, miR-221/ miR-222 mengalami peningkatan regulasi (*upregulated*), sementara miR-29 mengalami penurunan regulasi (*downregulated*) pada sel-sel yang resisten terhadap tamoksifen.

ERE: *estrogen response element*; DNMTs: *DNA methyltransferases*; HDAC: *histone deacetylases*; TAM: tamoksifen; PTEN: *phosphatase and tensin homolog*; mTORC1: *mammalian target of rapamycin complex*.

## **J. Peran Reseptor *G-Protein Coupled Receptor* (GPR30) terhadap Resistensi Tamoksifen**

### **1. Penemuan reseptor estrogen baru, yang dikenal sebagai GPR30**

Eric Prossnitz, PhD, Profesor dalam Cell Biology and Physiology di University of New Mexico (UNM), bersama-sama dengan kolega-koleganya di UNM Cancer Center dan Department of Chemistry and Biochemistry di New Mexico State University telah menemukan bahwa sebuah *G-Protein Coupled Receptor* baru pada permukaan sel yang dikenal sebagai GPR30 yang turut mengikat estrogen.<sup>95</sup>

Penemuan reseptor estrogen yang baru sangat penting karena estrogen diyakini turut berperan dalam stimulasi pertumbuhan berbagai jenis kanker seperti di payudara, endometrium, dan ovarium. Meskipun estrogen tidak menyebabkan timbulnya kanker secara langsung namun estrogen diyakini dapat menstimulasi proliferasi beberapa jenis sel kanker.<sup>95,96</sup>

Estrogen 17-beta-estradiol (E2) yang aktif secara biologis, berikatan dengan reseptor estrogen yang klasik (ER) akan menghasilkan dimerisasi reseptor. Interaksi E2 dengan ER $\alpha$  turut mengaktifasi kaskade pengiriman sinyal yang berperan dalam proliferasi sel, seperti aktivasi c-Src tyrosine kinase (Src). Aktivasi Src menstimulasi kaskade matrix metalloproteinase (MMP), yang berakibat pelepasan epidermal growth factor (EGF) yang terikat

heparin (HEP) pada permukaan sel. Ligan EGF bebas, berikatan dengan keluarga reseptor EGFR seperti misalnya HER2, yang akan mengaktifasi kaskade pengiriman sinyal extracellular stimulus regulate kinase (ERK). Hasil akhir dari kaskade ini adalah adanya proliferasi, survival dari sel, serta migrasi atau metastasis.<sup>95,96</sup>

Di samping mekanisme aksi estrogen yang bersifat genomik atau klasik pada reseptor intraseluler ( $E\alpha$  dan  $ER\beta$ ), terdapat bukti bahwa estrogen memiliki jalur alternatif lain, jalur non-genomik, yang menimbulkan aksi dengan respon yang cepat, yang dimulai dari permukaan sel. Respon-respon ini diyakini berasal dari adanya sinyal yang dikirimkan dari reseptor steroid pada sitoplasma dan permukaan sel, yang disebut sebagai sinyal non-klasik atau non-genomik.<sup>96</sup>

Pengiriman sinyal secara non-genomik ini memiliki berbagai karakteristik, yaitu respon yang dihasilkan sangat cepat (hanya dalam beberapa detik atau menit), tidak sensitif terhadap inhibitor mRNA dan sintesis protein, dan banyak ditemukan pada sel-sel yang kurang memiliki reseptor steroid nuklear. Sebenarnya aksi cepat dari estrogen dari membran plasma ini telah ditemukan sejak dua dekade lalu, namun kelompok-kelompok peneliti saat itu tidak berfokus pada hal tersebut sehingga penelitian lebih lanjut mengenai reseptor ini tidak dilakukan. Namun berbagai bukti menunjukkan bahwa  $17\beta$ -estradiol

(E2), suatu mitogen yang poten, turut menghasilkan berbagai respon ekstraseluler atau non-genomik. Misalnya, E2 dapat cepat meningkatkan second messengers intraseluler, seperti kalsium dan cAMP, mengaktivasi mitogen-activated protein kinase (MAPK) dan phospholipase C. Respon-respon intraseluler ini penting dalam berbagai proses fisiologis, seperti untuk proteksi kardiovaskular, preservasi tulang, proliferasi sel kanker, neuroproteksi, spermatogenesis, dan proliferasi keratinosit.<sup>96</sup>

GPR30 merupakan bagian dari G-protein coupled receptors yang terbentang pada membran sebanyak tujuh kali, ada yang menyebutnya sebagai **heptahelical transmembrane proteins**. GPR30 ini pada berbagai literatur dikatakan terletak pada membran plasma namun juga terdapat beberapa literatur yang mengatakan terletak di membran retikulum endoplasma. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui posisi GPR30 pada sel. Reseptor yang terkait dengan protein G ini, juga diketahui dapat mengikat berbagai peptida atau protein, sehingga menimbulkan pertanyaan akan adanya kemungkinan reseptor ini memiliki ligan lainnya selain estrogen.

Melalui kaki  $\beta$  dan  $\gamma$  protein G (protein G merupakan protein trimerik, memiliki 3 kaki yaitu  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$ ), induksi E2 menimbulkan aktivasi dari SRC-like tyrosine kinase, aktivasi dari metalloproteinase, dan pelepasan ekstraseluler dari heparin-bound epidermal growth

factor (HB-EGF). Pelepasan dari HB-EGF mengakibatkan aktivasi reseptor EGF (EGFR), yang akhirnya menginduksi jalur mitogen activated kinase (MAPK). Kaki protein G yang lainnya, yaitu kaki  $\alpha$ , berperan dalam aktivasi jalur adenilat siklase dan produksi cAMP pada sel kanker payudara.

Selain itu, E2 juga mengaktivasi phosphoinositide 3-kinases (PI3K) melalui GPR30. Sebagai akibat dari akumulasi phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3), terjadi aktivasi dari AKT kinase yang berefek proliferasif dan menghambat apoptosis hasil induksi tumor necrosis factor. PI3K diketahui juga memediasi timbulnya efek seluler dari platelet-derived growth factor (PDGF) dan vascular endothelial growth factor (VEGF). Peningkatan kalsium (Ca) intraseluler juga terjadi sebagai respon cepat dari aktivasi GPR30 pada berbagai sel. Namun, belum terdapat penjelasan yang memuaskan terhadap stimulasi peningkatan kalsium ini dan dari mana kalsium ini berasal. Pelepasan simpanan kalsium intraseluler ataupun influks dari luar sel, keduanya masih merupakan penjelasan yang mungkin. Adanya peranan dari phospholipase C (PLC) dapat dipertimbangkan namun tergantung dari tipe sel yang terkait ataupun mungkin melibatkan fosfolipase lainnya.

Stimulasi connective tissue growth factor (CTGF) juga turut dimediasi oleh GPR30 dan faktor ini berperan dalam terjadinya proliferasi

dan migrasi sel. Secara keseluruhan, dapat disimpulkan hasil akhir dari kaskade yang diinisiasi dari GPR30 ini adalah adanya proliferasi atau pertumbuhan sel, survival dari sel (antiapoptosis), serta migrasi atau metastasis.

**2. Perilaku Tamoksifen yang ternyata disinyalir berbeda pada ER dan pada GPR30, timbul pemahaman bahwa GPR30 turut berperan dalam karsinogenesis.**

Selective estrogen receptor modulator yang selama ini banyak digunakan, hydroxyTamoksifen (OHT), suatu antagonis ER parsial, ternyata bersifat agonis terhadap GPR30, dan dapat menstimulasi timbulnya proliferasi.

Telah dikatakan di berbagai literatur bahwa estrogen diyakini dapat menimbulkan efek proliferasi melalui GPR30. Hal ini menimbulkan suatu pemahaman baru bahwa GPR30 memang dapat berperan dalam karsinogenesis. Ekspresi berlebihan (overexpression) dari GPR30 berhubungan secara signifikan dengan ukuran tumor (> 2 cm), munculnya metastasis jauh, dan peningkatan ekspresi HER-2/neu. Hal ini turut memberikan kesimpulan bahwa adanya ekspresi berlebihan dari GPR30 dapat menjadi prediktor adanya penyakit yang agresif. Pada pasien-pasien dengan ekspresi GPR30 yang berlebihan, survival rate secara keseluruhan secara signifikan terlihat lebih buruk dibandingkan dengan penderita yang memiliki ekspresi GPR30 yang rendah.

Hanya sekitar dua pertiga dari semua kanker payudara yang mengekspresikan ER  $\alpha$ , dan 25% di antaranya tidak berespon terhadap terapi Tamoksifen. Bahkan bila pada awalnya menunjukkan respon yang baik, banyak pasien pada akhirnya juga mengalami lesi kanker refrakter, yang ditunjukkan dengan pertumbuhan sel yang kembali cepat dan invasif. Hal ini mungkin berhubungan dengan Tamoksifen yang bersifat sebagai agonis terhadap GPR30.

Fakta bahwa Tamoksifen, suatu antagonis ER yang parsial, berperan sebagai agonis pada GPR30, mengemukakan suatu penemuan baru bahwa sebenarnya terapi anti-estrogen konvensional selama ini, lebih bersifat stimulasi daripada inhibisi perkembangan dari tumor yang resisten terhadap Tamoksifen. Penyebab yang berkontribusi perubahan atau progresi dari tumor yang sensitif terhadap pemberian terapi hormonal menjadi tumor yang secara farmakologis tidak sensitif lagi terhadap pemberian hormon, masih perlu diteliti lebih lanjut melalui eksperimen-eksperimen.

### **3. Peranan GPR30 dalam mekanisme resistensi terhadap Tamoksifen**

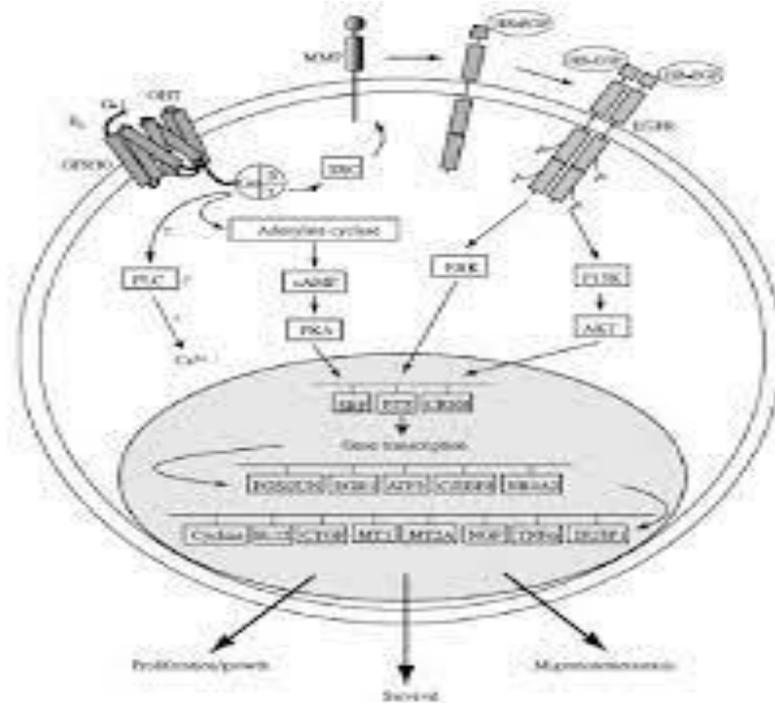
Terdapat penelitian dimana cell line MCF-7 pada kanker payudara diberikan paparan Tamoxifen secara terus-menerus selama 6 bulan untuk menimbulkan resistensi terhadap efek inhibisi dari Tamoksifen. Terapi Tamoksifen jangka panjang (misalkan lebih dari 6 bulan) pada sel-sel MCF-7 ini mengubah efek inhibisi dari Tamoxifen secara signifikan, hanya dengan konsentrasi Tamoxifen yang lebih tinggi yang dapat mempertahankan efek inhibisi dari Tamoksifen. Ternyata sel-sel yang kemudian mengalami resistensi terhadap Tamoksifen (TAM-R) ini, akan mengalami peningkatan sensitivitas terhadap stimulasi estrogen (E<sub>2</sub>) dan peningkatan kapabilitas GPR30 dalam memediasi aksi estrogen pada sel. Pada sel-sel TAM-R ini tidak ditemukan peningkatan ekspresi basal dari GPR30 namun terdapat sedikit peningkatan ekspresi basal EGFR. Terdapat beberapa data yang mendukung peranan penting pengiriman sinyal melalui GPR30/EGFR dalam terjadinya resistensi terhadap Tamoksifen. Inhibisi kaskade ini merupakan salah satu pilihan untuk menimbulkan respon anti-hormonal yang valid pada kanker payudara.

Terapi Tamoksifen memang terbukti efektif untuk tumor yang mengekspresikan ER dan telah mengurangi angka mortalitas secara signifikan pada penderita kanker payudara. Namun ternyata, sebagian besar tumor akan mengalami

resistensi saat pengobatan berlangsung. Beberapa studi eksperimental telah menunjukkan bahwa peningkatan pengiriman sinyal melalui growth factor berperan besar dalam timbulnya resistensi terhadap Tamoksifen. Disamping itu, adanya ekspresi GPR30 dan human epidermal growth factor receptor-2(HER-2) yang berlebihan (over expressed) turut berperan dalam timbulnya fenomena resistensi ini. Dapat dikatakan bahwa GPR30 tidak hanya memiliki kontribusi dalam pertumbuhan sel tumor namun juga berperan dalam terjadinya resistensi terhadap terapi hormonal. Knocking down terhadap GPR30 dan inhibisi pengiriman sinyal melalui EGFR, mengembalikan efek inhibisi Tamoksifen terhadap sel, menguatkan pentingnya cross talk dari GPR30/EGFR dalam terjadinya resistensi Tamoksifen in vitro.<sup>95,96</sup>

**GPR30 merupakan bagian dari G-protein coupled receptors yang terbentang pada membran sebanyak tujuh kali, ada yang menyebutnya sebagai heptahelical transmembrane proteins. GPR30 ini pada berbagai literatur dikatakan terletak pada membran plasma namun juga terdapat beberapa literatur yang mengatakan terletak di membran retikulum endoplasma. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui sebagian besar letak GPR30 pada sel. Reseptor yang terkait dengan protein**

G ini, juga diketahui dapat mengikat berbagai peptida atau protein, sehingga menimbulkan pertanyaan akan adanya kemungkinan reseptor ini memiliki ligan lainnya selain estrogen.



**Gambar 2-8.**Skema pengiriman sinyal melalui jalur GPR30.<sup>96</sup>

Melalui kaki  $\beta$  dan  $\gamma$  protein G (protein G merupakan protein trimerik, memiliki 3 kaki yaitu  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$ ), induksi E2 menimbulkan aktivasi dari SRC-like tyrosine kinase, aktivasi dari metalloproteinase, dan pelepasan ekstraselular dari heparin-bound epidermal growth factor (HB-EGF). Pelepasan dari HB-EGF mengakibatkan aktivasi reseptor EGF (EGFR), yang akhirnya menginduksi jalur mitogen activated kinase (MAPK). Kaki protein G yang lainnya, yaitu kaki  $\alpha$ , berperan dalam aktivasi jalur adenilat

siklase dan produksi cAMP pada sel kanker payudara. Selain itu, E2 juga mengaktivasi phosphoinositide 3-kinases (PI3K) melalui GPR30. Sebagai akibat dari akumulasi phosphatidyl inositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) akan menyebabkan aktivasi AKT kinase yang berefek proliferasif dan menghambat apoptosis yang diinduksi oleh tumor necrosis factor (TNF). PI3K juga akan memediasi timbulnya efek seluler dari platelet-derived growth factor (PDGF) dan vascular endothelial growth factor (VEGF). Peningkatan kalsium (Ca) intraseluler juga terjadi sebagai respon cepat dari aktivasi GPR30 pada berbagai sel. Namun, belum terdapat penjelasan yang memuaskan terhadap stimulasi peningkatan kalsium ini, demikian pula asal usul dari kalsium tersebut. Pelepasan simpanan kalsium intraseluler ataupun influks dari luar sel, keduanya masih merupakan dua hal yang mungkin berperan penting.. Adanya peranan dari phospholipase C (PLC) dapat dipertimbangkan namun tergantung dari tipe sel yang terkait ataupun mungkin melibatkan fosfolipase lainnya. Stimulasi connective tissue growth factor (CTGF) juga turut dimediasi oleh GPR30 dan faktor ini berperan dalam terjadinya proliferasi dan migrasi sel. Secara keseluruhan, dapat disimpulkan hasil akhir dari kaskade yang diinisiasi oleh GPR30 ini adalah adanya proliferasi atau pertumbuhan sel, survival (anti-apoptosis), serta migrasi atau metastasis. Perlu diketahui bahwa sel jaringan payudara yang normal

memiliki ER $\alpha$ , PR, dan juga GPR30. Terdapat asosiasi yang signifikan namun masih belum jelas mengenai hubungan ekspresi kedua jenis reseptor ini.

17- $\beta$ -Estradiol (E2) menunjukkan ikatan yang lebih lemah afinitasnya terhadap GPR30, bila dibandingkan dengan ikatan fisiologisnya terhadap ER $\alpha$  yang jauh lebih kuat. GPR30 tidak dapat memediasi aksi estrogen pada sel yang tidak memiliki ER $\alpha$  maupun ER $\beta$  dan beberapa laboratorium telah menunjukkan bahwa efek E2 tidak berubah apabila dilakukan “knock down” terhadap GPR30 melalui RNA yang terkait. Fungsi-fungsi biologis lain juga tidak dipengaruhi oleh hilangnya fungsi GPR30. Hal ini berbeda bila dilakukan “knock down” terhadap ER  $\alpha$ , maka dapat terlihat adanya berbagai abnormalitas fungsi dan perkembangan organ. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa efek estrogen yang fisiologis tetap memerlukan ER  $\alpha$ . Namun, pada sel yang tidak memiliki ER  $\alpha$  maupun GPR30, seperti pada cell lineMDA-MB-231, respon estrogen yang bersifat cepat dapat ditransfer dengan cara melakukan transfeksi vektor ekspresi GPR30. Pada sel yang tidak memiliki ER  $\alpha$  namun memiliki GPR30, seperti pada cell lineSKBr3, ternyata efek proliferasi sel juga masih sangat tergantung dari ikatan E2 dengan GPR30. Hal ini menunjukkan bahwa sebenarnya GPR30 menimbulkan efek secara independen

terhadap ER $\alpha$  maupun ER  $\beta$ , aksi yang ditimbulkan tidak berkorelasi dengan ekspresi ER  $\alpha$  maupun ER  $\beta$ .

Selain E2, ternyata selective estrogen receptor modulator yang selama ini banyak digunakan, hydroxytamoxifen (OHT), merupakan suatu antagonis ER parsial, bersifat agonis terhadap GPR30, dan dapat menstimulasi timbulnya proliferasi. Hal ini berbeda dengan reseptor progesteron(PR) yang hanya berespon terhadap E2.

Telah disebutkan dalam beberapa literatur bahwa estrogen diyakini dapat menimbulkan efek proliferasi melalui GPR30. Hal ini menimbulkan suatu pemahaman baru bahwa GPR30 memang dapat berperan dalam karsinogenesis. Ekspresi berlebihan (overexpression) dari GPR30 berhubungan secara signifikan dengan ukuran tumor (> 2 cm), munculnya metastasis jauh, dan peningkatan ekspresi HER-2/neu. Hal ini turut memberikan kesimpulan bahwa adanya ekspresi berlebihan dari GPR30 dapat menjadi prediktor adanya penyakit yang agresif. Pada penderita kanker dengan ekspresi GPR30 yang berlebihan, secara keseluruhan menunjukkan survival rate lebih buruk dibandingkan dengan penderita yang memiliki ekspresi GPR30 yang rendah.

Selama ini, terapi endokrin atau hormonal masih merupakan pilihan terapi yang banyak digunakan pada penderita kanker payudara, termasuk pada kasus lanjut sepanjang masih estrogen-

dependent. Hanya sekitar dua pertiga dari semua kanker payudara yang mengekspresikan ER  $\alpha$ , dan 25% di antaranya tidak berespon terhadap terapi Tamoxifen. Bahkan bila pada awalnya menunjukkan respon yang baik, banyak pasien pada akhirnya juga mengalami lesi kanker refrakter, yang ditunjukkan dengan pertumbuhan sel yang kembali cepat dan invasif.

Tamoksifen, sebagai salah satu selective estrogen receptor modulator (SERM), bersifat antagonis ER pada jaringan payudara, bekerja dalam bentuk metabolit aktifnya, yaitu Hydroxytamoxifen. Sedangkan pada jaringan yang lain, seperti pada tulang dan endometrium, Tamoksifen berperan sebagai agonis ER.

Dari literatur dikemukakan bahwa ternyata Tamoksifen memiliki efek yang berbeda ketika berikatan dengan GPR30 dibandingkan bila berikatan dengan ER. Fakta bahwa Tamoksifen, suatu antagonis ER yang parsial, berperan sebagai agonis pada GPR30, mengemukakan suatu penemuan baru bahwa sebenarnya terapi anti-estrogen konvensional selama ini, lebih bersifat stimulasi daripada inhibisi dalam perkembangan tumor yang resisten terhadap Tamoksifen. Penyebab yang berkontribusi perubahan atau progresi dari tumor yang sensitif terhadap pemberian terapi hormonal menjadi tumor yang secara farmakologis tidak sensitif lagi terhadap pemberian

hormon, masih perlu diteliti lebih lanjut melalui eksperimen-eksperimen.

Seperti yang kita ketahui bahwa Tamoksifen merupakan obat anti-hormonal yang paling banyak digunakan dalam pengobatan kanker payudara yang masih bersifat hormone-dependent. Terdapat penelitian dimana cell line MCF-7 pada kanker payudara diberikan paparan Tamoksifen secara terus-menerus selama 6 bulan untuk menimbulkan resistensi terhadap efek inhibisi dari Tamoksifen. Terapi Tamoksifen jangka panjang (misalkan lebih dari 6 bulan) pada sel-sel MCF-7 ini mengubah efek inhibisi dari Tamoxifen secara signifikan, hanya dengan konsentrasi Tamoksifen yang lebih tinggi yang dapat mempertahankan efek inhibisi dari Tamoksiifen. Ternyata sel-sel yang kemudian mengalami resistensi terhadap Tamoksifen (TAM-R) ini, akan mengalami peningkatan sensitivitas terhadap stimulasi estrogen (E2) dan peningkatan kapabilitas GPR30 dalam memediasi aksi estrogen pada sel. Pada sel-sel TAM-R ini tidak ditemukan peningkatan ekspresi basal dari GPR30 namun terdapat sedikit peningkatan ekspresi basal EGFR. Terdapat beberapa data yang mendukung peranan penting pengiriman sinyal melalui GPR30/EGFR dalam terjadinya resistensi terhadap Tamoksifen. Inhibisi kaskade ini merupakan salah satu pilihan

untuk menimbulkan respon anti-hormonal yang valid pada kanker payudara.

Terapi Tamoksifen memang terbukti efektif untuk tumor yang mengekspresikan ER dan telah mengurangi angka mortalitas secara signifikan pada penderita kanker payudara. Namun pada kenyataannya, hampir semua tumor akan mengalami resistensi saat pengobatan berlangsung. Beberapa studi eksperimental telah menunjukkan bahwa peningkatan pengiriman sinyal melalui growth factor berperan besar dalam timbulnya resistensi terhadap Tamoksifen. Di samping itu, adanya ekspresi GPR30 dan human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) yang berlebihan (overexpressed) turut berperan dalam timbulnya fenomena resistensi ini. Dapat dikatakan bahwa GPR30 tidak hanya memiliki kontribusi dalam pertumbuhan sel tumor namun juga berperan dalam terjadinya resistensi terhadap terapi hormonal. Knocking down terhadap GPR30 dan inhibisi pengiriman sinyal melalui EGFR, mengembalikan efek inhibisi Tamoksifen terhadap sel, menguatkan pentingnya cross talk dari GPR30/EGFR dalam terjadinya resistensi Tamoksifen in vitro.

## **K. Micro-RNA (miRNA)**

### **1. Definisi micro-RNA (miRNA)**

Mekanisme epigenetik yang lain adalah micro-RNA atau disingkat miRNA, yaitu golongan asam ribonukleat (RNA) non-koding single stranded berukuran kecil (dengan panjang antara 19-25 nukleotida) yang berfungsi dalam regulasi ekspresi gen dengan menghambat peran (men-downregulasi) gen sasarannya pada tahap pasca transkripsi dari ekspresi gen. Mengenai microRNA ini pertama kali ditemukan pada tahun 1993, dan istilah miRNA digunakan pertama kali pada tahun 2001, dan sejak saat itu penelitian mengenai miRNA ini telah berhasil menemukan beberapa set miRNA yang diekspresikan oleh berbagai sel dan jaringan yang berbeda.

Pada hewan, mekanisme penghambatan (supresi) terjadi tanpa degradasi, sementara pada tumbuhan miRNA akan menempel pada mRNA, sehingga terjadi double stranded RNA, yang merupakan substrat bagi enzim-enzim peredam (silencer).

miRNA ini ditranskrip dari DNA namun tidak diproses menjadi protein atau polinukleotid, sehingga dikatakan dihasilkan oleh bagian non-koding dari DNA. Bagian DNA ini dikenal sebagai faktor transkripsi (transcription factor), karena mengganggu proses transkripsi. miRNA dapat ditemukan pada daerah di antara gen (intergenik) ataupun di dalam intron dari gen (intragenik). miRNA ini ditranskripsikan sebagai molekul tunggal atau dalam bentuk kelompok.

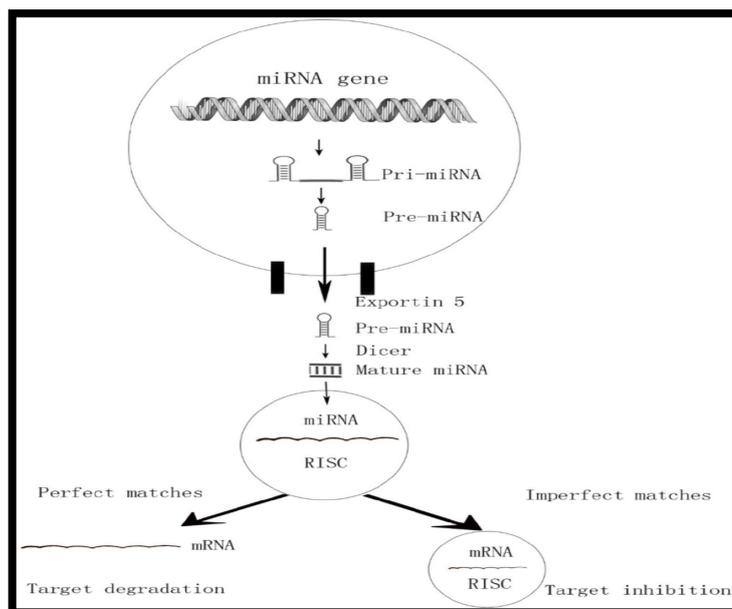
Proses yang melibatkan miRNA sekarang diketahui mencakup berbagai bidang yang luas, termasuk di dalamnya perkembangan, pengisyratan (signaling) hormon, pemeliharaan homeostatis, dan tanggapan isyarat lingkungan dan nutrisi.

microRNA (miRNA) adalah RNA dari DNA yang tidak menyandi protein berukuran sekitar 22 pasang basa. Fungsi miRNA adalah mengatur ekspresi gen-gen targetnya dengan mengikat urutan basa di regio 3'-*untranslated region* (UTR) sehingga terjadi penurunan translasi dan/atau degradasi mRNA.<sup>65</sup> Diperkirakan terdapat 2.588 miRNA yang ditranskripsi dari regio intragenik atau intergenik dalam genom manusia.<sup>66</sup> MikroRNA diduga mengatur hampir sepertiga dari seluruh genom manusia. Setiap miRNA dapat menarget sampai 200 sekuens mRNA dan setiap miRNA dapat memiliki beberapa lokasi (situs) penargetan miRNA.

## **2. Biogenesis miRNA**

miRNA diproduksi dari gennya sendiri atau dari intron. Kebanyakan miRNA adalah intergenik atau dari bagian anti-sense terhadap gen disebelahnya dan ditranskripsikan sebagai unit yang independen. Namun, pada keadaan lain, gen miRNA ditranskripsikan bersama dengan gen hostnya. Sekitar 40 % gen miRNA terdapat pada intron dengan protein dan gen koding non-protein atau bahkan pada ekson dari transkripsi koding-nonprotein.

Gen miRNA ditranskripsikan oleh RNA polymerase II (Pol II). Polymerase biasanya berikatan dengan promotor yang berada di dekat sekuensi DNA yang mengkode apa yang akan menjadi pre-miRNA. Hasil dari proses transkripsi akan diapit (capped) oleh suatu nukleotida pada bagian 5' end, polyadenylated oleh adenosin multiple (poly (A) tail), dan akan diurai (spliced).



**Gambar 2-9. Biogenesis microRNA**

Proses biogenesis mulai dari gen yang mengkode primary miRNA (pri-miRNA) ditranskripsikan didalam nucleus, dan diproses oleh suatu *enzim* *Dorsha* menjadi precursor miRNA (pre-miRNA) dan dipindahkan ke sitoplasma dan akan lebih lanjut diproses oleh *Dicer* untuk memisahkan untaian ganda (double stranded me jadi single stranded). Setelah untaian terpisah, miRNA yang matang akan menekan produksi protein dengan cara memblok translasi atau menyebabkan degradasi transkripsi pada targetnya yaitu microRNA ribo nucleo protein complex (miRNP) atau sering disebut

sebagai RNA-induced silencing complex (RISC). Bersamaan dengan itu, limfosit T disekitarnya yang terlibat dalam pembentukan / pemeliharaan granuloma akan meningkatkan regulasi miRNA subset spesifik sel T sebagai cara memodulasi jenis respons imun adaptif. MiRNA yang telah matang yang dihasilkan dalam makrofag dan sel T juga dapat dilepaskan ke lingkungan ekstraseluler dalam eksosom, mikrovesikel heterogen, atau dalam hubungan dengan lipoprotein densitas tinggi, LDL, atau kompleks protein lainnya. Selanjutnya, miRNA ekstraseluler ini berpindah dari tempat infeksi lokal ke sistem sirkulasi. Oleh karena itu, proses ini dapat menimbulkan ekspresi miRNA bersirkulasi spesifik infeksi yang dapat dengan mudah diakses dari berbagai cairan biologis (mis., serum, plasma, atau dahak).

Setelah miRNA dihasilkan di dalam nukleus, selanjutnya akan dibawa ke sitoplasma untuk berikatan dengan messenger RNA (mRNA) yang akan membawa pesan atau kode genetik dimana mRNA ini akan mentranslasikan (menghasilkan) suatu protein, namun karena berikatan dengan miRNA merupakan komplementari, maka mRNA tadi tidak dapat menghasilkan protein tersebut.

Biogenesis miRNA terjadi dengan dua jalur, yaitu *canonical* dan *non-canonical*. Pada jalur *canonical*, RNA polimerase II mentranskripsi DNA menjadi transkrip RNA primer (pri-miRNA). Di dalam nukleus, pri-miRNA dipecah menjadi transkrip prekursor berukuran sekitar 70 nukleotida (pre-miRNA) oleh kompleks Drosha (RNase III) dan DGR8. Pre-miRNA dibawa keluar dari nukleus menuju sitoplasma oleh Exportin 5 dan kemudian

diproses lebih lanjut oleh enzim RNase III lainnya (Dicer) sehingga terbentuk RNA kecil untai ganda berukuran 22 nukleotida.<sup>65</sup> Salah satu untai RNA tersebut bergabung dengan kompleks *RNA-induced silencing* (RISC) dan kemudian berikatan dengan miRNA response element (MRE) di 3'UTR mRNA target. Ikatan pada MRE berukuran sekitar 6-9 nukleotida dan disebut "*seed sequence*". Akibat ikatan miRNA dan MRE terjadi represi translasi atau degradasi RNA, tergantung luasnya pasangan basa yang terikat antara miRNA dan 3'UTR.<sup>67</sup>

Beberapa miRNA secara konsisten dapat menjadi *tumor suppressor* miRNA dengan menekan onkogen dan sebaliknya menjadi *oncomiR* dengan menekan *tumor suppressor gene*. Namun tampaknya, sejumlah miRNA dapat berperan baik sebagai *oncomiR* maupun *oncosupressor-miR*, tergantung konteks selularnya.<sup>68</sup> Sebagai contoh, miR-221/miR-222 dapat bekerja sebagai *oncomiR* di tumor-tumor epitelial<sup>69</sup> dan sebagai oncosupressor- atau *oncomiR* di keganasan-keganasan hematopoietik.<sup>70</sup>

Eksresi miRNA tertentu diketahui berhubungan erat dengan perkembangan tumor, termasuk proliferasi sel, kematian sel, apoptosis, respons imun, siklus sel, metabolisme, imortalitas, *senescence*, invasi, dan metastasis.<sup>71</sup> Hal yang patut menjadi perhatian adalah peran miRNA dalam regulasi interaksi antara sel kanker dan lingkungan mikronya sebagai proses invasi ke jaringan sekitar dan metastasis.<sup>72</sup>

### 3. Peranan *miRNA* sebagai Regulator Gen

*miRNA* merupakan regulator post-transkripsi yang dapat ditemukan di jaringan dan sirkulasi darah. *MiRNA* berperan sebagai regulator ekspresi gen melalui targetnya pada *mRNA* dengan menekan translasi atau degradasi *mRNA*. Agar dapat berfungsi, *miRNA* harus diko-ekspresikan dengan targetnya yaitu *mRNA*. Satu *miRNA* dapat meregulasi beberapa *mRNA*, dan satu *mRNA* dapat menjadi target beberapa *miRNA* yang berbeda-beda. *MiRNA* memiliki banyak target *mRNA* sehingga mempengaruhi ratusan ekspresi protein. *MiRNA* terlibat di berbagai proses selular yaitu perkembangan, proliferasi sel, diferensiasi sel, apoptosis, dan respon terhadap stress (Calin GA, Croce CM, 2006).

### 4. Peran *miRNA* pada Kanker Payudara

Penelitian ekspresi *miRNA* pada kanker payudara menunjukkan peran yang sangat penting karena *miRNA* tidak hanya sebagai alat diagnostik tetapi juga faktor prediktif hasil terapi dan prognostik.<sup>73</sup> Peran *miRNA* pada kanker payudara dipublikasi pertama kali tahun 2005 ketika ditemukan miR-12b dan miR-145 yang mengalami penurunan regulasi (*down-regulation*) dan miR-21 yang mengalami peningkatan (*upregulation*) pada jaringan kanker payudara dibandingkan jaringan payudara normal.<sup>74</sup> Beberapa *miRNA* yang terlibat dalam kanker payudara antara lain adalah mir-10b, miR-21, miR-155, miR-520c, miR-373 (sebagai *oncomiR*) dan miR-31, miR-125b, miR-126, miR-200, miR-206, dan miR-355 (sebagai *tumor*

*suppressor- miR*)<sup>75</sup>.

Saat ini telah banyak studi yang meneliti potensi miRNA sebagai petanda diagnostik pada kanker payudara. Ekspresi miRNA tertentu pada jaringan kanker payudara menunjukkan kadar yang berbeda jika dibandingkan dengan jaringan payudara normal. Pemeriksaan miRNA dari sampel jaringan banyak dipakai karena miRNA memiliki stabilitas yang tinggi dalam jaringan bahkan sampai bertahun-tahun dalam blok parafin. Selain itu, miRNA dapat diekstraksi dengan mudah dan dapat dikuantifikasi.<sup>76</sup> Namun kini banyak studi mencoba melakukan pemeriksaan miRNA dalam darah, serum atau plasma sebagai petanda biologis kanker payudara. Sebagai contoh, tingkat ekspresi miR-195, let-7a<sup>77</sup> dan miR-205<sup>78</sup> yang rendah serta miR-222<sup>79</sup> yang tinggi ditemukan dalam *whole blood*, plasma, atau serum penderita kanker payudara.

## **5. Peran *miRNA* pada Resistensi Terapi Endokrin**

Pada kanker payudara, miRNA sering dikaitkan dengan resistensi terhadap terapi, baik berupa kemoterapi sitotoksik, radiasi, terapi endokrin maupun terapi target. Masing-masing miRNA dapat meningkatkan sensitivitas ataupun resistensi terhadap pengobatan tergantung pada mRNA yang menjadi targetnya. Pada terapi endokrin, ekspresi dan pensinyalan penting untuk adanya respons terapi yang baik. Tumor tanpa ekspresi ER $\alpha$  biasanya tidak responsif terhadap terapi tamoksifen atau terapi anti-estrogen.<sup>80</sup> Jadi, hilangnya ekspresi ER $\alpha$  atau modifikasi ER $\alpha$

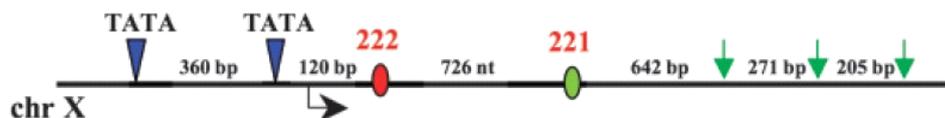
dapat menyebabkan resistensi terhadap terapi tamoksifen.<sup>48</sup>

Beberapa studi menunjukkan bahwa miRNA dapat menjadi faktor prediktif bagi status ER.<sup>81</sup> miRNA juga mengatur ekspresi protein ER $\alpha$  untuk memerantari resistensi terapi endokrin.<sup>82,83</sup> Sebagai contoh, miR-221/miR-222,<sup>84</sup> miR-343-3p<sup>85</sup>, miR-873<sup>86</sup> dan let-7b/let-7i<sup>87</sup> menurunkan regulasi protein ER $\alpha$ . Turunnya ER $\alpha$  mengakibatkan berkurangnya target untuk terapi endokrin sehingga terjadi resistensi terapi endokrin. Di pihak lain, ikatan E2-ER $\alpha$  menghambat ekspresi miR-221 dan miR-222 pada sel-sel kanker payudara.<sup>11</sup> Penurunan let-7 memerantai peningkatan ekspresi protein ER $\alpha$  <sup>36</sup>. Reseptor ini merupakan variasi *splicing* ER $\alpha$  yang berhubungan dengan prognosis buruk dan berperan dalam resistensi terapi endokrin.<sup>88,89</sup> Keluarga let-7 juga mengalami penurunan regulasi pada sel-sel tumor payudara dan sel-sel MCF-7 yang resisten TAM.<sup>90</sup> Studi lain menggunakan analisis *microarray* untuk mengidentifikasi miRNA yang membantu terjadinya resistensi terhadap Tamoksifen. Peneliti lain mendapatkan adanya peningkatan ekspresi miR-221, miR-222, dan miR-181 disatu pihak serta penurunan ekspresi miR-21, miR-342, miR-489 pada kultur sel-sel kanker payudara MCF-7 yang resisten TAM dibandingkan yang sensitif TAM.<sup>9</sup>

## **6. Klaster Gen miR-221/miR-222 pada Kanker Payudara dan Resistensi Terapi Endokrin**

MiR-221 dan miR-222 disandi sebagai suatu tandem dari sebuah klaster gen yang berada pada kromosom X (Xp11.3).<sup>84</sup> Gen ini memiliki *seed*

*sequence* yang sama dan terpisah 726 basa nukleotida. Dalam kondisi normal, miR-221 dan miR-222 diketahui mengatur berbagai proses vaskular fisiologis yang penting, seperti angiogenesis, hiperplasia neointimal, penyembuhan luka pembuluh darah, penuaan vaskular dan remodeling pembuluh darah aterosklerotik.<sup>91</sup> Kedua miR yang sangat mirip tersebut sering bekerja sebagai sebuah klaster gen (Gambar 2-7) dan telah banyak diteliti dalam berbagai penyakit keganasan pada manusia.



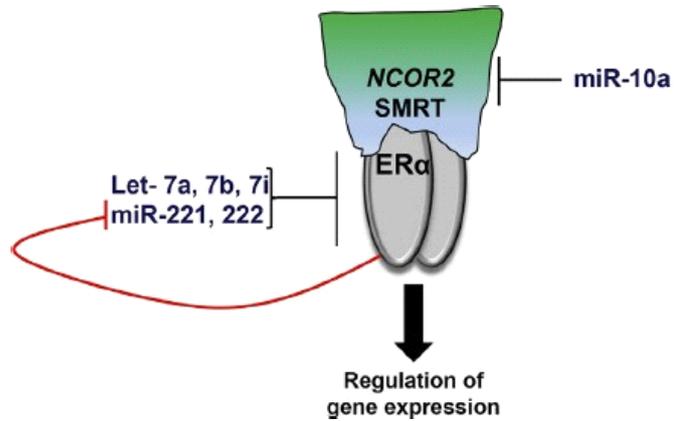
**Gambar 2-10. Klaster gen pre-miR-221 dan pre-miR-222 di kromosom X.<sup>84</sup>**

*Keterangan: skema posisi miR-221 dan miR-222 yang terpisah 726 nukleotida (nt) dengan dua kotak TATA (biru) yang berada di hulu pre-miR-222 (merah) dan tiga sinyal poliA (anak panah hijau) yang berada di hilir pre-miR-221 (hijau).*

Selain ER $\alpha$ , beberapa protein penting dan jalur pensinyalan yang diatur oleh miR-221/miR-222 antara lain adalah famili Cip/Kip (p27Kip1),<sup>92</sup> *tissue inhibitor metalloproteinase 3* (TIMP3), FOXO3A, PUMA dan PTEN. MiR-221/ miR-222 dilaporkan dapat mengatur mekanisme pascatranslasi yang mengubah ekspresi  $\alpha$ 4-integrin dan target-target lainnya pada kanker payudara luminal sehingga berperangai lebih agresif.<sup>93</sup>

Ekspresi ER $\alpha$  juga diatur oleh beberapa mikroRNA selain miR-221 dan miR-222. Tumor-tumor payudara umumnya memiliki ekspresi keluarga let-7 yang tinggi.<sup>87</sup> Peningkatan miR-10a juga dilaporkan pada kanker payudara dan menargetkan korepresor SMRT (NCOR2) pada kompleks transkripsi ER $\alpha$ .<sup>94</sup> Pengaruh berbagai miRNA tersebut berdampak pada

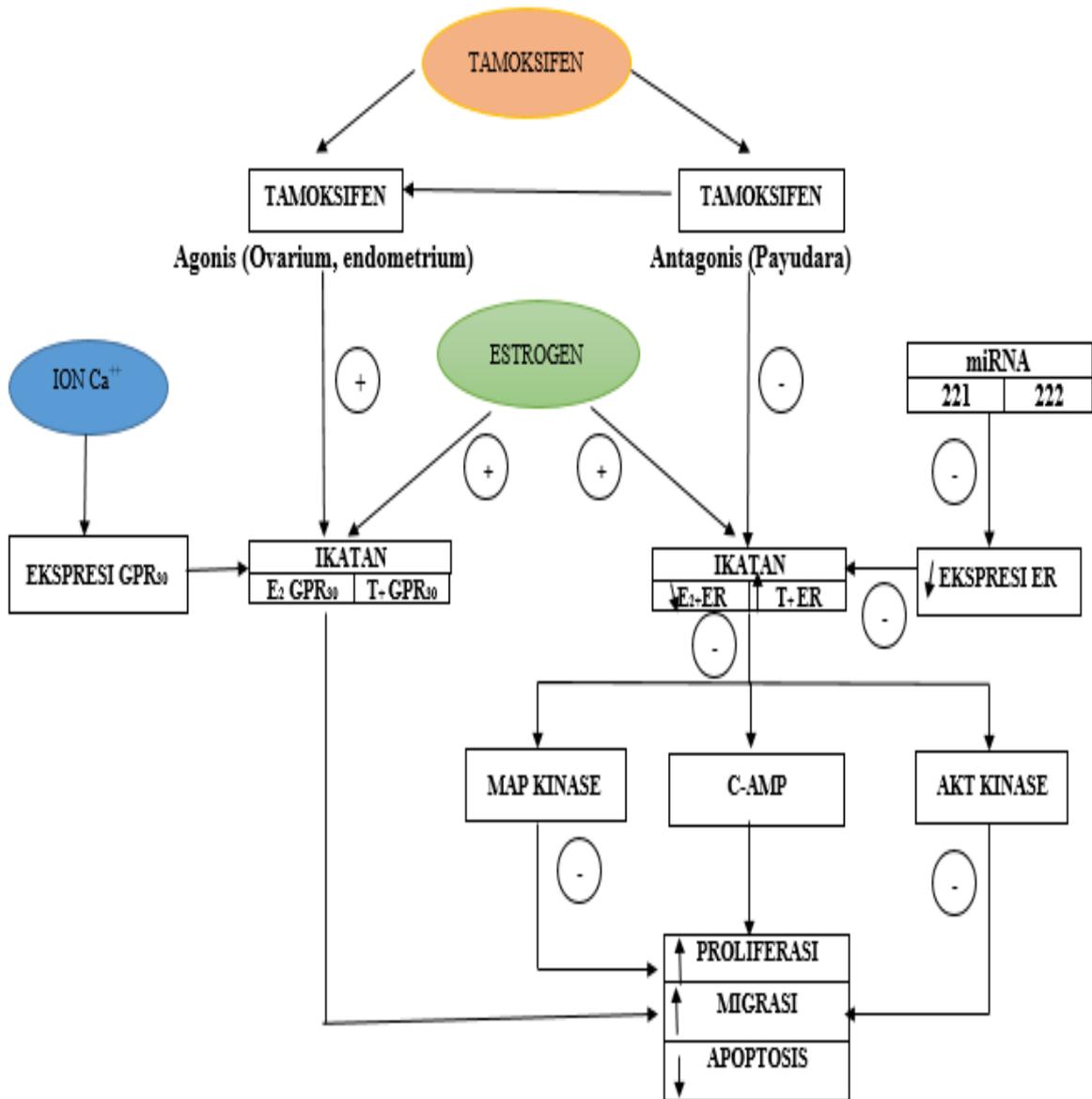
regulasi ekspresi ER $\alpha$  yang kemudian berperan pada regulasi ekspresi gen-gen pada jalur pensinyalan ER $\alpha$  (Gambar 2-8).



**Gambar 2-11. Beberapa MiRNA yang mengatur pensinyalan ER $\alpha$  pada tumor payudara.<sup>82</sup>**

Keterangan: NCOR2 SMRT: *nuclear receptor corepressor 2 silencing mediator of retinoid or thyroid hormone receptor*

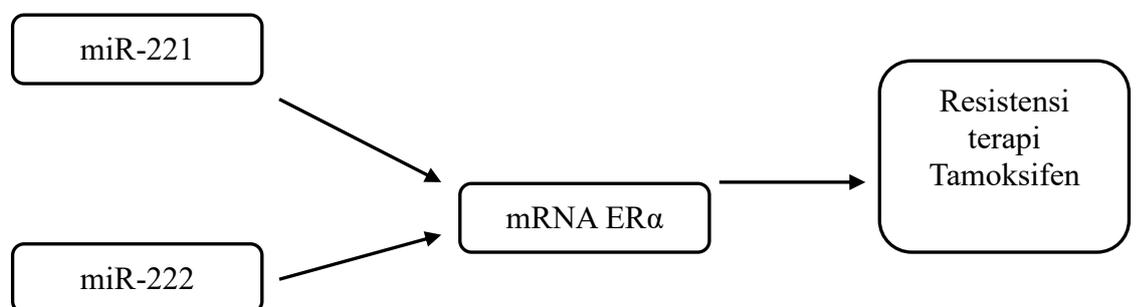
## 7. Kerangka Teori Penelitian



Gambar 2-12. Bagan.kerangka.teori.penelitian

Resistensi terhadap tamoksifen dapat terjadi dalam beberapa mekanisme, antara lain karena tidak adanya reseptor estrogen untuk mengikat tamoksifen dan pertumbuhan sel kanker yang tidak dapat dikendalikan sehingga meningkatkan kesintasan atau ketahanan hidup sel-sel kanker. Peningkatan ekspresi miR-221 dan miR-222 diketahui meningkat pada penderita kanker payudara yang resisten terhadap terapi tamoksifen. Salah satu mekanisme yang diduga memerantari efek tersebut adalah peran miR-221 dan miR-222 yang mendegradasi mRNA ER $\alpha$  sehingga tidak terjadi translasi protein ER $\alpha$ . Perubahan genetik (mutasi) pada gen *ESR1* dan perubahan epigenetik juga berdampak pada penurunan sintesis ER $\alpha$ . Kemungkinan lain mekanisme resistensi adalah variasi pascatranslasional pada ER $\alpha$  dan komunikasi silang (*cross-talk*) dengan reseptor faktor pertumbuhan (GFR) sehingga terjadi peningkatan proliferasi dan kesintasan sel-sel kanker.

## 8. Kerangka Konsep



**Gambar 2-13. Bagan kerangka konsep penelitian**

miR-221 dan miR-222 secara langsung dapat mendegradasi mRNA ER $\alpha$  sehingga tidak terbentuk protein ER $\alpha$  yang dapat berikatan dengan tamoksifen. Secara klinis, hal ini tampak sebagai kegagalan terapi atau resistensi terapi yang bermanifestasi sebagai kekambuhan, baik lokal maupun metastatik jauh.