

## Ekspresi EBER pada Berbagai Tipe Histopatologi Karsinoma Nasofaring

Kenty Wantri Anita<sup>1</sup>, Bambang Endro Putranto<sup>1</sup>,  
 Awal Prasetyo<sup>1</sup>, Dewi Kartikawati Paramita<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang

<sup>2</sup>Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Etiologi kanker nasofaring (KNF) sudah terbukti merupakan interaksi dari infeksi *Epstein-Barr Virus* (EBV), paparan lingkungan dan kerentanan genetik. Infeksi EBV mendominasi etiopatogenesis KNF terutama untuk tipe WHO-3. Di Indonesia, saat ini belum ada publikasi tentang ekspresi *Epstein-Barr-virus-encoded small nuclear RNA* (EBER) yang dikaitkan dengan klasifikasi histopatologi KNF. Tujuan penelitian ini menganalisis ekspresi EBER pada berbagai tipe histopatologi KNF untuk menambah informasi dalam diagnosis etiologi KNF, sehingga bermanfaat dalam strategi terapi.

#### Metode

Penelitian dengan desain *cross sectional* ini menggunakan sampel biopsi nasofaring yang didiagnosis sebagai KNF antara tahun 2009 sampai 2012 di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP. Dr. Kariadi dan RS. St. Elisabeth Semarang. Sediaan dievaluasi ulang dan dilakukan *in situ hybridization* dengan probe *fluorescein-conjugated peptide nucleic acid* (PNA) pada jaringan blok parafin.

#### Hasil

Sebanyak 29 dari 31 kasus (93,5%) KNF tipe WHO-3 mengekspresikan EBER positif dan terdapat perbedaan bermakna ( $p=0,024$ ) dengan KNF tipe WHO-1 dan 2. Uji korelasi antara ekspresi EBER dengan tipe histopatologi KNF positif kuat (koefisien korelasi  $\Lambda = 0,667$ ,  $p=0,034$ ).

#### Kesimpulan

Ekspresi EBER terdapat lebih banyak pada KNF WHO tipe 3 yang berarti EBV lebih sering ditemukan pada KNF WHO tipe 3.

**Kata kunci:** EBER, hibridisasi *in situ*, karsinoma nasofaring, virus Epstein-Barr.

### ABSTRACT

#### Background

The factors contributing nasopharyngeal carcinoma (NPC) has been proven to be the interaction of viral, environmental and genetic factors. Etiopathogenesis of NPC is dominated by Epstein-Barr virus (EBV) infection, especially for WHO type 3. In Indonesia, there has been no publication about the expression of Epstein-Barr-virus-encoded small nuclear RNA (EBER) associated with histopathological classification. The aim of this study is to analyze the expression of EBER in various histopathological types of NPC and provide information onetiological diagnosis of NPC that can be useful for therapeutic strategies.

#### Methods

This study was an descriptive designed as cross sectional study. Nasopharyngeal biopsies that were diagnosed as nasopharyngeal carcinoma, between the year 2009 and 2012, in Dr. Kariadi Hospital and St. Elisabeth Hospital Semarang were reevaluated. *In situ hybridization* with fluorescein-conjugated peptide nucleic acid (PNA) probe was performed on paraffin embedded tissue sections.

#### Results

This study found that 29 of 31 (93.5%) WHO-3 type NPC cases were EBER positif that significantly differed from WHO-1 and WHO-2 type NPC ( $p=0.024$ ). There were strong positive correlation between histopathological types of NPC and expression of EBER ( $\Lambda$  coefficient correlation= $0.667$ ,  $p=0.034$ ).

#### Conclusion

EBER expressions found more in NPC WHO type 3 which mean EBV is often found in NPC WHO type 3.

**Key words:** EBER, Epstein-Barr- virus, *in situ* hybridization, nasopharyngeal carcinoma.

**PENDAHULUAN**

Karsinoma nasofaring (KNF) adalah keganasan epitel nasofaring yang sering ditemukan di populasi Asia Selatan, Asia Tenggara, termasuk Indonesia, Asia Timur, dan Afrika Utara.<sup>1</sup> Insiden KNF di Hongkong dan Cina paling tinggi, dimana KNF adalah satu dari lima kanker tersering.<sup>2</sup> Angka kejadian KNF di Indonesia belum ada laporan menyeluruh. Studi Puspita, *et al.*, 2012, mencatat bahwa insiden KNF di Semarang sebesar 24 pria dan 12 wanita per 100.000 penduduk.<sup>3</sup> Di RSUP. Dr.Kariadi Semarang pada tahun 2002-2009, KNF adalah kanker terbanyak kedua di kepala dan leher berdasarkan diagnosis histopatologi, dengan tipe histopatologi tersering (52,5%) yaitu karsinoma skuamosa nasofaring *undifferentiated*.<sup>4</sup>

Karsinoma nasofaring diklasifikasikan oleh *World Health Organization* (WHO) dalam 3 tipe histologi: *keratinizing squamous cell carcinoma* (WHO tipe 1), *nonkeratinizing squamous cell carcinoma differentiated* (WHO tipe 2) atau *undifferentiated* (WHO tipe 3), dan *basaloid squamous cell carcinoma*.<sup>5</sup>

Karsinoma nasofaring terbukti merupakan interaksi dari faktor infeksi *Epstein-Barr virus* (EBV), lingkungan dan genetik dan dari bukti yang ada didapatkan suatu pola sebaran geografik, demografik dan usia yang khas. EBV muncul sebagai faktor yang paling kuat di seluruh dunia<sup>6,7</sup>, sedangkan faktor kerentanan genetik dan lingkungan hanya berperan sebesar 2,7% dalam perkembangan KNF pada populasi beresiko tinggi.<sup>8</sup>

Saat ini manajemen terapi penderita KNF lebih ke arah terapi individual,<sup>9</sup> oleh karena itu diperlukan penegakan diagnosis yang didasarkan etiologi disamping histopatologi yang merupakan baku emas. Identifikasi etiologi lebih spesifik mengarahkan manajemen terapi dan prediksi prognosis.

Identifikasi etiologi salah satunya dapat dilakukan dengan mendeteksi ekspresi gen EBV laten seperti *latent membrane protein-1* (LMP1) pada mukosa nasofaring, namun ekspresi LMP1 hanya positif pada 30-40% dan kadang setempat-setempat dan lemah.<sup>6</sup> *Epstein-Barr-virus-encoded small nuclear RNA* (EBER) terekspresi sangat banyak di sel yang terinfeksi EBV laten, sehingga praktis semua inti sel tumor dapat dilabel.<sup>10</sup> Pemeriksaan terhadap LMP1 dan EBER menjadikan diagnosis etiologi KNF akibat EBV menjadi lebih akurat.<sup>11</sup> Jumlah

salinan genomik DNA virus dan transkripsi mRNA rendah pada infeksi laten. *In situ hybridization* (ISH) pada EBER (EBER-ISH) terbukti dapat digunakan sebagai faktor prognosis KNF. Meskipun EBV secara umum berhubungan dengan WHO tipe 3, tetapi WHO tipe 1 dan 2 dengan EBER positif mempunyai angka harapan hidup lebih baik dibandingkan WHO tipe 1 dan 2 dengan EBER negatif.<sup>10</sup>

EBER adalah RNA berberat molekul rendah yang ditranskripsikan oleh RNA polimerase III dan eksis sebagai kompleks ribonukleoprotein dengan protein antigen lupus (La) dan *EBER associated protein* (EAP) sel pejamu. EBER merupakan sasaran yang ideal untuk ISH karena ditranskripsikan sangat banyak yaitu lebih dari 10<sup>7</sup> salinan/sel pada sel yang terinfeksi EBV laten dan menjadi metode yang paling sensitif dan spesifik untuk identifikasi EBV.<sup>10,12,13</sup>

Pemeriksaan serologi, *southern blotting*, *polymerase chain reaction* (PCR), imunohistokimia, dan DNA-ISH digunakan untuk melihat keterkaitan antara EBV dan KNF, tetapi angka positif untuk EBV bervariasi untuk tiap metode.<sup>13</sup> Sensitivitas EBER-ISH lebih tinggi dibandingkan PCR. Studi terkini menyatakan bahwa 100% *undifferentiated squamous cell carcinoma* (WHO-3) adalah positif terhadap pengecatan EBER ISH.

Sejauh ini di Indonesia belum ada publikasi tentang ekspresi *Epstein-Barr-virus-encoded small nuclear RNA* (EBER) yang dikaitkan dengan klasifikasi histopatologi KNF. Penelitian ini bertujuan mengetahui ekspresi EBER pada berbagai tipe histopatologi KNF. Penelitian ini dilakukan pada hasil biopsi nasofaring yang diagnosis KNF dari pasien yang berobat ke rumah sakit di Semarang dan sekitarnya.

**METODE PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan penelitian desain *cross sectional*. Sampel penelitian diambil dari arsip blok parafin dan preparat histopatologi dengan diagnosa KNF. Sampel didapatkan secara *consecutive* sampling, yaitu berdasarkan adanya blok parafin hasil biopsi nasofaring dengan diagnosis KNF selama kurun waktu tertentu sampai jumlah sampel minimal terpenuhi.

Dilakukan pembacaan ulang untuk menentukan tipe histopatologi pada preparat histopatologi. Blok parafin dari biopsi nasofaring

dengan diagnosis KNF selama tahun 2009 sampai 2012 di pusat Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP. Dr. Kariadi, dan RS. St. Elisabeth Semarang yang telah difiksasi dengan buffer formalin 10% dan dipotong dengan ketebalan 3 µm dilakukan CISH untuk EBER. Setelah dilakukan deparafinisasi dan rehidrasi, jaringan diberi proteinase K dan dilakukan hibridisasi dengan probe *fluorescein-conjugated peptide nucleic acid* (PNA) (Dako kode Y5200), dilakukan pencucian dan deteksi menggunakan *alkaline phosphatase* (AP)-*conjugated streptavidin* untuk *biotinylated probe* (PNA ISH Detection Kit, Dako kode No. K5201). Setelah diberi *counterstain* menggunakan Hematoksilin, ditutup menggunakan *glycergel (aqua base)*. Setiap langkah dilakukan dengan waktu dan temperatur yang tepat. Penilaian hasil pewarnaan secara mikroskopis dilakukan menggunakan metode semi kuantitatif *Allred Score*. Setiap sampel dinilai proporsi sel yang positif dengan skala 0-5 dan intensitas pewarnaannya dengan skala 0-3. Proporsi dan intensitas warna dijumlah dengan total skor 0 atau 2-8. Skor 0-2 dianggap negatif; skor 3-8 dianggap positif apabila minimal didapatkan persentase sel yang terpulsa positif 1% dengan intensitas sedang atau persentase sel yang terpulsa positif 2-10% dengan intensitas lemah dan maksimal didapatkan persentase sel yang terpulsa positif 67-100% dengan intensitas kuat.<sup>14</sup>

Analisis statistik menggunakan SPSS for Windows versi 16.00. Untuk mengetahui adanya hubungan antara tipe histopatologi KNF dengan ekspresi EBER menggunakan analisis korelasi Lambda dan dibandingkan menggunakan uji komparasi non parametrik Kolmogorov-Smirnov Z dengan nilai kemaknaan  $p < 0,05$ .

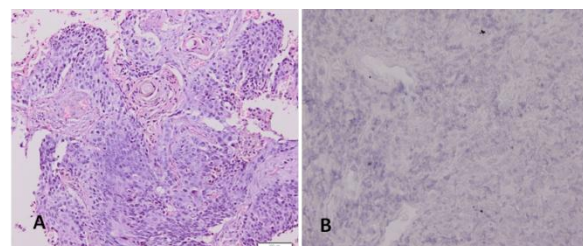
**HASIL**

Sebanyak 35 sampel kasus KNF memenuhi kriteria inklusi, berasal dari 26 kasus penderita KNF laki-laki dan 9 perempuan. Frekuensi tertinggi pada kelompok usia 40-49 tahun (40%), dengan usia termuda 23 tahun dan tertua 72 tahun. Berdasarkan klasifikasi WHO didapatkan KNF dengan tipe WHO-1 sebanyak 3 kasus (8,6%), WHO-2 sebesar 1 kasus (2,9%) dan WHO-3 sebanyak 31 kasus (88,6%).

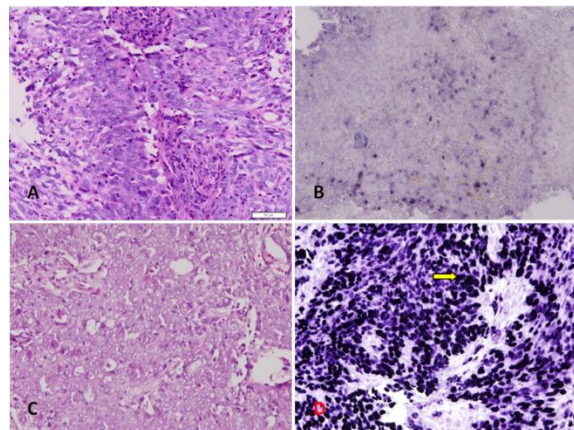
Gambaran histopatologi KNF WHO-1 menunjukkan diferensiasi skuamosa yang nyata. Sel berbentuk poligonal, berstratifikasi, sito-

plasma eosinofilik, inti hiperkromatik, pleomorfik ringan sampai berat. Terdapat keratinisasi individual dan mutiara tanduk pada sebagian besar tumor (Gambar 1a). Ekspresi EBER negatif pada KNF WHO-1 tidak menunjukkan adanya warna biru gelap di area inti seluruh sel ganas (skor 0 metode Allred- Gambar 1b). Gambaran histopatologi KNF WHO-2 menunjukkan diferensiasi skuamosa. Sel berbentuk poligonal, berstratifikasi, batas sel cukup tegas, jembatan interselular tampak samar. Sitoplasma eosinofilik, inti hiperkromatik, anak inti tidak begitu menonjol, pleomorfik ringan sampai berat (Gambar 2a). Ekspresi EBER negatif pada KNF WHO-2 menunjukkan adanya warna biru gelap dengan intensitas lemah pada <1% area inti sel ganas (skor 2 metode Allred- Gambar 2b). Gambaran histopatologi KNF WHO-3 menunjukkan sel-sel besar tumbuh sinsisial, batas antar sel tidak jelas, inti bulat sampai oval, vesikuler dan nukleoli besar di sentral. Sel sering bergerombol atau tumpang-tindih, kadang inti lebih hiperkromatik, sitoplasma sedikit dan bersifat amfofilik atau eosinofilik (Gambar 2c). Ekspresi EBER positif pada KNF WHO-3 menunjukkan adanya warna biru gelap dengan intensitas sedang sampai kuat pada >1% area inti sel ganas (skor 3-8 metode Allred- gambar 2d).

Ekspresi EBER positif pada 29 dari 31 kasus KNF WHO-3, sedangkan EBER negatif terdapat pada 3 dari 3 kasus KNF WHO-1 dan 1 dari 1 kasus KNF WHO-2. Hasil uji statistik dengan Kolmogorov-Smirnov Z menunjukkan perbedaan bermakna dengan nilai  $P=0,024$ . Uji korelasi dengan koefisien korelasi *Lambda* didapatkan korelasi positif kuat antara ekspresi EBER dengan tipe histopatologi KNF ( $r=0,667$ ,  $p=0,034$ ).



Gambar 1. *Keratinizing squamous carcinoma* (WHO-1) A. HE,100x B. Pulasan inti untuk EBER menggunakan CISH dengan hasil negatif (400x).



Gambar 2. *Non keratinizing squamous carcinoma*. A. *Differentiated* (WHO-2) HE (200x), B. Pulasan inti untuk EBER menggunakan CISH (400x), C. *Undifferentiated* (WHO-3) HE (400x), D. Pulasan inti untuk EBER menggunakan CISH (400x). Inti sel positif mengekspresikan EBER (panah kuning).

**DISKUSI**

Pada hampir semua populasi insiden KNF pada laki-laki 2-3 kali lebih tinggi dibanding wanita pada semua tingkatan usia, demikian juga pada populasi Semarang didapatkan rasio laki-laki: wanita 2:1. Pada populasi resiko tinggi angka puncak pada rentang usia 50-59 tahun dan menurun setelahnya, namun usia <20 tahun termasuk jarang. Di Semarang distribusi rentang usia tersering 40-49 tahun (30%) dan 50-59 tahun (25,9%).<sup>2,15</sup> Penelitian ini memberikan hasil yang tidak jauh berbeda yaitu insiden KNF pada laki-laki>wanita dengan rasio 3:1 dengan distribusi tersering pada rentang usia 40-49 tahun dan tidak ditemukan kasus pada usia dibawah 20 tahun.

Hasil reevaluasi KNF berdasarkan tipe histopatologi didapatkan *Non keratinizing carcinoma* 91,5% terdiri atas WHO-2 1 kasus (2,9%) dan WHO-3 31 kasus (88,6%). *Keratinizing squamous carcinoma* 3 kasus (8,6%). Sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya pada berbagai populasi resiko tinggi KNF yang menunjukkan sebagian besar berupa WHO-3.<sup>3,5,13</sup>

Hibridisasi *in situ* untuk EBER adalah metode yang paling sensitif dan spesifik untuk identifikasi EBV pada sel-sel yang terinfeksi EBV. Metode ini didasarkan pada amplifikasi biologik alami dari sekuens target, yang menghasilkan sejumlah besar transkrip EBER.<sup>12,13</sup>

Pada infeksi laten EBV EBER berjumlah sangat banyak ( $10^7$  salinan/sel).<sup>13</sup> Hasil penelitian ini menunjukkan metode ISH mampu mendeteksi adanya infeksi laten EBV pada sebagian besar kasus (29/35). Di Taiwan dari 107 kasus KNF, EBV dapat dideteksi pada 97 kasus menggunakan metode PCR sedangkan menggunakan metode ISH EBER, EBV dapat dideteksi pada 105 kasus. Hal ini membuktikan sensitivitas yang lebih tinggi dari ISH EBER dibandingkan PCR.<sup>16</sup> Oleh karena tingginya sensitivitas dan spesifisitas EBER ISH, maka metode ini disarankan dapat dipakai untuk evaluasi histologik rutin, bagi sampel jaringan pasien yang memiliki risiko tinggi KNF.

Hasil penelitian ini memberikan konfirmasi hubungan antara EBV dengan berbagai tipe histopatologi KNF pada penderita KNF populasi Semarang ( $p < 0,05$ ) dengan koefisien korelasi  $\Lambda$  0,667,  $p = 0,034$  atau terdapat korelasi positif kuat antara ekspresi EBER dengan tipe histopatologi KNF.

Pada beberapa penelitian dari berbagai wilayah di dunia menunjukkan ekspresi EBER pada pasien KNF.<sup>11-13,16,17</sup> Penelitian pada kasus KNF terutama etnis Cina di Malaysia memperlihatkan ekspresi EBER pada sebagian besar kasus KNF pada ketiga tipe WHO KNF dan juga menunjukkan ekspresi EBER pada *non keratinizing squamous cell carcinoma differentiated* (WHO tipe 2) atau *undifferentiated* (WHO tipe 3) lebih tinggi daripada *keratinizing squamous cell carcinoma* (WHO-1).

Penelitian di Jepang didapatkan ekspresi EBER pada seluruh tipe histopatologi pada seluruh kasus KNF dan di Turki pada 100% kasus KNF WHO-3, masing 50% pada KNF WHO-2 dan KNF WHO-1 menunjukkan adanya hubungan yang kuat dengan infeksi laten EBV. Hal ini menunjukkan peran yang penting dari EBV dalam onkogenesis semua tipe KNF.<sup>13,17</sup> Berbeda dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan ekspresi negatif pada KNF WHO-1 dan KNF WHO-2.

Blok parafin untuk kasus KNF WHO tipe 1 dan 2 sedikit didapatkan dalam penelitian ini yang berakibat distribusi data tidak normal dan kemungkinan dapat memberikan perbedaan hasil positivitas EBER pada ketiga tipe KNF dibandingkan penelitian yang lain.

**KESIMPULAN**

Ekspresi EBER terdapat lebih banyak pada KNF WHO tipe 3 yang berarti EBV lebih sering ditemukan pada KNF WHO tipe 3.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Haugen M. Frailty modeling of bimodal age-incidence curves of nasopharyngeal carcinoma in low-risk populations. *Biostat.* 2009; 10: 501-14.
2. Ellen TC, Hans OA. The Enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2006; 15: 1765-77.
3. Puspita M, Prasetyo A, Putranto BE. Age standardized rate (ASR) and age standardized cancer ratio (ASCR) of nasopharyngeal cancer in Kariadi central hospital during 2002-2011 (the perspective of nasopharyngeal cancer incidence in Semarang city). *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Federation of Head and Neck Oncology*; Oct 20-22, 2012; Jakarta, Indonesia; 2012.
4. Prasetyo A, Wiliyanto O. Head and neck cancer incidence based on anatomic pathology diagnosis at Kariadi hospital Semarang Indonesia. Presented on: The 12<sup>th</sup> Asia-Oceania Otolaryngology Congress. The Aotea Centre Auckland, New Zealand. March 1st - 4th. 2011.
5. Chan JKC, Pilch BZ, Kuo TT, Wenig BM, Lee AWM. Tumours of the nasopharynx-introduction. In: Leon Barnes eds. 2005. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology & Genetics Head and Neck Tumours.* Lyon: IARC Press; 2005.
6. Chan JKC, Pilch BZ, Kuo TT, Wenig BM, Lee AWM, Bray F, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma. In: Leon Barnes eds. 2005. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology & Genetics Head and Neck Tumours.* Lyon: IARC Press; 2005.
7. Tao Q and Chan ATC. Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Rev Mol Med.* 2007; 9: 1-24.
8. Xiuchan-Guo, Randall CJ, Hong D, Jian L, Li G, George WN, *et al.* Evaluation of nonviral risk factors for nasopharyngeal carcinoma in a high-risk population of Southern China. *Int J Cancer.* 2009; 124: 2942-7.
9. Hayden EC. Personalized cancer therapy gets closer. *Nature.* 2009; 458: 131-32.
10. Nakao K, Mochiki M, Nibu K, Sugasawa M, Uozaki H. Analysis of prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma: impact of *in situ* hybridization for Epstein-Barr virus encoded small RNA 1. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 134: 639-45.
11. Bernadette Brennan. Review: nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet J Rare Dis.* 2006; 1: 23.
12. Sela GB, Kuten A, Minkov I, Ari EG and Izhak OB. Prevalence and relevance of EBV latency in nasopharyngeal carcinoma in Israel. *J Clin Pathol.* 2004; 57: 290-3.
13. Ertan Y, Hekimgil M, Karaarslan S, Soydan S. Expression of Epstein-Barr-virus-encoded small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinomas of Aegean Turkish patients. *Virch Arch.* 2008; 452:411-4.
14. Qureshi A and Perez S. Allred scoring for ER reporting and it's impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers. *J Pak Med Assoc.* 2010; 60: 350-3.
15. Prasetyo A, Sadhana U, Miranti IP. Age standardized rate (ASR) and age standardized cancer ratio (ASCR) of nasopharyngeal cancer at Semarang Indonesia (tidak dipublikasi).
16. Breda E, Catarino RJ, Azevedo I, Lobão M, Monteiro E, Medeiros R. Epstein-Barr virus detection in nasopharyngeal carcinoma: implications in a low-risk area. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010; 76: 310-5.
17. Kimura Y, Suzuki D, Tokunaga T, Takabayashi T, Wakisaka N. Epidemiological analysis of nasopharyngeal carcinoma in the central region of Japan during the period from 1996 to 2005. *Auris Nasus Larynx* 2011; 38: 244-9.