CRISTINA ANTON

Predição de malignidade de tumores ovarianos utilizando marcadores tumorais, índice de risco e ROMA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa: Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho

SÃO PAULO

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Anton, Cristina
Análise e comparação de quatro métodos de classificação de massas ovarianas, utilizando marcadores tumorais, índice de risco e o algoritmo ROMA / Cristina Anton. -- São Paulo, 2011.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Jesus Paula Carvalho.

Descritores: 1.Marcadores biológicos de tumor 2.Neoplasias ovarianas 3.Antígeno Ca-125 4.Proteínas secretadas pelo epidídimo 5.Medição de risco 6.Sensibilidade e especificidade 7.Curva ROC

USP/FM/DBD-272/11

DEDICATÓRIA

Aos meus amores: Francisco e Sofia.

AGRADECIMENTOS

Ao Francisco, meu marido, amigo e sempre companheiro, que me deu grande apoio para realização do trabalho, ensinou-me muito e fez sempre críticas pertinentes.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho, meu orientador e exemplo de vida, que sempre me incentivou, apoiou e ajudou.

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, agradeço a oportunidade de realizar esta dissertação, os comentários e as sugestões.

À Prof. Dra. Filomena Marino Carvalho, agradeço a colaboração em todas as fases deste trabalho.

A todos meus amigos do Setor de Ginecologia Oncológica da Disciplina de Ginecologia da FMUSP e aos anestesistas do HCFMUSP e do ICESP que foram muito importantes no auxílio da coleta das amostras.

À Elci e à Mônica do Laboratório de Marcadores Tumorais que me introduziram na análise laboratorial e foram fundamentais para realização deste trabalho.

À Betina, minha irmã, que me auxiliou muito na resolução de dúvidas em português e inglês.

Ao Dr. Gustavo Maciel, agradeço as suas considerações e seu apoio.

Aos funcionários do LIM 58 da Disciplina de Ginecologia da FMUSP, agradeço o auxílio no armazenamento das amostras.

À empresa Alka e suas funcionárias, agradeço o fornecimento dos kits de HE4 e a colaboração na realização dos testes.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS
RESUMO
SUMMARY

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Objetivos 3

2 REVISÃO DE LITERATURA 5
2.1 Epidemiologia do câncer de ovário 5
2.2 Patologia do câncer de ovário 6
2.3 Diagnóstico 10
2.3.1 Ultrassonografia abdominopélvica 10
2.4 Marcadores tumorais 12
2.4.1 CA 125 (*Cancer Antigen 125*) 13
2.4.2 HE4 (*Human Epididymis Protein 4*) 18
2.5 Índices de malignidade 22
2.5.1 IRM (Índice de risco de malignidade) 22
2.5.2 ROMA (*Risk Ovarian Malignancy Index*) 24

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS 26
3.1 Amostra 26
3.2 Critérios de inclusão e exclusão 26
3.3 Marcadores tumorais 27
3.4 Cálculo do índice e algoritmo (IRM e ROMA) 29
3.5 Avaliação dos resultados 30

4 RESULTADOS 32
4.1 Características da amostra 32
4.2 Características histopatológicas 33
4.3 Marcadores tumorais 34
4.4 ROMA e IRM 42
4.5 Curvas ROC 45

5 DISCUSSÃO 53

6 CONCLUSÕES 62

7 ANEXOS 63

8 REFERÊNCIAS 67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características ultrassonográficas avaliadas no cálculo de IRM 23

TABELA 2 - Valores de corte do IP segundo o algoritmo ROMA em pacientes na pré e na pós-menopausa 24

TABELA 3 - Características das pacientes do estudo 33

TABELA 4 - Diagnósticos histolopatológicos 34

TABELA 5 - Médias, valores máximos, mínimos e medianas dos marcadores tumorais 35

TABELA 6 - Médias e medianas de CA 125 e HE4 para alguns tumores benignos do ovário 36

TABELA 7 - Médias e medianas de CA 125 e HE4 para alguns tumores malignos do ovário 37

TABELA 8 - Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN de CA 125 em pacientes na pré e pós-menopausa 38

TABELA 9 - Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN de HE4 em pacientes na pré e pós-menopausa. 39

TABELA 10 - Porcentagem de pacientes com valores de CA 125 e HE4 acima do valor de corte nas neoplasias benignas 40

TABELA 11 - Porcentagem de pacientes com valores de CA 125 e HE4 acima do valor de corte nas neoplasias malignas 41

TABELA 12 - Sensibilidade e Especificidade de CA 125 e HE4 quando tumores de BPM foram classificados como tumores de baixo risco 42

TABELA 13 - Médias, valores mínimos e máximos do algoritmo ROMA 42

TABELA 14 - Médias, valores mínimos e máximos do IRM 43

TABELA 15 - Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN de ROMA em pacientes na pré e pós-menopausa. 44

TABELA 16 - Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN de IRM em pacientes na pré e pós-menopausa. 44

TABELA 1 - Sensibilidade e Especificidade de ROMA e IRM quando tumores de BPM foram classificados como tumores de baixo risco 45

TABELA 18 - Áreas das curvas ROC de CA 125, HE4, ROMA e IRM 47

TABELA 19 - Comparação das áreas das curvas ROC entre marcadores tumorais, ROMA e IRM 48

TABELA 20 - Sensibilidade e especificidade do CA 125, HE4, ROMA e IRM na pré e pós - menopausa no melhor valor de corte e valor de corte padrão. 52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Curva ROC para CA 125 46
FIGURA 2 - Curva ROC para HE4 46
FIGURA 3 - Curva ROC para ROMA 46
FIGURA 4 - Curva ROC para IRM 46
FIGURA 5 - Curvas ROC para CA 125, HE4, ROMA e IRM 46
FIGURA 6 - Curva ROC para CA 125 em pacientes na pré-menopausa .. 49
FIGURA 7 - Curva ROC para HE4 em pacientes na pré–menopausa 49
FIGURA 8 - Curva ROC para ROMA em pacientes na pré-menopausa.. 499
FIGURA 9 - Curva ROC para IRM em pacientes na pré-menopausa 49
FIGURA 10 - Curvas ROC de CA 125, HE4, ROMA e IRM em pacientes na pré-menopausa 49
FIGURA 11 - Curva ROC para CA 125 em pacientes na pós-menopausa .. 50
FIGURA 12 - Curva ROC para HE4 em pacientes na pós-menopausa 50
FIGURA 13 - Curva ROC para ROMA em pacientes na pós-menopausa ... 50
FIGURA 14 - Curva ROC para IRM em pacientes na pós-menopausa 50
FIGURA 15 - Curvas ROC de CA 125, HE4, ROMA e IRM em pacientes na pós-menopausa 50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcM	Anticorpos Monoclonais
AUC	*Area Under the Curve*
BPM	Baixo Potencial de Malignidade
CA 125	*Cancer Antigen 125*
cm	centímetros
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
DP	Desvio Padrão
E	Especificidade
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
Exp	Exponencial
Fc	Fragmento cristalizável
HE4	*Human Epididymis Protein 4*
HNPCC	*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*
IOTA	*International Ovarian Tumor Analysis*
IC	Intervalo de Confiança
IP	Índice Preditivo
IRM	Índice de Risco de Malignidade
IgG	Imunoglobulina G
JEM	Junção Endossalpinge Mesotelial
ln	logaritmo neperiano
>	maior
<	menor
mL	mililitros
n	número
nm	nanômetro
pM	pico mol
p53	*Protein 53*
RM	Ressonância Magnética
RMI	*Risk Malignancy Index*
ROC	*Receiver Operating Characteristic*
ROMA	*Risk Ovarian Malignancy Algorithm*

SEER	*Surveillance Epidemiology and End Results*
S	Sensibilidade
TC	Tomografia Computadorizada
TGI	Trato Gastrointestinal
TP53	*Tumor Protein 53 gene*
U/mL	Unidades por mililitros
USG	Ultrassonografia
v.	volume
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
WAP	*Whey Acid Protein*
WFDCD2	*WAP four-disulphide core domain 2*
µl	microlitro

RESUMO

Anton C. *Predição de malignidade de tumores ovarianos utilizando marcadores tumorais, índice de risco e ROMA.* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUÇÃO: O câncer de ovário é o mais letal de todos os cânceres ginecológicos e requer ser tratado por ginecologistas especializados em centros terciários para se obter melhor prognóstico. Este trabalho tem como objetivo analisar e comparar quatro estratégias diferentes para predizer a benignidade ou malignidade de tumores pélvicos supostamente de origem ovariana utilizando para este fim, marcadores tumorais CA 125 e HE4, índice de risco de malignidade (IRM) e algoritmo ROMA. MÉTODOS: Neste estudo prospectivo foram avaliadas 128 pacientes com diagnóstico de tumores pélvicos supostamente de origem ovariana atendidas na Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo entre julho de 2008 e janeiro 2011. Foram calculadas a sensibilidade e a especificidade e construídas curvas ROC para comparar os quatro parâmetros (CA 125, HE4, ROMA e IRM) na eficácia de diferenciar tumores ovarianos. RESULTADOS: A sensibilidade obtida para CA 125, HE4, ROMA e IRM foi de, respectivamente, 70,4%, 79,7%, 74,1% e 63,0%. A especificidade para CA 125, HE4, ROMA e IRM foi de, respectivamente, 74,2%, 66,7%, 75,8% e 92,4%. Não houve diferença na comparação das áreas abaixo da curva ROC entre os quatro parâmetros. CONCLUSÕES: Nenhum dos quatro métodos estudados é o ideal na diferenciação de

tumores ovarianos. Entre os quatro parâmetros analisados o HE4 foi o parâmetro com melhor sensibilidade na diferenciação de tumores ovarianos. A acurácia dos quatro métodos é equivalente e podem ser utilizados indistintamente para referenciar pacientes para serviços especializados no tratamento de câncer de ovário.

Descritores: 1. Marcadores biológicos de tumor, 2. Neoplasias ovarianas, 3. Antígeno Ca-125, 4. Proteínas secretadas pelo epidídimo, 5. Medição de risco, 6. Sensibilidade e especificidade, 7. Curva ROC

SUMMARY

Anton C. *Prediction of malignancy of ovarian tumors using tumor markers, risk index and ROMA.* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011.

BACKGROUND: Ovarian cancer is the most lethal of all gynecological cancers and requires to be treated by gynecologic oncologists in tertiary centers accustomed to treating this disease to achieve the best prognosis. This study aims to compare four different strategies to predict the benignity or malignancy of pelvic tumors presumably of ovarian origin using, for this purpose, tumor markers CA 125 and HE4, risk malignancy index (RMI) and algorithm ROMA. METHODS: This prospective study evaluated 128 patients supposedly with ovarian tumors treated at the Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and at Instituto do Câncer do Estado de São Paulo between July 2008 and January 2011. We calculated sensitivity, specificity and ROC curves to compare the four parameters (CA 125, HE4, ROMA and RMI) ability to differentiate the ovarian tumors. RESULTS: The sensitivity obtained for CA 125, HE4, ROMA and RMI was, respectively, 70.4%, 79.7%, 74.1% and 63.0%. The specificity obtained for CA 125, HE4, ROMA and RMI was, respectively, 74.2%, 66.7%, 75.8% and 92.4%. There was no difference the areas under the ROC curve among the four parameters. CONCLUSIONS: None of the four studied methods is best in the differentiation of ovarian tumors. Among the four parameters analyzed, HE4 was the parameter with highest sensitivity in the differentiation of ovarian tumors. The accuracy of the four methods is equivalent and can be used

interchangeably to refer patients for specialized services in the treatment of ovarian cancer.

Descriptors: 1. Tumor markers, biological, 2. Ovarian neoplasms, 3. CA 125 antigen, 4. Epididymal secretory proteins, 5. Risk assessment, 6. Sensitivity and Specificity, 7. ROC curve

1 INTRODUÇÃO

A classificação dos tumores primários de ovário é extensa e compreende grande variedade de neoplasias com epidemiologia, história natural e comportamento bastante distintos[1]. Os tumores malignos primários do ovário podem ser classificados em três grandes grupos: a) tumores de células germinativas, mais comum em mulheres jovens e adolescentes, representam em torno de 3% dos tumores malignos do ovário; b) tumores dos cordões sexuais e estroma, que compreendem outros 8% e c) tumores epiteliais que constituem cerca de 90% dos cânceres de ovário. Cerca de 6 a 7% das massas ovarianas encontradas ao exame físico são tumores secundários, mais comumente metastáticos da mama, do trato gastrointestinal e do endométrio[1].

O carcinoma de ovário é uma doença bastante heterogênea, com diferentes tipos histológicos, a saber: serosos, mucinosos, endometrióides, de células claras, de células transicionais e indiferenciados. O tipo histológico mais comum é o seroso totalizando aproximadamente 70% dos casos[2-4]. Apresentam-se como doença avançada em torno de 70% dos casos (estádios tardios III e IV), com taxas de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 30%[5,6]: Quando diagnosticado precocemente a sobrevida ascende para valores superiores a 90%[7]. É também o mais letal de todos os cânceres ginecológicos[3,6].

Tentativas de se fazer rastreamento e diagnóstico precoce desta neoplasia em mulheres assintomáticas tem se mostrado pouco eficazes. Os principais estudos neste sentido envolveram a utilização de métodos de imagem, sobretudo a ultrassonografia e marcadores tumorais[8]. Estes parâmetros têm sido usados isoladamente ou compondo estratégias mais elaboradas no desenvolvimento de índices de malignidade, que quando aplicados podem orientar na diferenciação entre tumores benignos e malignos.

Entre os marcadores tumorais o mais amplamente utilizado é o *Cancer Antigen 125* (CA 125)[8]. Mais recentemente outro marcador, o *Human Epididymis Protein 4* (HE4), vem despertando interesse como um marcador promissor na detecção precoce dos carcinomas[9,10].

Se o rastreamento e o diagnóstico precoce do carcinoma de ovário é tarefa difícil, a diferenciação entre massas tumorais ovarianas benignas e malignas não é mais fácil. Os ovários são órgãos intrapélvicos, o que impede a coleta de material para exames diagnósticos, a não ser por procedimentos invasivos. Desta forma, torna-se de vital importância o desenvolvimento de métodos que permitam diferenciar as massas ovarianas benignas, que podem ter conduta expectante ou conservadora, daquelas com considerável risco de malignidade que necessitam de intervenções imediatas.

Os carcinomas de ovário costumam ser assintomáticos nos seus estágios iniciais ou apresentam sintomas não relacionados com os órgãos genitais femininos até um ano antes de serem diagnosticados. Em um dos

maiores estudos sobre a sintomatologia destas pacientes antes do diagnóstico, foi observado que 95% das pacientes apresentavam algum tipo sintoma como dor abdominal, relatada em 77% dos casos; sintomas gastrointestinais em 70%; alterações constitucionais em 50%; sintomas urinários em 34% e sintomas pélvicos em 26%. Os sintomas referidos apareceram em menos de três meses antes do diagnóstico de carcinoma de ovário em 55% das vezes e há mais de seis meses em 26% dos casos[11-13].

Considerando as dificuldades atuais de identificação de sintomas específicos do carcinoma ovariano; a falta de métodos efetivos de rastreamento, diagnóstico precoce e, sobretudo, a grande dificuldade em diferenciar massas tumorais benignas e malignas nos estádios iniciais, propusemo-nos a estudar e comparar quatro diferentes estratégias, os marcadores tumorais CA 125 e HE4, o índice de risco de malignidade (IRM) e o algoritmo ROMA (*Risk Ovarian Malignancy Algorithm*), na predição de malignidade de tumores pélvicos supostamente de origem ovariana.

1.1 Objetivos

Avaliar e comparar a eficácia de quatro métodos (marcadores tumorais CA125 e HE4, IRM e ROMA) na predição de benignidade ou malignidade dos tumores pélvicos supostamente de origem ovariana de pacientes atendidas no setor de Ginecologia Oncológica da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia do câncer de ovário

O câncer de ovário é o sétimo câncer mais comum entre as mulheres, com 3,7% dos casos. Segundo os dados do GLOBOCAN (2008), estimou-se a incidência mundial em 225.484 casos ao ano e a mortalidade de 140.153 casos ao ano. É o terceiro câncer ginecológico mais comum. Sua incidência é variável nas diferentes regiões do mundo, sendo maior nos países do norte da Europa e menor no norte da África[14].

Nos EUA, o câncer de ovário é a quinta causa de morte por câncer em mulheres (5% dos casos). Segundo estatísticas americanas fornecidas pelo *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER), em 2010, sua incidência estimada foi de 21.880 casos e de 13.850 mortes[15]. A frequência aumenta com a idade: 8 casos em 100.000 mulheres abaixo de 65 anos e 48,4 em 100.000 acima dos 65 anos. A média etária é de 63 anos. Um dos maiores fatores de risco é o antecedente familiar de primeiro grau com câncer de ovário ou de mama principalmente quando diagnosticado na pré-menopausa[15].

No Brasil, o câncer de ovário é o terceiro câncer ginecológico, sendo precedido pelo câncer de colo e do corpo uterino, mas é o segundo em número de mortes. A incidência estimada é de 5.530 casos e a mortalidade de 2.982 casos por ano[14]. Nos anos de 1997 e 1998, sua incidência em São

Paulo foi de 1.277 casos (3,09% dos cânceres), com maior prevalência entre 60 e 64 anos[16].

2.2 Patologia do câncer de ovário

O câncer de ovário é uma doença heterogênea, com diferentes tipos histológicos[2]. Os tumores não epiteliais de ovário distribuem-se entre os tumores de cordão sexual e estroma (1,2 a 6%), tumores de células germinativas (2,6 a 3%) e tumores indeterminados (0,8 a 1%)[3,17]. Dentre os tumores malignos, os epiteliais, ou seja, carcinomas são os tipos mais comuns, contabilizando cerca de 90% dos cânceres de ovário[3]. Os carcinomas englobam diferentes tipos histológicos, a saber: serosos, mucinosos, endometrióides, de células claras, de células transicionais e os carcinomas indiferenciados. O tipo histológico mais comum é o seroso, totalizando aproximadamente 70% dos casos[2-4]. Existem ainda os tumores metastáticos nos ovários, cuja verdadeira incidência é difícil de avaliar, mas que varia de 10 a 30% dos tumores malignos ovarianos segundo alguns autores[18,19].

O estudo das características histológicas, a expressão de marcadores e o comportamento biológico dos tumores epiteliais levou recentemente a proposição de um modelo que classifica estes tumores em dois grupos: tipo I e tipo II. Os tumores do tipo I geralmente tem comportamento indolente, são restritos ao ovário no diagnóstico e teriam uma linearidade com seu tumor benigno correspondente, passando por um passo intermediário que seriam

os denominados tumores de baixo potencial de malignidade (*borderline*). Incluem os carcinomas serosos de baixo grau, endometrióides de baixo grau, de células claras, mucinosos e de células transicionais (tumores de Brenner). Suas mutações são estáveis e dificilmente apresentam mutações do gene TP53. Já os tumores do tipo II, têm crescimento rápido, são agressivos e rapidamente se disseminam para fora do ovário. Uma grande parte dos tumores de tipo II surgiria nas fímbrias e envolveria o ovário. Neste grupo se inserem os carcinomas serosos de alto grau, os endometrióides de alto grau, os carcinossarcomas e os carcinomas indiferenciados. Suas mutações são instáveis e mutações do gene TP53 são muito comuns[,21].

Recentemente estudos mostraram evidências que tumores primários de ovário na verdade surgiriam de outros órgãos pélvicos e atingiriam o ovário secundariamente[21]. Foi proposto que os tumores serosos se originariam da implantação de células epiteliais das tubas. Já os tumores endometrióides e de células claras, teriam associação com endometriose sendo esta lesão precursora destes tumores[21-23]. Os tumores mucinosos e de células transicionais surgiriam de ninhos de epitélio tipo transicional que sofreram metaplasia na junção tubo mesotelial[24].

Em torno de 10% dos carcinomas de ovário estão relacionados a mutações genéticas de herança autossômica dominante. Duas doenças com este padrão de transmissibilidade são conhecidas: a Síndrome do câncer de ovário e mama (mutações nos genes BRCA-1 e BRCA-2) e a Síndrome Hereditária Não Poliposa do Câncer Colorretal (HNPCC)[25-27]. Mulheres

portadoras da mutação do gene BRCA1 têm risco de carcinoma de ovário elevado em 28 a 44%. Já nas portadoras de mutação no gene BRCA2 este risco é de 0,4% para mulheres abaixo dos 50 anos e atinge 27% aos 70 anos. As mutações nos genes BRCA são responsáveis por 90% dos carcinomas de ovário hereditários. Populações específicas como a dos Judeus Ashkenazi são mais predispostas a essas mutações. Na HNPCC a provável mutação ocorre nos genes MMR; pacientes com essas mutações tem o risco de desenvolvimento do carcinoma de ovário avaliado em 12%[28].

Algumas teorias a respeito da origem do carcinoma de ovário foram aventadas[29]. Uma delas está relacionada com o estímulo repetido de gonadotrofinas e estrogênio sobre epitélio da superfície do ovário, levando a danos no DNA não reparados, o que poderia levar ao carcinoma[30]. Situações como amamentação, gestação ou uso de anticoncepcionais orais, em que há suspensão deste estímulo há redução do risco de desenvolver carcinoma de ovário[29].

A outra teoria proposta sugere que o carcinoma de ovário teria origem na tuba uterina. Em estudo de pacientes portadoras de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 submetidas a salpingooforectomia profilática, observou-se que 2,3% apresentavam carcinoma nos espécimes anatomopatológicos. A neoplasia se encontrava, na maioria das vezes, nas fímbrias e não nos ovários como seria esperado[31]. A análise das fímbrias de pacientes com carcinoma de ovário ou peritônio, com ou sem mutações do gene BRCA identificou carcinoma seroso intraepitelial tubário em 47% dos casos[32]. Ao

estudarem as fimbrias, vários autores identificaram a presença de células positivas para mutação do gene TP53 ao exame imuno-histoquímico de tubas de pacientes com e sem mutações do gene BRCA. A presença de mutação do gene TP53 foi denominada de “assinatura p53” (*p53 signature*)[32]. Esta alteração é encontrada concomitantemente a marcadores de dano celular e em carcinomas serosos intraepiteliais tubários. A “assinatura p53” seria a primeira alteração no processo de carcinogênese do carcinoma seroso do ovário. As mutações do gene TP53 são encontradas no carcinoma seroso de ovário e também no carcinoma seroso intraepitelial tubário[32]. A exposição de fatores como ovulações, flutuações hormonais[33], processos inflamatórios e infecciosos crônicos da tuba uterina como, por exemplo, pela *Chlamydia trachomatis*[29,34] ou contato com substâncias carcinogênicas seriam genotóxicas, levando às mutações[33]. Estas alterações teriam maior predisposição de evoluírem para carcinoma seroso intraepitelial tubário na presença de mutações do gene BRCA. O carcinoma seroso intraepitelial tubário seria a lesão precursora do carcinoma seroso do ovário[35]. Diversos autores identificaram este carcinoma justamente no local onde as fímbrias se conectam ao mesotélio do peritônio formando a junção endossalpinge mesotelial (JEM) [36,37].

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico de tumor de ovário é feito por exame de imagem quando há suspeita clínica ou achado incidental em exame ginecológico de rotina. Para o diagnóstico diferencial das massas ovarianas, utilizam-se parâmetros ultrassonográficos[38-41], marcadores tumorais[42-45] e índices de risco de malignidade[46-48]. Muitas vezes, estes métodos são utilizadas de forma isolada e a combinação de alguns deles poderia melhorar a sua acurácia na predição de malignidade.

2.3.1 Ultrassonografia abdominopélvica

A acurácia da ultrassonografia abdominopélvica na identificação dos tumores ovarianos é muito boa. Entretanto, a diferenciação entre tumores benignos e malignos é menos eficiente[49].

Vários autores avaliaram a capacidade do exame ultrassonográfico em diferenciar tumores benignos de malignos[50-54]. As características morfológicas das massas ovarianas podem ser usadas para esta diferenciação. Constitui importante fator limitante para esta análise a experiência do examinador. Timmerman *et al.* (2000) padronizaram os parâmetros morfológicos com o intuito de minimizar erros de avaliação[55].

Para a diferenciação das massas ovarianas alguns autores criaram sistemas de pontuação levando em conta os parâmetros morfológicos. Os mais comumente avaliados são presença de cistos uni ou multiloculares,

regularidade e espessura das paredes do cisto, ocorrência de septos e do tamanho[53]. A sensibilidade dessa pontuação na predição de malignidade nos trabalhos avaliados variou entre 74%[50] e 88%[52]. Quanto à especificidade, a menor encontrada foi 40% e a maior 67%[53]. O uso da pontuação tende a minimizar os resultados falsos positivos que ocorrem na avaliação de tumores benignos como os teratomas, por exemplo. Foi demonstrado que cistos uniloculares de paredes lisas dificilmente são malignos, mas se houver projeções sólidas no interior do cisto este risco aumenta[51,56]. Quanto maiores e mais irregulares as projeções sólidas no interior do cisto, maior o risco de malignidade. As projeções sólidas são comuns nos tumores de baixo potencial de malignidade. Os tumores uniloculares menores do que 10 cm têm risco de malignidade pequeno. Várias mulheres que apresentavam cistos simples menores ou iguais a cinco cm foram seguidas por mais de 9 anos apenas com ultrassom[56].

Em 1989, Bourne *et al.* sugeriram que a ausência de neovascularização intratumoral e alto índice de pulsatilidade à avaliação com ultrassom com doppler poderiam excluir tumores malignos[40]. Porém, estudos subsequentes não validaram este achado[57-59].

Em nosso meio, Blanco *et al.* (2003) avaliaram a capacidade da ultrassonografia com doppler em diferenciar tumores ovarianos benignos e malignos. Apesar da melhora da sensibilidade ao se utilizar contraste intravenoso para aumentar a identificação vascular, a sensibilidade do método permaneceu baixa[60]. Em 2010, Veyer *et al.* também estudaram o

emprego de contraste intravenoso para incrementar a acurácia na avaliação de massas anexiais. Contudo, o resultado que obtiveram usando o contraste foi menor, mas semelhante ao diagnóstico feito pelo examinador. Ao se excluir os tumores de BPM, a acurácia com o contraste foi maior[61].

Nenhum sinal ultrassonográfico sozinho é capaz de predizer se um tumor ovariano é benigno ou maligno. Com a avaliação de vários trabalhos e experiência do IOTA (*International Ovarian Tumor Analysis*), Timmerman *et al.* (2008) elaboraram um conjunto de 10 regras simples para se identificar um tumor benigno e maligno[62].

2.4 Marcadores tumorais

Marcadores tumorais são indicadores bioquímicos da presença de um tumor. Estas substâncias podem ser produzidas por células tumorais ou outras células do organismo em resposta à presença do câncer. A aferição qualitativa e quantitativa dos marcadores tumorais pode ser feita no sangue, urina, tecidos ou em outros fluidos corpóreos[63]. Nem todos portadores de câncer têm marcadores tumorais alterados, principalmente nos estádios iniciais. Outrossim, alguns têm aumento dos valores destas substâncias em condições benignas. Além disso, o mesmo marcador tumoral pode estar elevado em diferentes tipos de câncer. O marcador ideal seria aquele que tivesse alta sensibilidade e alta especificidade e elevado valor preditivo positivo. O marcador adequado para rastreamento e para monitorizar a

resposta ao tratamento e recidivas tumorais deve ser o mais específico possível para o tumor em investigação ou em seguimento[64].

2.4.1 CA 125 (*Cancer Antigen 125*)

Um dos mais conhecidos e utilizados marcadores tumorais na avaliação do câncer de ovário é o CA 125, glicoproteína de alto peso molecular. Este antígeno é detectado por um anticorpo monoclonal OC125 de origem murina, desenvolvido a partir de uma linhagem de células de carcinoma de ovário (OVCA433)[65,66]. O anticorpo OC125 é detectado em grande parte dos carcinomas de ovário[65].

Além dos carcinomas de ovário, a glicoproteína CA 125 é expressa em tecidos fetais e adultos. São encontrados no âmnio e em tecidos derivados do epitélio celômico, como pleura, peritônio e pericárdio, principalmente em áreas com processos inflamatórios e com aderências[67]. No trato genital feminino é expressa no epitélio de tubas, endométrio e endocérvice[67]. No ovário normal foi identificada a sua expressão em cistos de inclusão, excrescências papilares e em áreas de metaplasia[67,68].

A partir do encontro da expressão dessa glicoproteína em diferentes tecidos, com destaque para o carcinoma de ovário, passou-se a estudar o CA 125 como um marcador tumoral para o câncer de ovário. Inicialmente foi desenvolvido um teste laboratorial que posteriormente foi aprimorado. Este teste permitiu avaliar o papel deste marcador na detecção de diferentes tipos de tumores, em condições normais, fisiológicas e benignas. Posteriormente,

começaram os estudos para analisar seu uso no rastreamento do câncer de ovário, na avaliação de recorrência de doença e do tratamento do câncer de ovário e no diagnóstico diferencial de massas tumorais.

O primeiro teste laboratorial para identificação do CA 125 baseava-se no reconhecimento de um epitopo do anticorpo monoclonal OC125 contra a linhagem de células OVCA 433 de cistoadenocarcinoma seroso de ovário[65]. Este teste foi comercialmente disponibilizado em 1983. A segunda geração de testes (CA 125 II) incorporou o anticorpo M11 ao OC125 na determinação do epitopo. Trata-se de um teste laboratorial tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) em sanduíche. Nesta técnica, uma quantidade fixa de anticorpo de quantidade conhecida é fixada às placas de microtitulação. Uma solução com antígeno é colocada para reagir com anticorpo monoclonal fixo. Após a ligação, o antígeno não ligado é removido e é acrescentado novo anticorpo monoclonal não superposto ao antígeno. Então, é removido o segundo anticorpo não ligado. A partir daí é construída uma curva padrão da ligação do segundo anticorpo em função da concentração do antígeno. A quantificação é feita por espectofotometria[69].

Com a introdução do anticorpo M11 ao teste, o CA 125 II mostrou maior taxa de positividade em relação ao CA 125 anterior[70].

O CA 125 encontra-se elevado (maior que 35U/mlL) no soro de pacientes com carcinoma de ovário em mais de 80% dos casos[71]. Além da identificação do aumento do CA 125 nos tumores epiteliais de ovário, mostrou-se sua elevação também em tumores de células germinativas[72],

tumores derivados dos cordões sexuais e em tumores metastáticos, como os tumores de Krukenberg[73]. Vários outros tumores ginecológicos estão associados a aumento do CA 125. Em um estudo que avaliou 60 mulheres com tumores ginecológicos não ovarianos observou-se aumento do CA 125 em 100% dos casos de tumores tubários, 83% de adenocarcinoma de colo uterino, 50% dos adenocarcinomas endometriais e em menos de 15% nos tumores escamosos de vulva e colo uterino[71].

Na população saudável, este antígeno pode ser encontrado em baixos níveis (menor que 35U/mL) tanto em homens como em mulheres. Em estudo com 888 doadores de sangue (537 homens e 351 mulheres), notou-se que em apenas 1% o valor de CA 125 foi maior que 35U/mL independentemente do sexo. Já quando se usou o valor de 65U/mL encontrou-se elevado em apenas 0,2%[74].

Em algumas condições fisiológicas também se observa elevação nos valores de CA 125. Registrou-se que os valores mais altos de CA 125 são encontrados durante a menstruação. Nas pacientes com endometriose este padrão de variação durante o ciclo menstrual também é seguido, porém com valores de CA 125 mais elevados[75]. Em gestantes, encontra-se elevado no primeiro trimestre da gestação[76]. Não se detectou este aumento no segundo e terceiro trimestres[77]. Dependendo do estado hormonal (pré ou pós-menopausa) foram notados diferentes valores de referência do CA 125. Assim, mulheres na pós-menopausa, assim como as histerectomizadas, revelam valores mais baixos que as na menacme[75,78,79].

Em alterações benignas foi identificado aumento do CA 125 em pacientes com tuberculose peritoneal, processos inflamatórios pélvicos e endometriose[80]. Nas com endometriose, principalmente em estádios avançados, pode haver aumento em especial nos três primeiros dias do ciclo menstrual[81]. Outro fator que se deve levar em conta na análise deste marcador é a presença de fluido em cavidades serosas como peritônio, pericárdio e pleura em pacientes com doenças benignas. Estudo feito com 39 pacientes submetidos à hemodiálise crônica divididos em dois grupos com e sem a presença de fluidos em cavidades serosas, comparados a um grupo controle de 52 pacientes, mostrou aumento significante do CA 125 nos pacientes com fluido em cavidades serosas em relação aos outros grupos. Não houve diferença entre o grupo controle e o grupo dialítico sem fluido em cavidades serosas[82]. Topalak *et al.* avaliaram 133 pacientes com doenças benignas e malignas com o intuito de observar o comportamento do CA 125 sérico e nos fluidos ascítico e pleural. Observaram aumento de CA 125 em 76% das pacientes com câncer de ovário, 96% dos pacientes com ascite e em 100% das pacientes com carcinomatose com tumores de origem não ginecológica[83].

O CA 125 está elevado (acima de 35U/mL) em mais de 85% dos carcinomas de ovário em estádios avançados, porém, encontra-se elevado em apenas 50% dos casos em estádios iniciais. Aproximadamente 6% das mulheres com CA 125 acima de 35U/mL não são portadoras de carcinoma de ovário. A baixa sensibilidade para detecção precoce faz com que o uso isolado deste marcador como método de rastreamento não seja adequado[84].

Em relação ao seguimento de pacientes com carcinoma de ovário após citorredução com ou sem quimioterapia adjuvante, a elevação do CA 125 está relacionada à recorrência em 95% dos casos. A persistência de níveis altos de CA 125 é indicativa de presença da doença. A elevação do CA 125 sem evidência de doença pode ocorrer até três meses antes do aparecimento de lesão evidente. O seu incremento dentro dos limites da normalidade não necessariamente indica recorrência da doença[85].

Em relação à monitorização do tratamento, o CA 125 é utilizado para avaliar a resposta à quimioterapia. A queda nos seus valores parece estar relacionada à resposta ao tratamento mesmo na ausência de doença mensurável. A resposta ao tratamento é definida como redução de 50% ou mais do valor do CA 125, o qual deve permanecer diminuído por pelo menos 28 dias. Este critério é válido para pacientes que tinham os valores de CA 125 com pelo menos o dobro do limite de referência[86]. A sua queda rápida após quimioterapia é indicador de prognóstico mais favorável[85].

Apesar da baixa especificidade para identificar tumores ovarianos em estádios iniciais, o CA 125 é muito utilizado para a diferenciação de tumores benignos e malignos principalmente em mulheres na pós-menopausa com tumor ovariano[86]. Valores de CA 125 maiores que 95U/mL em mulheres pós-menopáusicas têm valor preditivo positivo de 95% para diferenciar massas benignas de malignas[87]. Além da prevalência de carcinoma de ovário ser baixa na população de mulheres na pré-menopausa, a especificidade do CA 125 não é boa já que muitas condições benignas e fisiológicas podem

confundir nessa avaliação diferencial quando se utiliza apenas o CA 125 como marcador. Recentemente, vem sendo proposta a avaliação do CA 125 juntamente com outros marcadores com o objetivo de melhorar a acurácia da predição de malignidade de massas ovarianas[42].

2.4.2 HE4 (*Human Epididymis Protein 4*)

Uma família de genes que codificam proteínas moduladoras no câncer vem tendo destaque. As proteínas codificadas por estes genes têm como característica a presença de regiões WAP (*Whey Acid Protein*). Estas regiões são compostas por cinquenta aminoácidos com oito resíduos de cisteina que formam quatro pontes de dissulfeto. O gene WFDC2 (*WAP four-Disulphide Core Domain 2*) codifica a proteína HE4 (*Human Epididymis Protein 4*) que tem dois domínios WAP. Este gene aloca-se no cromossomo 20q12–13.1. Nesta região, várias outras proteínas WAP envolvidas na carcinogênese e progressão tumoral são codificadas. Proteínas da família com domínio WAP, como elafin e SLPI, têm importante papel na defesa pulmonar e da pele. Estas proteínas são codificadas na mesma região da HE4[88]. Ainda não se sabe as reais funções da proteína HE4. Sua sequência de mRNA foi originalmente identificada por Kirschoff *et al.* e armazenada no GenBank (banco de genes) [89].

A proteína HE4 foi identificada primeiramente no epidídimo e acreditava-se ter alguma função na maturação do esperma[90]. Na tentativa de se identificar marcadores tumorais foram avaliadas a expressão de cDNA de culturas de tecidos e células tumorais utilizando técnica de *microarray*.

Alguns trabalhos identificaram que o gene WFDC2 achava-se superexpresso nos tumores ovarianos[91-93]. Outros também notaram a superexpressão deste gene em outros tumores, como adenocarcinoma de mama[94,95], adenocarcinoma de pulmão, mesoteliomas e carcinoma de endométrio[96].

A expressão do gene WFDC2 também foi encontrada em alguns tecidos normais. A expressão da proteína nas glândulas salivares e nasais, na região posterior da língua, na tonsila e na região traqueobrônquica leva a crer que ela poderia estar envolvida com a imunidade do trato respiratório superior, uma vez que todas as regiões onde se observa esta expressão são sítios de produção de proteínas envolvidas na imunidade do trato respiratório[88,95].

No trato genital masculino, está expressa no epidídimo e no vaso deferente e parece estar envolvida na maturação dos espermatozóides[97]. Já no trato genital feminino, é expressa nas tubas, no endométrio, na endocérvice e na glândula de Bartholin[96]. Quando comparada a expressão tecidual de WFDC2 entre carcinomas de ovário e tecido ovariano normal, é muito maior no primeiro grupo[91,98,99]. A observação de que a proteína HE4 é expressa em tumores a torna candidata a ser um marcador tumoral[91].

Em 2003, foi elaborado por Hellström *et al.*, um teste laboratorial com objetivo de dosagem sérica do marcador HE4. Foi construída uma proteína fundindo a proteína HE4 ao domínio Fc (fragmento cristalizável) da IgG1 (Imunoglobulina G), que posteriormente foi utilizada na imunização de ratos para obtenção de dois anticorpos monoclonais (AcM): 2H5 e 3D8. O AcM

3D8 foi fixado nas placas de microtitulação e o AcM 2H5 foi biotinilado (junção com a vitamina biotina e a proteína estreptavidina para identificação de ácidos nucléicos). Com os dois anticorpos monoclonais elaborou-se um teste por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) em sanduíche[100].

A partir da obtenção de um teste no soro para quantificar o marcador HE4, os primeiros estudos avaliando esta proteína como marcador tumoral começaram a ser feitos. Em 2008, Moore *et al.* avaliaram 233 pacientes com tumores ovarianos utilizando uma combinação de diversos marcadores tumorais incluindo HE4 e CA 125, com o objetivo de predizer malignidade dessas lesões. Observou que isoladamente o HE4 teve melhor sensibilidade (72,9%), com especificidade fixa em 95%, comparativamente aos outros marcadores testados. Quando analisado os dados referentes ao estádio I, o HE4 também se mostrou isoladamente melhor que os outros marcadores testados, com sensibilidade de 45,9% fixando-se a especificidade em 95%. A associação de nenhum outro marcador para melhorar a sensibilidade na avaliação do estádio I teve sucesso. Melhores resultados na avaliação global foram conseguidos com a associação de CA 125 e HE4, que atingiram sensibilidade de 76,4% na especificidade de 95%. O incremento da sensibilidade com a associação em relação aos marcadores isolados foi de 33,1% em relação ao CA 125 e de 3,5% do HE4. Na análise das pacientes na pré e pós-menopausa, tanto a associação de HE4 ao CA 125, como o HE4 isoladamente, obtiveram maior acurácia em relação ao CA 125 isoladamente em mulheres na pré-menopausa[42]. A diferenciação de malignidade na pré-menopausa é difícil uma vez que muitas doenças

benignas que ocorrem nesta faixa etária, como miomas uterinos e endometriose elevam o valor do CA 125, não sendo possível, portanto, diferenciar nestes casos a presença de malignidade através da avaliação do CA 125. O HE4 auxilia nesta avaliação, pois seu valor, na maioria das vezes, não se eleva. A acurácia na diferenciação entre o câncer de ovário e a endometriose ovariana chega a 94%[101]. Quanto à avaliação na pós-menopausa a associação CA 125 e HE4 não foi significante. No estudo de Moore *et al.*, o HE4 teve apenas 12% de falsos positivos. Em contrapartida, com o CA 125 houve 26% de falsos positivos. O HE4 tem maior especificidade na avaliação de doenças benignas. Além disso, observou-se aumento do HE4 em mais de 50% dos tumores que não expressaram CA 125. Portanto, a associação destes dois marcadores parece melhorar a predição de malignidade em tumores ovarianos[42].

Alguns autores, a partir da avaliação de Moore *et al.*, passaram a testar a capacidade de predição de malignidade de massas ovarianas utilizando a associação dos marcadores HE4 e CA 125[42,102]. A predição de malignidade é importante principalmente para o referenciamento das pacientes com suspeita de malignidade para hospitais terciários, que contam com ginecologistas oncológicos. A abordagem do câncer de ovário por profissionais treinados em cirurgia oncológica é fundamental para o adequado estadiamento e citorredução ótima, fatores que têm impacto na sobrevida, com redução da morbidade e da mortalidade[103-106].

Com a observação de que o HE4 aumenta a acurácia do CA 125 na predição de tumores ovarianos foi elaborado um algoritmo denominado ROMA. Associa os valores séricos do HE4 e do CA 125 com informações sobre o estado menopausal, a fim de classificar as pacientes em baixo e alto risco[48,102]. Neste particular, foram classificadas como pacientes de alto risco 94% daqueles com cânceres epiteliais de ovário[102].

2.5 Índices de malignidade

2.5.1 IRM (Índice de risco de malignidade)

Com o objetivo de melhorar a eficiência da predição de malignidade de massas ovarianas foi proposto por Jacobs, *et al.* em 1990, o IRM (Índice de Risco de Malignidade), que, através de regressão logística, associou aos parâmetros ultrassonográficos o marcador tumoral CA 125 e o estado menopausal[46]. Para seu cálculo, o valor do CA 125 é multiplicado pelo valor obtido através dos parâmetros ultrassonográficos e pelo valor associado à pré ou pós-menopausa.

Os parâmetros ultrassonográficos analisados (Tabela 1) foram: cisto multiloculado, evidência de áreas sólidas, ocorrência de metástases, presença de ascite e lesões ovarianas bilaterais. Na ausência de qualquer um desses itens, o valor atribuído ao parâmetro ultrassonográfico é zero; à presença de um parâmetro é conferido um ponto e, à presença de dois ou mais o valor três. Quanto ao estado menopausal, é atribuído o valor um para

pacientes na pré-menopausa e três para as pacientes na pós-menopausa. A multiplicação desses três parâmetros: CA 125, ultrassonografia e estado menopausal, resulta em um índice de risco. Para Jacobs *et al.*, o valor de corte de 200 mostrou sensibilidade de 85,4%, especificidade de 96,9%, valor preditivo positivo de 42,1% e valor preditivo negativo de 0,15%[46].

TABELA 1 - Características ultrassonográficas avaliadas no cálculo de IRM

Parâmetros
Multiloculações
Áreas sólidas
Evidência de metástases
Ascite
Bilateralidade

A presença de cada um vale um ponto.
U = parâmetro ultrassonográfico do IRM.
Ausência dos parâmetros da tabela: U = 0
Presença de um parâmetro: U = 1
Presença de dois ou mais parâmetros: U =3

Outros autores, baseado no índice de risco de malignidade proposto por Jacobs *et al.*, sugeriram novos índices de risco alterando em suas regressões logísticas os valores atribuídos aos parâmetros do índice de risco original[47,107]. Contudo, a comparação entre os índices não se mostrou diferente[47].

2.5.2 ROMA (*Risk Ovarian Malignancy Index*)

Moore *et al.* (2009), com o intuito de criar um método com dados objetivos que pudesse ser utilizado em diferentes centros, propôs um algoritmo utilizando valores da quantificação dos marcadores CA 125 e HE4 associado à informação sobre o estado menopausal[102]. Desta forma, obtiveram um instrumento para a predição de malignidade de tumores ovarianos sem a interferência dos dados ultrassonográficos que são examinador dependente e podem ocasionar erros. Este algoritmo classifica os tumores ovarianos em baixo ou alto risco para doença ovariana maligna. Os pontos de corte foram fixados em valores em que a especificidade foi de 75% tanto na pré quanto na pós-menopausa. Assim, 75% das pacientes com doença benigna foram classificadas corretamente como sendo de baixo risco. Segundo Moore *et al.* (2010), os valores do índice de predição do ROMA com a especificidade de 75% foram 13,1% para pacientes na pré-menopausa e 27,7% na pós-menopausa. Isto significa que pacientes na pré-menopausa com índice de predição menor que 13,1% e aquelas na pós-menopausa com valor abaixo de 27,7% são classificadas como baixo risco para doença maligna do ovário[108]. (Tabela 2)

TABELA 2 - Valores de corte do IP segundo o algoritmo ROMA em pacientes na pré e na pós-menopausa

Estado Menopausal	IP*	Risco
Pré	< 13,1%	Baixo

	≥ 13,1%	Alto
Pós	< 27,7%	Baixo
	≥ 27,7%	Alto

*IP = Índice preditivo

Na validação do ROMA, quando analisado o risco de tumores ovarianos serem carcinomas ou tumores de baixo potencial de malignidade foi obtida sensibilidade (S) de 89%, especificidade (E) 75%, valor preditivo positivo (VPP) de 62,3% e valor preditivo negativo (VPN) de 93,6%. Quando analisados isoladamente, os carcinomas, os valores foram S=94,3%, E=75%, VPP=59,8% e VPN=97,1%. Já na avaliação de estádios precoces os resultados foram os seguintes: S=85,3%, E=75%, VPP=27,1% e VPN=97,9%[48].

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Realizou-se estudo prospectivo no Setor de Ginecologia Oncológica da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo no período de junho de 2008 a janeiro de 2011. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo 1067/08 (Anexo A). Todas pacientes participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

3.1 Amostra

A amostra estudada foi constituída de mulheres com diagnóstico de tumores pélvicos supostamente de origem ovariana. O tamanho da amostra foi calculado com base na fixação dos erros tipo I e II e considerando a variabilidade da variável CA 125. Desse modo, estimaram-se para esta amostra 123 pacientes.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas pacientes com diagnóstico de tumores pélvicos obtidos através de ultrassonografia abdominopélvica (USG), tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) previamente ao diagnóstico anatomopatológico, com idade entre 15 e 90 anos. As pacientes

na menacme foram avaliadas fora do período menstrual. As mulheres incluídas no estudo foram submetidas à cirurgia ou biópsia da lesão guiada por imagem quando apresentavam sinais de carcinomatose. Foram consideradas na pós-menopausa as pacientes acima de 50 anos ou as com mais de 40 anos e sem menstruações há pelo menos um ano.

Adotaram-se, como critérios de exclusão, as gestantes, as pacientes submetidas à diálise peritoneal, os casos previamente diagnosticados com potencial elevação do CA 125 (como mesotelioma) e os tumores identificados como não ovarianos durante a cirurgia.

3.3 Marcadores tumorais

Foram colhidas amostras de 3 a 5 mL de sangue para determinação dos marcadores CA 125 e HE4. No dia da cirurgia ou da biópsia guiada por imagem foram coletadas duas amostras de 3 a 5 mL de sangue em tubo seco. A primeira foi encaminhada para o Laboratório de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para análise de CA 125 II utilizando cobas® 4000 *analyser series* e 411 *module for immunoassays* Roche®. A segunda foi centrifugada e o soro armazenado em tubos secos a - 20 °C e posteriormente encaminhados ao freezer a - 80 °C. Posteriormente, estas amostras foram submetidas à determinação dos níveis de HE4 através de HE4 EIA *assay* (*Fujirebio Diagnostics Inc*, Suécia). As amostras foram processadas através de teste imunológico de fase sólida pela técnica de sanduíche. Foram pipetados 25 µl

de calibradores, controles e amostras das pacientes e colocados em cada microtubo. A seguir, foram pipetados 100 µl do anticorpo monoclonal 2H5 biotinilado (junção com a vitamina biotina e a proteína estreptavidina para identificação de ácidos nucléicos) anti–HE4 e adicionados aos microtubos. A solução foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente em placa agitadora. Após a incubação, todos os microtubos foram aspirados e lavados por três vezes. O HE4 presente nos calibradores ou amostras foi absorvido pela estreptavidina durante a incubação. Após a lavagem, os microtubos receberam 100 µl de solução contendo anticorpo monoclonal 3D8 anti–HE4 e foram incubados novamente em temperatura ambiente, por 1 hora, na agitadora. Após a segunda incubação, os microtubos foram aspirados e lavados novamente por seis vezes. A seguir, colocou-se em cada um dos microtubos 100 µl de solução tamponada contendo peróxido de hidrogênio e 3, 3´, 5 , 5´tetra metilbenzidina. Os microtubos foram incubados por mais 30 minutos. Durante a reação houve a formação de coloração azul nos microtubos quando havia HE4 e sua intensidade de coloração foi proporcional à quantidade de HE4 presente nas amostras. Ao término dos 30 min, foi feita a leitura da intensidade da cor por espectrofotômetro a 620 nm. Foram construídas curvas calibradoras através da plotagem dos valores de absorbância *versus* a concentração de cada calibrador. As concentrações de HE4 das amostras foram então lidas da curva de calibração.

3.4 Cálculo do índice e algoritmo (IRM e ROMA)

O cálculo do IRM foi realizado pela multiplicação do valor de CA 125, pelo valor atribuído ao estado menopausal (1: pré-menopausa, 3: pós-menopausa) e pelo índice obtido através da avaliação dos parâmetros ultrassonográficos[46]. Quando a paciente havia sido submetida primeiramente a TC ou RM ao invés de ultrassonografia foram utilizadas as mesmas características preconizadas na avaliação ultrassonográfica por Jacobs *et al.*[46] Este tipo de análise já foi validada previamente por Moore *et al.*[48] Se no exame de imagem houvesse a presença de multiloculações, bilateralidade, presença de componente sólido em seu interior, presença de ascite, evidência de metástase à distância, foi atribuído 1 ponto para cada um desses parâmetros. Para o cálculo índice de imagem do IRM, na ausência de todos estes parâmetros, foi conferido o valor zero, um parâmetro valor 1 e dois ou mais parâmetros valor 3. Desta forma, o IRM foi calculado conforme expressão a seguir:

IRM= CA 125 x M x U

CA 125 = valor do CA 125 em U/mL

M = estado menopausal

U = índice obtido a partir dos parâmetros de imagem

O algoritmo ROMA foi calculado conforme expressões determinadas previamente por Moore[6]:

ROMA =exp(IP)/[1 + exp(IP)]

ROMA = Probabilidade de predição

exp = exponencial

IP = Índice preditivo, cujo cálculo depende do estado menopausal

Pré-menopausa:

IP=-12 +2.38*ln (HE4) + 0.0626*ln (CA 125)

ln = logaritmo neperiano

HE4 = valor do HE4 em pM

CA 125 = valor do CA 125 em U/mL

Pós-menopausa:

IP=-8.09 + 1.04*ln (HE4) + 0.732*ln (CA 125)

ln = logaritmo neperiano

HE4 = valor do HE4 em pM

CA 125 = valor do CA 125 em U/mL

Todos os tumores foram classificados segundo a Organização Mundial de Saúde e os tumores de baixo potencial de malignidade foram considerados malignos.

3.5 Avaliação dos resultados

Ao término da obtenção dos dados, foi calculada a sensibilidade, a especificidade, o VPP e o VPN para os marcadores CA 125 e HE4 e para os

índices IRM e ROMA. Foram confeccionadas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e calculadas as AUC (area under the curve) tanto para os marcadores tumorais como para os índices com objetivo de avaliar e comparar a acurácia de cada método na predição de malignidade de massas ovarianas. Foi utilizado o programa MedCalc v11.1.1.0 (MedCalc *Software*, Mariakerke, Belgium) para os cálculos estatísticos e confecção das curvas ROC. Para comparação das curvas ROC foi utilizado o método de DeLong, *et al.* (1988)[109]. Foi considerado $p<0,05$ como estatisticamente significante.

4 RESULTADOS

Das 128 pacientes selecionadas, oito foram excluídas pelos seguintes motivos: em cinco casos houve problemas com a amostra; um caso tratava-se de mioma subseroso; uma paciente fazia diálise peritoneal o que poderia comprometer a análise de CA 125 e uma tinha o diagnóstico de mesotelioma. Foram então utilizados no estudo 120 casos.

4.1 Características da amostra

Foram avaliadas 66 pacientes com massas ovarianas benignas e 54 com tumores ovarianos malignos. As idades das pacientes variaram entre 15 e 89 anos. A média de idade entre as pacientes com tumores benignos foi de 50,74 ± 16,16 anos e nas com tumores malignos foi de 55,24 ± 12,96 anos. Quanto à avaliação do estado menopausal, entre as pacientes com tumores ovarianos benignos 29 encontravam-se na menacme e 37 eram pós-menopáusicas. Entre as pacientes com tumores ovarianos malignos, 18 estavam na menacme e 36 eram pós-menopáusicas (Tabela 3).

TABELA 3 - Características das pacientes do estudo

	n	Idade (Média)	Estado Hormonal	
			Pré-menopausa	Pós-menopausa
Benigno	66	50,74 (16 – 89)	29	37
Maligno	54	55,24 (15 – 82)	18	36
Total	120	53,11 (15 – 89)	47	73

4.2 Características histopatológicas

Entre os tumores malignos diagnosticaram-se os seguintes tipos histológicos: carcinoma seroso (n=16), adenocarcinoma endometrióide (n=3), carcinossarcoma (n=1), adenocarcinoma metastático de mama (n=1), adenocarcinoma metastático do trato gastrointestinal (n=5), adenocarcinoma metastático de colo (n=1), carcinoma de células claras (n=1), tumor de células da granulosa (n=4), tumor de células de Leydig (n=1), tumor de células esteroídicas (n=1). Os tumores de baixo potencial de malignidade (BPM) foram considerados malignos na dicotomização de malignidade e benignidade. Entre eles, seis serosos e 11 mucinosos. Entre os classificados como benignos foram encontrados os seguintes tipos histológicos: teratoma (n=16), endometriose (n=13), fibroma (n=4), cistoadenoma mucinoso (n=11), cistoadenoma seroso (n=14), tumor de Brenner (n=2), cistos simples (n=6) (Tabela 4).

TABELA 4 - Diagnósticos histolopatológicos

Tipo histológico	n de casos	Tipo histológico	n de casos
Benigno (n=66)		**Maligno** (n=54)	
Teratoma	16	Seroso	16
Endometrioma	13	Endometrióide	3
Fibroma	4	Mucinoso	3
Cistoadenoma mucinoso	11	Células claras	1
Cistoadenoma seroso	14	Carcinossarcoma	1
Cisto simples	6	Tumor de célula da granulosa	4
Tumor de Brenner	2	Tumor de células de Leydig	1
		Tumor de células esteroídicas	1
		Metastático	7
		BPM*	
		Seroso	6
		Mucinoso	11

* BPM – Baixo potencial de malignidade

4.3 Marcadores tumorais

Foram obtidas as médias e medianas dos dois marcadores tumorais analisados - CA 125 e HE4. As médias e medianas dos tumores malignos foram superiores aos dos benignos para os dois marcadores. As médias e medianas assim como os valores mínimos e máximos de CA 125 e HE4 podem ser observados na Tabela 5.

TABELA 5 - Médias, valores máximos, mínimos e medianas dos marcadores tumorais

	Média (DP)*		Mediana (valores mínimos e máximos)	
	CA 125 (U/mL)	HE4 (pM)	CA 125 (U/mL)	HE4 (pM)
Benignos	36,78 ± 55,50	76,49 ± 58,41	17,05 (3,2-292)	64,8 (12,7-325,4)
Malignos	264,78 ± 458,28	212,25 ± 343,64	97,3 (7,5-2856)	138,5 (2,5-2427)

*DP = desvio padrão

O cálculo da média e mediana dos níveis de CA 125 e HE4 também foi feito separadamente para alguns tipos histológicos. Nos casos de endometriose, foram calculadas a média e a mediana do CA 125 (114,18 ± 86,95 e 91,90, respectivamente) que foram superiores aos dos tumores benignos em geral. Em relação ao HE4, os valores da média e mediana (55,97 ± 28,90 e 45,60 respectivamente) foram menores aos obtidos nos tumores benignos como um todo. Outros tumores benignos, como cistoadenomas serosos, mucinosos e teratomas, apresentaram valores médios de CA 125 inferiores em relação ao grupo benigno como um todo. Já na análise do HE4, as médias foram maiores, excetuando-se os cistoadenomas mucinosos (Tabela 6).

TABELA 6 - Médias e medianas de CA 125 e HE4 para alguns tumores benignos do ovário

	Média (DP)		**Mediana (valores máximos e mínimos)**	
	CA 125 (U/mL)	HE4 (pM)	CA 125 (U/mL)	HE4 (pM)
Endometriose	114,18 ± 86,95	55,97 ± 28,90	91,90 (29,30 – 292,90)	45,60 (18,50 – 110,80)
Cistoadenoma mucinoso	18,70 ± 6,09	66,38 ± 28,54	17,70 (11,50 – 29,90)	66,40 (17,70 – 104,40)
Cistoadenoma seroso	13,68 ± 8,17	87,99 ± 65,55	11,75 (4,00 – 17,70)	66,55 (12,70 – 68,30)
Teratoma	20,96 ± 22,13	77,70 ± 72,46	16,55 (13,90 – 97,50)	59,15 (18,90 – 325,40)

Alguns tipos histológicos de tumores malignos também foram avaliados separadamente. Os carcinomas foram os que apresentaram maior média e mediana. Os tumores metastáticos apresentaram também valores altos de média e mediana, porém bem mais baixos do que os carcinomas primários do ovário. Os tumores derivados dos cordões sexuais apresentaram valores de média e mediana bastante baixos de CA 125, mas revelaram valores altos de HE4. Em relação aos tumores de BPM, observaram-se valores altos de média e mediana tanto para o CA 125 quanto para o HE4; porém os do tipo serosos mostraram níveis próximos aos dos tumores malignos como um todo (Tabela 7).

TABELA 7 - Médias e medianas de CA 125 e HE4 para alguns tumores malignos do ovário

	Média (DP)		Mediana (valores máximos e mínimos)	
	CA 125(U/mL)	HE4 (pM)	CA 125(U/mL)	HE4 (pM)
Carcinomas primários	450,67 ± 619,58	356,1 ± 492,44	176,90 (44,60 – 2856,00)	186,20 (3,10 – 2427,00)
Carcinomas metastáticos	156,16 ± 122,99	110,63 ± 78,24	152,40 (17,00 – 336,10)	103,30 (2,50 – 223,90)
Tumores dos cordõe sexuais	50,18 ± 60,24	100,88 ± 24,98	16,35 (7,50 – 151,60)	95,25 (67,50 – 135,50)
*BPM mucinosos	91,90 ± 228,40	93,41 ± 54,11	18,70 (10,50 – 779,20)	75,50 (24,20 – 174,50)
*BPM serosos	248,02 ± 322,62	115,18 ± 60,64	106,35 (16,70 – 844,50)	108,40 (33,60 – 193,60)

*BPM: Tumores de baixo potencial de malignidade

Além da média e mediana do CA 125 e HE4, foram calculados para cada um deles a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN. Os valores de corte utilizados nesta avaliação foram: CA 125 = 35 U/mL e HE4 = 70 pM. Nesta avaliação, os tumores de BPM foram considerados de alto risco juntamente com os demais cânceres de ovário.

Em relação ao CA 125, a sensibilidade encontrada nas pacientes na pré–menopausa foi de 83,3% e apenas 16,7% dos tumores malignos deixariam de ser encaminhadas para serviços terciários. Já em pacientes na pós–menopausa, a sensibilidade foi de 63,9% e não seriam encaminhadas a um serviço terciário 36,1% de pacientes com tumores malignos. Nas

pacientes na pós–menopausa pode-se identificar corretamente 85,2% de pacientes com testes positivos realmente doentes (Tabela 8).

Na avaliação global do CA 125, seus valores de sensibilidade e especificidade não são muito bons (70,4% e 74,2% respectivamente). Porém, ao analisarmos os casos que deixaram de ser identificados como malignos encontramos um tumor metastático da mama e um tumor metastático do colo, ambos previamente diagnosticados, seis tumores de cordões sexuais, nove tumores mucinosos de BPM e um tumor de BPM seroso. Nenhum carcinoma primário de ovário deixou de ser identificado.

Na identificação específica dos carcinomas, a sensibilidade obtida foi de 93,5% e a especificidade de 70,8%.

TABELA 8 - Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN de CA 125 em pacientes na pré e pós-menopausa

CA 125(35U/mL)	**Sensibilidade**	**Especificidade**	**VPP**	**VPN**
Pré	83,3%	55,2%	53,6%	84,2%
Pós	63,9%	89,2%	85,2%	71,7%

Quanto ao HE4, a sensibilidade encontrada (79,6%) foi maior que a do CA 125, porém com especificidade menor (66,7%). Nesta avaliação, 20,4% das pacientes com tumores malignos deixariam de ser identificadas e encaminhadas para serviços terciários ao invés dos quase 30% na avaliação do CA 125. Quando avaliadas pacientes na pós-menopausa, os valores de

sensibilidade foram superiores aos da pré-menopausa (Tabela 9). Na pré-menopausa, 27,8% das pacientes com tumores malignos deixariam de ser encaminhadas a serviços terciários e enquanto na pós-menopausa este valor seria menor, apenas 16,7% das pacientes.

Na identificação específica dos carcinomas a sensibilidade obtida foi de 87,1% e a especificidade de 57,3%.

TABELA 9 - Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN de HE4 em pacientes na pré e pós-menopausa.

HE4 (70 pM)	**Sensibilidade**	**Especificidade**	**VPP**	**VPN**
Pré	72,2%	82,8%	72,2%	82,8%
Pós	83,3%	54,1%	63,8%	76,9%

Apenas um caso de carcinoma primário de ovário deixou de ser identificado com o uso do HE4. Porém, esta paciente apresentava valor de CA 125 = 1127 U/mL, índice bastante alto que chamaria a atenção para o encaminhamento desta paciente. Os demais casos não identificados com uso de HE4 possuíam a seguinte histologia: um tumor metastático de mama (previamente diagnosticado), um tumor metastático do TGI, cinco tumores mucinosos de BPM, um tumor seroso de BPM e um tumor derivado dos cordões sexuais. As Tabelas 10 e 11 mostram as porcentagens dos diferentes tipos histológicos dos tumores benignos com CA 125 e HE4 acima

dos valores de corte e dos tumores malignos com CA 125 e HE4 abaixo do nível de corte, respectivamente.

TABELA 10 - Porcentagem de pacientes com valores de CA 125 e HE4 acima do valor de corte nas neoplasias benignas

Tipo Histológico	*CA 125 >35 U/mL*	*HE4 > 70 pM*
Endometriose (n=13)	92,3%	23,1%
Teratoma (n=16)	12,5%	31,3%
Fibroma (n=4)	25%	50%
Cistoadenoma mucinoso (n=11)	0%	27,3%
Cistoadenoma seroso (n=14)	7,1%	31,3%
Cisto simples (n=6)	16,7%	33,3%
Tumor de Brenner (n=2)	0%	50%

TABELA 11 - Porcentagem de pacientes com valores de CA 125 e HE4 acima do valor de corte nas neoplasias malignas

Tipo Histológico	*CA 125 >35 U/mL*	*HE4 > 70 pM*
Adenocarcinoma seroso (n=16)-	100%	93,8%
Adenocarcinoma mucinoso (n=3)	66,7%	100%
Adenocarcinoma endometrióide (n-3)	100%	100%
Carcinoma de células claras (n=1)	100%	100%
Metastático mama (n=1)	0%	0%
Metastático colo (n=1)	0%	100%
Metastático TGI* (n=5)	100%	60%
Carcinossarcoma (n=1)	100%	100%
Tumor de células da granulosa (n=4)	50%	100%
Tumor de células de Leydig (n=1)	0%	0%
Tumor de células Esteroídicas (n=1)	0%	100%
Borderline mucinoso	18,2%	54,5%
Borderline seroso	66,7%	83,3%

*TGI = Trato Gastrointestinal

Quando os tumores de BPM foram considerados de baixo risco, houve um incremento das taxas de sensibilidade tanto do CA125 como do HE4 (Tabela 12).

TABELA 12 - Sensibilidade e Especificidade de CA 125 e HE4 quando tumores de BPM foram classificados como tumores de baixo risco

	CA 125(35U/mL)	**HE4** (70 pM)
Sensibilidade	83,8%	86,5%
Especificidade	71,1%	60,2%

4.4 ROMA e IRM

Foram obtidas as médias e medianas do algoritmo ROMA e do IRM. As médias e medianas dos tumores malignos em relação aos benignos foram bastante superiores, tanto na avaliação do ROMA quanto do IRM. As médias e medianas, assim como os valores mínimos e máximos de ROMA e IRM podem ser observados nas Tabelas 13 e 14.

TABELA 13 - Médias, valores mínimos e máximos do algoritmo ROMA

	Média (DP)	**Mediana (valores mínimos e máximos)**
Benignos	15,3% ± 11,1%	13,3% (8 - 42)
Malignos	48,8% ± 30,6%	52,2% (0-99,9)

TABELA 14 - Médias, valores mínimos e máximos do IRM

	Média (DP)	Mediana (valores mínimos e máximos)
Benignos	72,3 ± 105,4	29,4 (0 – 496,8)
Malignos	1411,5 ± 3669,8	358,6 (0-25704,0)

A sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram calculados para os para ROMA e IRM na pré e na pós-menopausa e considerando todas as pacientes. Os valores de corte utilizados nesta avaliação foram: ROMA = 13,1% na pré–menopausa e ROMA = 27,7% na pós - menopausa, IRM = 200.

A sensibilidade encontrada para o ROMA foi superior à do IRM tanto na pré como na pós–menopausa. Neste caso, 22,2% das pacientes deixariam de ser encaminhadas a serviços terciários para serem tratadas. A especificidade do IRM foi bastante elevada principalmente na pós – menopausa. Os valores de VPP na avaliação do IRM foram também bastante elevados. Nas Tabelas 15 e 16, pode-se observar a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, na pré e pós-menopausa tanto do ROMA como IRM. Na avaliação global, as sensibilidades do ROMA e IRM foram 74,1% e 63,0%, respectivamente.

Na identificação específica dos carcinomas utilizando-se o ROMA a sensibilidade obtida foi de 80% na pré e 95,2% na pós–menopausa. Já a especificidade foi de 59,5% na pré e 75,0% na pós–menopausa.

TABELA 15 - Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN de ROMA em pacientes na pré e pós-menopausa.

ROMA	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Pré (13,1%)	77,8%	69,0%	60,9%	83,3%
Pós (27,7%)	72,2%	81,1%	78,8%	75,0%

TABELA 16 - Sensibilidade, Especificidade, VPP e VPN de IRM em pacientes na pré e pós-menopausa.

IRM (200)	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Pré	72,2%	89,7%	81,3%	83,9%
Pós	58,3%	94,6%	91,3%	70,0%

Na identificação específica dos carcinomas utilizando-se o IRM a sensibilidade obtida foi de 87,1% e a especificidade de 80,9%.

O IRM diferenciou 76,9% dos casos de endometriose enquanto o ROMA apenas 46,2%. A média dos valores do IRM nestas pacientes foi de 126,5 enquanto a do ROMA foi de 12,4%, valor muito próximo ao nível de corte deste parâmetro.

Entre os tumores malignos, o algoritmo ROMA não foi capaz de diferenciar dois tumores metastáticos do TGI, um tumor metastático de mama, um adenocarcinoma seroso, quatro tumores dos cordões sexuais, seis tumores mucinosos de BPM e dois tumores serosos de BPM. Já o IRM não foi capaz de diferenciar um tumor metastático de colo, um tumor metastático da mama, um adenocarcinoma mucinoso, um adenocarcinoma

seroso, um carcinossarcoma, oito tumores mucinosos de BPM, três tumores serosos de BPM e quatro tumores do cordão sexual.

Assim como os marcadores tumorais, houve um incremento das taxas de sensibilidade tanto do ROMA como do IRM quando os tumores de BPM foram considerados de baixo risco. (Tabela 17).

TABELA 17 - Sensibilidade e Especificidade de ROMA e IRM quando tumores de BPM foram classificados como tumores de baixo risco

	ROMA Estado Hormonal		**IRM** (200)
	Pré (13,1%)	Pós(27,7%)	
Sensibilidade	83,3%	84%	75,7%
Especificidade	62,9%	75%	86,7%

4.5 Curvas ROC

Com o intuito de comparar a acurácia dos quatro métodos entre si foram construídas curvas ROC para CA125, HE4, ROMA e IRM (Figuras 1 a 4). A Figura 5 mostra a comparação de todas as curvas.

FIGURA 1 - Curva ROC para CA 125

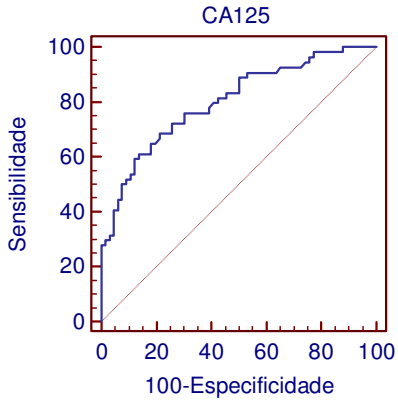


FIGURA 2 - Curva ROC para HE4

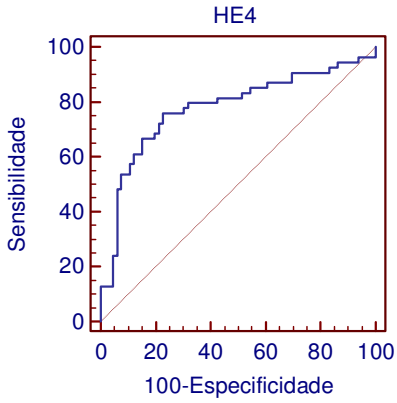


FIGURA 3 - Curva ROC para ROMA

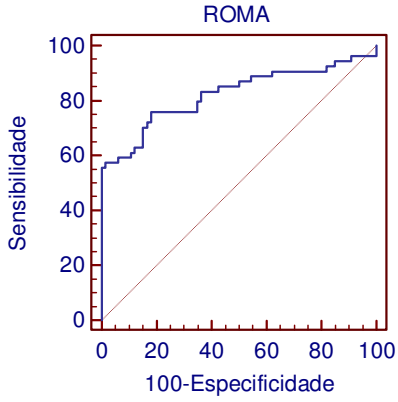


FIGURA 4 - Curva ROC para IRM

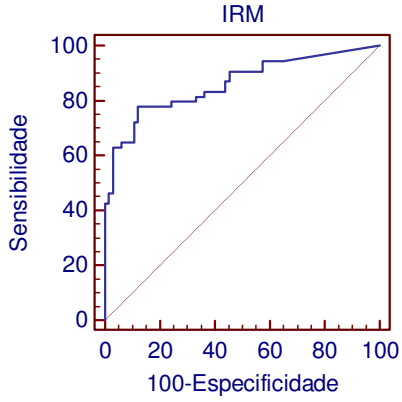
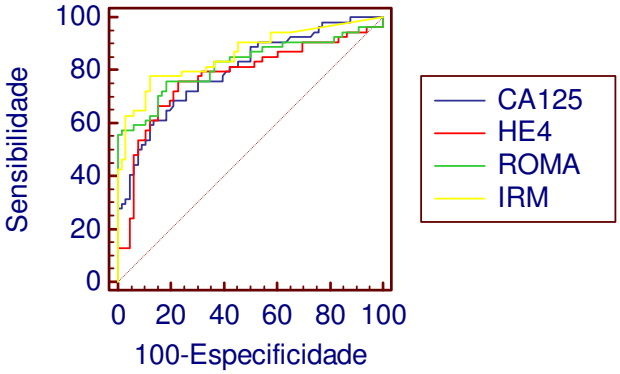


FIGURA 5 - Curvas ROC de CA 125, HE4, ROMA e IRM



As áreas abaixo da curva foram também calculadas. O método que apresentou maior AUC foi o IRM, ou seja, mostrou ter maior acurácia. Porém, quando comparadas as áreas entre si, não houve diferença significante. Na Tabela 18, observam-se as áreas abaixo da curva de cada um dos parâmetros avaliados.

TABELA 18 - Áreas das curvas ROC de CA 125, HE4, ROMA e IRM

	AUC*	IC95%**	Valor p
CA 125	0,802	0,719 – 0,869	<0,0001
HE4	0,777	0,692 – 0,848	<0,0001
ROMA	0,824	0,743 – 0,887	<0,0001
IRM	0,861	0,786 – 0,917	<0,0001

*AUC: Área abaixo da curva ROC
**IC: Intervalo de Confiança

Foi realizada comparação pareada entre as curvas ROC para avaliar se havia diferença estatística entre elas. As comparações das curvas entre os dois marcadores tumorais e entre ROMA e IRM não tiveram diferença estatística entre si. Na Tabela 19, podem-se notar as comparações. A única comparação das áreas abaixo da curva que houve diferença estatística foi entre HE4 e ROMA (p=0,03) na avaliação global e pós–menopausa (p=0,05).

TABELA 19 - Comparação das áreas das curvas ROC entre marcadores tumorais, ROMA e IRM

	Diferença das áreas	IC95%*	Valor p
CA 125 x HE4	0,024	-0,0886 - 0,137	0,675
ROMA x IRM	0,038	-0,0536 - 0,128	0,419

*IC: Intervalo de Confiança

Efetuou-se análise separada dos quatro parâmetros na pré e na pós–menopausa. Curvas ROC foram construídas para cada um dos dois grupos para analisar cada um dos parâmetros: CA 125, HE4, ROMA e IRM (Figuras 6 a 15).

FIGURA 6 - Curva ROC para CA 125 em pacientes na pré – menopausa

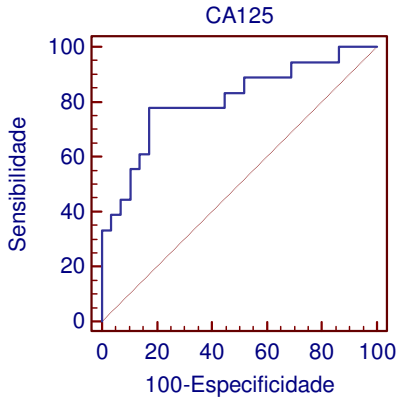


FIGURA 7 - Curva ROC para HE4 em pacientes na pré – menopausa

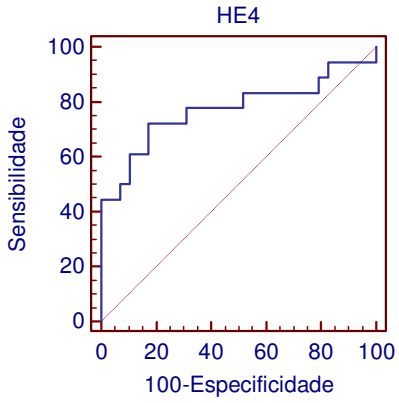


FIGURA 8 - Curva ROC para ROMA em pacientes na pré menopausa

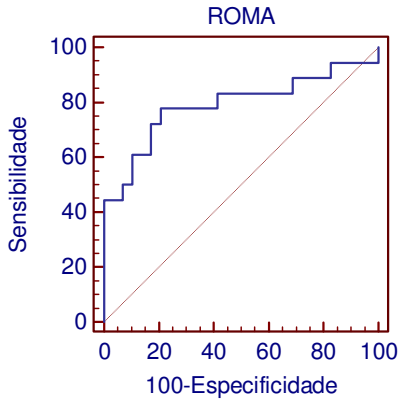


FIGURA 9 - Curva ROC para IRM em pacientes na pré menopausa

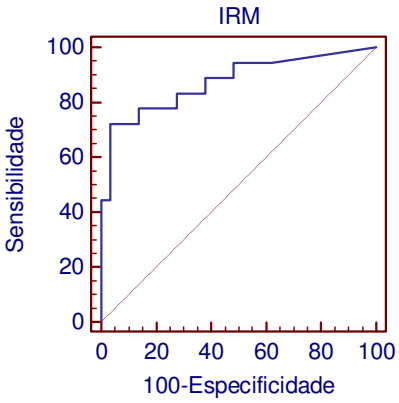


FIGURA 10 - Curvas ROC de CA 125, HE4, ROMA e IRM em pacientes na pré menopausa

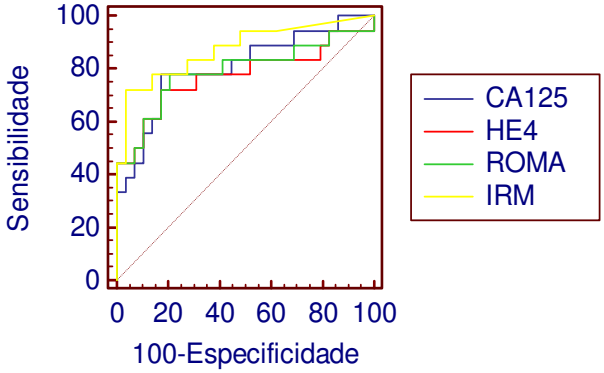


FIGURA 11 - Curva ROC para CA 125 em pacientes na pós menopausa

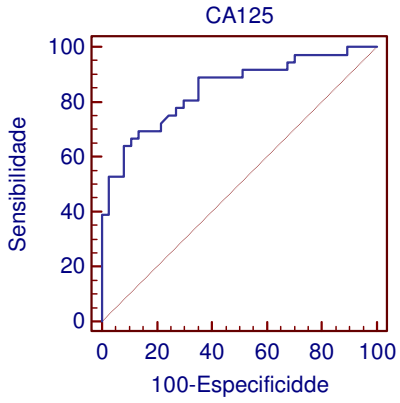


FIGURA 12 - Curva ROC para HE4 em pacientes na pós menopausa

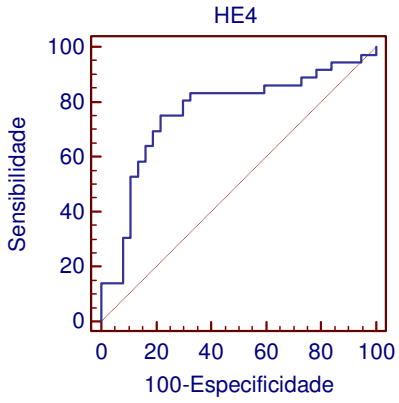


FIGURA 13 - Curva ROC para ROMA em pacientes na pós menopausa

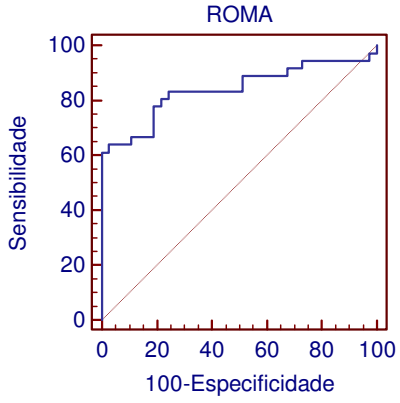


FIGURA 14 - Curva ROC para IRM em pacientes na pós menopausa

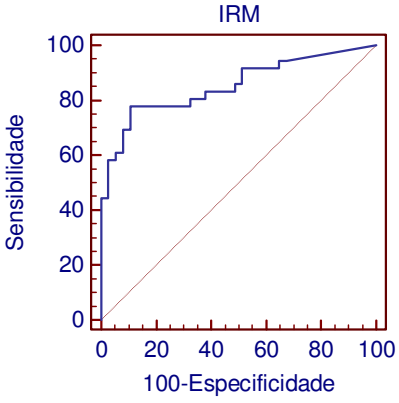
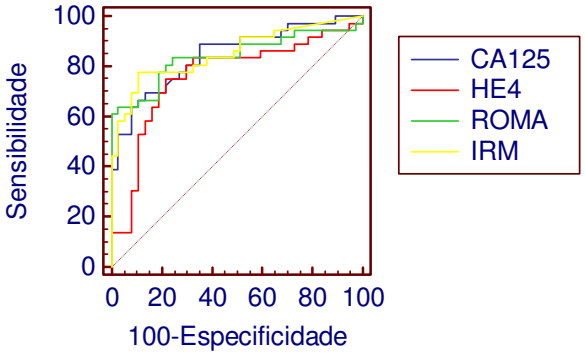


FIGURA 15 - Curvas ROC de CA 125, HE4, ROMA e IRM em pacientes na pós menopausa



A Tabela 20 mostra o melhor valor de corte obtido para CA 125, HE4, ROMA e IRM tanto na pré como na pós-menopausa e suas respectivas sensibilidades e especificidades. Foram encontrados valores de corte do HE4 e ROMA na pré-menopausa semelhante ao valor de corte padrão. O ROMA e IRM apresentaram tanto nos melhores valores de corte como no valor de corte padrão, especificidade muito boa, porém, a baixa sensibilidade dos métodos ainda deixaria de referenciar 25% de pacientes doentes.

TABELA 20 - Sensibilidade e especificidade do CA 125, HE4, ROMA e IRM na pré e pós - menopausa no melhor valor de corte e valor de corte padrão.

			Melhor valor de corte			Valor de corte padrão****		
	Marcador	ROC* AUC	Valor corte	S** (%)	E*** (%)	Valor corte	S** (%)	E*** (%)
Todos	CA 125	0,802	59 U/mL	61,1	86,4	35 U/mL	70,4	74,2
	HE4	0,777	87 pM	75,9	77,3	70 pM	79,6	66,7
	ROMA	0,824	23,3%	75,9	81,8	*****	74,1	75,8
	IRM	0,861	113,1	77,8	87,9	200	63	92,4
Pré	CA 125	0,807	96 U/mL	77,8	82,8	35 U/mL	83,3	55,2
	HE4	0,774	68 pM	72,2	82,8	70 pM	72,2	82,8
	ROMA	0,791	13,9%	77,8	79,3	13,1%	77,8	69,0
	IRM	0,875	244	72,2	96,6	200	72,2	89,7
Pós	CA 125	0,846	24 U/mL	69,4	86,5	35 U/mL	63,9	89,2
	HE4	0,762	104 pM	75,0	78,4	70 pM	83,3	54,1
	ROMA	0,840	39,7%	63,9	97,3	27,7%	72,2	81,1
	IRM	0,853	113,0	77,8	89,2	200	58,3	94,6

*ROC/AUC = área abaixo da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*)
**S = Sensibilidade
***E = Especificidade
**** Valores de corte padrão: CA 125 segundo Bast *et al.* 1983[74], HE4 segundo Moore *et al.* 2008[42], ROMA segundo Moore *et al.* 2010[108] e IRM segundo Jacobs *et al.* 1990[46]
***** Os valores de corte para o ROMA são diferentes para pré e pós-menopausa[108]

5 DISCUSSÃO

O câncer de ovário é uma doença altamente letal e requer ser tratado por equipe especializada habituada no tratamento desta doença para se obter o melhor prognóstico. Além do estadiamento cirúrgico, que é fundamental para a decisão de tratamento adjuvante, a citorredução ótima tem impacto na sobrevida dessas pacientes. Acredita-se que 20 a 30% dos casos supostamente em estádios iniciais são falsamente estadiados, e encontram-se, na verdade, em estádios mais avançados[110,111]. Isto, muitas vezes, ocorre quando as pacientes são tratadas por profissionais não especialistas. Além disso, estudos evidenciam melhor taxa de sobrevida quando as pacientes com câncer de ovário são tratadas inicialmente em centros terciários por ginecologistas oncológicos afeitos à citorredução ótima[112-114].

Nos Estados Unidos estima-se que uma em cada cinco mulheres será submetida a tratamento cirúrgico por tumores anexiais alguma vez ao longo de sua vida[115]. Mais de 90% das neoplasias ovarianas na pré-menopausa são benignas e este valor cai para 60% na pós-menopausa. Os centros terciários não conseguiriam tratar todas estas pacientes[116]. A utilização de um método capaz de diferenciar as neoplasias benignas e malignas é fundamental para se criar um sistema de referenciamento para estas pacientes.

A utilização de marcadores tumorais, índices de risco e algoritmos podem ser úteis na diferenciação de tumores ovarianos auxiliando no referenciamento adequado dessas pacientes.

Desde o desenvolvimento da dosagem sérica do CA 125 em 1985[64], este teste vem sendo usado como marcador tumoral. A sua sensibilidade no diagnóstico de carcinoma de ovário encontrada por vários autores variou de 69 a 97%[10,43,74,101,117-120]. Em nosso estudo, foi calculada a sensibilidade do CA 125 na avaliação de tumores ovarianos utilizando-se o valor de corte de 35U/mL. Encontramos sensibilidade de 70,4%, o que está de acordo com o observado na literatura. Como no presente estudo, Van Gorp *et al.*, também não descartaram os tumores de BPM na sua avaliação e obtiveram sensibilidade de 79,5%, valor ligeiramente superior ao encontrado por nós[121].

Os tumores de BPM interferem na avaliação de sensibilidade e especificidade. Jacob *et al.*, avaliou tumores benignos *versus* malignos não considerando os tumores de BPM e, paralelamente, avaliou os tumores benignos *versus* tumores de BPM. Obtiveram sensibilidade e especificidade de 69% e 90,1% no primeiro grupo e de 12,5% e 90,1% no segundo grupo, respectivamente[122]. Muito provavelmente os valores de sensibilidade encontrados na amostra do presente estudo são baixos porque os tumores de BPM foram considerados como de alto risco. Se agrupássemos essas neoplasias no grupo de baixo risco, obteríamos sensibilidade de 83,8%, especificidade de 71,1% e VPN de 90,8%. De igual modo, todos os outros parâmetros do estudo tiveram aumento do valor da sensibilidade quando os tumores de BPM foram considerados tumores de baixo risco: HE4 (86,5%

versus 79,7%), ROMA (83,8% *versus* 74,1%) e IRM (75,7% *versus* 63%). Assim, à luz desses dados, a inclusão dos tumores de BPM como tumores de baixo risco para referenciamento das pacientes para centros terciários parece ser adequada. Estes tumores têm bom prognóstico em 5 anos sendo de 98% nos estádios I e 90% nos estádios III sem implantes invasivos. Além disso, não é infrequente o diagnóstico de tumores de baixo potencial de malignidade apenas quando a peça cirúrgica é avaliada como um todo (principalmente nos tumores de BPM do tipo mucinoso). Após o diagnóstico, estas pacientes precisam ser adequadamente estadiadas cirurgicamente. Ou seja, se essas pacientes fossem operadas em centros não especializados ainda poderiam ser encaminhadas para centros terciários para adequado estadiamento sem comprometimento do seu prognóstico[123].

Desta forma, poucas pacientes com diagnóstico de neoplasias malignas deixariam de ser tratadas em serviços especializados. Em nossa série, as histologias dos tumores malignos que apresentaram valores de CA 125 menores que 35 U/mL foram: dois tumores da granulosa, um tumor de células de Leydig, um tumor de células esteroídicas, um tumor metastático de mama (previamente diagnosticado) e um tumor de colo uterino (previamente diagnosticado). Os tumores derivados dos cordões sexuais (tumores de células da granulosa, células de Leydig e células esteroídicas) são tumores raros. Muitas vezes, as massas ovarianas são encontradas na investigação de pacientes apresentando sinais de aumento de produção hormonal. Como exemplo, temos a hiperestrogenização do endométrio causando sangramentos anormais ou puberdade precoce no caso dos

tumores de células da granulosa ou virilização nos tumores de células de Leydig. O prognóstico desses tumores é bom e são encontrados na maioria das vezes em estádios iniciais devido aos sinais e sintomas que podem provocar. As pacientes em idade fértil podem ser submetidas a cirurgias conservadoras[124]. Além disso, esses tumores podem ter recorrência após muitos anos do seu tratamento, mostrando seu carácter indolente, o que não mudaria o prognóstico das pacientes eventualmente tratadas por não especialistas em um primeiro momento e referenciadas para serviços terciários após o diagnóstico. As duas pacientes com tumores metastáticos não mudariam o prognóstico de sua doença por serem tratadas em serviços terciários, mas provavelmente já estariam sendo seguidas nestes serviços pelo tumor primário.

Moore *et al.* em 2008[42], analisaram a sensibilidade e especificidade do novo marcador tumoral HE4. Obtiveram sensibilidade de 72,9% e especificidade de 95%. Porém, na análise desses autores[42], foram excluídos nove tumores de baixo potencial de malignidade, dois cânceres de ovário não epiteliais e 13 tumores metastáticos para o ovário. Ruggeri *et al.* em 2011, registraram sensibilidade de 84,4% e especificidade de 90%, porém foram considerados apenas os tumores epiteliais sendo também excluídos os tumores BPM e outros cânceres de ovário[124]. Van Gorp *et al.* [121], como em nossa amostra, consideraram os tumores de BPM como malignos e encontraram sensibilidade de 74,5%, valor maior que o encontrado por Moore *et al.*[42]. Em nossa casuística não foram excluídos os tumores de baixo potencial de malignidade nem os não epiteliais, uma vez que, previamente à

cirurgia não é possível saber o diagnóstico anatomopatológico da lesão ovariana. Neste caso, analisando-se o HE4 como marcador isolado obteve-se, mesmo assim, valor de sensibilidade (79,6%) maior que o relatado por Moore *et al.*, 2008[42]. Se analisarmos a nossa amostra considerando os tumores de baixo potencial de malignidade como sendo de baixo risco, a sensibilidade seria de 86,5% com VPN de 90,9%.

Outra análise interessante é a diferenciação dos casos de endometriose utilizando os marcadores CA 125 e HE4. Nesta amostra, 92,3% (12/13) das pacientes com endometriose tinham valores de CA 125 acima de 35U/mL. A endometriose é uma doença benigna que mais frequentemente interfere na avaliação de diferenciação de benignidade e malignidade de tumores ovarianos por aumentar muito os resultados falso positivos. Nos casos analisados, somente três (23,1%) das pacientes com endometriose apresentavam valores de HE4 superiores a 70 pM. Tal achado sugere que este marcador pode vir a ser fonte de avaliações futuras especificas desta doença. Huhtinen *et al.*, em seu estudo, também confirmaram que os valores de CA 125 estão elevados nos casos de endometriose enquanto os níveis de HE4 não se encontravam elevados[101].

Na avaliação dos tumores malignos, apenas um caso com histologia epitelial deixou de ser diferenciado através do marcador HE4. Porém, o nível de CA 125 achava-se bastante elevado (1127 U/mL), o que o teria diferenciado. As demais pacientes com HE4 menores que 70 pM apresentavam as seguintes histologias: dois tumores metastáticos do trato gastrointestinal e um tumor de células de Leydig. Esta avaliação é

importante por mostrar a capacidade do HE4 em identificar corretamente os carcinomas de ovário que são os cânceres com maior impacto na citorredução ótima primária. Quando comparamos os marcadores CA 125 e HE4, o CA 125 esteve abaixo de 35U/mL em 16,2% (seis casos) dos tumores malignos e o HE4 esteve abaixo de seu nível de corte em 8,1% (três casos).

Em 2009, Moore *et al.*, propuseram a criação de um algoritmo utilizando os dois marcadores CA 125 e HE4, levando-se em conta o estado menopausal, para potencializar a acurácia na determinação de massas ovarianas por utilizar apenas medidas objetivas quantitativas[102]. Encontraram sensibilidade de 88,7% e especificidade de 74,7%, quando avaliadas tanto as pacientes na pré como na pós-menopausa. Na análise dos nossos, os valores de sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, 74,1% e 75,8%. Provavelmente os valores mais baixos encontrados nesta análise ocorreram por considerarmos os carcinomas, os tumores não epiteliais e os tumores de BPM como tumores de alto risco, ao contrário de Moore *et al.* que não consideraram os tumores não epiteliais em sua análise[102]. Em outro estudo realizado em 2010, Moore *et al.* [48], avaliaram novamente os casos benignos versus os carcinomas epiteliais e também analisaram os casos benignos versus os carcinomas incluindo os tumores de BPM. Fixando-se a especificidade em 75 %, obtiveram sensibilidade de 94,3% no primeiro grupo e de 89% no segundo grupo. Assim, os tumores de BPM reduzem a sensibilidade na avaliação das massas anexiais quando associadas ao grupo de tumores de alto risco.

Outro método que pode ser utilizado na diferenciação de massas ovarianas benignas e malignas é a utilização de IRM criado por Jacobs *et al.,* em 1990[46]. Estes autores encontraram sensibilidade de 85,4% e especificidade de 96,9%, utilizando valor de corte de 200. Neste estudo, a sensibilidade e a especificidade encontradas tiveram valores mais baixos e foram de 66,7% e 87,9% respectivamente. No trabalho de Jacobs *et al.* [46]*,* a heterogeneidade de tipos histológicos foi menor, o que pode ter causado esta diferença. A heterogeneidade de tipos histológicos em nossa casuística e a contemplação de todos na análise torna a avaliação dos dados mais realística. A avaliação dos casos considerando os tumores de BPM como tumores de baixo risco, melhora os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN, que foram de 78,4%, 81,9%, 65,9% e 89,5%, respectivamente.

A avaliação da acurácia dos quatro métodos analisados (CA 125, HE4, ROMA e IRM) foi feita por meio do cálculo das áreas abaixo das curvas ROC de cada uma delas separadamente e, posteriormente, comparando-as entre si. A AUC para o IRM teve globalmente e numericamente o melhor valor, porém não houve diferença nas áreas na comparação dos quatro métodos.

A área abaixo da curva encontrada por Moore *et al.* em relação ao algoritmo ROMA foi superior ao verificado em nosso estudo (91,3% *versus* 82,4%)[48]. Quanto ao IRM, Moore *et al.* [48], registraram valor da área abaixo da curva ROC bastante semelhante ao nosso (84,4% *versus* 85,5%). Ao contrário de Moore *et al.* [48], a comparação entre as áreas abaixo das curvas ROC do algoritmo ROMA e do IRM não tiveram diferença (p=0,50). Quando

avaliados os valores das áreas abaixo da curva ROC dos marcadores CA 125 e HE4 obtiveram-se os valores 80,2% e 77,7%, porém sem diferença entre si (p=0,67). Já na avaliação destes marcadores tumorais feita por Moore *et al.*, os respectivos valores foram 83,6% e 90,8%.

Pela análise das curvas ROC também foi possível calcularmos o melhor valor de corte. Assim, o melhor valor de corte de CA 125 (CA 125 = 58,6U/mL) foi superior ao encontrado por Bast *et al.* (1983) (CA 125 = 35U/mL)[74]. Van Gorp *et al.*, em 2011, registraram valor de corte semelhante ao nosso (CA 125 = 62,5 U/mL)[121]. Na pré-menopausa, o melhor valor de corte foi menor que neste estudo (83,8 U/mL *versus* 95,6 U/mL), porém muito superior ao valor padronizado[121]. Com o marcador tumoral HE4 também foi encontrado valor superior (HE4 = 87,4pM) ao descrito por Moore *et al.* (HE4 = 70pM) como melhor valor de corte[46]. Van Gorp *et al.*, encontraram valor de corte semelhante ao nosso para as pacientes na pré–menopausa (66,0 U/mL *versus* 68,2 U/mL). Em relação à avaliação global e na pós-menopausa, o grupo de Van Gorp *et al.*[121] observaram valores mais próximos aos de Moore *et al.* [42]. O melhor valor encontrado para o algoritmo ROMA foi de 13,97% na pré-menopausa, muito semelhante ao valor encontrado por Moore *et al.* (13,1%) e de 39,68% na pós-menopausa, valor superior ao notado por Moore *et al.* (27,7%)[48]. Van Gorp *et al.* encontraram valores de corte mais próximos ao de nosso estudo, 22,2% *versus* 23,3% na avaliação global; 16,6% *versus* 13,97% na pré–menopausa e 35,9% *versus* 39,7% na pós-menopausa[121]. O valor de corte do IRM também foi maior (IRM

= 275,7) que o verificado por Jacobs *et al.*(IRM = 200) em seu artigo original[46].

Por fim, nenhum dos quatro métodos estudados é o ideal na diferenciação de tumores ovarianos. Podem ser úteis em situações específicas como é o caso do HE4 na avaliação de pacientes na pré-menopausa com suspeita de endometriose. A acurácia dos quatro métodos é equivalente e podem ser utilizados indistintamente para referenciar pacientes para serviços especializados no tratamento de câncer de ovário

6 CONCLUSÕES

1. O marcador CA 125 isoladamente mostrou ser eficiente na diferenciação dos carcinomas ovarianos primários. Entre as pacientes na pré–menopausa foi o parâmetro com melhor sensibilidade;

2. O marcador HE4 apresentou a melhor sensibilidade global na avaliação dos tumores malignos de ovário e também no diagnóstico diferencial de endometriose. Entre as pacientes na pós–menopausa foi o parâmetro com melhor sensibilidade. Mostrou-se superior em pacientes na pré-menopausa, na diferenciação de carcinomas ovarianos e endometriose;

3. O algoritmo ROMA mostrou menor sensibilidade do que os marcadores CA125 e HE4 na avaliação global, porém, foi bastante semelhante ao CA 125 quando considerados os tumores de baixo potencial de malignidade como tumores de baixo risco;

4. O IRM foi o parâmetro com menor sensibilidade, porém numericamente com melhor acurácia entre os quatro métodos.

5. Todos os parâmetros melhoraram o desempenho de sensibilidade quando os tumores de BPM foram considerados tumores de baixo risco o que é uma avaliação aceitável com objetivo de refereciamento de pacientes para centros terciários.

6. Os quatro parâmetros estudados, CA 125, HE4, IRM e ROMA, apresentam acurácia equivalentes quando o objetivo for selecionar pacientes de alto risco para referenciá-las a serviços de especializados em câncer.

7 ANEXOS

Anexo A: Aprovação do projeto pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

HC

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18/02/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1067/08**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA COMBINAÇÃO DE MARCADORES TUMORAIS (CA 125, DHL, COLESTEROL TOTAL E HE4) NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE CISTOS OVARIANOS**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Jesus Paula Carvalho**
Pesquisador (a) Executante: **Cristina Anton**

CAPPesq, 19 de Fevereiro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO……
Nº ..... .APTO: .....
BAIRRO:..... CIDADE.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: .....
Nº ..... APTO: .....
BAIRRO:.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Avaliação de uma nova combinação de marcadores tumorais (CA 125, DHL, Colesterol total e HE4) no diagnóstico diferencial de cistos ovarianos.**

PESQUISADOR: Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho
CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado FMUSP
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRM 35885
UNIDADE DO HCFMUSP: Ginecologia

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO □ RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO x RISCO MAIOR □

3. DURAÇÃO DA PESQUISA :24 meses

1 – Pacientes com diagnóstico clínico e ultrassonográfico de cistos anexiais com indicação de tratamento cirúrgico, farão coleta de 10 mL de sangue periférico, fluido peritoneal e líquido do cisto ovariano, no dia da cirurgia para dosagem dos marcadores: HE4, CA 125, Dehidrogenase láctea (DHL) e Colesterol total. Todas as pacientes serão submetidas a exérese da massa ovariana e exame anatomopatológico.

2 – Serão colhidos: a) uma amostra de sangue de 2 mL, b)amostra do líquido encontrado na cavidade abdominal no momento da cirurgia e c) amostra do líquido presente dentro do cisto do ovário.
3 – A cirurgia para o cisto de ovário será feita da forma costumeira.
4 – Não haverá desconforto adicional.
5 – Benefícios para o participante: Não existe benefício direto previsto. Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que o estudo dos marcadores tumorais possam predizer a natureza benigna ou maligna dos cisto ovarianos. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.
6 – Não existem procedimentos alternativos.
7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr *Jesus Paula Carvalho*. que pode ser encontrado no endereço *Clínica Ginecológica da FMUSP* Telefone(s) 3069-7621. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em

qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo" Avaliação de uma nova combinação de marcadores tumorais (CA 125, DHL, Colesterol total e HE4) no diagnóstico diferencial de cistos ovarianos"
Eu discuti com o Dr. *Jesus Paula Carvalho)*. sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

8 REFERÊNCIAS

1. Tavassoli FA, Devilee P. (Eds.): World Health Organization Classification of tumors. *Pathology and Genetics. Tumours of the Breast and Female Genital Organs.* IARC Press: Lyon 2003.

2. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1511-8.

3. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology and prognostic factors. *Semin Surg Oncol.* 2000;19(1):3-10.

4. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.

5. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, *et al*. Carcinoma of the ovary. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006;95 (Suppl 1):S161-92.

6. Andersen MR, Goff BA, Lowe KA, Scholler N, Bergan L, Dresher CW, *et al*. Combining a symptoms index with CA 125 to improve detection of ovarian cancer. *Cancer*. 2008;113(3):484-9.

7. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, *et al*. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):71-96.

8. van Nagell JR Jr, DePriest PD, Gallion HH, Pavlik EJ. Ovarian Cancer Screening. *Cancer*. 1993;71(Suppl4):1523-1528.

9. Anderson GL, McIntosh M, Wu L, Barnett M, Goodman G, Thorpe JD *et al*. Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(1):26-38.

10. Andersen MR, Goff BA, Lowe KA, Scholler N, Bergan L, Drescher CW, *et al*. Use of a Symptom Index, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2010;116(3):378-83.

11. Smith LH, Morris CR, Yasmeen S, Parikh-Patel A, Cress RD, Romano PS. Ovarian cancer: can we make the clinical diagnosis earlier? *Cancer*. 2005;104(7):1398-407.

12. Vine MF, Calingaert B, Berchuck A, Schildkraut JM. Characterization of prediagnostic symptoms among primary epithelial ovarian cancer cases and controls. *Gynecol Oncol*. 2003;90(1):75-82.

13. Goff BA, Mandel LS, Melancon CH, Muntz HG. Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA*. 2004;291(22):2705-12.

14. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127(12):2893-917.

15. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. Bethesda: 2010.

16. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. INCA. *Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional.* volume 3. Rio de Janeiro: INCA; 2003.

17. Quirk JT, Natarajan N. Ovarian cancer incidence in the United States, 1992-1999. *Gynecol Oncol*. 2005;97(2):519-23.

18 Parker RT, Currie JL. Metastatic tumors of ovary. In: Coppleson M, editor. Gynecologic oncology.2nd ed. v.2. New York: Churchill Livingstone; 1992, p. 987–99.

19 Young RH, Path FRC, Scully RE. Metastatic tumors of the ovary. In: Kurman RJ, editor. Blaustein's pathology of the female genital tract.4th ed. New York: Springer-Verlag; 1994, p. 939–74.

20. Kurman RJ, Shih Ie M. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol*. 2008;27(2):151-60.

21. Kurman RJ, Shih Ie M. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A Proposed Unifying Theory. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:433–443.

22. Veras E, Mao TL, Ayhan A, Ueda S, Lai H, Hayran M, *et al*. Cystic and adenofibromatous clear cell carcinomas of the ovary: distinctive tumors that differ in their pathogenesis and behavior: a clinicopathologic analysis of 122 cases. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:844–853.

23. Martin DC. Cancer and endometriosis: do we need to be concerned? *Semin Reprod Endocrinol.* 1997;15:319–324.

24. Seidman JD, Khedmati F. Exploring the histogenesis of ovarian mucinous and transitional cell (Brenner) neoplasms and their relationship with Walthard cell nests: a study of 120 tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:1753–1760.

25. Boyd J. Molecular genetics of hereditary ovarian cancer. *Oncology* (Williston Park). 1998;12(3):399-406; discussion 409-10, 413.

26. Whittemore AS. Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. *Gynecol Oncol*. 1994;55(3 Pt 2):S15-9.

27. Levy DE, Garber JE, Shields AE. Guidelines for genetic risk assessment of hereditary breast and ovarian cancer: early disagreements and low utilization. *J Gen Intern Med.* 2009;24(7):822-8.

28. Russo A, Calò V, Bruno L, Rizzo S, Bazan V, Di Fede G. Hereditary ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;69(1):28-44.

29. Piek JM, Kenemans P, Verheijen RH. Intraperitoneal serous adenocarcinoma: a critical appraisal of three hypotheses on its cause. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(3):718-32.

30. Fathalla, MF. Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*. 1971;2(7716): 163.

31. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van't Veer L, Garber JE, *et al.* Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med*. 2002;346(21):1616-22.

32. Carlson JW, Miron A, Jarboe EA, Parast MM, Hirsch MS, Lee Y, *et al*. Serous tubal intraepithelial carcinoma: its potential role in primary peritoneal serous carcinoma and serous cancer prevention. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4160-5.

33. Gross AL, Kurman RJ, Vang R, Shih IeM, Visvanathan K. Precursor lesions of high-grade serous ovarian carcinoma: morphological and molecular characteristics. *J Oncol*. 2010; 2010:126295. Epub 2010 April 27.

34. Carvalho JP, Carvalho FM. Is Chlamydia-infected tubal fimbria the origin of ovarian cancer? *Med Hypotheses*. 2008;71(5):690-3.

35. Crum CP, Drapkin R, Miron A, Ince TA, Muto M, Kindelberger DW, *et al*. The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007;19(1):3-9.

36. Medeiros F, Muto MG, Lee Y, Elvin JA, Callahan MJ, Feltmate C, *et al*. The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(2):230-6.

37. Seidman JD, Yemelyanova A, Zaino RJ, Kurman RJ. The fallopian tube-peritoneal junction: a potential site of carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol*. 2011;30(1):4-11.

38. Tailor A, Jurkovic D, Bourne TH, Collins WP, Campbell S. Sonographic prediction of malignancy in adnexal masses using multivariate logistic regression analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1997;.10(1):41-7.

39. Timmerman D, Bourne TH, Tailor A, Collins WP, Verrelst H, Vandenberghe K, *et al*. A comparison of methods for preoperative discrimination between malignant and benign adnexal masses: the development of a new logistic regression model. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181(1):57-65.

40. Bourne T, Campbell S, Steer C, Whitehead MI, Collins WP. Transvaginal colour flow imaging: a possible new screening technique for ovarian cancer. *BMJ*. 1989;299(6712):1367-70.

41. Guerriero S, Ajossa S, Garau N, Piras B, Paoletti AM, Melis GB. Ultrasonography and color Doppler-based triage for adnexal masses to provide the most appropriate surgical approach. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(2):401-6.

42. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, *et al*. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2008;108(2):402-8.

43. Nolen B, Velikokhatnaya L, Marrangoni A, De Geest K, Lomakin A, Bast RC Jr, *et al*. Serum biomarker panels for the discrimination of benign from malignant cases in patients with an adnexal mass. *Gynecol Oncol*. 2010;117(3):440-5.

44. Gadducci A, Ferdeghini M, Prontera C, Moretti L, Mariani G, Bianchi R, *et al*. The concomitant determination of different tumor markers in patients with epithelial ovarian cancer and benign ovarian masses: relevance for differential diagnosis. Gynecol Oncol. 1992;44(2):147-54.

45. Hogdall EV, Hogdall CK, Tingulstad S, Hagen B, Nustad K, Xu FJ, *et al.* Predictive values of serum tumour markers tetranectin, OVX1, CASA and CA125 in patients with a pelvic mass. *Int J Cancer.* 2000;89(6):519-23.

46. Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, Turner J, Frost C, Grudzinskas JG. A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990;97(10):922-9.

47. Manjunath AP, Pratapkumar, Sujatha K, Vani R. Comparison of three risk of malignancy indices in evaluation of pelvic masses. *Gynecol Oncol*. 2001;81(2):225-9.

48. Moore RG, Jabre-Raughley M, Brown AK, Robison KM, Miller MC, Allard WJ, *et al*. Comparison of a novel multiple marker assay vs the Risk of Malignancy Index for the prediction of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol.* 2010,203(3):228.e1-6.

49. van Nagell JR Jr, DePriest PD, Ueland FR, DeSimone CP, Cooper AL, McDonald JM, *et al*. Ovarian cancer screening with annual transvaginal sonography: findings of 25,000 women screened. *Cancer*. 2007;109(9):1887-96.

50. Sassone AM, Timor-Tritsch IE, Artner A, Westhoff C, Warren WB. Transvaginal sonographic characterization of ovarian disease: evaluation of a new scoring system to predict ovarian malignancy. *Obstet Gynecol.* 1991;78(1):70-6.

51. Granberg S., Wikland M, Jansson I. Macroscopic characterization of ovarian tumors and the relation to the histological diagnosis: criteria to be used for ultrasound evaluation. *Gynecol Oncol*. 1989;35(2):139-44.

52. DePriest PD, Shenson D, Fried A, Hunter JE, Andrews SJ, Gallion HH, et al. A morphology index based on sonographic findings in ovarian cancer. Gynecol Oncol. 1993; 51(1): 7-11.

53. Ferrazzi E, Zanetta G, Dordoni D, Berlanda N, Mezzopane R, Lissoni AA. Transvaginal ultrasonographic characterization of ovarian masses: comparison of five scoring systems in a multicenter study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997;10(3):192-7.

54. Lerner JP, Timor-Tritsch IE, Federman A, Abramovich G. Transvaginal ultrasonographic characterization of ovarian masses with an improved, weighted scoring system. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170(1 Pt 1):81-5.

55. Timmerman D, Valentin L, Bourne TH, Collins WP, Verrelst H, Vergote I, *et al*. Terms, definitions and measurements to describe the sonographic features of adnexal tumors: a consensus opinion from the International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) Group. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000;16(5):500-5.

56. Valentin L. Use of morphology to characterize and manage common adnexal masses. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(1):71-89.

57. Tekay A, Jouppila P. Validity of pulsatility and resistance indices in classification of adnexal tumors with transvaginal color Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1992;2(5):338-44.

58. Valentin L, Sladkevicius P, Marsal K. Limited contribution of Doppler velocimetry to the differential diagnosis of extrauterine pelvic tumors. *Obstet Gynecol*. 1994;83(3):425-33.

59. Valentin L. Gray scale sonography, subjective evaluation of the color Doppler image and measurement of blood flow velocity for distinguishing benign and malignant tumors of suspected adnexal origin. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1997;72(1):63-72.

60. Blanco EC, Pastore AR, Fonseca AM, Carvalho FM, Carvalho JP, Pinotti JA. Color Doppler sonography with contrast in the differentiation of ovarian tumors. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2003;58(4):185-92.

61. Veyer L, Marret H, Bleuzen A, Simon E, Body G, Tranquart F. Preoperative diagnosis of ovarian tumors using pelvic contrast-enhanced sonography. *J Ultrasound Med*. 2010;29(7):1041-9.

62. Timmerman D, Testa AC, Bourne T, Ameye L, Jurkovic D, Van Holsbeke C, *et al*. Simple ultrasound-based rules for the diagnosis of ovarian cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31(6):681-90.

63. Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK. *Tumor markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Application.* Washington, DC. AACC Press: 2002, v. 1.

64. NCI. Tumor Markers: Questions and Answers. 2006. http://www.cancer.gov.

65. Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest.* 1981;68(5):1331-7.

66. Obrist R, Reilly R, Leavitt T, Knapp RC, Bast RC Jr. Monocyte chemotaxis mediated by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine conjugated with monoclonal antibodies against human ovarian carcinoma. *Int J Immunopharmacol.* 1983.5(4):307-14.

67. Kabawat SE, Bast RC Jr, Bhan AK, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB. Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *Int J Gynecol Pathol*. 1983;2(3):275-85.

68. Auersperg N, Maines-Bandiera S, Booth JH, Lynch HT, Godwin AK, Hamilton TC. Expression of two mucin antigens in cultured human ovarian surface epithelium: influence of a family history of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173(2):558-65.

69. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunologia Celular e Molecular. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p.60-62.

70. Kobayashi H, Tamura M, Satoh T, Terao T. Clinical evaluation of new cancer-associated antigen CA125 II in epithelial ovarian cancers: comparison with CA125. *Clin Biochem*. 1993;26(3):213-9.

71. Niloff JM, Klug TL, Schaetzl E, Zurawski VR Jr, Knapp RC, Bast RC Jr. Elevation of serum CA125 in carcinomas of the fallopian tube, endometrium, and endocervix. *Am J Obstet Gynecol*. 1984;148(8):1057-8.

72. Altaras MM, Goldberg GL, Levin W, Darge L, Bloch B, Smith JA. The value of cancer antigen-125 as a tumor marker in malignant germ cell tumors of the ovary. *Gynecol Oncol*. 1986;25(2):150-9.

73. Cruickshank DJ, Fullerton WT, Klopper A. The clinical significance of pre-operative serum CA 125 in ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987;94(7):692-5.

74. Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, *et al*. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 1983;309(15):883-7.

75. Kafali H, Artuc H, Demir N. Use of CA125 fluctuation during the menstrual cycle as a tool in the clinical diagnosis of endometriosis; a preliminary report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;116(1):85-8.

76. Haga Y, Sakamoto K, Egami H, Yoshimura R, Akagi M. Evaluation of serum CA125 values in healthy individuals and pregnant women. *Am J Med Sci.* 1986;292(1):25-9.

77. Seki K, Kikuchi Y, Uesato T, Kato K. Increased serum CA 125 levels during the first trimester of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1986;65(6):583-5.

78. Bon GG, Kenemans P, Verstraeten R, van Kamp GJ, Hilgers J. Serum tumor marker immunoassays in gynecologic oncology: establishment of reference values. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174(1 Pt 1):107-14.

79. Kafali H, Artunc H, Erdem M. Evaluation of factors that may be responsible for cyclic change of CA125 levels during menstrual cycle. *Arch Gynecol Obstet.* 2007;275(3):175-7.

80. Meden H, Fattahi-Meibodi. A CA 125 in benign gynecological conditions. *Int J Biol Markers.* 1998;13(4):231-7.

81. Abrão MS, Podgaec S, Filho BM, Ramos LO, Pinotti JA, de Oliveira RM. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod.* 1997;12(11):2523-7.

82. Sevinc A, Buyukberber S, Sari R, Kiroglu Y, Turk HM, Ates M. Elevated serum CA-125 levels in hemodialysis patients with peritoneal, pleural, or pericardial fluids. *Gynecol Oncol*. 2000;77(2):254-7.

83. Topalak O, Saygili U, Soyturk M, Karaca N, Batur Y, Uslu T, *et al*. Serum, pleural effusion, and ascites CA-125 levels in ovarian cancer and nonovarian benign and malignant diseases: a comparative study. *Gynecol Oncol.* 2002;85(1):108-13.

84. Urban N, McIntosh MW, Andersen M, Karlan BY. Ovarian cancer screening. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003;17(4):989-1005, ix.

85. Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, *et al*. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15 Suppl 3:274-81.

86. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW, *et al*. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem*. 2008;54(12):11-79.

87. Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA 125: the past and the future. *Int J Biol Markers.* 1998;13(4):179-87.

88. Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene*. 2002;21(17):2768-73.

89. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod.* 1991;45(2):350-7.

90. Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol.* 2006;7(2):167-74.

91. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, Schummer B, Bednarski DW, *et al*. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene*. 1999;238(2):375-85.

92. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, *et al.* Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2000;60(22):6281-7.

93. Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, *et al*. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res*. 2004;10(10):3291-300.

94. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al*. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.

95. Bingle L, Cross SS, High AS, Wallace WA, Rassl D, Yuan G, *et al*. WFDC2 (HE4): a potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung. *Respir Res*. 2006;7:61.

96. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol.* 2006;19(6):847-53.

97. Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod.* 1998;3(2):86-95.

98. Peters DG, Kudla DM, Deloia JA, Chu TJ, Fairfull L, Edwards RP, *et al*. Comparative gene expression analysis of ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium by serial analysis of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(7):1717-23.

99. Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, *et al*. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3):1176-81.

100. Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, *et al*. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63(13):3695-700.

101. Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J, Junnila J, Huvila J, Kujari H, *et al*. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. *Br J Cancer*. 2009;100(8):1315-9.

102. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, *et al*. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*. 2009;112(1):40-6.

103. Giede KC, Kieser K, Dodge J, Rosen B. Who should operate on patients with ovarian cancer? An evidence-based review. *Gynecol Oncol.* 2005;99(2):447-61.

104. Earle CC, Schrag D, Neville BA, Yabroff KR, Topor M, Fahey A, *et al*. Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(3):172-80.

105. Engelen MJ, Kos HE, Willemse PH, Aalders JG, de Vries EG, Schaapveld M, *et al*. Surgery by consultant gynecologic oncologists improves survival in patients with ovarian carcinoma. *Cancer.* 2006;106(3):589-98.

106. Paulsen T, Kjaerheim K, Kaern J, Tretli S, Tropé C. Improved short-term survival for advanced ovarian, tubal, and peritoneal cancer patients operated at teaching hospitals. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16 Suppl 1:11-7.

107. Tingulstad S, Hagen B, Skjeldestad FE, Halvorsen T, Nustad K, Onsrud M. The risk-of-malignancy index to evaluate potential ovarian cancers in local hospitals. *Obstet Gynecol.* 1999;93(3):448-52.

108. Moore RG, Jabre-Raughley M, Brown AK, Robison KM, Miller MC, Allard WJ, *et al.* Comparison of a novel multiple marker assay vs the Risk of Malignancy Index for the prediction of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;203(3): 228 e1-6.

109 DeLong ER, De Long DM, Clarke-Pearson DL. Comparing areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988;44:837-45.

110 Young RC, Decker DG, Wharton JT, Piver MS, Sindelar WF, Edwards BK, *et al*. Staging laparotomy in early ovarian cancer. *JAMA*. 1983;250 :3072 – 6.

111 Wu PC, Qu JY, Lang JH, Huang RL, Tang MY, Lian LJ. Lymph node metastasis of ovarian cancer: a preliminary survey of 74 cases of lymphadenectomy. *Am J Obstet Gynecol.* 1986;155 :1103 – 8.

112 Verleye L, Vergote I, van der Zee AGJ. Patterns of care in surgery for ovarian cancer in Europe. *EJSO.* 2010;36 (Suppl 1):S108-14.

113 Earle CC, Schrag D, Neville BA, Yabroff KR, Topor M, Fahey A, *et al*. Effect of Surgeon Specialty on Processes of Care and Outcomes for Ovarian Cancer Patients. *J Nat Cancer Inst.* 2006;98(3):172 - 180.

114 Mercado C, Zingmond D, Karlan BY, Sekaris E, Gross J, Maggard-Gibbons M, *et al*. Quality of care in advanced ovarian cancer: The importance of provider specialty. *Gynecol Oncol.* 2010;117:18–22.

115 Curtin JP. Management of the adnexal mass. *Gynecol Oncol.* 1994;55(3):S42-6.

116 Enakpene CA, Omigbodun AO, Goecke TW, Odukogbe AT, Beckmann MW. Preoperative evaluation and triage of women withsuspicious adnexal masses using risk of malignancy index. J *Obstet Gynaecol Res.* 2009;35(1):131–138.

117. Mogensen O, Mogensen B, Jakobsen A. CA 125 in the diagnosis of pelvic masses. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1989;25(8):1187-90.

118 Klug TL, Bast RC Jr, Niloff JM, Knapp RC, Zurawski VR Jr. Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic determinant (CA 125) associated with Human epithelial ovarian carcinomas.. C*ancer Res* 1984;44(3):1048-53.

119 Canney PA, Moore M, Wilkinson PM, James RD. Ovarian cancer antigen CA125: a prospective clinical assessment of its role as a tumour marker. *Br J Cancer*. 1984;50(6):765-69.

120 Park Y, Lee JH, Hong DJ, Lee EY, Kim HS. Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian cancer from patients with various gynecologic and non-gynecologic diseases. *Clinical Biochemistry.* 2011;44:884–88.

121 Van Gorp T, Cadron I, Despierre E, Daemen A, Leunen K, Amant F, *et al.* HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Br J Cancer.* 2011;104(5):863-70.

122 Jacob F, Meier M, Caduff R, Goldstein D, Pochechueva T, Hacker N, *et al*. No benefit from combining HE4 and CA125 as ovarian tumor markers in a clinical setting. *Gynecologic Oncology*. 2011;121:487–91.

123 McCluggage WG. The pathology of and controversial aspects of ovarian borderline tumours. *Current Opinion in Oncology*. 2010;22:462–472.

124 Geetha P, Nair MK. Granulosa cell tumours of the ovary. *Aust N Z J of Obst Gynaecol*. 2010;50:216–220.

125 Ruggeri G, Bandiera E, Zanotti L, Belloli S, Ravaggi A, Romani C, *et al*. HE4 and epithelial ovarian cancer: Comparison and clinical evaluation of two immunoassays and a combination algorithm. *Clin Chim Acta*. 2011;412(15-16):1447-53.