



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ADRIANA YOSHIDA

AVALIAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA DE BIOMARCADORES SÉRICOS EM
MULHERES COM MASSAS ANEXIAIS

*PREOPERATIVE EVALUATION OF SERUM BIOMARKERS IN WOMEN WITH
ADNEXAL MASSES*

CAMPINAS
2016

ADRIANA YOSHIDA

AVALIAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA DE BIOMARCADORES SÉRICOS EM
MULHERES COM MASSAS ANEXIAIS

*PREOPERATIVE EVALUATION OF SERUM BIOMARKERS IN WOMEN WITH
ADNEXAL MASSES*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Doutora em Ciências da Saúde, na Área de Oncologia Ginecológica
e Mamária.

*Thesis presented to the Obstetrics and Gynecology Post Graduation
Program of School of Medical Sciences from State University of
Campinas for obtaining the Ph.D. degree in Health Sciences in
Gynecologic Oncology and Breast Cancer Area.*

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN
COORIENTADORA: PROF. DRA. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ADRIANA YOSHIDA E ORIENTADA PELO
PROF. DR. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN

CAMPINAS

2016

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Y831a	Yoshida, Adriana, 1975- Avaliação pré-operatória de biomarcadores séricos em mulheres com massas anexiais / Adriana Yoshida. – Campinas, SP : [s.n.], 2016. Orientador: Luis Otavio Zanatta Sarian. Coorientador: Sophie Françoise Mauricette Derchain. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 1. Antígeno Ca-125. 2. Neoplasias ovarianas. 3. Diagnóstico diferencial. 4. Doenças dos anexos. 5. Proteína C-reativa. I. Sarian, Luis Otavio Zanatta, 1974-. II. Derchain, Sophie Françoise Mauricette, 1959-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preoperative evaluation of serum biomarkers in women with adnexal masses

Palavras-chave em inglês:

CA-125 Antigen

Ovarian neoplasms

Diagnosis, Differential

Adnexal diseases

C-reactive protein

Área de concentração: Tocoginecologia

Titulação: Doutora em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Luis Otavio Zanatta Sarian [Orientador]

Francisco José Candido dos Reis

Jesus Paula Carvalho

Julio Cesar Teixeira

Luiz Carlos Zeferino

Data de defesa: 19-04-2016

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Diagramação: Assessoria Técnica do CAISM (ASTECC)

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
ADRIANA YOSHIDA

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN

**CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE
DERCHAIN**

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. LUIS OTAVIO ZANATTA SARIAN**
- 2. PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ CANDIDO DOS REIS**
- 3. PROF. DR. JESUS PAULA CARVALHO**
- 4. PROF. DR. JULIO CESAR TEIXEIRA**
- 5. PROF. DR. LUIZ CARLOS ZEFERINO**

Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 19/ 04 / 2016

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Gustavo Yoshida Olímpio

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Otávio Sarian, pela amizade, apoio, empenho e competência na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Sophie Derchain, pela amizade, por estar sempre ensinando e mostrando o caminho correto a se percorrer.

À Profa. Dra. Liliana Andrade, pela amizade e por todo o suporte nas questões de anatomia patológica.

Aos meus pais Massayoshi e Yoko, que sempre me ajudaram e incentivaram a estudar.

À toda equipe multidisciplinar do CAISM, em especial a de enfermagem do ambulatório de oncologia pélvica, da coleta de sangue, do setor de ecografia e do Serviço de Arquivo Médico e Estatística.

Aos amigos do CS Rosália, que me apoiaram neste projeto.

Aos colegas Giuliano Mendes e Luis Felipe Sallum, aos especializandos da pelve e residentes, que participaram da coleta de casos no ambulatório de ovário.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Karla Galvão, Patrick Nunes e Rodrigo da Silva.

Às biólogas Dras. Denise Pitta e Elizabeth Campos, pelas dosagens de biomarcadores no Laboratório de Procedimentos Especiais do CAISM.

Aos Profs. Drs. Rodrigo Jales e Cássio Cardoso Filho, pela amizade e incentivo.

Aos Profs. Drs. Julio Cesar Teixeira e Luiz Carlos Zeferino, pela participação no processo de qualificação.

Às secretárias Neuza, Debora, Regina, Raquel e Eliane sempre dispostas a ajudar.

Ao Claudinei e Valdinéia da ASTEC.

Às mulheres envolvidas no estudo, que gentilmente concordaram em participar.

Em especial, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo número 2012/15059-8.

RESUMO

Introdução: As massas anexiais são frequentes tanto na pré quanto na pós-menopausa. A maioria dessas massas é benigna, porém aproximadamente 30% delas são malignas. Os marcadores tumorais são ferramentas úteis na predição de malignidade das massas pélvicas. Atualmente, dois marcadores utilizados isoladamente ou em diferentes algoritmos/scores, associados ao CA125 estão sendo testados em diversas populações. **Objetivo:** Comparar os desempenhos do *Copenhagen Index* (CPH-I), *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm* (ROMA), Proteína C-Reativa (CRP), CA125 e *Ovarian Score* (OVS) na predição de malignidade em mulheres com massas anexiais.

Métodos: O estudo foi realizado no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (CAISM), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). As mulheres encaminhadas por massa anexial, no período de janeiro de 2010 a junho de 2015, foram convidadas a participar. Todas as pacientes incluídas assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Amostras de sangue foram obtidas antes da cirurgia e armazenadas para a dosagem de marcadores séricos. As pacientes com indicação cirúrgica foram operadas e tiveram a análise histopatológica realizadas nesta única instituição. No primeiro artigo, foram incluídas 384 mulheres, sendo 160 com tumores malignos e 224 com tumores benignos/ não neoplásicos de ovário. As Áreas sob a curva ROC [*Areas Under the Receiver Operating Characteristic Curve* (AUCs)], do CPH-I e ROMA foram comparadas e suas sensibilidades e especificidades foram calculadas. No segundo artigo, 293 pacientes foram incluídas, sendo 122 com tumores malignos e 171 com tumores benignos/ não neoplásicos de ovário. As AUCs, da CRP, CA125 e OVS foram comparadas e suas sensibilidades e especificidades foram calculadas. **Resultados:** As melhores AUCs do CPH-I e ROMA obtidas foram na discriminação entre carcinomas de ovário de doenças benignas [0,94 (IC 95% 0,90-0,97) e 0,93 (IC 95% 0,89-0,96), respectivamente]. Quando se acrescentaram tumores *borderline*, metástases ovarianas e os tumores malignos não epiteliais aos carcinomas, os desempenhos do CPH-I e ROMA diminuíram, com sensibilidade de 72%, e especificidade de 84%. O desempenho do CPH-I foi semelhante ao do ROMA. O CA125 e OVS apresentaram desempenhos melhores que a CRP na diferenciação de tumores benignos dos carcinomas ovarianos [AUC de 0,86 (IC 95% 0,81-0,92) para CA125, 0,79 para OVS (IC 95% 0,73-0,84) e 0,73 (IC 95% 0,66-0,80) para a CRP]. As

sensibilidades e especificidades foram de 52,5% e 83%, respectivamente para a CRP; 77,9% e 66,7%, respectivamente para o CA125 e 71,3% e 67,8%, respectivamente para o OVS. **Conclusões:** O ROMA e o CPH-I apresentaram desempenhos semelhantes na predição de malignidade em mulheres com massas anexiais, seja em uma coorte de mulheres com carcinomas e doenças ovarianas benignas, seja em outra coorte de mulheres com carcinomas, tumores malignos não epiteliais, tumores *borderline* de ovário, metástases ovarianas e doenças ovarianas benignas. A CRP isoladamente apresentou um desempenho inferior ao CA125 e OVS na predição de malignidade em mulheres com massas anexiais. Contudo, a CRP e o OVS podem contribuir para decisões clínicas em mulheres diagnosticadas com doença avançada, uma vez que permitem discriminar, nestes casos, entre mulheres com carcinoma e aquelas com tumor *borderline* de ovário.

Palavras-chave: Antígeno Ca-125, Diagnóstico diferencial, Doenças dos anexos, Neoplasias ovarianas, Proteína C-reativa.

ABSTRACT

Introduction. Adnexal masses are frequent in pre and postmenopausal women. The majority of these adnexal masses are benign, but 30% of women may harbor a malignant tumor. Serum tumor markers are useful tools to predict malignancy of adnexal masses. Recently, two biomarkers have been tested in different population, isolated or combined in algorithms/scores, associated to CA125.

Aim. To compare the performances of Copenhagen Index (CPH-I), Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA), C-reactive protein (CRP), CA125 and Ovarian Score (OVS) in the prediction of malignancy of women with adnexal masses.

Methods. The study was conducted at Women's Hospital Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (CAISM) from State University of Campinas (Unicamp). Women referred with adnexal masses from January 2010 to June 2015 were invited to participate. All included women signed an informed consent. Blood was collected before surgery from venous puncture and stored until biomarkers analysis. Women with surgical indication were submitted to surgery and had the histopathologic analysis in this single institution. In the first manuscript, 384 patients were included, 160 with malignant ovarian tumors and 224 with benign/non neoplastic ovarian tumors. Receiver Operating Characteristic (ROC) Areas Under the Curves (AUCs) of CPH-I and ROMA were compared and their sensitivities and specificities were calculated. In the second manuscript, 293 women were included, 122 with malignant ovarian tumors and 171 with benign/non neoplastic ovarian tumors. AUCs of CRP, CA125 and OVS were compared and their sensitivities and specificities were calculated.

Results. The best CPH-I and ROMA AUCs were obtained in the discrimination of epithelial ovarian cancer from benign diseases [0.94 (95% CI 0.90-0.97) and 0.93 (95% CI 0.89-0.96), respectively]. When borderline ovarian tumors, ovarian metastases and non epithelial ovarian cancer were added to epithelial ovarian cancer, performances of CPH-I and ROMA decreased with sensitivity of 72% and specificity of 84%. Overall, CPH-I performance was similar to ROMA. CA125 and OVS presented a better performance than CRP, in the differentiation of benign from epithelial ovarian cancer [AUC = 0.86 (95% CI 0.81- 0.92) for CA125, 0.79 (95% CI 0.73-0.84) for OVS and 0.73 (95% CI 0.66-0.80) for CRP]. Sensitivities and specificities were 52.5% and 83%, respectively for CRP; 77.9% and 66.7%, respectively for CA125 and 71.3% and 67.8%, respectively for OVS. **Conclusions.** ROMA and CPH-I presented similar

performances in the prediction of malignancy of women with adnexal masses, in a cohort including women with epithelial ovarian cancer and benign ovarian disease and in cohort including women with epithelial and non-epithelial ovarian cancer, borderline ovarian tumor, ovarian metastases and benign ovarian disease. The isolated CRP presented worse performance than CA125 and OVS in the prediction of malignancy of women with adnexal masses. However, CRP and OVS may help clinical decisions in women with advanced disease, since they allow the discrimination of women with carcinoma from those with borderline ovarian tumor.

Keywords: Adnexal diseases, CA-125 Antigen, C-reactive protein, Differential Diagnosis, Ovarian neoplasms.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC	- <i>Area under curve</i>
BMI	- <i>Body mass index</i>
BOT	- <i>Borderline ovarian tumor</i>
°C	- Grau centígrado
CA125	- <i>Cancer antigen 125</i>
CAISM	- Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CPH-I	- <i>Copenhagen Index</i>
CRP	- <i>C-reactive protein; proteína C-reativa</i>
EOC	- <i>Epithelial ovarian cancer</i>
et al.	- <i>E outro(s); e outra(s)</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FIGO	- Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FSH	- <i>Follicular stimulating hormone</i>
HE4	- <i>Human epididymis protein 4</i>
HNPCC	- <i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>
IC/CI	- Intervalo de Confiança/ <i>Confidence interval</i>
IL	- Interleucina
IQR	- <i>Interquartile range</i>
Kg/m²	- Kilograma por metro quadrado
mg/L	- Miligrama por litro
OC	- <i>Ovarian Cancer</i>
OR	- <i>Odds Ratio</i>
OVS	- <i>Ovarian Score</i>
P value	- Significância estatística
pmol/L	- Picomol por litro
ROMA	- <i>Risk of Ovarian Malignancy Algorithm</i>
ROC	- <i>Receiver operating characteristic</i>
ROS	- <i>Reactive oxygen species</i>

SD	- <i>Standard Deviation</i>
STICs	- <i>Serous Tubal Intraepithelial Carcinomas</i>
SLPI	- <i>Secretory Leukocyte Protease Inhibitor</i>
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF-α	- <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TP53	- <i>Tumor Protein 53 Gene</i>
Unicamp	- Universidade Estadual de Campinas
U/mL	- Unidade por mililitro
US	- Ultrassonografia
WAP	- <i>Whey Acid Protein</i>
WFDC2	- <i>Whey Acid Protein Four-Disulphide Core Domain 2</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
3. METODOLOGIA	24
3.1. Pacientes.....	24
3.2. Biomarcadores.....	26
3.2.1. Human Epididymis Protein 4 - HE4	26
3.2.2. C-Reactive Protein - CRP.....	26
3.2.3. Cancer Antigen 125 - CA125.....	26
3.2.4. Risk of Ovarian Malignancy Algorithm - ROMA	27
3.2.5. Copenhagen Index – CPH-I	27
3.2.6. Ovarian Score - OVS.....	27
3.3. Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS	29
Artigo 1. Comparing the Copenhagen Index (CPH-I) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA): Two equivalent ways to differentiate malignant from benign ovarian tumors before surgery?	30
Artigo 2. Preoperative dosage of serum C - reactive protein: Is it useful in the differential diagnosis of adnexal masses?.....	36
5. DISCUSSÃO GERAL	55
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS	65
8. ANEXOS	75
Anexo 1 - Ficha para coleta de dados	75
Anexo 2 - Carta de aprovação do projeto no CEP – FCM/UNICAMP	87
Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	89

1. INTRODUÇÃO

O câncer de ovário é a terceira neoplasia ginecológica mais incidente no mundo, com 238.719 casos ao ano, no entanto, é a mais letal entre os cânceres ginecológicos com 151.917 mortes (64%) [1]. Na Europa, o número de casos novos de câncer esperados para 2012 era de 65.538 com 42.704 mortes [2]. Nos Estados Unidos, para 2016 são estimados 22.280 casos novos e 14.240 mortes [3]. No Brasil, para 2014, foram estimados 5.680 casos novos de câncer de ovário, com risco de 5,58 casos a cada 100 mil mulheres. No estado de São Paulo esta incidência é maior: 7,03 casos a cada 100 mil mulheres [4].

Na maioria das vezes, a doença é diagnosticada em estágios III e IV da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), o que é um fator determinante para que se perpetue o número elevado de mortes a cada ano. A incidência da doença em mulheres abaixo dos 65 anos é de 7,4/ 100.000 aumentando para 44,5/ 100.000 naquelas com mais de 65 anos. Segundo estatísticas americanas, a sobrevivência em 5 anos para todos os estágios é de 45,6%, quando a doença é detectada em estágios iniciais é de 92,1% caindo para 28,3% nos casos avançados [5].

É doença esporádica na maioria das vezes, mas de causa genética em 10 a 20% dos carcinomas de ovário. A síndrome do câncer de mama e ovário corresponde a 90% dos cânceres hereditários e é de herança autossômica dominante, relacionada a mutações dos genes BRCA1 e BRCA2 [6, 7]. Mulheres com mutações nestes genes possuem um risco de até 46% de vir a desenvolver câncer de ovário durante a vida. Na síndrome de Lynch/ *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* (HNPCC) este risco corresponde a 9 - 12% [8].

A classificação dos tumores malignos do ovário é extensa, dividida em 3 grandes grupos: os tumores epiteliais (90%), os tumores de cordões sexuais e estroma (8%) e os de células germinativas (3%) [9]. Há ainda os tumores metastáticos no ovário que compreendem cerca de 5 a 15% de massas ovarianas, sendo mais frequentemente oriundos do trato gastrointestinal, mama e endométrio.

Dentre os tumores malignos epiteliais, existe uma heterogeneidade de subtipos histológicos, com diferentes epidemiologias, características clinico-patológicas e comportamentos. São os subtipos: serosos, endometrióides, células claras, mucinosos, mistos e indiferenciados [9].

Um modelo dualístico foi proposto classificando os tumores de ovário em dois grupos: tipo I e tipo II. Os tumores do tipo I englobam os carcinomas serosos de baixo grau e endometrióides de baixo grau, mucinosos e carcinomas de células claras. Apresentam um curso

mais indolente, progredindo de tumores benignos para *borderline* e malignos. No momento do diagnóstico se caracterizam por grandes massas confinadas ao ovário e estão associadas a mutações nos genes *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *ARID1A* e *PPP2R1A* [10, 11]. Já os tumores do tipo II são os carcinomas serosos de alto grau, endometrióides de alto grau, indiferenciados, tumores mullerianos mistos malignos (carcinossarcomas). Estes tumores são agressivos, com mutações no *TP53* e ao diagnóstico apresentam-se em estágios avançados. Já no início apresentam várias aberrações cromossômicas, ao contrário dos tumores do tipo I que são geneticamente mais estáveis. Correspondem a 75% dos carcinomas de ovário, sendo os mais frequentes, os carcinomas serosos de alto grau [10].

Algumas teorias sobre a origem e patogênese do câncer de ovário já foram propostas. A mais recente delas é de que a doença teria início em órgãos extra-ovarianos, acometendo o ovário secundariamente. Assim, o carcinoma seroso de alto grau surgiria através do deslocamento de células epiteliais das fímbrias tubáreas para o epitélio de superfície ovariano exposto durante a ovulação, resultando na formação do cisto de inclusão cortical com epitélio ciliado, que poderia ser um precursor da doença [12]. Outra forma seria a partir da semeadura de células neoplásicas das fímbrias diretamente na superfície ovariana [11, 13].

Na mesma linha de patogênese, os subtipos endometrióide e de células claras surgiriam do endométrio através da menstruação retrógrada e endometriose. Os tumores mucinosos e de Brenner seriam originados em ninhos de epitélio transicional localizado na junção tubo-mesotelial, onde as fímbrias entram em contato com o peritônio [11, 13].

Em salpingooforectomias profiláticas realizadas em mulheres com história familiar de câncer de mama ou mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA 2*, análises histopatológicas meticulosas evidenciaram carcinomas invasivos e não invasivos nas tubas, sobretudo nas fímbrias. Piek et al. (2003) propôs que estes carcinomas ocultos poderiam semear células malignas no ovário, que se implantariam e cresceriam neste órgão, oriundos das tubas [14]. Posteriormente, em estudo com mulheres com carcinomas serosos de alto grau descobriu-se que quase 50% delas apresentavam também carcinomas intraepiteliais tubáreos, que foram denominados de *Serous Tubal Intraepithelial Carcinomas* (STICs) [15]. Além dos STICs se assemelharem morfológicamente ao carcinoma seroso de alto grau, também apresentam mutação *TP53* idêntica ao deste tipo de câncer e podem estar presentes mesmo na ausência do carcinoma ovariano, reforçando a tese da origem tubárea do câncer de ovário [10].

A teoria da ovulação incessante foi proposta por Fathalla em 1971. Esta teoria se baseou em dados epidemiológicos sobre fatores de risco reprodutivos, e na comparação do padrão de ovulação de diferentes animais. Nas mulheres, ocorrem ovulações consecutivas da

menarca à menopausa, sendo interrompidas fisiologicamente apenas por gestação ou amamentação. Ao contrário, outros mamíferos têm ovulações menos frequentes, e raramente desenvolvem câncer de ovário. Assim, o uso de contraceptivos orais reduziria o risco da doença, pela supressão da ovulação [16]. Esta redução de risco se confirmou e foi mais acentuada quanto maior o tempo de uso, diminuindo em até 50% do risco entre as mulheres que usaram contraceptivos orais por mais de 10 anos [17] e seu efeito protetor se manteve por mais de 30 anos após o término do uso, porém atenuado com o passar dos anos [18].

Em 2013, a teoria foi revisada pelo mesmo autor, ressaltando que a origem tubárea do câncer de ovário também pode ser relacionada à da ovulação incessante, à medida em que a ovulação causa o mesmo impacto no epitélio de superfície ovariano e nas células epiteliais tubáreas [16, 19]. No momento da ovulação que resulta na liberação do oócito para as fímbrias adjacentes, a superfície ovariana e as fímbrias estão banhadas em um fluido folicular, que contém citocinas inflamatórias, incluindo *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α), espécies reativas ao oxigênio (ROS) e esteroides [20]. Recentemente, observou-se que células do sistema imune como linfócitos TCD8, macrófagos, células dendríticas estão presentes em tubas normais e cistos de inclusão cortical ovarianos [21].

A inflamação é uma das hipóteses para explicar a patogênese dos cânceres em geral. Inicialmente, em 1863, Rudolf Virchow observou infiltrado leucocitário em tecidos neoplásicos e supôs que a inflamação crônica estaria relacionada ao câncer. Os estudos continuaram reforçando este achado, constatando que células cancerígenas estão embebidas em um microambiente contendo um infiltrado de leucócitos, dentre eles macrófagos e outros leucócitos especializados, com citocinas e quimiocinas atuando como mediadores, semelhante ao ambiente encontrado na inflamação crônica [22 – 24].

Mantovani et al. (2008) descreveram duas vias de conexão entre inflamação e câncer: a via intrínseca que é ativada por eventos genéticos, mutação por oncogene, rearranjo ou amplificação cromossomal, e inativação de genes supressores de tumores. As células transformadas produzem mediadores inflamatórios, gerando o microambiente inflamatório nos tumores. Já a via extrínseca depende de condições inflamatórias ou infecciosas para promover o desenvolvimento de câncer. Estas 2 vias convergem resultando na ativação de fatores de transcrição, que coordenam a produção de mediadores da inflamação como citocinas e quimiocinas que ativam leucócitos principalmente da linhagem mielomonocítica.

Este micro-ambiente favorece a carcinogênese, à medida que induz a proliferação celular, sobrevivência da célula, transição epitelial-mesenquimal, angiogênese, linfangiogênese, migração de célula tumoral, invasão, metástase, inibe a imunidade adaptativa,

altera a resposta a hormônios e agentes quimioterápicos [25]. Estima-se que cerca de 25% de todos os cânceres tenham associação com a inflamação crônica, de causas infecciosas ou não [26, 27].

O aumento do risco para câncer de ovário está associado a condições ligadas à inflamação: doença inflamatória pélvica, ovulação, endometriose, síndrome dos ovários policísticos [28]. Por sua vez, a ligadura tubárea e histerectomia atuam de forma protetora à medida que previnem ascensão de substâncias prejudiciais aos ovários, como menstruação retrógrada e talco [29]. Observou-se também uma redução do risco associada ao uso de anti-inflamatórios não esteroidais [30].

Os sintomas do câncer de ovário podem ser pouco específicos, porém estão presentes na maioria das mulheres com esta neoplasia. Um estudo retrospectivo envolvendo 1.725 mulheres, mostrou que 95% delas apresentavam algum sintoma prévio ao diagnóstico do câncer de ovário, inclusive em 89% das mulheres com estágios I e II da doença [31].

A associação de empachamento pós-prandial, aumento de volume abdominal e sintomas urinários foi encontrada em 43% das mulheres com câncer de ovário e somente 8% das pacientes controle. As mulheres com tumores malignos de ovário apresentaram sintomas com maior frequência, de maior intensidade e com início mais recente do que aquelas com tumores benignos de ovário ou controles [32 – 34]. Além disso, mulheres que relatam dor pélvica ou abdominal, aumento de volume abdominal, empachamento ou dificuldade para se alimentar, por pelo menos 12 vezes no mês, e com menos de 12 meses de início poderiam ser investigadas para câncer de ovário [35].

Por sua vez, mulheres assintomáticas não devem realizar rastreamento para câncer de ovário com ultrassonografia (US) transvaginal e dosagem do marcador tumoral CA125. Por ser uma doença de baixa prevalência, o valor preditivo positivo de um teste de rastreamento é baixo, acarretando em um grande número de cirurgias para doenças ovarianas benignas. Paralelamente, deve-se ressaltar que estes procedimentos estão associados a morbimortalidade cirúrgica que não pode ser desprezada [36, 37].

Entretanto, as mulheres fazem US frequentemente, e as massas pélvicas são achados comuns durante a pré e pós-menopausa, sendo mais frequentes na pré-menopausa. Estima-se que cerca de 5 a 10% das mulheres serão submetidas a cirurgia por massa pélvica [38], a maioria delas, benigna [39]. A obtenção do diagnóstico histológico é difícil pois os ovários são órgãos intrapélvicos e cirurgias como a laparotomia ou laparoscopia são necessárias. Nos casos suspeitos de malignidade existe uma tendência a tratar por laparotomia devido ao risco de se romper o tumor e espalhar células tumorais na cavidade [40, 41].

As pacientes com suspeita de tumores benignos devem ser encaminhadas ao ginecologista geral, para que, em centros secundários possam ser operadas por cirurgias minimamente invasivas [42]. As pacientes com suspeita de tumores malignos devem ser referenciadas a centros terciários onde são operadas pelo ginecologista experiente em procedimentos oncológicos [40]. O estadiamento cirúrgico do câncer de ovário compreende um inventário da cavidade minucioso, coleta de lavado peritoneal, omentectomia, histerectomia com salpingooforectomia bilateral, além da linfadenectomia pélvica e paraórtica. As cirurgias realizadas pelo ginecologista oncológico nos centros terciários apresentam maiores taxas de citorredução ótima, menores índices de complicações pós-operatórias e consequentemente, melhores taxas de sobrevivência [43, 44].

Nas últimas décadas, vários estudos têm avaliado a capacidade dos marcadores tumorais de prever malignidade das massas pélvicas. Os marcadores tumorais são objetivos, relativamente baratos, com análises sob condições padronizadas entre diferentes laboratórios, e resultados reprodutíveis [45]. No entanto, a performance dos marcadores atualmente disponíveis, utilizados de forma isolada ou em conjunto, ainda precisa ser reavaliada [46].

O *Cancer Antigen 125* (CA125) tem um papel estabelecido como marcador tumoral do câncer de ovário, sendo útil na investigação de massas pélvicas, na avaliação de resposta a quimioterapia e na detecção de recidiva da doença [47]. O CA125 é um determinante antigênico localizado em uma glicoproteína de alto peso molecular. É detectado através de um teste laboratorial, o CA125 II, pelos anticorpos M11 e o OC125. Não se conhece a real função do CA125. É produzido por células mesoteliais das cavidades do peritônio, pleura e pericárdio. Em tecidos normais, já foi encontrado nos fetais, derivados de epitélios celômicos, no epitélio amniótico; e em células das tubas, endométrio e endocérvice de mulheres adultas [48]. Bast et al. (1983) encontraram valores de CA125 > 35 U/ml em 1% de quase 900 indivíduos saudáveis [49].

Sua concentração sérica está elevada em condições ginecológicas benignas: menstruação, gravidez de 1º trimestre, miomatose uterina, endometriose, tumores benignos de ovário. E em outras não ginecológicas, como tuberculose peritoneal, pancreatite, cirrose hepática. O CA125 é metabolizado pelo fígado, o que pode explicar seu aumento na falência hepática mesmo na ausência de ascite. Está aumentado em neoplasias não ovarianas como de endométrio, mama, pulmões, estômago, fígado, pâncreas e outras [47, 48].

No câncer de ovário em estágios avançados, o CA125 encontra-se elevado em 85% dos casos. No entanto, nos estágios iniciais é pouco expresso, apresentando-se aumentado em somente 50% [48]. Quanto aos subtipos histológicos, os níveis de CA125 são menores nos

carcinomas mucinosos, com valores crescentes nos endometrióides, seguidos pelos de células claras e serosos, sendo os maiores valores encontrados nos indiferenciados [50].

O *Human Epididymis Protein 4* (HE4) é um marcador promissor no diagnóstico de massas anexiais. Esta proteína foi inicialmente isolada do epitélio do epidídimo distal. O gene *Whey Acid Protein Four-Disulphide Core Domain 2* (WFDC2) codifica a proteína HE4, que tem dois domínios de Whey Acid Protein (WAP). Este gene localiza-se no cromossomo 20q12-13.1. Genes do locus WFDC teriam um papel na imunidade natural com atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, mas ainda não se conhece a verdadeira função do HE4 [51].

Duas proteínas que possuem o domínio WAP mais estudadas são a *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor* (SLPI) e a elafin, que exercem vários papéis na defesa do hospedeiro. O HE4, a SLPI e elafin estão expressos em tecidos normais da traquéia, pulmões, e epitélio nasal, e esta co-expressão sugere que o HE4 possa ter uma função na defesa do trato respiratório [51]. Em estudo posterior, Bingle et al. (2006) encontraram a presença de HE4 em células de glândulas submucosas do trato respiratório superior, em glândulas do nariz, seios paranasais, língua posterior e tonsilas, ductos de glândulas salivares e na maioria dos adenocarcinomas de pulmões [52].

Em 1999, a expressão do gene do HE4 foi descrita em carcinomas de ovário [53]. A partir deste achado, levantou-se a possibilidade desta proteína ser usada como marcador tumoral. O HE4 encontrou-se superexpressa em carcinomas serosos e endometrióides, com pouca expressão nos carcinomas de células claras e nenhuma em mucinosos [54]. Os níveis séricos de HE4 podem estar aumentados com a idade, tabagismo, mas não são afetados pelo ciclo menstrual, uso de contraceptivo oral ou endometriose [55]. No entanto, suas concentrações séricas podem estar elevadas em doença renal crônica, o que pode ser causado pela diminuição da eliminação, ou aumento da produção por túbulos renais danificados [56, 57]. Os níveis de HE4 estão diminuídos na gestação [58], e menos frequentemente aumentados em doenças benignas como mioma uterino, teratoma e cistadenomas serosos, principalmente nas pacientes no menacme [59].

O *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm* (ROMA) é um algoritmo que classifica as mulheres em baixo ou alto risco de malignidade na avaliação de massas anexiais. Foi descrito por Moore et al. (2009) e envolve as dosagens séricas de CA125, HE4 e o estado menopausal. Neste estudo com 129 carcinomas, apenas 6,2% das mulheres com a doença foram classificadas como de baixo risco, ou seja, obteve-se uma sensibilidade de 93,8% com especificidade de 75% [60]. Este algoritmo foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso na diferenciação de massas pélvicas. Vários estudos brasileiros e internacionais já validaram o

ROMA [61 - 67]. Alguns apontam que o ROMA tem um melhor desempenho para avaliar mulheres no menacme, sendo seu papel ainda controverso [68].

Mais recentemente, foi descrito um novo algoritmo, o Copenhagen Index (CPH-I), que envolve os valores de HE4, CA125 e idade da paciente, utilizado na triagem de massas pélvicas suspeitas. A idade é um dado mais simples de se obter do que o estado menopausal, que pode ter diferentes interpretações nos estudos, podendo, por exemplo, ser definido pela dosagem de *Follicle Stimulating Hormone* (FSH), ou ausência de menstruações por 1 ano ou ainda, idade maior que 50 anos [69].

Outros marcadores poderiam ter um papel no diagnóstico diferencial de massas anexiais. A proteína C-reativa (CRP) é uma proteína plasmática, que faz parte da resposta sistêmica a inflamação. Seu gene é localizado no braço curto do cromossomo 1, e sua produção nos hepatócitos é induzida pela interleucina 6 (IL-6), podendo este efeito ser aumentado pela interleucina 1 (IL-1) [70]. A CRP é liberada na circulação em resposta ao dano tecidual, inflamação e neoplasia [27].

O aumento dos níveis da CRP não é específico, refletindo processo inflamatório de várias origens, sendo seu uso já estabelecido como marcador de diversas condições clínicas como artrite reumatoide, infarto agudo do miocárdio, diabetes. Concentrações séricas acima de 10 mg/ L indicam uma inflamação aguda, enquanto valores intermediários são detectados em inflamação crônica [71]. Níveis aumentados de CRP já foram associados a risco de desenvolver câncer de ovário em estudos caso controle [71 – 75]. Outros estudos, retrospectivos, mostraram o papel da CRP no diagnóstico diferencial entre tumores benignos e malignos de ovário [76, 77].

1.1. Justificativa

Massas anexiais são um achado comum em ginecologia e frequentemente necessitam de cirurgias para diagnóstico. Os marcadores tumorais podem ser úteis na predição de malignidade dessas massas, facilitando o correto referenciamento dos casos. Aqueles sugestivos de malignidade devem ser encaminhados para centros terciários, ao passo que, aqueles com maior probabilidade de serem benignos devem ser direcionados para serviços secundários, onde serão tratados pelo ginecologista geral.

O Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM - Unicamp é um hospital de referência no atendimento à saúde da mulher. Possui um serviço de ginecologia geral e outro de ginecologia oncológica. Realiza cirurgias minimamente invasivas em mulheres com massas anexiais clinicamente benignas. Por outro lado, realiza avaliação histológica

intraoperatória e possui uma equipe capacitada para realizar estadiamento cirúrgico e citorredução em mulheres com câncer de ovário.

Ao avaliar a expressão de marcadores tumorais na predição pré-operatória de malignidade em mulheres brasileiras com massas anexiais, atendidas neste serviço de referência, esperamos contribuir com o aprimoramento de protocolos de atenção à estas mulheres.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Comparar os desempenhos do *Copenhagen Index* (CPH-I), *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm* (ROMA), Proteína C-Reativa (CRP), CA125 e *Ovarian Score* (OVS) na predição de malignidade em mulheres com massas anexiais.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Comparar os desempenhos do *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm* (ROMA) e *Copenhagen Index* (CPH-I) na predição de malignidade em mulheres com massas anexiais em dois cenários: em uma coorte de mulheres com carcinomas e doenças ovarianas benignas e em outra coorte de mulheres com carcinomas, tumores malignos não epiteliais, tumores *borderline* de ovário, metástases ovarianas e doenças ovarianas benignas.
- 2.2.2. Comparar os desempenhos da CRP, CA125 e do *Ovarian Score* na predição de malignidade em mulheres com massas anexiais.

3. METODOLOGIA

Esta tese consiste em dois estudos inter-relacionados, realizados no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti da Unicamp. A metodologia geral para os dois estudos é apresentada a seguir, enquanto os detalhes de cada um estão especificados nas respectivas publicações.

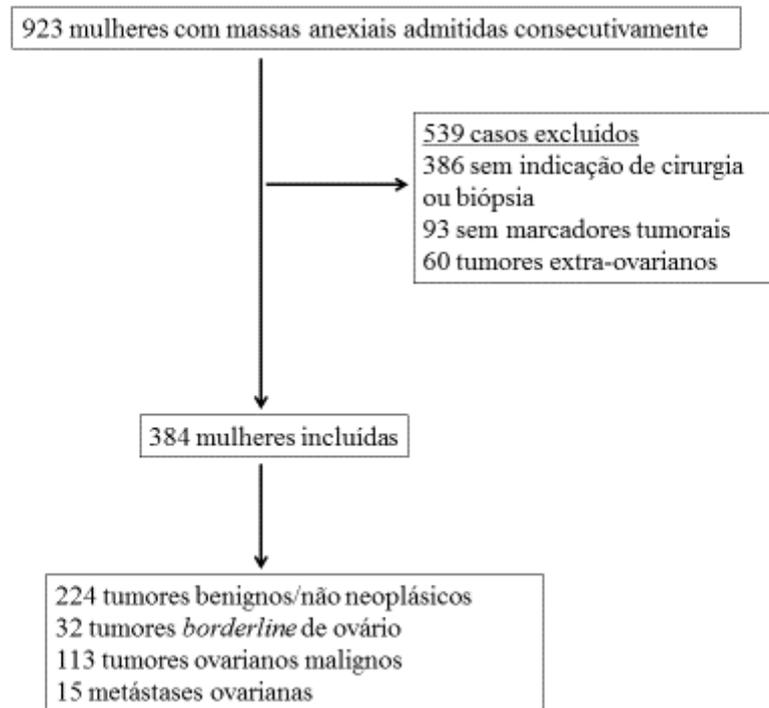
3.1. Pacientes

As mulheres encaminhadas por massa anexial no período de janeiro de 2010 a junho de 2015 foram convidadas a participar dos estudos, que foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (protocolo no. 1092/2009). Todas as pacientes incluídas assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. As mulheres foram submetidas a exame clínico, coleta de amostra de sangue para a dosagem dos biomarcadores e para armazenamento e a ultrassonografia foi agendada. De acordo com a indicação médica, as pacientes foram submetidas a cirurgia para diagnóstico/tratamento. Aquelas sem indicação de cirurgia foram mantidas em acompanhamento clínico. As mulheres com suspeita de tumor maligno tiveram a sua cirurgia antecipada, enquanto as com suspeita de tumor benigno aguardaram cirurgia eletiva.

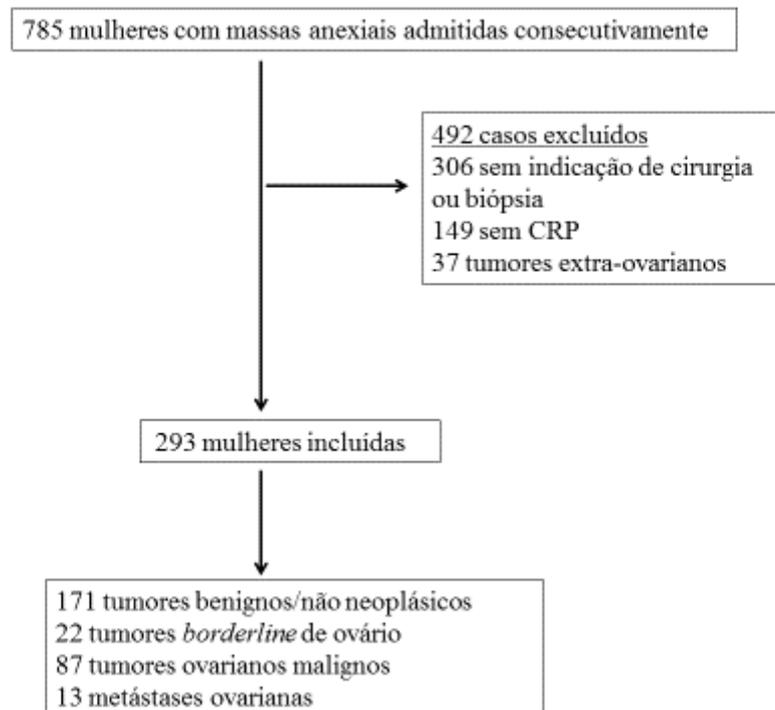
As mulheres com tumores considerados irressecáveis foram submetidas a biópsias percutâneas para obtenção de material para análise histológica. Todos os espécimes histológicos foram analisados por patologistas com especial interesse em patologia ginecológica, seguindo os *guidelines* do *World Health Organization Classification of Ovarian Tumors* [9]. A cirurgia e a análise histopatológica foram realizadas nesta única instituição. No caso de a mulher apresentar tumor bilateral de ovário, somente aquele de pior prognóstico foi considerado para a análise.

Das pacientes encaminhadas por massa pélvica, foram excluídas aquelas sem indicação cirúrgica, sem soro disponível para a dosagem dos marcadores e aquelas com tumores extra-ovarianos, isto é, tumores benignos não ovarianos como leiomiomas uterinos, cistos tubáreos, hidrossalpinges, e tumores malignos como carcinomas de origem no trato gastrointestinal. Nestes últimos, a análise histopatológica não foi obtida do ovário, e não houve comprovação histológica de comprometimento do mesmo. A seguir, as figuras ilustram as mulheres excluídas e incluídas em cada estudo.

Fluxograma de seleção das pacientes para o primeiro estudo (artigo 1)



Fluxograma de seleção das pacientes para o segundo estudo (artigo 2)



3.2. Biomarcadores

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa de veia periférica e armazenadas a -80°C até a dosagem dos marcadores tumorais. O tempo médio entre a coleta de sangue e a cirurgia foi de 69 dias, variando de 24 horas (para procedimentos de urgência) a 119 dias.

3.2.1. *Human Epididymis Protein 4 - HE4*

O nível sérico de HE4 foi determinado através da técnica de quimiluminescência em analisador automático ARCHITECT (*Abbott Diagnostics, ARCHITECT, Abbott Park, IL, USA*), sendo os valores expressos em picomol por litro (pmol/L).

3.2.2. *C-Reactive Protein - CRP*

O nível sérico desta proteína foi dosado pelo teste CRP ultrasensível através da técnica de imunoturbidimetria em analisador automático modular ANALYTICS – P 800 – Modelo Evolution (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*), com valores expressos em miligrama por litro (mg/L).

3.2.3. *Cancer Antigen 125 - CA125*

Para o primeiro artigo, o nível sérico de CA 125 foi determinado usando o teste ARQ CA125 através da técnica de quimiluminescência em analisador automático ARCHITECT (*Abbott Diagnostics, ARCHITECT, Abbott Park, IL, USA*), sendo os valores expressos em unidades por mililitro (U/ml).

Para o segundo artigo, o nível sérico de CA 125 foi obtido pelo teste CA125 II através da técnica de eletroquimiluminescência em analisador automático Cobas e411 (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*), com valores expressos em unidades por mililitro (U/ml).

3.2.4. *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm - ROMA*

O ROMA foi calculado, segundo Moore et al. [60] conforme cálculo abaixo:

Pré-menopausa: Índice Preditivo (IP) = $-12.0 + 2.38 * \text{LN}(\text{HE4}) + 0.0626 * \text{LN}(\text{CA125})$

Pós-menopausa: Índice Preditivo (IP) = $-8.09 + 1.04 * \text{LN}(\text{HE4}) + 0.732 * \text{LN}(\text{CA125})$

ROMA = $\exp(\text{IP}) / [1 + \exp(\text{IP})]$

LN = logaritmo neperiano; exp = exponencial; HE4 = nível sérico do HE4 em pmol/L;

CA125 = nível sérico de CA125 em U/ml.

O ponto de corte do ROMA para a pré-menopausa foi de 13,1% e na pós-menopausa foi de 27,7%.

3.2.5. *Copenhagen Index – CPH-I*

O CPH-I foi obtido, segundo a descrição de Karlsen et al. [69] conforme cálculo abaixo:

CPH-I = $-14.0647 + 1.0649 * \log_2(\text{HE4}) + 0.6050 * \log_2(\text{CA125}) + 0.2672 * \text{idade}/10$

Probabilidade de Predição (PP) = $e^{(\text{CPH-I})} / (1 + e^{(\text{CPH-I})})$

\log_2 = logaritmo na base 2; HE4 = nível sérico do HE4 em pmol/L; CA125 = nível sérico de CA125 em U/ml; $e \simeq 2.71828$ (número de Euler).

O ponto de corte utilizado para o CPH-I foi de PP = 0,070.

3.2.6. *Ovarian Score - OVS*

Recentemente descrito, o *Watrowski Score* [76] foi modificado em nosso estudo para o *Ovarian Score* para o qual foram utilizados os valores séricos do CA125, CRP e estado menopausal. Estes três parâmetros utilizados foram dicotomizados de acordo com o ponto de corte de 35 U/ml para o CA125 e 10 mg/L para a CRP e o estado menopausal. Considerou-se o resultado de 1 para os valores dos marcadores acima do ponto de corte e para a pós-menopausa. O OVS variou de 0 a 3, sendo os valores de 0 e 1 classificados como negativos e 2 e 3 classificados como positivos.

3.3. Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa *R Environment for Statistical Computing Software* [78]. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando intervalos de confiança de 95%, considerando o valor de $p < 0,05$ significativo. Os tumores ovarianos foram classificados como benignos, *borderline*, carcinomas, tumores malignos não epiteliais e metástases ovarianas de acordo com o diagnóstico histopatológico. Foram determinadas as médias e/ou medianas das concentrações séricas do CA125, HE4, CRP e o ROMA, CPH-I e o OVS foram calculados. A seguir foram calculadas as Áreas sob as curvas ROC [*Areas Under the Receiver Operating Characteristic Curves* (AUCs)] para o ROMA, CPH-I, CA125, CRP e OVS nos diferentes cenários. As AUCs foram comparadas utilizando o método DeLong [79]. Foram calculadas as sensibilidades e especificidades para o ROMA, CPH-I, CA125, CRP e OVS utilizando os pontos de corte já expostos.

4. RESULTADOS

Artigo 1. Comparing the Copenhagen Index (CPH-I) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA): Two equivalent ways to differentiate malignant from benign ovarian tumors before surgery?

Artigo 2. Preoperative dosage of serum C - reactive protein: Is it useful in the differential diagnosis of adnexal masses?

Artigo 1. Comparing the Copenhagen Index (CPH-I) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA): Two equivalent ways to differentiate malignant from benign ovarian tumors before surgery?

27/02/2016

RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 27, 2016

This is a License Agreement between Adriana Yoshida ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

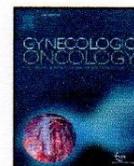
Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Adriana Yoshida
Customer address	Alexander Fleming Street 101 Campinas, São Paulo, 13083881
License number	3817000655505
License date	Feb 27, 2016
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Gynecologic Oncology
Licensed content title	Comparing the Copenhagen Index (CPH-I) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA): Two equivalent ways to differentiate malignant from benign ovarian tumors before surgery?
Licensed content author	Adriana Yoshida, Sophie Françoise Derchain, Denise Rocha Pitta, Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade, Luis Otavio Sarian
Licensed content date	March 2016
Licensed content volume number	140
Licensed content issue number	3
Number of pages	5
Start Page	481
End Page	485
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	Preoperative evaluation of serum biomarkers in women with adnexal masses
Expected completion date	Mar 2016
Estimated size (number of pages)	115



Contents lists available at ScienceDirect

Gynecologic Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygyno



Comparing the Copenhagen Index (CPH-I) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA): Two equivalent ways to differentiate malignant from benign ovarian tumors before surgery?



Adriana Yoshida^a, Sophie Françoise Derchain^a, Denise Rocha Pitta^b,
Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade^c, Luis Otavio Sarian^{a,*}

^a Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas-Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

^b Special Procedures Laboratory, CAISM Hospital, State University of Campinas-Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

^c Department of Pathologic Anatomy, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas-Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

HIGHLIGHTS

- CPH-I and ROMA had similar performances in the differentiation of pelvic masses.
- CPH-I uses age, which is an easier data to obtain than menopausal status.
- CPH-I and ROMA are useful tools for referring high risk women to tertiary centers.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2015

Received in revised form 19 January 2016

Accepted 25 January 2016

Available online 26 January 2016

Keywords:

Ovarian cancer

HE4

CPH-I

Benign ovarian tumors

ABSTRACT

Aim. To evaluate the prediction of malignancy in women with pelvic masses using the Copenhagen Index (CPH-I) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA).

Patients and methods. Three hundred eighty four women operated due to an ovarian mass were enrolled between January 2010 and June 2015. All patients had histopathological diagnosis, HE4 and CA125 measurement. CPH-I and ROMA were calculated and their performances compared in two distinct scenarios: 1) for the discrimination of benign ovarian disease from epithelial ovarian cancer (EOC), non-epithelial ovarian cancer, borderline ovarian tumors (BOT) and ovarian metastases, and 2) for the discrimination of benign disease from EOC. Receiver Operator Characteristics' Areas Under the Curves (AUC) were calculated for CPH-I and ROMA and compared.

Results. Of the 384 women, 224 presented a benign ovarian tumor, 32 BOT, 87 EOC, 26 non-epithelial ovarian cancer, and 15 had ovarian metastases. The best AUCs were obtained for the discrimination of EOC from benign tumors. CPH-I performed slightly better than ROMA, and both approached 89% sensitivity and 85% specificity. When all malignant tumors (EOC, BOT, ovarian metastases and non-epithelial ovarian cancer – entire cohort) were included, the performance of CPH-I and ROMA declined to nearly 72%, although the specificity remained close to 85%.

Conclusion. CPH-I and ROMA performed similarly well for the discrimination of EOC from benign ovarian tumors. However, caution is necessary since, in practical situations, where all the histological possibilities for malignant ovarian tumors must be considered, the sensitivity of CPH-I and ROMA may not surpass 70%.

© 2016 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Differently from other gynaecological malignancies, most cases of ovarian cancer (OC) are diagnosed in advanced stages. As a result, OC represents the most lethal malignancy among women [1]. Several studies have focused on the diagnosis of OC in the initial stages. When the

tumor is limited to the ovary, the disease is curable and have excellent prognosis. Nevertheless, approximately 70% of women are still diagnosed with stage III or IV OC and <30% of them will survive 5 years or more [2].

Pelvic masses are a common finding in pre and postmenopausal women and the prediction of OC in women diagnosed with a pelvic mass is critical. It is estimated that 5–10% women will be submitted to surgery due to a pelvic mass during their lives [3]. Fortunately, benign ovarian tumors are far more frequent than OC [4]. Discerning a benign from a malignant tumor before surgery is crucial to the correct referral

* Corresponding author at: Department of Obstetrics and Gynecology, Campinas State University, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.
E-mail address: sarian@unicamp.br (L.O. Sarian).

of the women. A general gynaecologist is trained to resolve benign cases, but significant survival gains are obtained when a malignant tumor is first approached by a gynaecological oncologist [5–7].

To distinguish a benign ovarian tumor from OC limited to the ovary or pelvis is challenging using gynaecological imaging. The recommended diagnostic method is transvaginal ultrasound. However, the accuracy of the exam depends on the skill level of sonographers [8]. On the other hand, serum tumor markers have the advantage of being performed under more standardized conditions and have lower costs compared to ultrasound [9, 10].

Consequently, studies are making every effort to develop other indexes using tumor markers combined to patients' characteristics, e.g. age or menopausal status, to aid in the diagnosis of suspicious masses. The Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA), utilizes human epididymis protein 4 (HE4), CA125, and menopausal status. The ROMA was firstly described in by Moore and cols. in a study that presented a correct classification of 94% of epithelial ovarian cancer (EOC) as high risk of malignancy utilizing this algorithm [11]. Since then, ROMA has been validated in several studies [12–22]. Some studies showed a better performance of ROMA over the CA125 alone in the prediction of ovarian cancer [19, 21, 22], although diverging results are seen in other studies [12, 17]. Furthermore, HE4 could be used alone, without the benefit of adding the ROMA to the preoperative setting [13, 14]. Li and cols. performed a meta-analysis and found that ROMA could be a useful tool to distinguish EOC from benign pelvic masses with a high diagnostic accuracy (Area Under the Curve = 0.93). ROMA presented a higher sensitivity to predict advanced stage EOC than early stage EOC, and a higher sensitivity to predict EOC in postmenopausal than in premenopausal woman [23].

More recently, a new biomarker based index, the Copenhagen Index (CPH-I), was described by Karlsen and cols. [24]. CPH-I is calculated using serum HE4 and CA125 concentrations and the age of patients. This index was validated in a population of eight international studies and showed promising results for discerning epithelial OC from benign ovarian tumors [24]. However, there are two important issues regarding the CPH-I validation study that must be addressed: 1) the validation cohort did not include women with borderline ovarian tumors (BOT), ovarian metastases and non-epithelial OC, and 2) CPH-I has not yet been tested in studies other than the validation one [24].

The aim of our study was to compare the performance of ROMA and CPH-I for the discrimination of malignant disease in women diagnosed with ovarian masses, in two distinct scenarios: 1) in a cohort including only women with EOC and benign ovarian disease, similar to that used in CPH-I validation study [24]; and 2) in a cohort including women with epithelial and non-epithelial OC, BOT, ovarian metastases and benign ovarian disease.

2. Patients and methods

2.1. Patients

This study was conducted at the Women's Hospital (CAISM) of State University of Campinas (Unicamp), which has a tertiary cancer center dedicated to breast and gynaecologic malignancies. CAISM-Unicamp is located at the city of Campinas, São Paulo, Brazil, and patient enrolment occurred from January 2010 to June 2015. We invited to participate 923 consecutive women with a pelvic mass referred to the hospital. The study was approved by the University Research Ethics Committee (number 1092/2009). After signing the informed consent form, patients were submitted to pelvic examination, and an ultrasound evaluation of the pelvis was scheduled. Blood samples were collected for serum marker measurement and archival purposes. When indicated, diagnostic and/or treatment surgical procedures were scheduled. When surgery was not indicated, women were scheduled for clinical follow-up. Women with tumors more likely to be benign waited for nonpriority surgeries. Those with moderate or high risk of malignancy underwent

surgery earlier. In 22 cases of non-resectable tumors, percutaneous biopsy of a pelvic mass or abdominal implant were performed. Tissue specimens were analyzed by a team of pathologists specialized in gynaecologic pathology, according to the guidelines of the World Health Organization International Classification of Ovarian Tumors [25]. Both surgery and histopathological analyses were performed in this single institution. Bilateral tumors were found in 58 women; for statistical purposes, the tumor with worse prognosis was considered in analyses. We excluded women with no surgical indication (386 women), those for whom serum for measurement of CA125 and HE4 was not available (93 women), and women who had extra ovarian tumors, comprising benign (uterine leiomyoma, tubal cysts, sactosalpinx) and malignant (pseudomixoma peritonei, gastrointestinal origin carcinomas) (60 women). For these later, i.e. for women with extra ovarian malignant tumors, the histopathological diagnoses were not obtained from ovarian specimens, and there was no evidence whatsoever of ovarian compromise.

2.2. Methods

Blood samples obtained from peripheral venous puncture were stored at -80°C until analysis of biomarkers. The mean time elapsed between the blood collection and surgery was 69 days, ranging from 24 h or less for emergency procedures to a maximum of 119 days (90% central range = 40 to 75 days). Serum CA125 and HE4 concentrations were measured according to the manufacturer instructions using the Architect automated assay (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA), a two-step chemiluminescent micro particle immunoassay (CMIA). Postmenopausal status was defined as >1 year of amenorrhea or ≥ 50 years in the case of previous hysterectomy.

2.3. Statistical analyses

We analyzed data using the R Environment for Statistical Computing Software [26]. Statistical calculations were performed using 95% confidence intervals (CIs), considering $P < 0.05$ as significant. Ovarian tumors were classified as benign, borderline ovarian tumors (BOT), ovarian cancer (consisting of EOC and non-epithelial OC), and ovarian metastases, according to the histopathologic diagnosis. The Copenhagen Index (CPH-I) was calculated for each subject using the formulae proposed by Karlsen and cols. [24] and the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) was used as proposed by Moore and cols. [11]. We determined the median (with corresponding ranges) values for age, body mass index, serum HE4 and CA125 levels, and ROMA and CPH-I predicted risk of malignancies for each tumor category. Next, we calculated the Receiver Operator Characteristics' (ROC) Areas Under the Curves (AUC) for CPH-I and ROMA in different scenarios. We compared the AUCs using the DeLong method [27]. In order to match the inclusion criteria used to assemble the validation cohort used in the Karlsen and cols. [24] study, in a few analyses we excluded BOT, ovarian metastases and non-epithelial OC (we named this subset of patients as "EOC-restricted cohort"). We then calculated the sensitivity and specificity for CPH-I and ROMA, using standard cut-off points (for CPH-I, 0.07; for ROMA, 13.1% in premenopausal women and 27.7% for postmenopausal women) [11, 24], for the entire cohort and for the EOC-restricted cohort. We next depicted the ROC curves for CPH-I and ROMA for the complete and EOC-restricted cohorts.

3. Results

Table 1 briefly shows the main characteristics of the study cohort. Three hundred eighty four patients entered analyses, 58.3% (224 patients) of which had benign ovarian disease. Of the 224 women with benign ovarian disease, 83 had epithelial tumors, 56 germ cells, and 28 had stromal tumors (data not shown in table). Another 57 women with benign ovarian disease had non-neoplastic tumors, comprising 24

endometriomas, 11 functional cysts and 22 other minor groups, which consisted of atrophic ovaries, ovarian torsion, tubo-ovarian abscess, oophoritis, and ovarian oedema (data not shown in table). Of the 160 women with non-benign ovarian disease, 32 (8.3%) had BOT, 87 (22.6%) EOC, 26 (6.8%) non-epithelial OC and 15 (4%) had ovarian metastases. Median patients' age achieved its acumen in those with epithelial OC (62.9 years, range 18.4–86.6), contrasted to only 46.1 years (range 14.4–84.4) in those with benign ovarian disease. Patients with epithelial OC also had the highest median serum levels of HE4 (280.9 pmol/L, range 19.1–24,752.3) and CA125 (314.2 U/mL, range 3.9–24,647.2), and accordingly their predicted risk of harbouring a malignant tumor were the highest among all study groups [87.3%, (range 1.7–99.9) according to ROMA, and 83.4% (range 0.2–100) according to CPH-I].

Table 2 compares the performance of CPH-I and ROMA for the discrimination of ovarian tumors, in different scenarios. In all comparisons, both tests performed similarly. The best AUCs were obtained for the EOC-restricted cohort, i.e. the discrimination of epithelial OC from benign tumors. When all malignant tumors (BOT, ovarian metastases and non-epithelial OC) were included, the performance of both exams deteriorated (first line of the table). In addition, CPH-I and ROMA performed similarly for the discrimination of benign from stage I-II OC (0.78 and 0.77, respectively). However, when differentiating benign tumors from stage I-II EOC, the AUCs for both tests increased (0.87 for both). Both tests performed similarly for the differentiation of OC from metastases (CPH-I AUC = 0.66 and ROMA AUC = 0.65); for the hypothetical discrimination of EOC from metastases, the AUC for both tests increased to 0.75. Importantly, both tests performed poorly for the differentiation of stage I-II OC from ovarian metastases (CPH-I and ROMA AUC = 0.53), although a better performance was obtained for the discrimination of stage III-IV OC from metastases (CPH-I AUC = 0.88; ROMA AUC = 0.86).

In Table 3, we dissect and compare the performance indicators of CPH-I and ROMA for the complete cohort and for the EOC-restricted cohort. For the EOC restricted cohort, CPH-I performed slightly better than ROMA, and both tests approached 89% sensitivity and 85% specificity. When analysing the same parameters for the complete cohort, which include women with BOT, ovarian metastases and non-epithelial OC, the sensitivity of both tests declined to nearly 72%, although the specificity remained close to 85%.

Fig. 1 shows the ROC curves for CPH-I and ROMA for the discrimination of OC + BOT + metastases from benign tumors (A) and EOC from benign tumors (B). Curves for CPH-I and ROMA were statistically similar in both scenarios.

4. Discussion

Our study shows that ROMA and CPH-I performed similarly well for the discrimination of malignant from benign ovarian tumors. This is the

Table 2
Polytomous discrimination performance of CPH-I and ROMA.

Performance measures	AUC CPH-I (95%CI)	AUC ROMA (95%CI)	P-value ROMA vs. CPH-I ^a
Benign vs OC + BOT	0.84 (0.79–0.88)	0.82 (0.78–0.86)	0.15
Benign vs EOC	0.94 (0.90–0.97)	0.93 (0.89–0.96)	0.30
Benign vs BOT	0.83 (0.54–1)	0.74 (0.27–1)	0.32
Benign vs OC stages I–II	0.78 (0.70–0.85)	0.77 (0.71–0.85)	0.82
Benign vs EOC stages I–II	0.87 (0.80–0.94)	0.87 (0.80–0.94)	0.65
Benign vs ovarian metastases	0.83 (0.70–0.96)	0.80 (0.68–0.93)	0.42
BOT vs OC stages I–II	0.71 (0.60–0.82)	0.68 (0.56–0.69)	0.26
BOT vs OC stages III–IV	0.84 (0.72–.95)	0.87 (0.74–0.98)	0.30
BOT vs ovarian metastases	0.69 (0.52–0.86)	0.66 (0.49–0.84)	0.55
OC vs metastases	0.66 (0.54–0.78)	0.65 (0.53–0.78)	0.71
EOC vs metastases	0.75 (0.64–0.87)	0.75 (0.63–0.87)	0.72
OC stages I–II vs metastases	0.53 (0.38–0.69)	0.53 (0.36–0.69)	0.78
OC stages III–IV vs metastases	0.88 (0.79–0.97)	0.86 (0.86–0.95)	0.15

Note:

AUC = Areas Under the Curves.

CPH-I = Copenhagen Index [24].

ROMA = Risk of Ovarian Malignancy Index [11].

CI = confidence interval.

Benign = women with benign ovarian disease, consisting of 83 benign epithelial tumors, 56 benign germ cell, and 28 benign stromal tumors; another 57 women had atrophic ovaries, ovarian torsion, tubo-ovarian abscess, oophoritis, and/or ovarian oedema. (n = 224). OC = ovarian cancer, comprising 87 epithelial and 26 non-epithelial malignant tumors (n = 113).

EOC = epithelial ovarian cancer (n = 87).

BOT = borderline ovarian tumors (n = 32).

Metastases = ovarian metastases (n = 15).

^a AUC were compared using DeLong.

first study to evaluate CPH-I outside the validation datasets. When using selection criteria similar to those used in the CPH-I validation study (i.e. including only epithelial OC as malignant tumors), we obtained an AUC of 0.94 for CPH-I, which is virtually the same value (0.95) reported by Karlsen and cols. in the validation study [24]. The same results were observed for the comparison of benign tumors versus stages I-II with ROC-AUC 0.87 for CPH-I in the present study and 0.88 in the previous study (validation cohort) [24].

It is important to emphasize that BOT, ovarian metastases and non-epithelial OC cases were not included in the CPH-I study due to different designs across study partners [24]. In our single-institution study, we tested CPH-I in a more clinically realistic scenario, encompassing all the histological possibilities for malignant ovarian tumors (epithelial and non-epithelial OC, BOT and ovarian metastases). Our approach is more suitable to the practitioner. When including all patients in the analyses, the performances of CPH-I and ROMA were not that brilliant, with a significant deterioration of both tests' sensitivities, although specificity was preserved. Thus, in the real world, CPH-I and ROMA

Table 1
Clinical features of women by tumor type.

	Benign ^a disease (n = 224)	Borderline ovarian tumor (n = 32)	Epithelial OC (n = 87)	Non-epithelial OC (n = 26)	Ovarian metastases (n = 15)
Age, in years ^b	46.1 (14.4–84.4)	47.1 (20.5–76.8)	62.9 (18.4–86.6)	47.9 (14.7–80.2)	51.4 (30.6–67.2)
Pre-/post-menopausal	122/102	17/15	20/67	14/12	8/7
Body mass index, in kg/m ^{2b}	27.8 (16.7–43.8)	28.1 (21.1–41.0)	26.0 (16.4–44.1)	30.0 (18.8–45)	27.9 (19.9–38.9)
HE4, in pmol/L ^b	48 (8–1012)	66.6 (33.7–301.5)	280.9 (19.1–24,752.3)	59.1 (25–840.2)	84.2 (29.3–547.8)
CA125, in U/ml ^b	23.3 (1.7–2688.7)	43.8 (6.4–1170.8)	314.2 (3.9–24,647.2)	58.3 (7.5–1248.7)	122.8 (7.4–2420.9)
ROMA, in percentage ^b	8.7 (0.1–95.4)	17.9 (3–88.4)	87.3 (1.7–99.9)	12.6 (1.5–97.3)	49.6 (4.3–97)
CPH-I, in percentage ^b	1.4 (0.1–79.2)	5 (0.3–82.4)	83.4 (0.2–100)	7.7 (0.1–96.9)	16.6 (0.4–97.6)
Disease stage (I–II/III–IV)		27/5	36/51	23/3	

OC = ovarian cancer.

CPH-I = Copenhagen Index [24].

ROMA = Risk of Ovarian Malignancy Algorithm [11].

^a Please refer to text in the "Results" section for the description of tumors included in the Benign category.

^b Values expressed as median (range).

Table 3
Performance of CPH-I and ROMA for the complete and EOC-restricted cohort at standard cutoff points.

	Complete cohort ^a		EOC-restricted cohort ^b	
	CPH-I	ROMA	CPH-I	ROMA
Sensitivity	73.1% (67.3 to 78.9%)	71.2% (65.3 to 77.2%)	89.7% (85.7 to 93.7)	88.5% (84.3 to 92.6%)
Specificity	84.4% (78.6 to 90.1%)	83.5% (77.6 to 89.4%)	85.3% (78.7 to 91.9%)	83.5% (76.7 to 90.3%)

Cutoff points: for CPH-I, 0.07 predicted probability (PP); for ROMA, 13.1% for premenopausal women and 27.7% for postmenopausal women [11, 24].

CPH-I = Copenhagen Index [24].

ROMA = Risk of Ovarian Malignancy Index [11].

EOC = epithelial ovarian cancer.

^a Includes, in the “malignant” arm, borderline ovarian tumors, ovarian metastases, epithelial and non-epithelial ovarian cancer. This analysis simulates real-world conditions faced by practitioners, which cannot discern the pathological nature of the ovarian masses before surgery.

^b These analyses emulate those used in CPH-I validation studies [24] and exclude borderline ovarian tumors, non-epithelial ovarian cancer and ovarian metastases.

should be used with caution, and their results must always be interpreted in conjunction with the image analyses of the mass.

It is difficult to compare the performance of ROMA across studies since authors report several methodological differences. In a recent study, when the algorithm was used to distinguish epithelial OC from benign diseases, the AUC for ROMA was 0.82 (premenopausal) and 0.88 (postmenopausal) [22]. In our study, it was 0.93, considering pre and postmenopausal women altogether. It is of note that Xu and cols. measured HE4 and CA125 using Roche assays, whereas we used the Abbott assays. Karlsen and cols. used the same methods that we used and obtained an AUC for ROMA = 0.95 (for the differentiation of EOC from benign disease) [18], while we obtained quite the same performance (AUC = 0.93). It is important to emphasize, in our study, we collected blood for the markers on average 69 days before surgery, whereas in the comparison studies samples were obtained immediately or two weeks before surgery [18, 22]. Authors that conducted similar but smaller studies have reported comparable results: Ortiz and cols. obtained AUC = 0.94 for the discrimination of 29 ovarian cancers (93% EOC) from 119 cases of benign pelvic diseases (88% ovarian); Sandri and cols. reported AUC = 0.93 for the discrimination of 160 malignant adnexal tumors (including tubal cancer) from 164 benign pelvic masses [19, 20].

CPH-I and ROMA performed fairly well for the discrimination of advanced (stages III-IV) OC from ovarian metastases, but poorly for the discrimination of early OC from ovarian metastases. In fact, a good discriminating power would be useful for correct surgery planning and even patient referral of the patient either to a gynaecological cancer center or to a general cancer hospital.

Our study is faulty in that we performed our assessments in a selected cohort of patients referred to a tertiary cancer center. A stronger study design would be to test CPH-I and ROMA before patient referral to a specialized gynaecological cancer center. In highly specialized gynaecological cancer centers, ultrasound and other imaging services are often highly capable and can provide reliable diagnoses. This situation is in stark contrast to that in non-specialized centers, where auxiliary methods such as CPH-I, ROMA and other triaging methods can be more useful to select patients for referral to a specialized center. Good triaging methods can avoid patient anxiety, unnecessary surgeries, or a delay in the treatment of OC. Our study is also peculiar in that we report on a relatively high proportion of women with early-stage OC. One possible explanation for this fact is that Brazil is in the middle of a rapid demographic transition [28], and the bulk of the Brazilian population pyramid is in the 15–35 years age strata. This results in a relatively high proportion of ovarian tumors typical of these age strata, non-EOC and BOT, which in general can be diagnosed earlier in their natural course.

We decided to compare ROMA – a well-known and already extensively tested triaging algorithm – to CPH-I because the latter is calculated using age instead of menopausal status. Age is an information easier to obtain compared to menopausal status, which is established using different criteria across studies. For instance, there are authors who consider >1 year of amenorrhea as the diagnostic criterion for menopause, while others utilize follicle stimulating hormone (FSH) level, or the age of 50 years as a cut-off point [15, 24, 29]. The finding that both methods performed similarly is thus encouraging, since the ease of use of CPH-I can make it more popular among practitioners.

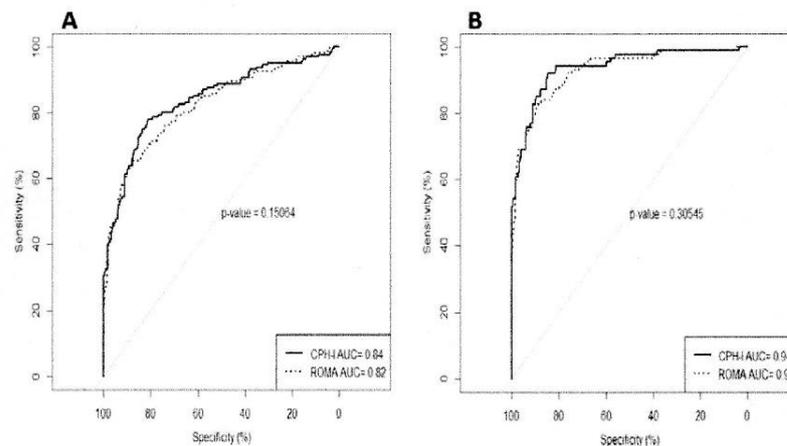


Fig. 1. Comparison of ROC curves for CPH-I and ROMA for the discrimination of malignant from benign ovarian tumors. In A, all tumors were included in the analysis (i.e., in the “malignant” arm, EOC, non-epithelial OC, BOT and ovarian metastases were included). In B, BOT, non-epithelial OC and ovarian metastases were excluded, emulating the cohort used in the CPH-I validation studies [24].

In essence, our study shows that CPH-I may be a tool to aid in the discrimination of patients that might possibly benefit from a referral to a specialized cancer center. CPH-I can be easily performed in primary and secondary health services in the case of suspicious masses visualized on ultrasound or another imaging. However, caution is necessary since, in practical situations, the sensitivity of CPH-I may be as low as 70% and incorrect interpretation of results can in turn lead to a delayed referral of a woman to a specialized cancer center.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

The São Paulo Research Foundation, FAPESP number 2012/15059-8 funded this study.

References

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 3/September/2015.
- [2] Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF et al. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2012, National Cancer Institute, Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015, accessed on 1/November/2015.
- [3] J.P. Curtin, Management of the adnexal mass, *Gynecol. Oncol.* 55 (3 Pt 2) (1994 Dec) 542–546.
- [4] U. Menon, A. Gentry-Maharaj, R. Hallett, A. Ryan, M. Burnell, A. Sharma, et al., Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS), *Lancet Oncol.* 10 (4) (2009 Apr) 327–340.
- [5] J.L. Brun, X. Fritel, Y. Aubard, B. Borghese, N. Bourdel, N. Chabbert-Buffet, et al., Collège National des Gynécologues Obstétriciens Français. Management of presumed benign ovarian tumours: updated French guidelines, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 183 (2014 Dec) 52–58.
- [6] K.C. Giede, K. Kieser, J. Dodge, B. Rosen, Who should operate on patients with ovarian cancer? An evidence-based review, *Gynecol. Oncol.* 99 (2) (2005 Nov) 447–461.
- [7] C.C. Earle, D. Schrag, B.A. Neville, K.R. Yabroff, M. Topor, A. Fahey, et al., Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (3) (2006 Feb 1) 172–180.
- [8] A. Sayasneh, L. Wynants, J. Preisler, J. Kaijser, S. Johnson, C. Stalder, et al., Multicentre external validation of IOTA prediction models and RMI by operators with varied training, *Br. J. Cancer* 108 (12) (2013 Jun 25) 2448–2454.
- [9] S. Kondalsamy-Chennakesavan, A. Hackethal, D. Bowtell, Australian Ovarian Cancer Study Group, A. Obermair, Differentiating stage I epithelial ovarian cancer from benign ovarian tumours using a combination of tumour markers HE4, CA125, and CEA and patient's age, *Gynecol. Oncol.* 129 (3) (2013 Jun) 467–471.
- [10] S. Kondalsamy-Chennakesavan, A. Obermair, Differentiating stage I epithelial ovarian cancer from benign disease in women with adnexal tumours using biomarkers or the ROMA algorithm, *Gynecol. Oncol.* 130 (2) (2013 Aug) 400.
- [11] R.G. Moore, D.S. McMeekin, A.K. Brown, P. Disilvestro, M.C. Miller, W.J. Allard, 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.* 112 (1) (2009 Jan) 40–46.
- [12] T. Van Gorp, I. Cadron, E. Despierre, A. Daemen, K. Leunen, F. Amant, et al., HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm, *Br. J. Cancer* 104 (5) (2011 Mar 1) 863–870.
- [13] F. Jacob, M. Meier, R. Caduff, D. Goldstein, T. Pochechueva, N. Hacker, et al., No benefit from combining HE4 and CA125 as ovarian tumor markers in a clinical setting, *Gynecol. Oncol.* 121 (3) (2011 Jun 1) 487–491.
- [14] M. Montagnana, E. Danese, O. Ruzzenente, V. Bresciani, T. Nuzzo, M. Gelati, et al., The ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) for estimating the risk of epithelial ovarian cancer in women presenting with pelvic mass: is it really useful? *Clin. Chem. Lab. Med.* 49 (3) (2011 Mar) 521–525.
- [15] R.G. Moore, M.C. Miller, P. Disilvestro, L.M. Landrum, W. Gajewski, J.J. Ball, et al., Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass, *Obstet. Gynecol.* 118 (2 Pt 1) (2011 Aug) 280–288.
- [16] G. Ruggeri, E. Bandiera, L. Zanotti, S. Belloi, A. Ravaggi, C. Romani, et al., HE4 and epithelial ovarian cancer: comparison and clinical evaluation of two immunoassays and a combination algorithm, *Clin. Chim. Acta* 412 (15–16) (2011 Jul 15) 1447–1453.
- [17] C. Anton, F.M. Carvalho, E.I. Oliveira, G.A. Maciel, E.C. Baracat, J.P. Carvalho, A comparison of CA125, HE4, risk ovarian malignancy algorithm (ROMA), and risk malignancy index (RMI) for the classification of ovarian masses, *Clinics (Sao Paulo)* 67 (5) (2012) 437–441.
- [18] M.A. Karlsen, N. Sandhu, C. Høgdall, I.J. Christensen, L. Nedergaard, L. Lundvall, et al., Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass, *Gynecol. Oncol.* 127 (2) (2012 Nov) 379–383.
- [19] M.T. Sandri, F. Bottari, D. Franchi, S. Boveri, M. Candiani, S. Ronzoni, et al., Comparison of HE4, CA125 and ROMA algorithm in women with a pelvic mass: correlation with pathological outcome, *Gynecol. Oncol.* 128 (2) (2013 Feb) 233–238.
- [20] B. Ortiz-Muñoz, E. Aznar-Oroval, A. García García, A. Covisa Peris, P. Perez Ballester, M. Sanchez Yepes, et al., HE4, Ca125 and ROMA algorithm for differential diagnosis between benign gynaecological diseases and ovarian cancer, *Tumour Biol.* 35 (7) (2014 Jul) 7249–7258.
- [21] H. Fujiwara, M. Suzuki, N. Takeshima, K. Takizawa, E. Kimura, T. Nakanishi, et al., Evaluation of human epididymis protein 4 (HE4) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) as diagnostic tools of type I and type II epithelial ovarian cancer in Japanese women, *Tumour Biol.* 36 (2) (2015 Feb) 1045–1053.
- [22] Y. Xu, R. Zhong, J. He, R. Ding, H. Lin, Y. Deng, et al., Modification of cut-off values for HE4, CA125 and the ROMA algorithm for early-stage epithelial ovarian cancer detection: results from 1021 cases in South China, *Clin. Biochem.* 49 (1) (2016 Jan) 32–40.
- [23] F. Li, R. Tie, K. Chang, F. Wang, S. Deng, W. Lu, et al., Does risk for ovarian malignancy algorithm excel human epididymis protein 4 and ca125 in predicting epithelial ovarian cancer: a meta-analysis, *BMC Cancer* 12 (2012 Jun 19) 258.
- [24] M.A. Karlsen, E.V. Høgdall, I.J. Christensen, C. Borgfeldt, G. Kalapotharakos, L. Zdrzilova-Dubská, et al., A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer — an international multicenter study in women with an ovarian mass, *Gynecol. Oncol.* 138 (3) (2015 Sep) 640–646.
- [25] R.J. Kurman, M.L. Carcangiu, C.S. Herrington, R.H. Young, World Health Organization Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, fourth ed. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2014.
- [26] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. URL <http://www.R-project.org/>
- [27] E.R. DeLong, D.M. DeLong, D.L. Clarke-Pearson, Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach, *Biometrics* 44 (3) (1988 Sep) 837–845.
- [28] Brazilian Institute of Geography and Statistics — IBGE. Population projection of Brazil and Federative Units [Internet]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>, accessed on 8/January/2016.
- [29] T. Van Gorp, J. Veldman, B. Van Calster, I. Cadron, K. Leunen, F. Amant, et al., Subjective assessment by ultrasound is superior to the risk of malignancy index (RMI) or the risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) in discriminating benign from malignant adnexal masses, *Eur. J. Cancer* 48 (11) (2012 Jul) 1649–1656.

Artigo 2. Preoperative dosage of serum C - reactive protein: Is it useful in the differential diagnosis of adnexal masses?

Date: Feb 22, 2016

To: "Luis Otavio Sarian" luis.sarian@gmail.com

From: "IJBME Editorial Office" journal.biomarkers@ulss12.ve.it

Subject: The International Journal of Biological Markers | Submission confirmation: JBM-D-16-00045

Dear Prof. Sarian,

This is to confirm receipt of your manuscript as follows:

JBM-D-16-00045

"Preoperative dosage of serum C - reactive protein: is it useful in the differential diagnosis of adnexal masses?"

Corresponding Author: Prof. Luis Otavio Sarian

Include the manuscript number in all correspondence with the Journal.

You may check on the progress of your submission by logging in to <http://jbm.edmgr.com/> with your username (*****) and password (*****).

Thank you for submitting this article for consideration to the The International Journal of Biological Markers

With kind regards,

Editorial Office

the International Journal of Biological Markers

www.biological-markers.com

Preoperative dosage of serum C - reactive protein: Is it useful in the differential diagnosis of adnexal masses?

The role of CRP in the differentiation of adnexal masses

Authors:

Adriana Yoshida^a, M.D.

Sophie F. Derchain^a, M.D., Ph.D.

Denise R. Pitta^b, Biologist

Nathália Crozatti^a, Medical Science student

Liliana A. L. A. Andrade^c, M.D., Ph.D.

Rodrigo F. da Silva^b, Biologist

Luis O. Sarian^{a*}, M.D., Ph.D.

a. Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

b. Special Procedures Laboratory, CAISM Hospital, State University of Campinas - Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

c. Department of Pathologic Anatomy, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil

***Corresponding author at:** Department of Obstetrics and Gynecology, State University of Campinas, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail address: sarian@unicamp.br

Phone/FAX: + 55 19 35219300

Manuscript word count: 2,964

Abstract

Serum biomarkers may help to discriminate malignant from benign adnexal masses with equivocal features on image exams. Adequate discrimination of such tumors is crucial for referring patients to either a specialized cancer center or a non-specialized gynecologic service.

Aim. Investigate if serum preoperative C-reactive protein (CRP) alone or combined with CA125 and menopausal status in the Ovarian Score (OVS) is useful in the prediction of malignancy of women with ovarian tumors. **Methods.** This cross-sectional study included 293 patients who underwent surgery in a tertiary cancer center. Receiver Operator Characteristics Areas Under the Curves (AUC) for CRP, CA125 and OVS were calculated in different scenario, as well as their sensitivity and specificity, using standard cut-off points (for CRP, 10mg/l; for CA125, 35U/ml). **Results.** CA125 and the OVS performed significantly better than CRP alone in the differentiation of benign disease from epithelial ovarian cancer (EOC) (AUC = 0.86 for CA125, 0.79 for OVS and 0.73 for CRP). The OVS and CRP alone were superior to CA125 only in the differentiation of borderline ovarian tumor from advanced stages EOC and non-EOC. Sensitivity and specificity was 52.5% and 83%, respectively for CRP, 77.9% and 66.7%, respectively for CA125, and 71.3% and 67.8%, respectively for OVS. **Conclusion.** The OVS is as good as CA125 in the differentiation of benign tumors from ovarian cancer. The addition of CA125 and menopausal status to CRP enhanced the relatively low discriminatory power of isolated CRP.

Keywords: Adnexal masses; CA125; CRP; Inflammation; Ovarian cancer; Ovarian tumors.

Introduction

Ovarian cancer remains the most lethal gynecological cancer worldwide, with 238,719 estimated new cases and 151,917 deaths each year (1). The majority of patients are diagnosed in advanced stages and less than 30% of them survive after 5 years (2). Pro-inflammatory processes elicited by ovulation, endometriosis, pelvic inflammation and polycystic ovarian syndrome have been proposed as potential pathways involved in the pathogenesis of ovarian cancer (3, 4). The inflammatory response promotes carcinogenesis by the induction of genomic instability and epigenetic alterations, leading to inappropriate gene expression, which stimulates neoangiogenesis, cell proliferation and inhibition of apoptosis in cancer cells. A similar chronic inflammation environment is often found in tumor tissues (5, 6).

Serum biomarkers can be useful to assist on the diagnosis of a benign or malignant ovarian tumor together with clinical and ultrasound exams. Although ovarian cancer is a rare entity, pelvic masses are a relatively common finding in pre and postmenopausal women, being more frequent in premenopausal. Moreover, it is estimated that 5-10% women will be submitted to surgery due to a pelvic mass in their lifetime (7) and approximately 30% of postmenopausal women referred to surgery will be diagnosed with a malignant tumor (8). Preoperative identification of malignant tumors allows patient referral to a tertiary hospital, where they can be operated by a gynecologic oncologist, with improvement of survival, while benign tumors may be surgically removed in a minimal invasive approach (laparoscopy) in a secondary center (9 – 11).

Serum C reactive protein (CRP) is a sensitive indicator of acute or chronic inflammation, used routinely in several acute or chronic inflammatory diseases. Besides, its production by the hepatocytes as part of the inflammatory response is expected when tissues are damaged by an infection, trauma or a malignant disease (4, 5). Some studies have already investigated the elevated circulating levels of CRP in ovarian cancer setting. These studies showed a positive correlation between CRP and ovarian cancer, however it must be emphasized that they evaluated pre - diagnostic serum to assess cancer risk, but were not designed to examine whether women with adnexal masses should undergo surgery (4, 12 -15). Higher levels of CRP are related to advanced disease, worse prognosis (16), decreased progression-free survival and overall survival (17) but little is known about the role of the biomarker in the preoperative setting (18, 19).

CA125 is a well-established biomarker used in the management of women with epithelial ovarian cancer (EOC). It has been useful in monitoring response to chemotherapy,

diagnosis of ovarian cancer (OC) recurrence and in the prediction of disease prognosis. It also plays a role in the discrimination of malignant from benign pelvic masses in preoperative setting (20, 21). However, because of its low specificity, mainly in premenopausal women, as it presents higher concentration in many benign gynecological diseases and conditions, such as menstruation, uterine myoma and endometriosis, other biomarkers have been tested to enhance the performance of CA125 alone. In addition, CA125 level is elevated in 85% of advanced OC but shows low sensitivity in initial stages of the disease, about 50% of the cases (22).

The association of different systemic inflammatory related biomarkers in the evaluation of women with OC is useful to assess treatment response, prognosis, however, as a preoperative test, we should choose more simple association of biomarkers, considering costs, availability and reproducibility in clinical practice, mainly in under resourced settings.

The goal of this study was to determine the role of CRP measurement in the prediction of malignancy in women with ovarian tumors, compared to the gold standard biomarker for ovarian tumors CA125. In addition, the Ovarian Score (OVS) involving CRP, CA125 values and menopausal status was used to compare if this association is superior to the biomarkers alone.

Patients and methods

Patients

This cross-sectional study was conducted from January 2010 to November 2014 at the Women's Hospital (CAISM), State University of Campinas, a tertiary cancer center specialized in gynecological malignancies. The University Research Ethics Committee (number 1092/2009) approved this study. Women referred to the pelvic oncology clinic, due to pelvic or adnexal masses, were included in this study after signed consent, and were submitted to the study protocol. In brief, patients were submitted to pelvic examination, and an ultrasound evaluation of the pelvis was scheduled. Blood samples were collected for serum marker measurement and archival purposes. When indicated, diagnostic and/or treatment surgical procedures were scheduled. When surgery was not indicated, women were scheduled for clinical follow-up. Women with tumors more likely to be benign waited for nonpriority surgeries. Those with moderate or high risk of malignancy underwent surgery earlier, as previously described (23).

From 785 consecutive enrolled women, we excluded those with no surgical indication (306 women), without CA125 and/or CRP results (149 women) and those who had

extra ovarian tumors (37 women), among these, benign (uterine leiomyoma, tubal cysts, sactosalpinx) and malignant tumors (pseudomyxoma peritonei, gastrointestinal origin carcinomas). The biopsy tissue specimens of these extra ovarian tumors were collected from sites other than the ovaries. Percutaneous biopsy of pelvic masses or abdominal implants, were performed in 22 cases of non-resectable ovarian tumors. Bilateral tumors were found in 64 women; for categorization purposes, the tumor with worst prognosis was taken into account. Postmenopausal status was defined as > 1 year of amenorrhea or ≥ 50 years in the case of previous hysterectomy.

Methods

Blood samples collected from patients were stored in serum separator tubes. They were left to clot for at least 30 minutes before centrifugation. Blood samples were centrifuged 1300g for 10min, and serum was separated into aliquots and stored at -80°C until the analysis of biomarkers. The mean time elapsed between the blood collection and surgery was 69 days, ranging from 24 h or less for emergency procedures to a maximum of 119 days (90% central range = 40 to 75 days).

C-reactive protein (CRP)

Serum CRP was measured through the high-sensitivity CRP test, a method using the immuno-turbid metric assay in an automatic analyzer Modular ANALYTICS - P800 - Evolution Model (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), expressed in mg/l.

Cancer antigen (CA125)

Serum CA125 was determined by the CA125 II test, through the chemiluminescence technique in the automatic analyzer Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions, expressed in U/ml.

Statistical analysis

Data were analyzed using the R Environment for Statistical Computing Software (24). Statistical calculations were performed using 95% confidence intervals (CIs), considering P values < 0.05 as significant. Ovarian tumors were classified into non-neoplastic, benign, borderline ovarian tumor (BOT), malignant, and metastatic groups according to histopathologic diagnosis. For analytic purposes, tumors were grouped into benign (non-neoplastic and benign)

and malignant (BOT, malignant and metastatic). Clinical characteristics of groups classified as benign or malignant were compared using the chi-square test for categorical variables and Kruskal-Wallis test for continuous variables. A simple score, recently described by Watrowski and Zeillinger (18) was modified in our study to OVS, in order to test the association of CA125, CRP dosage and menopausal status. These three parameters were dichotomized according to CA125 (35 U/ml as cutoff), CRP (10 mg/l as cutoff) and menopausal status, giving 1 to marker values above cutoff and to postmenopausal status. OVS thus ranged from 0 to 3, values 0 – 1 classified as negative and 2 – 3 classified as positive. Next, we calculated the Receiver Operator Characteristics' (ROC) Areas Under the Curves (AUC) for CRP, CA125, and OVS in different scenarios. We compared the AUCs using the DeLong method (25). We then calculated the sensitivity and specificity for CRP, CA125 and OVS using standard cutoff points above. We next depicted the ROC curves for CRP and CA125 for the complete cohort, and then for pre and postmenopausal subsets of women.

Results

Among the studied sample of 293 women, 41.6% of them presented a malignant tumor. Malignant ovarian tumors were found in women significantly older (mean 55.4 vs. 47.2 years old, $P < 0.01$; data not shown) and postmenopausal (66.9% vs. 48%, $P < 0.01$). Neither body mass index nor history of close relatives with breast or ovarian cancer, were related to tumor malignancy. Most malignant (74.6%) and benign (39%) tumors were of epithelial nature. In women with non-neoplastic masses, 19 were diagnosed with endometriomas, 9 with functional cysts and 10 with other minor categories. Of the malignant tumors, 54.1% was at stages I - II. Most women with malignant tumors had elevated levels of CA125 (77.9%), when compared to those with benign tumors (33.3%) ($P < 0.01$). The same was true for CRP levels, since 52.5% of women with malignant tumors had elevated levels of the serum marker compared to only 17% of the women with benign tumors ($P < 0.01$). Most women with ovarian metastases had elevated levels of CA125 ≥ 35 U/ml (84.6%) and CRP >10 mg/l (61.5%). (**Table 1**).

In **Table 2**, median (with interquartile range – IQR) and mean (with standard deviations – SD) serum concentrations of CRP and CA125 are described according to the histological classification of the tumors. **Table 3** shows the significance values for pairwise comparisons of the CA125 and CRP levels in the different histology strata. CRP levels were significantly higher in women with metastatic tumors when compared to EOC, non-EOC, BOT,

benign and non-neoplastic ($P < 0.01$). In addition, CRP levels from women with EOC were significantly higher when compared to that in women with benign and non-neoplastic tumors ($P < 0.01$). CA125 levels were significantly higher in women with EOC when compared to that in women with benign and non-neoplastic tumors ($P < 0.01$).

In **Table 4**, we show AUCs for CA125, CRP and OVS calculated for the discrimination of different subsets of histological diagnoses. P-values comparing the AUCs for CA125, CRP and OVS were calculated using the DeLong method. CA125 had a significantly better performance (AUC=0.80) than CRP (AUC=0.69) for the differentiation of benign ovarian diseases from OC + BOT, as well as for the discrimination of benign tumors from EOC (AUC = 0.86 for CA125 and AUC = 0.73 for CRP). Similarly, CA125 performed better than CRP for the discrimination of EOC from metastases and stages III - IV OC from metastases. The performance of CRP was statistically similar to CA125 for the differentiation of benign tumors from BOT, early stage OC, and ovarian metastases. Of note, CRP and OVS performed significantly better than CA125 for the differentiation of BOT from advanced stages OC. In the differentiation of BOT from benign, BOT from initial stages OC, and initial stages OC from metastases, OVS had a worse performance than CA125. OVS was superior to CRP alone in the differentiation of benign from OC + BOT; benign from EOC; BOT from advanced stages OC and EOC from metastases.

For the discrimination of benign from malignant ovarian tumors, CRP had a sensitivity of 52.5% and a specificity of 83%, compared to 77.9% and 66.7%, respectively, for CA125, and 71.3% and 67.8%, respectively for OVS (data not shown in tables).

Fig 1 shows the comparison of ROC curves for CA125 and CRP for the discrimination of benign from malignant ovarian tumors in the whole cohort (A), and in the subsets of pre (B) and postmenopausal (C) women. The best AUC for CRP was obtained in postmenopausal women (AUC = 0.73 in postmenopausal women, compared to 0.66 in premenopausal women and 0.69 in the entire cohort), although CA125 performed better than CRP in all studied situations.

Discussion

Our study shows that CRP, a low-cost, widely available serum biomarker, when associated to CA125 and menopausal status may be of some clinical value for women with adnexal masses. In general, biomarkers can be useful tools in preoperative evaluation of adnexal masses, helping to decide if surgery or surveillance is more appropriate for each woman,

considering that most operated pelvic masses are benign and the morbidity of surgical procedures is relevant.

Similar to other biomarkers, it is not correct to classify any value as “normal” for CRP. A minor elevation of CRP (3 – 10 mg/l), found in a third of Americans, is associated to dietary patterns and non-inflammatory conditions, which leads to mild tissue injury. This latter phenomenon may precede disease onset. Consequently, this minor elevation of CRP is related to increased risk of healthy people to develop diseases, predicts worse prognosis and mortality of healthy and diseased people (26). Moreover, ethnical variations are responsible for different values of CRP among studies. In Chinese populations, mean serum concentration of CRP in patients with EOC was 14.32 mg/l (16), another report for Caucasian cases was 36 mg/l (27), which is similar to our findings (36.5 mg/l).

Hefler-Frichmuth et al., in a retrospective study, obtained a doubled CRP serum level in women with malignant (1 mg/dl) compared to those with benign tumors (0.5 mg/dl) (19). In our analyses, women with benign tumors had CRP levels similar to women with BOT (3.2 mg/l), whereas women with EOC (17.3 mg/l) and non-EOC (17.1 mg/l) had significantly higher levels of CRP. Hefler-Frichmuth et al., obtained similar results to ours, in the differentiation of benign from EOC, AUC = 0.90 for CA125 and AUC = 0.73 for CRP (19). However, we were unable to reproduce Hefler-Frichmuth et al. results when CRP, CA125 and age were combined in a ROC curve, with an AUC of 0.92. They found that CRP levels were independently associated with the prediction of malignancy, suggesting that this biomarker could be a useful tool in the differential diagnosis of pelvic masses (19).

Watrowski's score was an association of preoperative platelet count, CRP, fibrinogen and CA125 dosage (18). The association of these four parameters resulted in a higher specificity (94% for Watrowski Score and 80% for CA125) but lower sensitivity than CA125 alone (76% for Watrowski Score and 93% for CA125). A higher sensitivity is crucial for the preoperative setting, since false negatives in this case are related to delay in appropriate treatment and worsening disease prognosis. In our study, we obtained OVS sensitivity (71.3%) slightly inferior to that for CA125 alone (77.9%), with the same specificity (67.8% for OVS and 66.7% for CA125). However, our study population differs from that studied by Watrowski and Zeillinger (2015), as our sample presented a higher number of BOT and stages I - II OC. Another notable difference is that we included ovarian metastases in the analyses. Our study also differs from Watrowski-Zeillinger's in the cutoff points used for CRP (5 mg/l in their study compared to 10 mg/l in our study). In addition, we chose to use menopausal status, as we

obtained an improvement in the performance of isolated CRP in the discrimination of pelvic masses in this subgroup of women.

Of note, the best AUCs for CA125, CRP and OVS were related to the differentiation of EOC from benign tumors and metastases, showing that CRP, as well as CA125 are useful markers, mainly for the prediction of EOC. When we grouped together non-EOC, metastases, BOT and EOC, the performance of CA125, CRP and OVS deteriorated significantly. This latter comparison is not possible with Hefler-Frichmuth's and Watrowski's studies, since they considered EOC + BOT altogether for analysis.

When we analyzed biomarker performance according to menopausal status, although CRP was slightly better in postmenopausal (AUC = 0.73) than in premenopausal women (AUC = 0.66), CA125 showed a significantly superior result in the differentiation of pelvic masses (AUC = 0.81 for both). When we associated CA125 + CRP + menopausal status (OVS), the AUC obtained for this same comparison was 0.76, which was better than CRP ($P = 0.01$) but not to CA125 alone.

One weak point of our study was that we did not exclude women who were in use of hormonal therapy, as other authors (4, 14). The use of oral estrogens replacement therapy enhances CRP levels by a first-pass hepatic effect (28), which could be a potential confounder factor. In addition, both CRP and CA125 can result in false positive results; therefore, we must interpret results with caution, always considering image, clinical exam and presence of conditions and diseases that could enhance biomarker levels.

It is important to emphasize that our sample was relatively rich in stages I - II tumors (54.1%), which is an uncommon feature in ovarian cancer studies. Early stage OC is potentially curable, and we provide a reliable estimate of CRP and CA125 behavior in this subset of women. In our study, CA125, CRP and OVS had similar performances in the differentiation of benign ovarian disease from ovarian cancer stages I - II. In the differentiation of BOT from initial stages OC, CA125 performed better than OVS but was equivalent to CRP.

The correct discrimination between a primary ovarian neoplasia and metastatic ovarian malignancies is also key to the correct referral of women with ovarian tumors. In the case of suspected ovarian metastases, complementary exams such as colonoscopy, computed tomography of the abdomen, mammography and magnetic resonance should be requested (29).

Our results showed predisposition to elevated CRP levels in women with ovarian metastases. CRP elevation has been reported as risk and prognosis factor in other cancers, such as colon (30, 31), breast (32) and uterine (33), which were the primary tumors of our ovarian metastases sample. If we consider CRP levels increase as disease progresses, as reported in

ovarian cancer studies (16, 27), the fact that metastatic disease expresses higher levels of CRP was already expected.

In conclusion, OVS is as good as CA125 for the differentiation of benign adnexal masses from ovarian cancer. In this scenario, the addition of CA125 and menopausal status to CRP enhanced the relatively low discriminatory power of the isolated CRP. However, CRP and OVS may be useful in the even less frequent situation of women with disseminated, non-resectable intraabdominal disease and a pathological diagnosis of BOT. For these cases, elevated CRP levels may suggest that invasive disease was missed during surgical/pathological evaluation, and chemotherapy may be considered a treatment option.

Acknowledgments

The São Paulo Research Foundation, FAPESP number 2012/15059-8, funded this study.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 3 September 2015.
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF et al. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015, accessed on 1 November 2015.
3. Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1459-67
4. Trabert B, Pinto L, Hartge P, Kemp T, Black A, Sherman ME et al. Pre-diagnostic serum levels of inflammation markers and risk of ovarian cancer in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer (PLCO) screening trial. *Gynecol Oncol*. 2014 Nov;135(2):297-304
5. Wang CS, Sun CF. C-reactive protein and malignancy: clinico-pathological association and therapeutic implication. *Chang Gung Med J* 2009 Sep-Oct; 32(5):471-82
6. Kundu JK, Surh YJ. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* 2012 May 1; 52 (9): 2013-37. Review.
7. Curtin JP. Management of the adnexal mass. *Gynecol Oncol*. 1994 Dec;55(3 Pt 2):S42-6.
8. Bennett JA, Oliva E. Pathology of the adnexal mass. *Clin Obstet Gynecol*. 2015 Mar;58(1):3-27.
9. Giede KC, Kieser K, Dodge J, Rosen B. Who should operate on patients with ovarian cancer? An evidence-based review. *Gynecol Oncol*. 2005 Nov;99(2):447-61. Epub 2005 Aug 29.
10. Earle CC, Schrag D, Neville BA, Yabroff KR, Topor M, Fahey A, Trimble EL, Bodurka DC, Bristow RE, Carney M, Warren JL. Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Feb 1;98(3):172-80.
11. Liu JH, Zanotti KM. Management of the adnexal mass. *Obstet Gynecol*. 2011 Jun;117(6):1413-28.
12. Ose J, Schock H, Tjønneland A, Hansen L, Overvad K, Dossus L et al. Inflammatory Markers and Risk of Epithelial Ovarian Cancer by Tumor Subtypes: The EPIC Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015 Jun;24(6):951-61.

13. McSorley MA, Alberg AJ, Allen DS, Allen NE, Brinton LA, Dorgan JF et al. C-reactive protein concentrations and subsequent ovarian cancer risk. *Obstet Gynecol.* 2007 Apr;109(4):933-41
14. Lundin E, Dossus L, Clendenen T, Krogh V, Grankvist K, Wulff M et al. C-reactive protein and ovarian cancer: a prospective study nested in three cohorts (Sweden, USA, Italy). *Cancer Causes Control.* 2009 Sep;20(7):1151-9.
15. Poole EM, Lee IM, Ridker PM, Buring JE, Hankinson SE, Tworoger SS. A prospective study of circulating C-reactive protein, interleukin-6, and tumor necrosis factor α receptor 2 levels and risk of ovarian cancer. *Am J Epidemiol.* 2013 Oct 15;178(8):1256-64
16. Lu Y, Huang S, Li P, Chen B, Liu W, Chen Z et al. Prognostic evaluation of preoperative serum C-reactive protein concentration in patients with epithelial ovarian cancer. *Exp Ther Med.* 2015 May;9(5):2003-2007. Epub 2015 Mar 12.
17. Zhang WW, Liu KJ, Hu GL, Liang WJ. Preoperative platelet/lymphocyte ratio is a superior prognostic factor compared to other systemic inflammatory response markers in ovarian cancer patients. *Tumour Biol.* 2015 Nov;36(11):8831-7.
18. Watrowski R, Zeillinger R. Simple laboratory score improves the preoperative diagnosis of adnexal mass. *Tumour Biol.* 2015 Oct 23. [Epub ahead of print]
19. Hefler-Frischmuth K, Hefler LA, Heinze G, Paseka V, Grimm C, Tempfer CB. Serum C-reactive protein in the differential diagnosis of ovarian masses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009 Nov; 147(1): 65- 8
20. Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer.* 2005 Nov-Dec;15 Suppl 3:274-81.
21. Sölétormos G, Duffy MJ, Othman Abu Hassan S, Verheijen RH, Tholander B, Bast RC Jr et al. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines From the European Group on Tumor Markers. *Int J Gynecol Cancer.* 2016 Jan;26(1):43-51.
22. Jacobs I, Bast RC Jr. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod.* 1989 Jan;4(1):1-12.
23. Yoshida A, Derchain SF, Pitta DR, De Angelo Andrade LA, Sarian LO. Comparing the Copenhagen Index (CPH-I) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA): Two equivalent ways to differentiate malignant from benign ovarian tumors before surgery? *Gynecol Oncol.* 2016 Jan 26. [Epub ahead of print]

24. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. URL <http://www.R-project.org/>.
25. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988 Sep;44(3):837-45.
26. Kushner I, Rzewnicki D, Samols D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med*. 2006 Feb;119(2):166.e17-28.
27. Hefler LA, Concin N, Hofstetter G, Marth C, Mustea A, Sehouli J et al. Serum C-reactive protein as independent prognostic variable in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 1;14(3):710-4.
28. Vongpatanasin W, Tuncel M, Wang Z, Arbique D, Mehrad B, Jialal I. Differential effects of oral versus transdermal estrogen replacement therapy on C-reactive protein in postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Apr 16;41(8):1358-63.
29. Sørensen SS, Mosgaard BJ. Combination of cancer antigen 125 and carcinoembryonic antigen can improve ovarian cancer diagnosis. *Dan Med Bull*. 2011 Nov;58(11):A4331.
30. Zhou B, Shu B, Yang J, Liu J, Xi T, Xing Y. C-reactive protein, interleukin-6 and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2014 Oct;25(10):1397-405.
31. Toriola AT, Cheng TY, Neuhaus ML, Wener MH, Zheng Y, Brown E et al. Biomarkers of inflammation are associated with colorectal cancer risk in women but are not suitable as early detection markers. *Int J Cancer*. 2013 Jun 1;132(11):2648-58.
32. Guo L, Liu S, Zhang S, Chen Q, Zhang M, Quan P et al. C-reactive protein and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015 May 22;5:10508.
33. Li J, Lin J, Luo Y, Kuang M, Liu Y. Multivariate Analysis of Prognostic Biomarkers in Surgically Treated Endometrial Cancer. *PLoS One*. 2015 Jun 24;10(6):e0130640.

Table 1. Key clinical features of women by tumor type (benign or malignant)

Characteristic	Benign n = 171 n (%)	Malignant n = 122 n (%)	P-value
Age (years)			
<50	94 (55)	41 (33.6)	< 0.01
≥50	77 (45)	81 (66.4)	
Body mass index (kg/m²)			
<30	109 (64.1)	84 (70)	0.36
≥30	61 (35.9)	36 (30)	
Menopausal status			
Premenopausal	88 (52)	40 (33.1)	< 0.01
Postmenopausal	82 (48)	81 (66.9)	
Missing data	1	1	
Close relatives with cancer (ovary/breast)			
No	149 (89.8)	114 (95)	0.17
Yes	17 (10.2)	6 (5)	
Missing data	5	2	
Histological type			
Epithelial	67 (39.2)	69 EOC (56.6) / 22 BOT (18%)	
Stroma	26 (15.2)	12 (9.8)	
Germ cell	40 (23.4)	6 (4.9)	
Ovarian metastases		13 (10.7)	
Non neoplastic			
Endometriomas	19 (11.1)		
Functional cysts	9 (5.3)		
Others	10 (5.8)		
Disease stage			
I		55 (45.8)	
II		10 (8.3)	
III		40 (33.3)	
IV		15 (12.5)	
Missing data		2	
Ca125 (U/ml)			
≥ 35	57 (33.3)	95 (77.9)	< 0.01
< 35	114 (66.7)	27 (22.1)	
CRP (mg/L)			
> 10	29 (17)	64 (52.5)	< 0.01
≤ 10	142 (83)	58 (47.5)	
Ovarian metastasis n = 13			
Ca125 serum levels (U/mL)			
≥ 35		11 (84.6)	
< 35		2 (15.4)	
CRP serum levels (mg/L)			
> 10		8 (61.5)	
≤ 10		5 (38.5)	

*EOC=epithelial ovarian cancer; BOT= borderline ovarian tumor

Table 2. Serum concentration of CRP and CA125 according to histological diagnosis

Tumor type	N (%)	CRP (mg/L)				CA125 (U/ml)			
		Median	IQR	Mean	SD	Median	IQR	Mean	SD
	Total = 293								
Non neoplastic	38 (13.0%)	5.3	1.4 – 16.7	24.2	60.2	35.1	19.2 - 79	154.9	418.8
Benign	133 (45.4%)	2.8	1.2 – 5.7	7.3	21.1	23.1	14.2 – 40.6	50	129.9
Non-EOC	18 (6.1%)	17.1	2 – 59.2	38.1	44.3	86.3	21 – 250.7	185.4	248.1
BOT	22 (7.5%)	3.2	1.3 – 12.1	8.2	10.3	47.4	21.6 – 121.6	185.1	280.5
EOC	69 (23.5%)	17.3	3.3 – 45.1	36.5	51.5	272.8	70.8 – 911.8	1520.8	4155.4
Metastases	13 (4.5%)	24.5	5.3 – 137.5	96.4	141.7	109.5	91.6 – 428.3	368.7	550.4

CRP = C – reactive protein; IQR = interquartile range; SD = standard deviation; EOC = epithelial ovarian cancer; BOT = borderline ovarian tumor

Table 3. Significance values for pairwise comparisons of marker serum levels in different histological strata

	Non neoplastic		Benign		Non-EOC		BOT		EOC		Metastases	
	CRP	CA125	CRP	CA125	CRP	CA125	CRP	CA125	CRP	CA125	CRP	CA125
Non neoplastic			ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0.01	0.01	<0.01	ns
Benign	ns	ns			ns	ns	ns	ns	<0.01	<0.01	<0.01	ns
Non-EOC	ns	ns	ns	ns			ns	ns	ns	ns	0.01	ns
BOT	ns	ns	ns	ns	ns	ns			ns	ns	<0.01	ns
EOC	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	ns	ns	ns	ns			<0.01	ns
Metastases	<0.01	ns	<0.01	ns	0.01	ns	<0.01	ns	<0.01	ns		

CRP = C – reactive protein; EOC = epithelial ovarian cancer; BOT = borderline ovarian tumor

ns = not statistically significant

Table 4. Polytomous discrimination performance of CA125, CRP and OVS

Discrimination	AUC CA125 (95%CI)	AUC CRP (95%CI)	AUC OVS (95% CI)	P-value CA125 vs. OVS*	P-value CA125 vs. CRP*	P-value CRP vs. OVS*
Benign vs. OC+BOT	0.80 (0.74 – 0.85)	0.69 (0.63 – 0.76)	0.76 (0.71 – 0.81)	P = 0.08	P = 0.01	P = 0.001
Benign vs. EOC	0.86 (0.81 – 0.92)	0.73 (0.66 – 0.80)	0.79 (0.73 – 0.84)	P = 0.81	P < 0.01	P = 0.03
Benign vs. BOT	0.71 (0.59 – 0.83)	0.55 (0.41 – 0.69)	0.62 (0.52 – 0.73)	P = 0.003	P = 0.07	P = 0.19
Benign vs. OC stages I-II	0.74 (0.66 – 0.83)	0.67 (0.58 – 0.76)	0.70 (0.62 – 0.78)	P = 0.05	P = 0.14	P = 0.37
Benign vs. EOC stages I-II	0.77 (0.68 – 0.86)	0.67 (0.57 – 0.77)	0.70 (0.62 – 0.78)	P = 0.05	P = 0.06	P = 0.37
Benign vs. metastases	0.82 (0.67 – 0.97)	0.76 (0.59 – 0.93)	0.82 (0.72 – 0.92)	P = 0.76	P = 0.22	P = 0.28
BOT vs. OC stages I-II	0.67 (0.54 – 0.81)	0.65 (0.51 – 0.79)	0.61 (0.47 – 0.74)	P = 0.01	P = 0.79	P = 0.40
BOT vs. OC stages III-IV	0.44 (0.21 – 0.67)	0.82 (0.68 – 0.96)	0.94 (0.81 – 1)	P = 0.002	P = 0.01	P = 0.01
BOT vs. metastases	0.67 (0.47 – 0.86)	0.74 (0.55 – 0.93)	0.76 (0.61 – 0.92)	P = 0.08	P = 0.40	P = 0.87
OC vs. metastases	0.55 (0.39 – 0.70)	0.56 (0.37 – 0.76)	0.51 (0.37 – 0.66)	P = 0.67	P = 0.94	P = 0.74
EOC vs. metastases	0.82 (0.77 – 0.87)	0.70 (0.63 – 0.76)	0.78 (0.73 – 0.83)	P = 0.61	P < 0.01	P = 0.001
OC Stages I-II vs. metastases	0.65 (0.48 – 0.83)	0.66 (0.48 – 0.86)	0.38 (0.23 – 0.52)	P < 0.01	P = 0.77	P = 0.05
OC Stages III-IV vs. metastases	0.73 (0.57 – 0.88)	0.50 (0.29 – 0.71)	0.62 (0.46 – 0.78)	P = 0.04	P < 0.01	P = 0.28

Benign= benign ovarian disease, consisting of 67 epithelial, 40 germ cell and 26 stromal tumors, 19 endometriomas, 9 functional cysts and 10 others: atrophic ovaries, ovarian torsion, tubo-ovarian abscess, oophoritis, and/or ovarian oedema. (n=171)

OC= ovarian cancer, comprising 69 epithelial and 18 non-epithelial ovarian cancer (n= 87)

EOC= epithelial ovarian cancer (n=69)

BOT= borderline ovarian tumor (n=22)

Metastases= ovarian metastases (n=13)

CRP = C – reactive protein; OVS = Ovarian Score

*AUC compared using the DeLong method

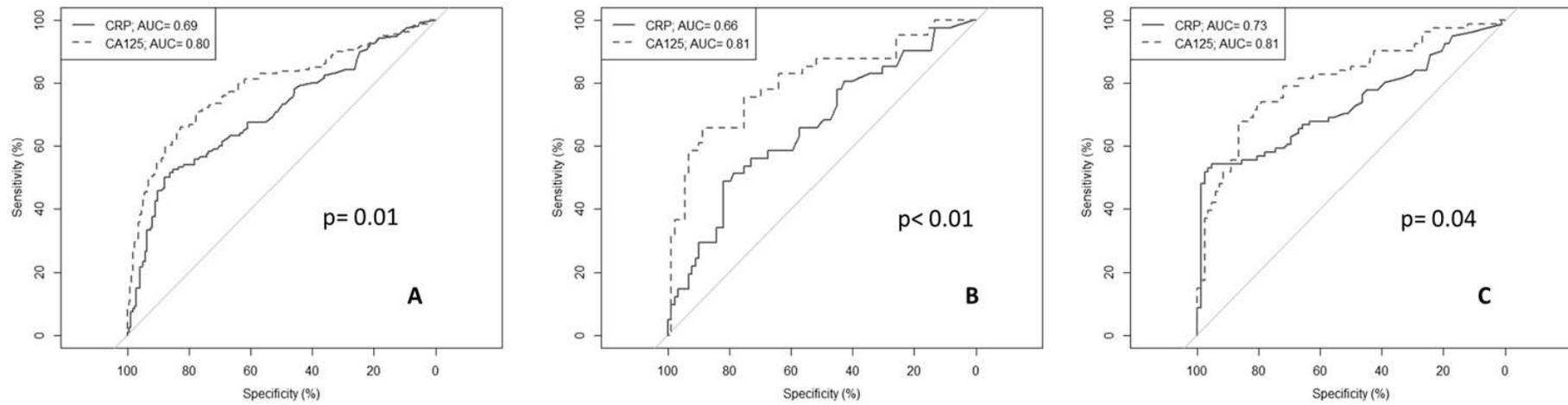


Fig. 1: Receiver Operator Characteristics (ROC) curves for CA125 and CRP in the complete cohort (A), and pre (B) and postmenopausal (C) women

CRP = C – reactive protein; AUC = Area Under the Curve

5. DISCUSSÃO GERAL

A mensuração sérica dos marcadores tumorais é objetiva, de fácil interpretação e sua dosagem pode ser padronizada entre os diferentes laboratórios. Podem ter um custo relativamente menor do que os exames de imagem [45]. Ainda não se conhece claramente a correlação entre o volume tumoral e a concentração do marcador detectado no sangue. Existem vários fatores biológicos envolvidos na quantidade do marcador que circula na corrente sanguínea: os níveis secretados por células tumorais e células saudias, a vascularização tumoral, a permeabilidade vascular e a heterogeneidade de efeitos que determinam o crescimento dos tumores. Em um modelo matemático, estimou-se que o câncer de ovário poderia crescer por 10 anos até atingir tamanho suficiente para liberar uma quantidade mínima de marcador tumoral, a ser detectada pelos ensaios laboratoriais disponíveis atualmente [80].

A maioria das neoplasias ovarianas que ocorrem tanto no menacme quanto na menopausa é benigna. No entanto, o risco de malignidade aumenta com a idade, sendo que na menopausa 30% desses tumores são malignos [81]. O correto referenciamento é imprescindível, para que os casos de câncer sejam encaminhados sem demora, para tratamento especializado, e também possibilita que os casos benignos não sobrecarreguem o centro terciário, desnecessariamente. O presente estudo teve enfoque no uso de marcadores séricos, na predição de malignidade de massas pélvicas. Foi realizado em um hospital terciário, com mulheres encaminhadas para diagnóstico e tratamento. Com a maior prevalência de casos malignos, nossa casuística aumentou o valor preditivo e diminuiu o valor preditivo negativo dos testes, não permitindo o uso destes valores.

Uma vantagem do nosso estudo foi a inclusão de casos de tumores benignos, não neoplásicos, tumores malignos epiteliais e não epiteliais, tumores *borderline* de ovário e metástases ovarianas, sendo excluídos apenas os casos não ovarianos, o que torna a casuística mais próxima da realidade clínica. Todos os casos incluídos foram submetidos a análises histopatológicas (padrão ouro). Os tumores benignos e as doenças benignas de ovário foram considerados controles. A indicação cirúrgica se baseou no valor do CA125, na US e eventualmente na ressonância nuclear magnética, realizados por examinadores experientes em patologias ginecológicas. Assim, mais casos malignos foram operados, e mais casos benignos foram mantidos em acompanhamento. Outros estudos, com enfoque no diagnóstico de massas pélvicas por métodos de imagem estão em andamento.

No primeiro artigo, dois algoritmos que utilizam marcadores tumorais, o ROMA e o CPH-I foram comparados na predição de malignidade de mulheres com massas anexiais. O

CA125 e o HE4 foram ambos dosados pelos ensaios da Abbott para se assemelhar a maioria dos estudos de treino e validação em que o CPH-I foi testado [69]. O estudo que inicialmente descreveu o ROMA utilizou o ensaio da Abbott para o CA125 e o da Fujirebio para o HE4 [60].

Em relação ao HE4, o teste da Abbott é um imunoenensaio de micropartícula quimioluminescente totalmente automatizado, enquanto o da Fujirebio é um ensaio imunoenzimático realizado de forma manual. O valor de referência para o ensaio da Abbott é de < 70 pmol/L para mulheres na pré-menopausa e < 140 pmol/L para mulheres na pós-menopausa, enquanto para o ensaio da Fujirebio é de < 150 pmol/L, sem distinção do estado menopausal. No entanto, assim como para outros marcadores tumorais, não é correto expressar o resultado em positivo ou negativo pelo fato de não haver um valor diagnóstico validado para o HE4 [68, 82].

Diferenças nas concentrações séricas, de acordo com o fabricante utilizado já foram reportadas. Em relação ao HE4, o ensaio da Fujirebio pode medir 14% (11.3%–16.9%) a mais quando comparado ao ensaio da Abbott [83]. No entanto, em outro estudo, não se verificou diferença entre a performance do HE4, quando se utilizou o ensaio da Abbott e da Fujirebio (AUC de 0,94 e 0,92 respectivamente) na discriminação de 163 mulheres sem câncer (73 mulheres sadias e 90 mulheres com doenças anexiais benignas) das 96 mulheres com carcinoma de ovário [82].

Em nosso estudo, as concentrações séricas do HE4 foram maiores nos carcinomas (280,9 pmol/L), em seguida nas metástases ovarianas (84,2 pmol/L), tumores *borderline* de ovário (66,6 pmol/L), tumores malignos não epiteliais (59,1 pmol/L) e nas doenças benignas (48 pmol/L). Resultados similares foram obtidos por Karlsen et al (2012), que também utilizaram o ensaio da Abbott para medir o HE4 e avaliaram 1.218 pacientes, sendo 809 com doenças benignas do ovário, 79 com tumores *borderline* de ovário, 252 com carcinomas, 9 com tumores malignos não epiteliais e 69 com cânceres não ovarianos [63]. As concentrações séricas também foram maiores nos carcinomas (436 pmol/L), em seguida nos cânceres não ovarianos (110 pmol/L), tumores *borderline* de ovário (81,8 pmol/L), tumores malignos não epiteliais (68 pmol/L) e doenças benignas do ovário (53,4 pmol/L).

Observamos níveis bem mais elevados de HE4 nos carcinomas do estudo de Karlsen et al. (2012), e uma das explicações possíveis é de que dos 252 carcinomas, 203 (80%) se apresentavam nos estágios III ou IV. Já em nosso estudo, 41% dos carcinomas se encontravam em estágios iniciais. Níveis mais elevados de HE4 nos estágios avançados de câncer de ovário também foram demonstrados no estudo de Sandri et al. (2013) [64]. Este estudo envolveu 160 tumores malignos, sendo 148 epiteliais (incluindo 5 casos de carcinomas

tubéreos), 164 tumores benignos de ovário/ doenças pélvicas benignas, 25 tumores *borderline*. Observou-se que os níveis séricos de HE4 nos estágios avançados foi 7 vezes superior à dos estágios iniciais [64]. Outros 2 estudos recentes com carcinomas ovarianos e doenças benignas de ovário obtiveram concentrações séricas de HE4 4,5 [84] e 7 vezes [85] maiores nos carcinomas em estágios III/ IV do que nos carcinomas estágios I/ II.

Em nosso estudo, as concentrações séricas de CA125, foram maiores nos carcinomas (314,2 U/ml), em seguida nas metástases ovarianas (122,8 U/ml), tumores malignos não epiteliais (58,3 U/ml), tumores *borderline* de ovário (43,8 U/ml) e doenças benignas (23,3 U/ml). No estudo de Karlsen (2012), as concentrações séricas do CA125, foram maiores nos carcinomas (647 U/ml), em seguida nos cânceres não ovarianos (159 U/ml), tumores *borderline* de ovário (87,6 U/ml), doenças benignas (28,7 U/ml) e tumores malignos não epiteliais (26 U/ml) [63]. Os níveis séricos de CA125 também foram mais elevados nos estágios avançados, sendo 10 vezes maiores que nos estágios iniciais, em outro estudo [64].

Várias publicações têm mostrado a superioridade do HE4 e ROMA sobre o CA125 isolado em predizer os casos de câncer de ovário [64, 66, 67], mas ainda existem dúvidas [62, 86]. Outros estudos encontraram resultados que indicam que o HE4 poderia ser usado de forma isolada, sem benefício de se acrescentar o ROMA à investigação, desta forma reduzindo os custos da avaliação pré-operatória [87, 88].

No estudo inicial de Moore et al. (2008) foram avaliados 67 carcinomas de ovário e 166 doenças pélvicas benignas. O HE4 estava elevado em 12% das doenças pélvicas benignas, enquanto o CA125 estava elevado em 26%. Na diferenciação entre carcinomas e doenças pélvicas benignas, com especificidade fixa de 95%, o CA125 apresentou sensibilidade de 43,3%, o HE4 de 72,9% e o CA125 + HE4 de 76,4%. Esta última associação adicionou 33% à sensibilidade do CA125 e 3,5% à sensibilidade do HE4.

Na discriminação dos carcinomas estágio I das doenças pélvicas benignas, na especificidade fixa de 95%, o HE4 mostrou sensibilidade de 45,9%, sendo que não houve melhora com a adição de qualquer outro marcador. Na associação do CA125 com o HE4 a sensibilidade caiu para 39,5%. Por sua vez, o CA125 apresentou sensibilidade de 15,1%.

Nas mulheres na pré-menopausa, na diferenciação das doenças pélvicas benignas dos carcinomas, tanto a associação de CA125 com HE4 quanto o HE4 isoladamente apresentaram AUCs maiores do que o CA125 isolado. Isso indica que o HE4 tem uma sensibilidade maior que o CA125 neste grupo. No grupo da pós-menopausa, as AUCs não foram diferentes, ou seja, o HE4 apresentou uma sensibilidade semelhante ao CA125. No entanto, houve uma diferença na sensibilidade do HE4 com CA125 em relação ao CA125 isolado na

diferenciação de doenças pélvicas benignas dos carcinomas independente do estado menopausal [89].

Os níveis de HE4 aumentam com a idade, sobretudo em mulheres ≥ 55 anos, que podem ter um aumento de 27,1% a cada década [90]. Assim, parece mais lógico e simples utilizar um índice cujo algoritmo envolva a idade e não o estado menopausal. Karlsen et al., (2015) descreveram o *Copenhagen Index* que utiliza a idade das pacientes e compararam a sua performance com o ROMA na diferenciação das massas pélvicas. Em nosso estudo, escolhemos testar o ROMA e o CPH-I na nossa casuística composta não apenas por doenças benignas ovarianas e carcinomas, mas também por tumores *borderline*, tumores malignos não epiteliais e metástases ovarianas.

Em relação ao desempenho dos algoritmos na diferenciação das massas anexiais, em nosso estudo, a performance do ROMA foi igual ao CPH-I em todos os grupos comparados, sendo o melhor resultado obtido na diferenciação de tumores benignos dos carcinomas, tanto para o ROMA quanto para o CPH-I, resultado similar ao obtido por Karlsen et al. (2015) [69].

Quando se acrescentou os tumores *borderline*, tumores malignos não epiteliais e as metástases ovarianas, as AUCs caíram de 0,94 para 0,84 no CPH-I e de 0,93 para 0,82 no ROMA, em nosso estudo. Apesar de Karlsen et al. (2012) já terem apresentado uma casuística com todos estes grupos de tumores em estudo prévio [63] esta análise não foi possível de ser realizada no estudo de Karlsen et al. (2015) por se tratar de um estudo multicêntrico com diferentes critérios de inclusão entre os estudos envolvidos [69].

Os desempenhos do CPH-I e ROMA foram inferiores na diferenciação de tumores benignos dos carcinomas e tumores benignos dos malignos não epiteliais estágios I - II, com AUCs 0,78 e 0,77 respectivamente. Quando se retirou desta análise os tumores malignos não epiteliais, as AUCs melhoram (0,87 para os dois algoritmos). Karlsen et al. (2015) obtiveram resultados discretamente melhores neste cenário, com AUCs de 0,90 para CPH-I e 0,89 para ROMA [69].

As piores AUCs foram obtidas na avaliação do desempenho da diferenciação de carcinomas e tumores malignos não epiteliais estágios I - II das metástases ovarianas, com 0,53 para CPH-I e ROMA. Também chama a atenção os desempenhos inferiores dos algoritmos na diferenciação de tumores *borderline* das metástases ovarianas (AUC 0,69 para CPH-I e 0,66 para ROMA) e de tumores *borderline* dos carcinomas e tumores malignos não epiteliais estágios I - II (AUC 0,71 para CPH-I e 0,68 para ROMA). Uma comparação com o estudo de Karlsen et al. (2012) não é possível nestes subgrupos, pois em sua análise da diferenciação entre

tumores *borderline* e carcinomas, que mostrou AUC de 0,868 para o ROMA, foram considerados os carcinomas de todos os estágios [63].

Os tumores *borderline* são uma entidade à parte de tumores do ovário. A maioria deles apresenta-se limitado aos ovários, com excelente prognóstico, sendo a sobrevida em 10 anos de mais de 95%. Mas alguns casos podem cursar com implantes não invasivos ou invasivos, podendo recidivar sob a forma de *borderline* ou carcinoma, e mais raramente evoluir a óbito [91]. Em nossa casuística, dos 32 tumores *borderline*, a maioria (84%) se apresentava em estágios iniciais (I ou II).

Braicu et al. (2014) avaliaram 104 massas pélvicas benignas (tumor ovariano e miomatose uterina), 48 tumores *borderline* de ovário sem implantes invasivos e 15 com implantes invasivos. A análise das curvas ROC mostrou que nas pacientes na pré-menopausa, o CA125 foi melhor do que o HE4 e ROMA na discriminação de pacientes com tumores *borderline* com implantes invasivos, daquelas com massas pélvicas benignas e tumores *borderline* sem implantes invasivos, com AUCs de 0,71 para CA125, 0,51 para HE4 e 0,52 para ROMA. Nas pacientes na pós-menopausa, o CA125 se mostrou discretamente melhor que o HE4 e semelhante ao ROMA na discriminação de tumores *borderline* com implantes invasivos das massas pélvicas benignas e tumores *borderline* sem implantes invasivos, AUCs de 0,77 para CA125; 0,73 para HE4 e 0,78 para ROMA [92]. No entanto, é necessário cuidado ao interpretar estes resultados, devido ao pequeno número de tumores *borderline* com implantes invasivos estudados. Na nossa análise, a AUC do ROMA na diferenciação dos tumores benignos dos tumores *borderline* (todos os estágios) foi de 0,74.

Quanto à sensibilidade do CPH-I e ROMA, quando analisados todos os tumores malignos (incluindo tumores *borderline*, metástases ovarianas e tumores malignos não epiteliais) foram menores (73,1% e 71,2%, respectivamente) do que quando foram considerados apenas os carcinomas (89,7% e 88,5%, respectivamente). Das pacientes deste primeiro grupo, que se aproxima mais da realidade clínica, 26,9 % (pelo CPH-I) e 28,8% (pelo ROMA), deixariam de ser encaminhadas para centros terciários na investigação de massas pélvicas. Em relação à especificidade, não houveram grandes variações nas diferenciações de tumores benignos dos malignos ou de tumores benignos dos carcinomas isoladamente. Portanto, cerca de 15% das mulheres com tumores benignos seriam submetidas a cirurgias em centros terciários, utilizando o CPH-I ou ROMA.

No segundo artigo, considerando-se a dosagem sérica de CRP, 52% das mulheres com tumores malignos apresentaram níveis de CRP > 10 mg/L. Deve-se ressaltar que para esta análise, os tumores *borderline* foram agrupados aos cânceres de ovário epiteliais, os não

epiteliais e as metástases ovarianas. No entanto, quando analisados os valores séricos de CRP nos subgrupos, observou-se que mulheres com tumores *borderline* apresentaram níveis similares aos daquelas com tumores benignos e não com tumores malignos, demonstrando a dificuldade de se obter um diagnóstico diferencial em relação a este subgrupo através dos marcadores tumorais.

Observamos uma concentração sérica duas vezes mais elevada nas mulheres com tumores não neoplásicos em relação às aquelas com tumores benignos. Isto se deve ao fato da presença de endometriomas entre os tumores não neoplásicos. A concentração sérica média das mulheres com endometriomas foi de 35,2 mg/L. A endometriose, condição ligada a inflamação, aumenta os níveis desta proteína, assim como também aumenta os níveis de CA125. A concentração sérica média de CA125 nas mulheres com endometriomas foi de 264,1 U/ml.

Mulheres com metástases ovarianas apresentaram as maiores concentrações séricas de CRP. As neoplasias primárias destas pacientes foram: 10 do trato gastrointestinal, 1 de endométrio, 1 de colo uterino e 1 de mama. O aumento da CRP já foi descrito como fator de risco e de prognóstico em outras neoplasias como cólon [93, 94], mama [95], endométrio [96]. Se considerarmos que os níveis de CRP aumentam à medida que a doença progride, assim como já reportado em estudos de câncer de ovário [97, 98] o aumento da proteína na doença metastática já era esperado.

Hefler-Frichmuth et al. (2009) em estudo retrospectivo com 198 carcinomas de ovário, 44 tumores *borderline* e 576 tumores benignos e não neoplásicos, em um modelo de regressão logística multivariável que incluiu CRP, CA125 e idade das pacientes, a CRP conseguiu predizer malignidade de forma independente dos demais parâmetros, de forma que poderia ser utilizada no diagnóstico diferencial de massas ovarianas [77]. No entanto, a AUC da CRP isolada foi de apenas 0,73, inferior à do CA125 isolado, de 0,90. Em nosso estudo, não conseguimos reproduzir estes resultados.

Watrowski & Zeillinger desenvolveram recentemente o *Watrowski score*, que envolve os níveis séricos de CRP, CA125, plaquetas e fibrinogênio na diferenciação de massas pélvicas [76]. Como resultado, obtiveram uma elevada especificidade (94%), porém uma reduzida sensibilidade (76%) na diferenciação de tumores benignos dos malignos. Os autores colocam como vantagens do score, a simplicidade e o não aumento de custos na avaliação pré-operatória. No entanto, a dosagem de CRP e do fibrinogênio não fazem parte da rotina de investigação das massas pélvicas. Em nosso estudo, optamos por um score simplificado, o *Ovarian Score* (OVS) que associa as concentrações séricas de CRP e CA125 com o estado

menopausal, porque observamos um melhor desempenho da CRP isolada, nas mulheres menopausadas.

Uma vantagem do nosso estudo foi a comparação dos desempenhos dos marcadores, isolados ou combinados, nos diferentes cenários. Apesar do OVS não ter sido superior ao CA125, exceto na diferenciação dos tumores *borderline* do câncer de ovário avançado, observamos que a adição do CA125 e do estado menopausal melhorou o desempenho da CRP isolada na diferenciação dos tumores benignos dos cânceres de ovário, tumores benignos dos carcinomas, metástases ovarianas dos carcinomas, metástases ovarianas dos cânceres de ovário avançado.

Lundin et al. (2009) realizaram um estudo caso controle com coorte prospectiva que investigou 207 casos de carcinomas invasivos e 30 tumores *borderline*, e comparou com controles sadios. Na avaliação geral, a CRP não esteve relacionada ao risco de câncer de ovário. No entanto, quando analisados valores de CRP > 10 mg/L o Odds Ratio (OR) (IC 95%) foi de 4,4 (1,8-10,9) [71].

Em outro estudo caso controle com 167 carcinomas, o risco de desenvolver câncer de ovário esteve associado a níveis séricos mais altos de CRP. O OR foi de 2,03 (IC 95% 1,2 - 3,47) quando se compararam os níveis de CRP entre 3 - 10 mg/L com < 1 mg/L [75]. Trabert et al. (2014) também em estudo caso controle, com 149 casos de tumores malignos de ovário, examinaram a associação 46 marcadores da inflamação com câncer de ovário e obtiveram uma correlação positiva da CRP com esta neoplasia: OR 2,04 (IC 95% 1,06 - 3,93) na comparação de CRP > 9,76 mg/L com CRP < 3,23 mg/L. Em análise dos carcinomas serosos separadamente, obtiveram um OR superior, de 3,96 (IC 95% 1,14 - 11,14) para a mesma comparação [73].

Poole et al. (2013) agrupando 2 estudos caso controle e 1 coorte prospectiva, avaliaram a dosagem de CRP em 376 casos de tumores invasores. Quando comparados os níveis de CRP de 5,17 mg/L com 0,33 mg/L e CRP de 6,93 mg/L com 0,43 mg/L, houve um aumento de risco de 53% de câncer de ovário (IC 95% 1,05 - 2,23). Na comparação de valores de CRP > 10 mg/L com CRP ≤ 1 mg/L obtiveram um risco relativo de 2,16 (IC 95% 1,23 - 3,78). O aumento dos níveis séricos de CRP também esteve relacionado ao maior risco para o câncer de ovário nos carcinomas serosos, e nos casos que foram a óbito nos 3 primeiros anos do diagnóstico da doença [74].

Em estudo recente caso controle com 754 casos de carcinomas de ovário (mais especificamente, 699 de ovário, 31 de tuba uterina e 24 de peritônio) e 1.497 controles, não se observou associação dos níveis de CRP com aumento de risco para carcinoma de ovário, quando analisados estes níveis de forma contínua, ou dividido em terços, em mg/L (1º. Terço:

0,53 - 1,47; 2º. Terço: 1,48 - 4,01; 3º. Terço: > 4,01). No entanto, quando se comparou níveis de CRP > 10mg/L com \leq 1 mg/L se observou um risco relativo aumentado deste câncer, de 1,67 (IC 95% 1,03-2,70) [72].

Todos estes estudos caso controle concluíram que níveis aumentados de CRP estão associados ao maior risco de câncer de ovário, indicando que a inflamação pode ter um papel na carcinogênese ovariana. No entanto, ainda não está claro se esta associação é causal, ou se é devido a outros fatores, que estão relacionados ao aumento de CRP e ao câncer de ovário [71 – 75].

Como se pode observar dos vários estudos expostos, não é correto classificar um valor de CRP como “normal”, assim como para outros marcadores. Um pequeno aumento de CRP (3-10 mg/L) é encontrado em um terço dos americanos, e está associado a determinados tipos de dieta, a diversas condições aparentemente não inflamatórias que acarretam em leves danos teciduais. Estes danos seriam a base para o desenvolvimento futuro de doenças. Portanto, este pequeno aumento de CRP está associado ao risco de indivíduos sadios de desenvolver várias doenças, à predição de complicações de diversas enfermidades, e aumento do risco de mortalidade em indivíduos doentes e até mesmo sadios [99].

Não se sabe se a CRP é um marcador somente da inflamação. É provável que a injúria celular inicialmente estimule a produção de CRP. Assim, nestas condições aparentemente não inflamatórias haveria uma lesão celular inicial, com discreto aumento de CRP, e se agravada esta injúria celular, desencadearia uma resposta inflamatória de fato, com maior aumento da proteína [99].

Concluindo, tanto os marcadores isoladamente ou em associação em algoritmos e scores, são utilizados em conjunto com o exame de imagem e exame clínico, na avaliação pré-operatória de massas anexiais. Existem estudos que questionam a utilidade de marcadores após a realização de US na caracterização de massas pélvicas [100, 101]. No entanto, estes estudos se basearam em US realizadas por examinadores experientes, com especial interesse no exame de massas anexiais, cenário difícil de ser reproduzido fora dos grandes centros terciários. Desta forma, os marcadores tumorais continuam sendo úteis na predição de malignidade de mulheres com massas anexiais.

O ROMA e o CPH-I são índices equivalentes na diferenciação dos tumores malignos dos benignos. O ROMA é um índice que já foi reconhecido como superior em relação ao uso do CA125 isoladamente por diversos estudos, e o CPH-I tem a vantagem sobre o ROMA por utilizar a idade, que é um dado mais simples de se obter do que o estado menopausal, facilitando seu uso na prática clínica. No intuito de se realizar o correto referenciamento das

mulheres, O CPH-I e o ROMA podem ser aplicados fora dos centros terciários. No entanto, é necessária cautela, já que na prática clínica a sensibilidade do CPH-I e do ROMA se aproxima de 70%.

O *Ovarian Score* é equivalente ao CA125 na diferenciação de tumor benigno do cancer de ovário. Ao acrescentar o CA125 e o estado menopausal a CRP, obteve-se um aumento do desempenho da CRP isolada na diferenciação de massas anexiais. Portanto, a interpretação dos níveis pré-operatórios de CRP na paciente com massa anexial depende dos níveis de CA125 e o estado menopausal.

6. CONCLUSÃO

6.1. O ROMA e o CPH-I apresentaram desempenhos semelhantes na predição de malignidade em mulheres com massas anexiais, seja em uma coorte de mulheres com carcinomas e doenças ovarianas benignas, seja em outra coorte de mulheres com carcinomas, tumores malignos não epiteliais, tumores *borderline* de ovário, metástases ovarianas e doenças ovarianas benignas.

6.2. A CRP isoladamente apresentou um desempenho inferior ao CA125 e OVS na predição de malignidade em mulheres com massas anexiais. Contudo, a CRP e o OVS podem contribuir para decisões clínicas em mulheres diagnosticadas com doença avançada, uma vez que permite discriminar, nestes casos, entre mulheres com carcinoma e aquelas com tumor *borderline* de ovário.

7. REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 3/September/2015.
2. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C; ESMO Guidelines Working Group. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013 Oct;24 Suppl 6:vi24-32.
3. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2016. Available from <http://www.cancer.gov>, accessed on February 27, 2016.
4. INCA, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, Brasil. Estimativa 2014. Incidência de Câncer no Brasil pg 50. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf, acesso em 23/11/2015.
5. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015, accessed on 1/November/2015.
6. Russo A, Calò V, Bruno L, Rizzo S, Bazan V, Di Fede G. Hereditary ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009 Jan;69(1):28-44.
7. Weissman SM, Weiss SM, Newlin AC. Genetic Testing by Cancer Site: Ovary *Cancer Journal*: July/August 2012 - Volume 18 – Issue 4 – p 320-327.
8. Lancaster JM, Powell CB, Chen LM, Richardson DL; SGO Clinical Practice Committee. Society of Gynecologic Oncology statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. *Gynecol Oncol*. 2015 Jan;136(1):3-7.
9. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. World Health Organization Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014

10. Nik NN, Vang R, Shih IeM, Kurman RJ. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:27-45.
11. Kurman RJ, Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol.* 2010 Mar;34(3):433-43.
12. Banet N, Kurman RJ. Two types of ovarian cortical inclusion cysts: proposed origin and possible role in ovarian serous carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol.* 2015 Jan;34(1):3-8.
13. Kurman RJ, Shih IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer – shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 2011 Jul; 42(7):918-31
14. Piek JM, Verheijen RH, Kenemans P, Massuger LF, Bulten H, van Diest PJ. BRCA1/2-related ovarian cancers are of tubal origin: a hypothesis. *Gynecol Oncol.* 2003 Aug;90(2):491.
15. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, Hirsch MS, Feltmate C, Medeiros F et al. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol.* 2007 Feb;31(2):161-9.
16. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet.* 1971 Jul 17;2(7716):163.
17. Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery WJ, Gierisch JM, Coeytaux RR, Urrutia RP et al. Oral contraceptive pills as primary prevention for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2013 Jul;122(1):139-47.
18. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet.* 2008 Jan 26;371(9609):303-14.
19. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis revisited. *Facts Views Vis Obgyn.* 2013;5(4):292-7.
20. Tone AA, Virtanen C, Shaw P, Brown TJ. Prolonged postovulatory proinflammatory signaling in the fallopian tube epithelium may be mediated through a BRCA1/DAB2 axis. *Clin Cancer Res.* 2012 Aug 15;18(16):4334-44.
21. Ardighieri L, Lonardi S, Moratto D, Facchetti F, Shih IeM, Vermi W et al. Characterization of the immune cell repertoire in the normal fallopian tube. *Int J Gynecol Pathol.* 2014 Nov;33(6):581-91.

22. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-45.
23. Smith GF, Missailidis S. Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *J Inflamm (London)*.2004 Sep 30; 1(1): 3.
24. Schwartsburd PM. Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer Metastasis Rev.* 2003 Mar; 22(1): 95-102. Review.
25. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008 July; 454(24): 436-44.
26. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121: 2373-80.
27. Wang CS, Sun CF. C-reactive protein and malignancy: clinico-pathological association and therapeutic implication. *Chang Gung Med J* 2009 Sep-Oct; 32(5):471-82.
28. Ness R, Pearce C, Stram D, Berchuck A, Pike M, Pharoah P. Lifetime risk of ovarian cancer based on endometriosis and other risk factors: igcs-0014 06. ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2015 May;25 Suppl 1:50.
29. Rice MS, Hankinson SE, Tworoger SS. Tubal ligation, hysterectomy, unilateral oophorectomy, and risk of ovarian cancer in the Nurses' Health Studies. *Fertil Steril.* 2014 Jul;102(1):192-198.e3.
30. Trabert B, Ness RB, Lo-Ciganic WH, Murphy MA, Goode EL, Poole EM et al. Aspirin, nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drug, and acetaminophen use and risk of invasive epithelial ovarian cancer: a pooled analysis in the Ovarian Cancer Association Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Feb;106(2):djt431
31. Goff BA, Mandel LS, Muntz HG, Melancon CH. Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer.* 2000;89:2068–2075.
32. Goff BA, Mandel LS, Melancon CH, Muntz HG. Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA.* 2004 Jun 9;291(22):2705-12.
33. Hartman CA, Juliato CR, Sarian LO, Barreta A, de Toledo MC, Pitta Dda R et al. Inclusion of symptoms in the discrimination between benign and malignant adnexal masses. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2012 Nov;34(11):511-7.

34. Pitta Dda R, Sarian LO, Barreta A, Campos EA, Andrade LL, Fachini AM et al. Symptoms, CA125 and HE4 for the preoperative prediction of ovarian malignancy in Brazilian women with ovarian masses. *BMC Cancer*. 2013 Sep 18;13:423.
35. Goff BA, Mandel LS, Drescher CW, Urban N, Gough S, Schurman KM et al. Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer*. 2007 Jan 15;109(2):221-7
36. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for ovarian cancer: reaffirmation recommendation statement. *Am Fam Physician*. 2013 May 15;87(10): Online. Available from: www.aafp.org/afp/2013/0515/od1.pdf. Accessed on 12/November/2015.
37. Sölétormos G, Duffy MJ, Othman Abu Hassan S, Verheijen RH, Tholander B, Bast RC Jr et al. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines From the European Group on Tumor Markers. *Int J Gynecol Cancer*. 2016 Jan;26(1):43-51.
38. Curtin JP. Management of the adnexal mass. *Gynecol Oncol*. 1994 Dec;55(3 Pt 2):S42-6.
39. Menon U, Gentry-Maharaj A, Hallett R, Ryan A, Burnell M, Sharma A et al. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS) *Lancet Oncol*. 2009;10(4):327–340.
40. Liu JH, Zanotti KM. Management of the adnexal mass. *Obstet Gynecol*. 2011 Jun;117(6):1413-28.
41. Brun JL, Fritel X, Aubard Y, Borghese B, Bourdel N, Chabbert-Buffet N et al. Management of presumed benign ovarian tumours: updated French guidelines. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 Dec;183:52-8.
42. Souza E, Yoshida A, Peres H, Andrade Lde A, Sarian LO, Derchain S. Preservation of the fertility and the ovaries in women with benign adnexal tumors. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2015 Jan;37(1):36-41.
43. Giede KC, Kieser K, Dodge J, Rosen B. Who should operate on patients with ovarian cancer? An evidence-based review. *Gynecol Oncol*. 2005 Nov;99(2):447-61.
44. 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 Feb 1;98(3):172-80.

45. Kondalsamy-Chennakesavan S, Obermair A. Differentiating stage I epithelial ovarian cancer from benign disease in women with adnexal tumours using biomarkers or the ROMA algorithm. *Gynecol Oncol.* 2013 Aug;130(2):400.
46. Kaijser J, Van Gorp T, Sayasneh A, Vergote I, Bourne T, Van Calster B et al. Differentiating stage I epithelial ovarian cancer from benign disease in women with adnexal tumors using biomarkers or the ROMA algorithm. *Gynecol Oncol.* 2013 Aug;130(2):398-9.
47. 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 Nov-Dec;15 Suppl 3:274-81.
48. Jacobs I, Bast RC Jr. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod.* 1989 Jan;4(1):1-12.
49. 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 Oct 13;309(15):883-7.
50. Kristjansdottir B, Levan K, Partheen K, Sundfeldt K. Diagnostic performance of the HE4 and CA125 in type I and type II epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2013 Oct;131(1):52-8.
51. 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 Apr 18;21(17):2768-73.
52. 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 Apr 6;7:61
53. 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 Oct 1;238(2):375-85.
54. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 2005 Mar 15;65(6):2162-9.
55. 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. *Clin Biochem.* 2011 Jul;44(10-11):884-8.

56. Romeo V, Framarino Dei Malatesta M, Nudo F, Simonelli L, Derme M, Berloco PB. Is HE4 serum level a valid screening test in women candidates for kidney transplant? A case report and a review of literature. *Clin Ter.* 2014;165(2):e162-5.
57. Karlsen NS, Karlsen MA, Høgdall CK, Høgdall EV. HE4 tissue expression and serum HE4 levels in healthy individuals and patients with benign or malignant tumors: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Nov;23(11):2285-95.
58. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, Lu KH, Bast RC Jr, Lambert-Messerlian G. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 Apr;206(4):349.e1-7.
59. Moore RG, Miller MC, Steinhoff MM, Skates SJ, Lu KH, Lambert-Messerlian G et al. Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 Apr;206(4):351.e1-8.
60. 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 Jan; 112(1):40-6.
61. Pitta Dda R, Sarian LO, Campos EA, Andrade LL, Sallum LF, Bragança JF et al. HE4 can help discriminate women with malignant ovarian tumors only if CA125 levels are elevated. *Int J Biol Markers.* 2013 Oct-Dec;28(4):e377-86.
62. Anton C, Carvalho FM, Oliveira EI, Maciel GA, Baracat EC, Carvalho JP. A comparison of CA125, HE4, risk ovarian malignancy algorithm (ROMA), and risk malignancy index (RMI) for the classification of ovarian masses. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67(5):437-41.
63. Karlsen MA, Sandhu N, Høgdall C, Christensen IJ, Nedergaard L, Lundvall L et al. Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2012 Nov;127(2):379-83.
64. Sandri MT, Bottari F, Franchi D, Boveri S, Candiani M, Ronzoni S et al. Comparison of HE4, CA125 and ROMA algorithm in women with a pelvic mass: correlation with pathological outcome. *Gynecol Oncol.* 2013 Feb;128(2):233-8.
65. Ortiz-Muñoz B, Aznar-Oroval E, García García A, Covisa Peris A, Perez Ballesteros P, Sanchez Yepes M et al. HE4, Ca125 and ROMA algorithm for differential diagnosis between benign gynaecological diseases and ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2014 Jul;35(7):7249-58.

66. Fujiwara H, Suzuki M, Takeshima N, Takizawa K, Kimura E, Nakanishi T et al. Evaluation of human epididymis protein 4 (HE4) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) as diagnostic tools of type I and type II epithelial ovarian cancer in Japanese women. *Tumour Biol.* 2015 Feb;36(2):1045-53.
67. Xu Y, Zhong R, He J, Ding R, Lin H, Deng Y et al. Modification of cut-off values for HE4, CA125 and the ROMA algorithm for early-stage epithelial ovarian cancer detection: Results from 1021 cases in South China. *Clin Biochem.* 2016 Jan;49(1):32-40.
68. Granato T, Porpora MG, Longo F, Angeloni A, Manganaro L, Anastasi E. HE4 in the differential diagnosis of ovarian masses. *Clin Chim Acta.* 2015 Jun 15;446:147-55.
69. Karlsen MA, Høgdall EV, Christensen IJ, Borgfeldt C, Kalapotharakos G, Zdrzilova-Dubska L et al. A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer - An international multicenter study in women with an ovarian mass. *Gynecol Oncol.* 2015 Sep;138(3):640-6.
70. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein. *J Biol Chem.* 2004 Nov 19;279(47):48487-90. Review
71. Lundin E, Dossus L, Clendenen T, Krogh V, Grankvist K, Wulff M et al. C-reactive protein and ovarian cancer: a prospective study nested in three cohorts (Sweden, USA, Italy). *Cancer Causes Control.* 2009 Sep;20(7):1151-9.
72. Ose J, Schock H, Tjønneland A, Hansen L, Overvad K, Dossus L et al. Inflammatory Markers and Risk of Epithelial Ovarian Cancer by Tumor Subtypes: The EPIC Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015 Jun;24(6):951-61.
73. Trabert B, Pinto L, Hartge P, Kemp T, Black A, Sherman ME et al. Pre-diagnostic serum levels of inflammation markers and risk of ovarian cancer in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer (PLCO) screening trial. *Gynecol Oncol.* 2014 Nov;135(2):297-304.
74. Poole EM, Lee IM, Ridker PM, Buring JE, Hankinson SE, Tworoger SS. A prospective study of circulating C-reactive protein, interleukin-6, and tumor necrosis factor α receptor 2 levels and risk of ovarian cancer. *Am J Epidemiol.* 2013 Oct 15;178(8):1256-64.

75. McSorley MA, Alberg AJ, Allen DS, Allen NE, Brinton LA, Dorgan JF et al. C-reactive protein concentrations and subsequent ovarian cancer risk. *Obstet Gynecol.* 2007 Apr;109(4):933-41.
76. Watrowski R, Zeillinger R. Simple laboratory score improves the preoperative diagnosis of adnexal mass. *Tumour Biol.* 2015 Oct 23. [Epub ahead of print]
77. Hefler-Frischmuth K, Hefler LA, Heinze G, Paseka V, Grimm C, Tempfer CB. Serum C-reactive protein in the differential diagnosis of ovarian masses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009 Nov;147(1):65-8.
78. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014. URL <http://www.R-project.org/>.
79. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988 Sep;44(3):837-45.
80. Hori SS, Gambhir SS. Mathematical model identifies blood biomarker-based early cancer detection strategies and limitations. *Sci Transl Med.* 2011 Nov 16;3(109):109ra116.
81. Bennett JA, Oliva E. Pathology of the adnexal mass. *Clin Obstet Gynecol.* 2015 Mar;58(1):3-27.
82. 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 Jul 15;412(15-16):1447-53.
83. Bolstad N, Øijordsbakken M, Nustad K, Bjerner J. Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population. *Tumour Biol.* 2012 Feb;33(1):141-8.
84. Cho HY, Park SH, Park YH, Kim HB, Kang JB, Hong SH et al. Comparison of HE4, CA125, and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm in the Prediction of Ovarian Cancer in Korean Women. *J Korean Med Sci.* 2015 Dec;30(12):1777-83.
85. Chudecka-Głaz A, Cymbaluk-Płoska A, Jastrzębska J, Menkiszak J. Can ROMA algorithm stratify ovarian tumor patients better when being based on specific age ranges instead of the premenopausal and postmenopausal status? *Tumour Biol.* 2016 Jan 11. [Epub ahead of print]

86. 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 Mar 1;104(5):863-70.
87. 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. *Gynecol Oncol*. 2011 Jun 1;121(3):487-91.
88. Montagnana M, Danese E, Ruzzenente O, Bresciani V, Nuzzo T, Gelati M et al. The ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) for estimating the risk of epithelial ovarian cancer in women presenting with pelvic mass: is it really useful? *Clin Chem Lab Med*. 2011 Mar;49(3):521-5.
89. 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 Feb;108(2):402-8.
90. Urban N, Thorpe J, Karlan BY, McIntosh MW, Palomares MR, Daly MB et al. Interpretation of single and serial measures of HE4 and CA125 in asymptomatic women at high risk for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012, 21(11):2087–94
91. Ewald-Riegler N, du Bois O, Fisseler-Eckhoff A, Kommos F, Harter P, Traut A et al. Borderline tumors of the ovary: clinical course and prognostic factors. *Onkologie*. 2012;35(1-2):28-33.
92. Braicu EI, Van Gorp T, Nassir M, Richter R, Chekerov R, Gasimli K et al. Preoperative HE4 and ROMA values do not improve the CA125 diagnostic value for borderline tumors of the ovary (BOT) - a study of the TOC Consortium. *J Ovarian Res*. 2014 May 7;7:49.
93. Zhou B, Shu B, Yang J, Liu J, Xi T, Xing Y. C-reactive protein, interleukin-6 and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2014 Oct;25(10):1397-405.
94. Toriola AT, Cheng TY, Neuhouser ML, Wener MH, Zheng Y, Brown E et al. Biomarkers of inflammation are associated with colorectal cancer risk in women but are not suitable as early detection markers. *Int J Cancer*. 2013 Jun 1;132(11):2648-58.
95. Guo L, Liu S, Zhang S, Chen Q, Zhang M, Quan P et al. C-reactive protein and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015 May 22;5:10508.

96. Li J, Lin J, Luo Y, Kuang M, Liu Y. Multivariate Analysis of Prognostic Biomarkers in Surgically Treated Endometrial Cancer. *PLoS One*. 2015 Jun 24;10(6):e0130640.
97. Hefler LA, Concin N, Hofstetter G, Marth C, Mustea A, Sehouli J et al. Serum C-reactive protein as independent prognostic variable in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 1;14(3):710-4.
98. Lu Y, Huang S, Li P, Chen B, Liu W, Chen Z et al. Prognostic evaluation of preoperative serum C-reactive protein concentration in patients with epithelial ovarian cancer. *Exp Ther Med*. 2015 May;9(5):2003-2007.
99. Kushner I, Rzewnicki D, Samols D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med*. 2006 Feb;119(2):166.e17-28.
100. Kaijser J, Van Gorp T, Smet ME, Van Holsbeke C, Sayasneh A, Epstein E et al. Are serum HE4 or ROMA scores useful to experienced examiners for improving characterization of adnexal masses after transvaginal ultrasonography? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014 Jan;43(1):89-97.
101. Van Gorp T, Veldman J, Van Calster B, Cadron I, Leunen K, Amant F et al. Subjective assessment by ultrasound is superior to the risk of malignancy index (RMI) or the risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) in discriminating benign from malignant adnexal masses. *Eur J Cancer*. 2012 Jul;48(11):1649-56.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Ficha para coleta de dados

Ficha para coleta de dados de pesquisa clínica dos projetos Ovário:

- Avaliação de biomarcadores para detecção de tumores malignos em pacientes com tumor anexial.
- Achados Clínicos, ultrassonográficos e bioquímicos como preditores de malignidade em mulheres com tumores anexiais.
- Laparoscopia na abordagem inicial de tumores ovarianos.

I. IDENTIFICAÇÃO	
HC / HES / RH: _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _	
Iniciais: _____	
Telefone (contato): _____	

Termo de consentimento →	Sim _ _ / Não _ _
Questionário de Sintomas / Antecedentes →	Sim _ _ / Não _ _
Marcadores →	Sim _ _ / Não _ _
US da Pesquisa →	Sim _ _ / Não _ _
Cirurgia Programada (data / via): (AGENDADA PARA: _____) (VIA PROGRAMADA: _____)	Cirurgia Realizada em: _____(data) VIA: LAPAROSCOPIA _ _ CONVERSÃO: Sim _ _ / Não _ _ LAPAROTOMIA _ _
Congelação: Sim _ _ Não _ _ (resultado)→	
Complicações →	Sim _ _ / Não _ _
Anatomo-patológico parafina (resultado)→	
Encaminhamento →	
Seguimento →	Sim _ _ / Não _ _
Alta →	Sim _ _ / Não _ _

III. DADOS DO ATENDIMENTO	
DATA DO 1º ATENDIMENTO: ____/____/____	Data de nascimento: ____/____/____
altura: _____ m	peso: _____ Kg IMC: _____
Raça:	<input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Amarela
Paridade:	G ____ PV ____ PC ____ A ____
Menarca aos : _____ anos	
Usou Anticoncepção Hormonal: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
Usou TH: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> atual <input type="checkbox"/> prévio <input type="checkbox"/> não	
Menopausa: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> natural <input type="checkbox"/> cirúrgica (histerectomia) - idade _____	
Cirurgias abdominais (intracavitárias) prévias: Não: <input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Número: ____ TIPO:	
Antecedente pessoal de câncer: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual? _____ Ano diagnóstico: _____ Antecedente familiar de câncer: Não: <input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Familiar / tipo:	
<u>Exame Físico de entrada:</u>	
<u>Exame ginecológico:</u>	
Há Massa Pélvica Palpável? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
Se Existe Massa Palpável esta é móvel ou fixa? <input type="checkbox"/> móvel <input type="checkbox"/> fixa	

Indicação Cirúrgica no Ambulatório:**1ª Consulta:** sim nãoVia Indicada: Laparoscopia Laparotomia

Motivo:

Após Protocolo inicial (US+Ex Fis+ Marcadores): sim nãoVia Indicada: Laparoscopia Laparotomia

Motivo:

IV. BIOMARCADORES

Amostra N° | _____ |

1. CA 125: _____ U/ml Data: ____/____/____

2. Mesotelina: _____ nM Data: ____/____/____

3. HE4: _____ pM Data: ____/____/____

4. CEA: _____ Data: ____/____/____

5. OUTROS: (Nome do Marcador) - Resultado

(_____) _____ Data: ____/____/____

(_____) _____ Data: ____/____/____

(_____) _____ Data: ____/____/____

(_____) _____ Data: ____/____/____

V. DADOS ULTRASSONOGRÁFICOS (duplicar ficha se houver mais de 1 tumor)				
Tumor <input type="checkbox"/> ovariano <input type="checkbox"/> extra ovariano <input type="checkbox"/> indeterminado		Ovário <input type="checkbox"/> direito <input type="checkbox"/> esquerdo <input type="checkbox"/> bilateral		
Medidas ovarianas: Ovário direito: L ___ x A ___ x T ___ mm – V= ___ cc <input type="checkbox"/> - não visualizado Ovário esquerdo: L ___ x A ___ x T ___ mm – V= ___ cc <input type="checkbox"/> - não visualizado		Medidas do tumor: L ___ x A ___ x T ___ mm – V= ___ cc Evidência de metástases: <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Local _____		
Descrição da tumoração segundo International Ovarian Tumor Analysis – IOTA (19)				
<input type="checkbox"/> Cisto unilocular	<input type="checkbox"/> Unilocular Sólido Comp. sólido ___mm	<input type="checkbox"/> Multilocular nº = ___	<input type="checkbox"/> Multilocular Sólido nº = ___ Comp. sólido ___mm	<input type="checkbox"/> Sólido Parede externa: <input type="checkbox"/> regular <input type="checkbox"/> irregular
Parede Interna do Cisto: <input type="checkbox"/> Lisa <input type="checkbox"/> Irregular				
Ecotextura	<input type="checkbox"/> Anecoide	<input type="checkbox"/> Baixa ecogenicidade	<input type="checkbox"/> Vidro fosco	<input type="checkbox"/> Hemorrágico <input type="checkbox"/> Mista
Presença de septo	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Completo - ___mm <input type="checkbox"/> Incompleto - ___mm			
Projeção sólida papilífera maior ou igual a 3mm	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Lisa <input type="checkbox"/> Irregular Número _____ Medidas da maior – base ___mm / altura ___mm Fluxo na projeção – <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Presença de sombra acústica	<input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim	
Presença de ascite	<input type="checkbox"/> Não		<input type="checkbox"/> Sim Volume de líquido em fundo de saco posterior _____ ml	
Doppler	TAMXV - _____	PS - _____	IP - _____	IR - _____

Índice do cor (IC)	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4
Classificação da Tumoração (21)				
Critérios preditores de benignidade				
<input type="checkbox"/> Cisto Unilocular. (B1) <input type="checkbox"/> Presença de componente sólido cujo diâmetro máximo seja menor que 7 mm. (B2) <input type="checkbox"/> Presença de sombra acústica. (B3) <input type="checkbox"/> Tumor multilocular com paredes lisas, medindo menos de 100mm. (B4) <input type="checkbox"/> Ausência de fluxo ao exame de dopplervelocimetria – IC = 1 (B5)				
Critérios preditores de malignidade				
<input type="checkbox"/> Tumor sólido irregular. (M1) <input type="checkbox"/> Presença de ascite. (M2) <input type="checkbox"/> Presença de quatro ou mais projeções papilares. (M3) <input type="checkbox"/> Tumor multilocular sólido irregular medindo mais que 100mm. (M4) <input type="checkbox"/> Presença de alto fluxo ao exame de dopplervelocimetria – IC = 4 (M5)				
Classificação segundo as “Regras Simples”				
<input type="checkbox"/> Benigno <input type="checkbox"/> Maligno <input type="checkbox"/> Tumoração não classificável nos critérios acima				
Impressão subjetiva dos Examinadores	<input type="checkbox"/> Benigno		<input type="checkbox"/> Maligno	

Dor ao exame de ultrassonografia:

sim não

TABELA DE US PARA CÁLCULO DO IRM (segundo Torres et al)			
Tumor		Ovário	
<input type="checkbox"/> Único <input type="checkbox"/> múltiplo		<input type="checkbox"/> Direito <input type="checkbox"/> esquerdo <input type="checkbox"/> bilateral	
Característica	Score	Característica	Score
<input type="checkbox"/> Único ou múltiplos cistos simples uniloculares com parede fina e regula	<u>0</u>	<input type="checkbox"/> Cisto uni ou multilocular com parede fina e presença de irregularidade na parede ou septo maior que 3mm	<u>2</u>
<input type="checkbox"/> Lesão sugestiva de cisto dermoide	<u>0</u>	<input type="checkbox"/> Cisto multilocular com parede espessa e irregular (irregularidade menor que 3mm) e/ou septo irregular	<u>4</u>
<input type="checkbox"/> Cisto multilocular com parede menor que 3mm lisa e regular	<u>1</u>	<input type="checkbox"/> Cisto com irregularidade papilar maior que 3mm	<u>4</u>
<input type="checkbox"/> Cisto simples com parede espessa (maior que 3mm)	<u>1</u>	<input type="checkbox"/> Lesão complexa com predominância cística ou sólida sem irregularidade na superfície	<u>5</u>
<input type="checkbox"/> Tumor sólido com parede hiperecogênica e bem definida	<u>1</u>	<input type="checkbox"/> Lesão complexa com irregularidade na superfície menor que 3mm ou parede irregular e mal definida	<u>10</u>
<input type="checkbox"/> Presença de ascite associada	<u>1</u>	<input type="checkbox"/> Lesão sólida heterogênea	<u>10</u>
<input type="checkbox"/> Presença de processo expansivo associado em parede abdominal maior que 3mm	<u>2</u>		
Evidência de metástases:			
<input type="checkbox"/> não			
<input type="checkbox"/> sim: Presença de processo expansivo em parede abdominal maior que 3mm			
<input type="checkbox"/> sim: Presença de lesão em outros órgãos sugestiva de lesão metastática (ex: nódulo hepático)			
<input type="checkbox"/> sim: Imagem sugestiva de linfonodomegalia intra-abdominal			

Cálculo do Índice de Risco de Malignidade (segundo Torres et al)	
Escore ultrassonográfico: _____	
Dosagem sérica de CA-125= _____ Ui/ml	
MENOPAUSA: (M) <input type="checkbox"/> não (M=1) <input type="checkbox"/> sim (há _____ anos) (M=3) <input type="checkbox"/> histerectomizada (M)=3	
ÍNDICE DE RISCO DE MALIGNIDADE (Torres et al) IRM= _____ US x _____ M x _____ CA-125= _____ (total)	

Cálculo do Índice de Risco de Malignidade (segundo Jacobs et al 1990) (RMI 1)	
Escore ultrassonográfico (US) (somar pontos entre parênteses): >Lesão cística multilocular (1) >Área sólida (1) >Lesão bilateral (1) >Ascite (1) >Lesão sugestiva de metástase intra-abdominal (1)	Se (US)=0; escore =0 Se (US)=1; escore =1 Se (US)=2 ou +; escore =3
Dosagem sérica de CA-125= _____ Ui/ml	
MENOPAUSA (M): <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim (há _____ anos) <input type="checkbox"/> histerectomizada	Se não (M)=1 Se sim (M)=3
ÍNDICE DE RISCO DE MALIGNIDADE (RMI 1) RMI 1= _____ (US) x _____ (M) x _____ (CA-125)= _____ (total)	

Cálculo do Índice de Risco de Malignidade (segundo Tingulstad et al 1996) (RMI 2)	
Escore ultrassonográfico (US) (somar pontos entre parênteses): >Lesão cística multilocular (1) >Área sólida (1) >Lesão bilateral (1) >Ascite (1) >Lesão sugestiva de metástase intra-abdominal (1)	Se (US)=0 ou 1; escore =1 Se (US)=2 ou +; escore =4
Dosagem sérica de CA-125= _____ Ui/ml	

MENOPAUSA (M): <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim (há _____ anos)	Se não (M)=1
<input type="checkbox"/> hysterectomizada	Se sim (M)=4
ÍNDICE DE RISCO DE MALIGNIDADE (RMI 2)	
RMI 2= _____(US) x _____(M) x _____(CA-125)= _____(total)	

Cálculo do Índice de Risco de Malignidade (segundo Tingstad et al 1999) (RMI 3)	
Escore ultrassonográfico (US) (somar pontos entre parênteses): >Lesão cística multilocular (1) >Área sólida (1) >Lesão bilateral (1) >Ascite (1) >Lesão sugestiva de metástase intra-abdominal (1)	Se (US)=0 ou 1; escore =1 Se (US)=2 ou +; escore =3
Dosagem sérica de CA-125= _____ Ui/ml	
MENOPAUSA (M): <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim (há _____ anos)	Se não (M)=1
<input type="checkbox"/> hysterectomizada	Se sim (M)=3
ÍNDICE DE RISCO DE MALIGNIDADE (RMI 3)	
RMI 3= _____(US) x _____(M) x _____(CA-125)= _____(total)	

Cálculo do Índice de Risco de Malignidade (segundo Yamamoto et al 2009) (RMI 4)	
Escore ultrassonográfico (US) (somar pontos entre parênteses): >Lesão cística multilocular (1) >Área sólida (1) >Lesão bilateral (1) >Ascite (1) >Lesão sugestiva de metástase intra-abdominal (1)	Se (US)=0 ou 1; escore =1 Se (US)=2 ou +; escore =4
Dosagem sérica de CA-125= _____ Ui/ml	
MENOPAUSA (M): <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim (há _____ anos)	Se não (M)=1
<input type="checkbox"/> hysterectomizada	Se sim (M)=4

Tamanho do tumor (S)	Se < 7cm; (S) =1 Se ≥ 7cm; (S) =2
ÍNDICE DE RISCO DE MALIGNIDADE (RMI 4)	
RMI 4= _____(US) x _____(M) x _____(S) x _____(CA-125)= _____(total)	

ACOG Guideline: (Alto Risco se Positivo) Referir ao serviço de oncologia	
Pre-menopausa (<50 anos) <ul style="list-style-type: none"> • CA-125>200 U/mL • Ascite • Evidencia de metástase abdominal ou à distância (pelo exame clíco ou de imagem) • História familiar de câncer de ovário e/ou mama (em parente de 1º grau) 	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não se aplica
Pos-menopausa (≥50 anos) <ul style="list-style-type: none"> • CA-125>35 U/mL • Ascite • Massa pélvica nodular ou fixa • Evidencia de metástase abdominal ou à distância (pelo exame clíco ou de imagem) • História familiar de câncer de ovário e/ou mama (em parente de 1º grau) 	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não se aplica

VI. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Indicação Cirúrgica no Centro Cirúrgico:

Via Indicada:

Laparoscopia Laparotomia Motivo _____

Tumor

único múltiplo

Ovário

Direito Esquerdo Bilateral

AMOSTRA OBTIDA POR:

laparoscopia laparotomia data ____ / ____ / ____

Duração: _____ Perda sanguínea estimada: _____ (em ml)

Inventário da cavidade:

Cirurgia realizada:

Conversão imediata para laparotomia:

Não Sim – Motivo:

Houve rotura do cisto no INTRA-OPERATÓRIO:

Não Sim

SE HOUVE INSUCESSO NA EXÉRESE DO TUMOR POR LAPAROSCOPIA:

MOTIVO:

- complicação do ato anestésico (qual: _____)

- aderências

- tumor muito volumoso para abordagem intracavitária

- ausência de tumor

- presença de tumor extraovariano

- outro; **qual:**

DIAS DE INTERNAÇÃO: _____

VII. AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

COMPLICAÇÕES PRECOSES: Não Sim – Quais:

COMPLICAÇÕES TARDIAS: Não Sim – Quais:

VIII. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA			
CONGELAÇÃO: Nº _____			
RESULTADO:			
PARAFINA: Nº _____			
<u>TAMANHO DA PEÇA 1 (AP):</u> ___ X ___ X ___ cm			
<u>TAMANHO DO TUMOR 1 (AP):</u> ___ X ___ X ___ cm			
<u>TAMANHO DA PEÇA 2 (AP):</u> ___ X ___ X ___ cm (se houver)			
<u>TAMANHO DO TUMOR 2 (AP):</u> ___ X ___ X ___ cm (se houver)			
<input type="checkbox"/> BENIGNO		<input type="checkbox"/> MALIGNO	
<u>TIPO HISTOLÓGICO:</u>		<input type="checkbox"/> epitelial; <input type="checkbox"/> germinativo; <input type="checkbox"/> estroma; <input type="checkbox"/> misto; <input type="checkbox"/> nao se aplica; <input type="checkbox"/> nao ginecologico	
<u>Diferenciação histológica (se maligno):</u>			
<input type="checkbox"/> bem diferenciado / GI			
<input type="checkbox"/> moderadamente diferenciado / GII			
<input type="checkbox"/> pouco diferenciado / GIII			
<input type="checkbox"/> indiferenciado / GIII			
<u>Estádio Clínico-patológico (se maligno): Ecp:</u>			
<input type="checkbox"/> Ia;	<input type="checkbox"/> IIa;	<input type="checkbox"/> IIIa;	<input type="checkbox"/> IVa;
<input type="checkbox"/> Ib;	<input type="checkbox"/> IIb;	<input type="checkbox"/> IIIb;	<input type="checkbox"/> IVb;
<input type="checkbox"/> Ic;	<input type="checkbox"/> IIc;	<input type="checkbox"/> IIIc;	<input type="checkbox"/> nao se aplica;
			<input type="checkbox"/> metastase (IVde outro orgao)

OBSERVAÇÕES

Anexo 2 - Carta de aprovação do projeto no CEP – FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 24/11/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 1092/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0849.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA DETECÇÃO DE TUMORES MALIGNOS EM MULHERES COM TUMOR ANEXIAL”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Denise da Rocha Pitta Lima de Moraes/Sophie Françoise Mauricette Derchain

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/11/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/11/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a sensibilidade e especificidade do CA 125, HE4, mesotelina no diagnóstico de tumores malignos de ovário em mulheres submetidas a laparotomia por massa anexial associada aos sintomas e fatores pessoais.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo clínico prospectivo para o qual serão selecionados 93 casos malignos, 149 casos benignos e 149 casos sem a doença, totalizando uma amostra de 391 casos. O sangue periférico será coletado em tubo seco de 10ml de maneira a termos amostra suficiente para quantificação dos três biomarcadores através de imunoensaio enzimático. Os dados serão tabulados em planilhas eletrônicas no programa Excel. A distribuição das variáveis de controle nos grupos de estudo será avaliada através de regressão logística. Serão calculadas a sensibilidade e especificidade, bem como seus intervalos de confiança em 95% (IC95%) para cada um dos biomarcadores (e a combinação destes) na detecção dos tumores ovarianos em diferentes pontos de corte. Será usada a curva ROC (Receiver Operator Characterist) para a determinação dos melhores pontos de corte. Será comparada as áreas sob as curvas ROC para cada marcador através do método não paramétrico de De Long.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto apresenta-se bem redigido, com metodologia adequada. Os critérios de inclusão, exclusão e descontinuação dos sujeitos estão bem definidos; cálculo do tamanho amostral e análise estatística muito bem embasados por cálculos estatísticos. Os aspectos éticos estão bem discutidos no corpo do projeto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é claro e adequado às recomendações. O orçamento é detalhado e prevê encaminhamento para agência de fomento.



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de novembro de 2009.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Avaliação de biomarcadores para detecção de tumores malignos em pacientes com tumor anexial.

Achados Clínicos, ultrassonográficos e bioquímicos como preditores de malignidade em mulheres com tumores anexiais.

Laparoscopia na abordagem inicial de tumores ovarianos.

Eu, Sra _____, atendida no ambulatório de oncologia pélvica – ovário do Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher (CAISM)-UNICAMP fui convidada a participar destas pesquisas por apresentar tumor na pelve, dentro da barriga e podendo ter necessidade de cirurgia para saber se o tumor é maligno ou benigno e para realizar o tratamento da minha doença. Essas pesquisas têm como objetivo verificar se há melhora na capacidade de classificar tumores de ovário em benignos e malignos (câncer) antes da cirurgia. Para isso avaliaremos: 1) a dosagem no sangue das substâncias chamadas de marcadores tumorais, CA 125, mesotelina, HE4; 2) o exame de ultrassonografia; 3) a avaliação de vários sintomas e; 4) o índice de risco de malignidade; separados e em conjunto.

Os critérios clínicos encontrados durante a consulta associados aos resultados dos exames de ultrassonografia e CA 125 serão utilizados para definição da conduta (observação do meu caso ou cirurgia) e se necessário da indicação médica do tipo de tratamento cirúrgico a ser realizado que poderá consistir em: videolaparoscopia (técnica cirúrgica pouco invasiva, que consiste na realização de 3 ou 4 pequenos cortes) ou laparotomia (técnica cirúrgica, que consiste na realização de um corte maior na barriga). A pesquisa não mudará em nada o tratamento que seria feito com você se você não participasse da pesquisa.

Sei que responderei a um questionário, com duração prevista de 20 a 30 minutos, com perguntas sobre informações pessoais. Essas perguntas serão feitas pelos responsáveis pela pesquisa, em uma única entrevista, antes da consulta médica, em uma sala do ambulatório de oncologia pélvica, não atrapalhando o meu atendimento. As fichas ficarão de posse do responsável pela pesquisa, que manterá o sigilo da fonte destas informações, mantendo o meu anonimato.

Sei que para este estudo será realizada a coleta de uma amostra de sangue por punção venosa, semelhante a uma injeção na veia sendo aspirada pequena quantidade de sangue que ficará armazenada no Laboratório Clínico Especializado para quantificação das substâncias chamadas de marcadores tumorais: CA125, mesotelina e HE4. O exame de ultrassonografia será agendado após a consulta no ambulatório de ovário e será feito no setor de ultrassonografia do CAISM que fica no andar térreo. Esse exame não dói nem faz mal à saúde e é realizado passando-se gel e aplicando-se um aparelho sobre a pele do abdome, ou utilizando-se um aparelho que é colocado no canal vaginal (ultrassom transvaginal), protegido por um condom (camisinha), a critério do médico que realizará o exame. Para realizar este exame a Sra permanecerá deitada por cerca de 20 minutos.

Se for necessária a realização de cirurgia para diagnóstico definitivo, tratamento e estadiamento do meu tumor esta poderá ser realizada de uma das seguintes formas: 1) videolaparoscopia ou; 2) laparotomia. Estas técnicas de cirurgia não são novas nem tampouco experimentais, existem há vários anos e suas técnicas e usos estão consolidadas. Sua indicação será baseada em critérios clínicos bem estabelecidos. A cirurgia por videolaparoscopia consiste em 3 ou 4 pequenos cortes na barriga de tamanho necessário à introdução de instrumental cirúrgico dentro da barriga o qual é usado para o tratamento do tumor tratando-se de técnica considerada pouco invasiva com vantagens bem estabelecidas na recuperação das pacientes após a cirurgia e na redução do tempo de retorno às atividades habituais, porém é técnica mais complexa, dependente de material especializado, e de realização dificultada por fatores como tumores de grande tamanho, aderências e outros. A laparotomia consiste em cirurgia com corte extenso em pé, no meio da barriga para permitir o acesso ao tumor localizado dentro da barriga, possui vantagens ao permitir manipulação mais fácil do tumor e não ser dependente de material especializado, porém está associada a mais dor no pós-operatório e recuperação mais lenta e maior demora no retorno às atividades habituais. Sempre que se propõe cirurgia por videolaparoscopia pode haver a necessidade de conversão para laparotomia a depender de necessidade e avaliação do cirurgião no momento da realização da cirurgia.

Só participarei da pesquisa intitulada “Laparoscopia na Avaliação Inicial de Tumores Ovarianos” caso o médico que me atender, baseando-se em critérios clínicos e no resultado de meus exames, indique a realização de cirurgia por videolaparoscopia.

Fui esclarecida que a participação nestas pesquisas é totalmente voluntária. Sei que não serei paga para participar destes estudos. **A não aceitação na participação nas pesquisas não implicará na perda dos direitos iniciais rotineiramente oferecidos pelo hospital.** Aceitando participar, não terei privilégios adicionais no atendimento.

Os possíveis benefícios que essas pesquisas possam trazer ao tratamento de pacientes com tumores ovarianos, só poderão ser utilizados após o término das mesmas, portanto, estas pesquisas não trarão nenhum privilégio ou benefício imediato. Também não acarretarão prejuízos.

Autorizo os responsáveis pelas pesquisas a examinarem meus registros médicos a fim de verificar informações relacionadas aos objetivos das pesquisas, para que sejam anexados às fichas de pesquisa. No entanto, os registros médicos serão tratados confidencial e sigilosamente.

Tenho o direito de fazer perguntas para esclarecer minhas dúvidas sobre minha participação em qualquer momento da entrevista, podendo desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento, mesmo após a realização dos exames, sem nenhum prejuízo ou alteração no meu tratamento.

Em caso de dúvidas ou esclarecimento, tenho o direito de telefonar para os pesquisadores responsáveis, para a Dra Sophie Derchain, Profa Dra Pesquisadora orientadora dos projetos no número (19) 3521-9305 ou para o Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP no número (19) 3521-8936.

Paciente _____

RG _____

HC _____

Pesquisadores _____

Campinas, _____ de _____ de 20 _____