

A Nossa
Universidade

Colégio dos Jesuítas
Rua dos Ferreiros - 9000-082, Funchal

Tel: +351 291 209400
Fax: +351 291 209410
Email: gabinetedareitoria@uma.pt

DM

CA-125 e HE4
O seu papel como biomarcadores em cancro do ovário
Dina Rodrigues de Abreu



CA-125 e HE4
O seu papel como biomarcadores em cancro do ovário
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dina Rodrigues de Abreu
MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

UNIVERSIDADE da MADEIRA
A Nossa Universidade
www.uma.pt

setembro | 2016

DIMENSÕES: 45 X 29,7 cm

PAPEL: COUCHÊ MATE 350 GRAMAS

IMPRESSÃO: 4 CORES (CMYK)

ACABAMENTO: LAMINAÇÃO MATE

NOTA*

Caso a lombada tenha um tamanho inferior a 2 cm de largura, o logótipo institucional da Uma terá de rodar 90°, para que não perca a sua legibilidade/identidade.

Caso a lombada tenha menos de 1,5 cm até 0,7 cm de largura o layout da mesma passa a ser aquele que consta no lado direito da folha.



CA-125 e HE4

O seu papel como biomarcadores em cancro do ovário

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dina Rodrigues de Abreu

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADORA

Patrícia Alexandra da Silva Rosa

CO-ORIENTADOR

Hugo Manuel Rodrigues Gaspar

Dina Abreu

CA-125 e HE4: o seu papel como biomarcadores em cancro do ovário

Dissertação apresentada na Universidade da Madeira para obtenção do grau de mestre em Bioquímica Aplicada

Orientadora: Prof. Doutora Alexandra Rosa
(Faculdade das Ciências da Vida, Universidade da Madeira)

Co-orientador: Mestre Hugo Gaspar
(Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital Dr. Nélio Mendonça, SESARAM E.P.E.)

Funchal-Portugal

2016

Agradecimentos

Agradeço à Prof. Doutora Alexandra Rosa pela orientação científica, disponibilidade, apoio incansável, paciência e pela minuciosa revisão deste trabalho e, acima de tudo, pelo constante incentivo para a finalização do mesmo. Obrigada por me ter concedido esta oportunidade de aprender e crescer profissionalmente sob sua orientação.

Ao Dr. Hugo Gaspar, pela sua co-orientação científica e por me ter proporcionado as condições necessárias para a realização deste trabalho, o meu reconhecimento!

À Dr^a Isabel Mendonça e equipa do Gabinete de Investigação do Hospital Dr. Nélio Mendonça pela disponibilidade e colaboração no recrutamento de participantes saudáveis. O meu sincero obrigado!

À Prof. Doutora Ana Abreu e Prof. Doutora Rita Vasconcelos pela disponibilidade na interpretação e esclarecimento de dúvidas da análise estatística dos dados recolhidos.

À empresa Roche, em particular ao Sr. Jorge Gomes, pela contribuição no fornecimento dos reagentes necessários para o desenvolvimento deste trabalho sem qualquer encargo monetário.

À Dr^a Graça Andrade, pela disponibilidade das condições necessárias para o desenvolvimento do trabalho prático no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça.

À Técnica Maria da Luz, a quem admiro muito e agradeço profundamente pela compreensão e apoio para a concretização deste trabalho.

Ao Dr. Ilídio Ornelas, por todo o seu apoio, conselhos e conhecimentos transmitidos não só durante este trabalho, mas também ao longo da minha vida profissional.

Às minhas colegas de trabalho e de Mestrado, Annabella Farinha, Claudia Pita e Fátima Costa, pelo companheirismo e amizade, pelas conversas e incentivos nos momentos menos bons e apoio ao longo desta árdua jornada, e não só! Obrigada por me aturarem nestes últimos seis anos!

Por último e mais importante, agradeço aos meus pais e irmãos, obrigada!

Resumo

Apesar da sua baixa prevalência e incidência, o cancro do ovário (CO) é a principal causa de morte do foro ginecológico. A sua deteção precoce é importante, porque a taxa de sobrevivência global aos 5 anos pode atingir os 90% nos estádios iniciais (I-II) mas varia entre os 20 e 50% em estádios avançados (III-IV). O CA-125 é o único marcador tumoral recomendado para o diagnóstico de CO. Embora apresente uma boa sensibilidade em estádios avançados, é pouco útil na identificação de estádios precoces e sua distinção de condições ginecológicas benignas (GB), assim como na distinção dos subtipos histológicos.

Com este estudo, avaliou-se a utilidade clínica dos marcadores CA-125 e HE4 (isoladamente, combinados ou interpretados pelo algoritmo ROMA) em prever o risco de malignidade de uma massa anexial e assim distinguir CO de GB. Foram avaliadas 45 mulheres com massa anexial (12 CO, 3 *borderline* e 30 GB) e 30 controlos saudáveis, recrutadas no Hospital Dr. Nélio Mendonça. Para os marcadores tumorais e algoritmo ROMA, foram determinados os índices de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e precisão (ROC-AUC).

O CA-125 obteve a melhor sensibilidade (83,3%) e VPN (90,9%), seguido de combinação CA-125 ou HE4 (83,3% e 90,5%), ROMA (66,7% e 85,2%), combinação CA-125 + HE4 (50,0% e 82,4%) e HE4 (50,0% e 81,8%). A combinação CA-125 + HE4 obteve a melhor especificidade (93,3%) e VPP (75,0%), seguido do HE4 (90,0% e 66,7%), ROMA (76,7% e 53,3%), CA-125 (66,7% e 50,0%) e combinação CA-125 ou HE4 (63,3% e 47,6%). O CA-125 obteve a melhor precisão (AUC 0,878), seguido do ROMA (AUC 0,875), combinação CA-125 ou HE4 (AUC 0,856) e HE4 (AUC 0,786).

Assim, o presente estudo corrobora uma utilidade clínica superior de CA-125 isolado, relativamente à da utilização de HE4 ou do algoritmo ROMA, na diferenciação de massas anexiais benignas de malignas.

Palavras-chave: cancro do ovário, massa anexial, marcadores tumorais, CA-125, HE4, algoritmo ROMA.

Abstract

The ovarian cancer (OC) is the leading cause of death from gynecological cancers despite its low prevalence and incidence. Detecting this pathology in early stages is very important because overall survival rates at 5 years may reach 90% in earlier stages (I-II) and varies between 20 and 50% in advanced stages (III-IV). The only tumor marker recommended for OC diagnosis is the CA-125 tumor marker. Although being a marker with good sensitivity in advanced stages, in early stages of the pathology it's very ineffective as well as it's distinction of benign gynecological conditions (BG) and distinguishing histological subtypes.

This study evaluated the clinical utility of CA-125 and HE4 markers (alone, combined or interpreted by ROMA algorithm) in predicting the risk of malignancy of an adnexal mass and thus distinguish OC from BG. During the process, 45 women were evaluated with adnexal mass (12 OC, 3 borderline and 30 BG), and 30 healthy controls recruited from Dr. Nélio Mendonça Hospital. Tumor markers and ROMA algorithm were determined with: sensitivity, specificity, PPV, NPV and precision (ROC-AUC).

The CA-125 achieved the highest sensitivity (83,3%) and NPV (90,9%), followed by the combination CA-125 or HE4 (83,3% and 90,5%), ROMA (66,7% and 85,2%), combination CA-125 + HE4 (50,0% and 82,4%) and HE4 (50,0% and 81,8%). The combination CA-125 + HE4 had the highest specificity (93,3%) and PPV (75,0%), followed by HE4 (90,0% and 66,7%), ROMA (76,7% and 53,3%), CA-125 (66,7% and 50,0%) and the combination CA-125 or HE4 (63,3% and 47,6%). The CA-125 achieved the best precision (AUC 0,878), followed by ROMA (AUC 0,875), combination CA-125 or HE4 (AUC 0,856) and HE4 (AUC 0,786).

Therefore, in the differentiation of benign from malignant adnexal mass, the present study confirms a superior clinical utility for the CA-125 alone compared to the use of HE4 or even by ROMA algorithm.

Keywords: ovarian cancer, adnexal mass, tumor markers, CA-125, HE4, ROMA algorithm

Índice

Agradecimentos	3
Resumo.....	4
Abstract	5
Índice das Figuras	7
Índice das Tabelas.....	8
Abreviaturas	9
1. Introdução	11
1.1. Epidemiologia do cancro do ovário.....	11
1.2. Classificação histopatológica dos tumores do ovário.....	12
1.3. Etiologia e fatores de risco do CO.....	15
1.4. Diagnóstico do CO	18
1.4.1. Marcadores tumorais	20
1.4.2. Índices de Malignidade	24
1.5. Rastreio do CO	26
1.6. Tratamento e monitorização do CO.....	27
2. Objetivos do estudo.....	31
3. Material e Métodos	31
3.1. Seleção e recrutamento de participantes.....	31
3.2. Amostragem e análise laboratorial	32
3.3. Recolha e análise dos resultados	35
4. Resultados	39
4.1. Caracterização dos grupos amostrais.....	39
4.2. Caracterização das condições ginecológicas (benigno, <i>borderline</i> e maligno) e avaliação dos níveis séricos de CA-125 e HE4.....	44
4.3. Índices de avaliação e curvas ROC dos marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA.....	50
5. Discussão	55
6. Conclusão.....	65
7. Referências.....	66
8. Anexos	81

Índice das Figuras

Figura 1 - Localização ovárica dos tumores consoante a sua categoria	12
Figura 2 - Subtipos histológicos mais frequentes do tumor epitelial do ovário.....	14
Figura 3 - Estrutura da molécula de CA-125	21
Figura 4 - Taxa de sobrevivência de mulheres com CO e idade ≥ 20 anos, em meses após o diagnóstico, por estágio FIGO	29
Figura 5 - Representação esquemática do princípio ECLIA e procedimento experimental para quantificação de HE4 e CA-125	34
Figura 6 - Determinação do algoritmo ROMA.....	35
Figura 7A - Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio-padrão), em mulheres diagnosticadas com as principais classes de tumores benignos	45
Figura 7B - Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio-padrão), em mulheres diagnosticadas com tumores benignos, de acordo com o estado de menopausa.....	45
Figura 8A - Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio padrão), em mulheres diagnosticadas com tumores malignos, por subtipo histológico	47
Figura 8B - Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio-padrão), em mulheres diagnosticadas com tumores serosos em relação aos não serosos.....	47
Figura 8C - Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio-padrão), em mulheres diagnosticadas com tumores malignos, de acordo com o estágio FIGO.....	47
Figura 9 - Curvas ROC e AUC para os marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, no diagnóstico de cancro do ovário em relação as condições ginecológicas benignas.....	53
Figura 10 - Curvas ROC e AUC para os marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, no diagnóstico de cancro do ovário em relação as condições ginecológicas benignas, na pós-menopausa	54

Índice das Tabelas

Tabela 1 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN, dos exames de imagem em estudos selecionados	20
Tabela 2 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do IRM e ROMA, em estudos selecionados	25
Tabela 3 - Estadiamento FIGO para o CO e tumores <i>borderline</i>	28
Tabela 4 - Índices que avaliam um teste de diagnóstico a partir de uma tabela 2x2	38
Tabela 5 - Características clínicas e laboratoriais dos grupos amostrais na pós- e pré-menopausa	41
Tabela 6 - Classificação histológica dos tumores benignos.....	44
Tabela 7 - Classificação dos tumores malignos e <i>borderline</i> , de acordo com o subtipo histológico e estágio FIGO	46
Tabela 8 - Frequência (%) de tumores do ovário acima do valor de <i>cut-off</i> para os marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, por subtipo histológico e por estado de menopausa	49
Tabela 9 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, no diagnóstico de cancro do ovário (incluindo apenas mulheres com condições GB e CO)	51

Abreviaturas

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

AUC - *Area Under Curve*

CA-125 - *Carbohydrate Antigen 125*

CHGM - Concentração de hemoglobina globular média

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CO - Cancro do ovário

DNA - *Desoxyribonucleic Acid*

ECLIA - *ElectroChemiLuminescence ImmunoAssay*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EIA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

FDA - *Food and Drug Administration*

FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

FSH - *Follicle Stimulating Hormone*

GB - Ginecológicas benignas

HBOC - *Hereditary Breast and Ovary Cancer*

HE4 - *Human Epididymis Protein 4*

HGM - Hemoglobina globular média

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IMC - Índice de massa corporal

IRM - Índice de risco de malignidade

LH - *Luteinizing Hormone*

LR +/- - Razões de verosimilhança positiva e negativa

NICE - *National Institute for Health and Clinical Excellence*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PLCO - *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian*

R.A.M - Região Autónoma da Madeira

RM - Ressonância magnética

ROC - *Receiver Operating Characteristics*

ROCA - *Risk of Ovarian Cancer Algorithm*

ROMA - *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*

RR - Risco relativo

SI - *symptom index*

TC - Tomografia computadorizada

TEP - Tomografia por emissão de positrões

THS - Terapêutica hormonal de substituição

UKCTOCS - *United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening*

VGM - Volume globular médio

VPN - Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

WFDC2 - *WAP four-disulfide core domainprotein 2*

WHI - *Women's Health Initiative*

1.Introdução

1.1. Epidemiologia do cancro do ovário

Numa escala mundial, o cancro do ovário (CO) é a oitava neoplasia maligna mais comum entre as mulheres e a terceira ginecológica, assumindo-se como a principal causa de morte do foro ginecológico [1]. Em 2008, registou-se uma incidência de 225 mil casos de CO (6,3/100 mil mulheres) e uma mortalidade de 140 mil casos de CO (3,8/100 mil mulheres) [1], sendo que apenas 37,7% das pacientes sobrevivem à doença. A sua incidência é variável nas diferentes regiões do mundo, sendo maior nos países em desenvolvimento [1]. Embora possa surgir em mulheres de todas as idades, o CO é uma doença característica da mulher pós-menopausa, em que 30% dos tumores do ovário são malignos, em contraste com apenas 7% na pré-menopausa [2], tendo a sua prevalência máxima em mulheres entre os 60-64 anos de idade [3].

Na Europa, o CO representa a quinta causa de morte de cancro em mulheres e é o segundo cancro ginecológico mais comum, precedido apenas pelo cancro do útero [4]. Em 2012, a sua incidência europeia foi de 65,5 mil casos (13,1/100 mil mulheres) e mortalidade de 42,7 mil casos (7,6/100 mil mulheres), sendo estas taxas mais elevadas nos países no norte da Europa. Portugal é o segundo país da união europeia com menor taxa de incidência e mortalidade por CO [4].

Segundo os dados do Registo Oncológico Nacional, em 2010, foram apontados 484 novos casos (8,8/100 mil mulheres), com maior prevalência entre os 75 e 79 anos (24,7/100 mil mulheres), enquanto que a mortalidade verificada foi de 357 mulheres (6,5/100 mil mulheres) [5]. É assim a décima neoplasia maligna mais comum, o terceiro do foro ginecológico e a sétima causa de morte de cancro entre as mulheres portuguesas [5]. Já na Região Autónoma da Madeira (R.A.M), a taxa de incidência foi de 11,3/100 mil mulheres [5]. Até à data não existem dados quanto à mortalidade de CO neste arquipélago. Segundo dados fornecidos pelo *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a taxa de sobrevivência no primeiro, terceiro e quinto ano após o diagnóstico, em Portugal, são de 14,5, 35,3 e 50,2%, respetivamente [6].

1.2. Classificação histopatológica dos tumores do ovário

Os tumores do ovário incluem um grupo extenso de neoplasias, com padrões histopatológicos e comportamentos biológicos variáveis. Consoante a sua localização e transformação celular, podem ser classificados em 3 categorias, nomeadamente os tumores das células germinativas, os tumores dos cordões sexuais-estroma e os tumores epiteliais (Figura 1), sendo que cada categoria inclui um número de subtipos histológicos. Os tumores que combinam dois ou mais subtipos histológicos diferentes são designados por tumores mistos [2, 7]. Algumas (6-7%) das massas anexiais são ainda metástases de tumores primários de outra localização, mais comumente da mama, trato gastrointestinal e do aparelho genital feminino [8]. Cada categoria é classificada ainda em três categorias de relevância prognóstica (benigno, baixo potencial maligno ou *borderline* e maligno), com base no grau de proliferação celular e a presença/ausência de atipia nuclear e invasão do estroma [9].

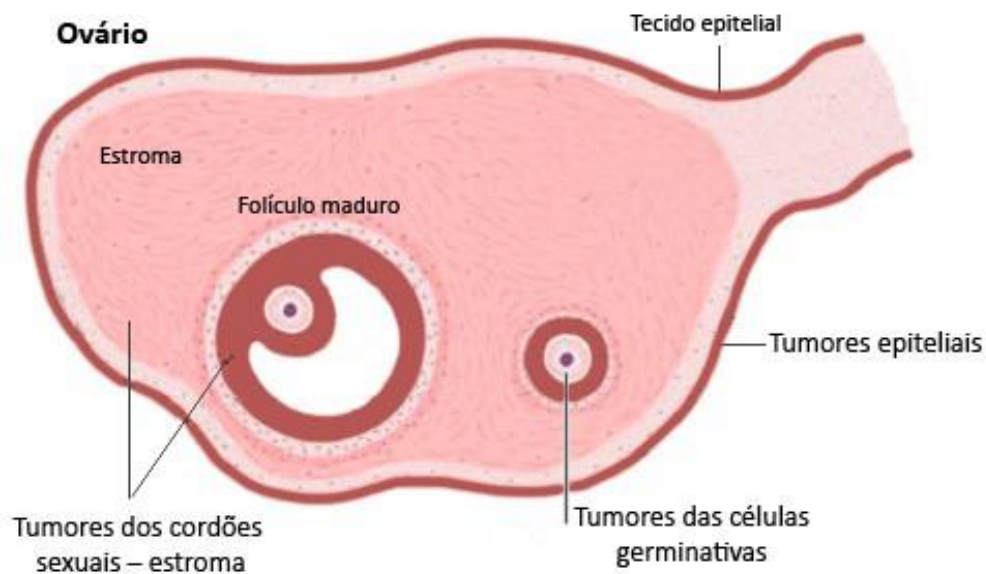


Figura 1 - Localização ovárica dos tumores, consoante a sua categoria (Adaptado de [10]).

Os tumores das células germinativas do ovário são neoplasias poucos comuns (3-7% dos tumores malignos do ovário), mas são a categoria mais frequente (70%) entre as jovens nas primeiras duas décadas de vida, sendo um terço malignos [2, 7]. Já nas mulheres adultas a maioria destes tumores são benignos. Os subtipos malignos mais comuns são os disgerminomas, os teratomas imaturos e os

tumores do seio endodérmico [7]. Os tumores dos cordões sexuais-estroma (7% dos tumores malignos do ovário) têm origem em células especializadas na produção de hormonas esteroides, estando assim frequentemente associados a manifestações endócrinas. São, no entanto, raramente malignos, habitualmente diagnosticados nos estádios iniciais e entre os seus subtipos mais comuns estão os tumores da granulosa, os tecomas, os fibromas e os tumores de Sertoli-Leydig [7, 11].

Os tumores epiteliais, compostos por um ou vários tipos de epitélio e uma quantidade variável de estroma [12], constituem a grande maioria dos tumores malignos do ovário (90%) [2, 7]. Os subtipos histológicos do cancro epitelial do ovário mais frequentes são os tumores serosos (50-60%), mucinosos (10-15%), endometrióides (10-15%) e os tumores das células claras (2-5%) [12].

A maioria dos tumores epiteliais surgem de uma transformação metaplásica do epitélio do ovário, derivado de tecido celómico, para epitélio do tipo mülleriano [9]. Esta transformação serve, por sua vez, de base à classificação histológica dos tumores serosos, mucinosos e endometrióides, consoante as suas células se assemelhem às do epitélio de revestimento das trompas de Falópio, do epitélio endocervical e do endométrio, respetivamente [9, 12] (Figura 2). Estes três subtipos ocorrem frequentemente em mulheres que já se encontram na sexta década de vida. Aproximadamente metade dos tumores mucinosos são diagnosticados em estádios iniciais e alguns podem ainda assemelharem-se ao epitélio do intestino [7]. O estudo de Cheng *et al.* [13], em ratinhos, sugere que a expressão de alguns genes *HOX* pode influenciar a iniciação tumoral destes subtipos histológicos. *Hoxa9*, *Hoxa10* e *Hoxa11* regulam a segmentação do trato reprodutor adulto, mas estão silenciados no tecido epitelial do ovário sendo que, quando anormalmente expressos, podem induzir uma transformação epitelial aberrante. Neste estudo, as células epiteliais que expressavam *Hoxa9* desenvolveram tumores papilares semelhantes aos tumores serosos, as que reativaram *Hoxa11* originaram tumores mucinosos e as que expressaram *Hoxa10* formaram tumores endometrióides. Contudo, o mecanismo precursor que leva às alterações genéticas/epigenéticas não é conhecido à data [13, 14]. Os tumores das células claras apresentam características histopatológicas semelhantes às do carcinoma de células renais (Figura 2), estando frequentemente associados às síndromes endócrinas e hipercalcemia [12]. São raramente benignos e diagnosticados na quinta década de vida da mulher [7].

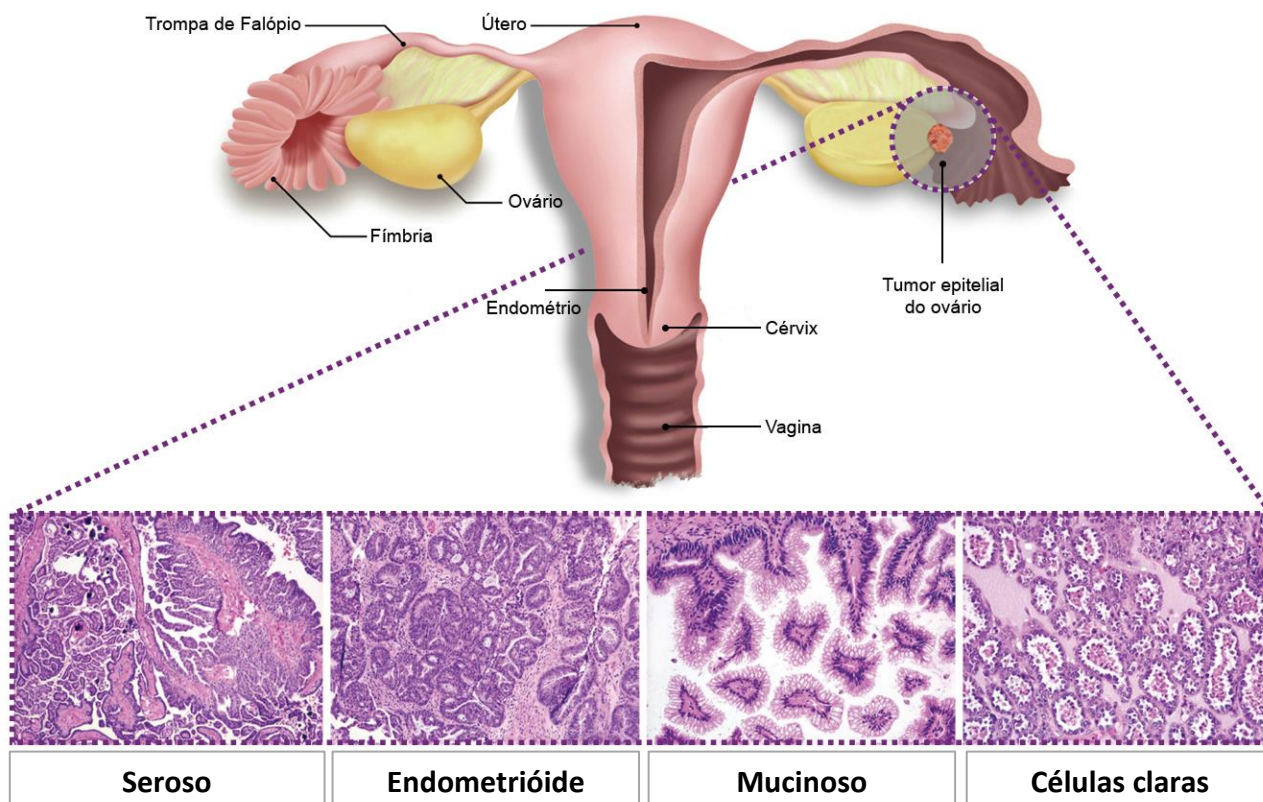


Figura 2 - Subtipos histológicos mais frequentes do tumor epitelial do ovário (Adaptado de [15]).

Os tumores *borderline* apresentam características histopatológicas e comportamento biológico intermédio entre os tumores benignos e malignos [12, 16]. Este grupo foi classificado pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) em 1971 como tumores de baixo potencial de malignidade e, dois anos mais tarde, foi aceite pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como tumores *borderline* [16]. Estes tumores, comparados com os benignos, apresentam um maior grau de proliferação celular epitelial com existência de atipia nuclear. Não apresentam invasão destrutiva do estroma, sendo esta a característica que os diferencia dos tumores malignos [2, 8, 16, 17]. Representam cerca de 10 a 20% dos tumores epiteliais do ovário e os seus subtipos mais comuns são o seroso e o mucinoso (53-65% e 32-42%, respetivamente) [17]. Na sua grande maioria comportam-se como tumores benignos, sendo que apenas 10-15% mostram capacidade de invadir e metastizar [12, 16]. São mais frequentes em mulheres mais jovens, com idade média no diagnóstico de 45 anos, quando comparados com os tumores epiteliais malignos [12]. O prognóstico é bom, atingindo uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 86-100% [16].

Os tumores epiteliais são também classificados de acordo com o seu grau de diferenciação celular, relativamente ao tecido normal do ovário: tumores bem diferenciados (G1); pouco diferenciados (G3); moderadamente diferenciados (G2), que apresentam características entre G1 e G3 [12].

Os avanços na biologia molecular objetivam uma melhor percepção de que o CO inclui um grupo de neoplasias com eventos moleculares e comportamentos biológicos distintos. O modelo proposto por Kurman e Shih [18] classifica os tumores epiteliais em 2 entidades distintas, designados tipo I e tipo II. Os tumores do tipo I são os menos comuns, apresentam mutações somáticas em *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* e *β-catenina*, mas não têm instabilidade cromossômica. Provêm essencialmente de tumores *borderline* e evoluem de forma lenta para carcinomas serosos de baixo grau (G1), endometrióides, de células claras, mucinoso e transicionais. Por serem detetados nos seus estádios iniciais, são menos letais. Por outro lado, os tumores do tipo II caracterizam-se por uma elevada frequência de mutações somáticas no gene *TP53* e por apresentarem instabilidade cromossômica. São principalmente representados pelos carcinomas serosos de alto grau histológico (G2 e G3), sendo mais agressivos e metastizam rapidamente, pelo que na sua maioria são detetados já em estádios avançados [18, 19].

1.3. Etiologia e fatores de risco do CO

A etiologia do CO, de origem epitelial, é ainda pouco compreendida, sendo que as principais hipóteses sobre as etapas que antecedem o seu aparecimento baseiam-se em observações epidemiológicas. No início dos anos 70, Fathalla e o seu grupo de trabalho sugeriram que a ovulação incessante causa microtraumas recorrentes no epitélio do ovário e que, na renovação celular para a sua reparação, ocorrem alterações genéticas que conduzem à transformação maligna [20]. Alguns anos mais tarde, foi apontado que a formação de quistos de inclusão que permanecem quiescentes no estroma ovárico mas que, sob estimulação excessiva de androgénios, estrogénios e gonadotrofinas pituitárias (*Follicle Stimulating Hormone* (FSH) e *Luteinizing Hormone* (LH)), podem levar à transformação maligna [21]. Contudo, os mecanismos moleculares subjacentes no desenvolvimento do CO nestas duas hipóteses permanecem ainda por esclarecer [22].

Estas hipóteses são suportadas pelo estudo de fatores de risco, observando-se que o risco de CO diminui com a redução do número de ciclos ovulatórios [15, 23] como a gravidez (redução de risco de 26%) [24], a amamentação (redução de 30%) [25] e o uso de contraceptivos orais [26]. No caso destes últimos, o risco de CO é reduzido em 50% com o uso de contraceptivos orais por mais de 10 anos, além do que existem evidências de que quanto mais cedo a mulher iniciar a contraceção oral,

menor será o risco de desenvolver CO [26]. Por outro lado, a menarca precoce, a menopausa tardia e a nuliparidade contam com mais episódios de ovulação, pelo que são sugeridos como fatores de risco para CO [12].

O hipergonadotrofismo, também observado na menopausa, em tratamentos de infertilidade (RR=3,63, IC95%: 1,36-9,72, $p=0,001$) [27] e em mulheres com síndrome do ovário policístico, assumem-se como fatores de risco para o CO [22, 28]. O síndrome do ovário policístico afeta 5-8% das mulheres em idade fértil e é a causa mais comum de infertilidade e hiperandrogenismo, tendo as mulheres o dobro do risco de desenvolver CO [29, 30]. Um estudo demonstrou que o aumento de circulação de androgénios endógenos tem um risco acrescido para os tumores do tipo I ($OR_{\log 2}=1,99$, IC95%: 1,18-3,35, $p_{trend}=0,010$) [31]. A obesidade, associada ou não ao síndrome do ovário policístico, também parece representar um papel no aumento do risco de CO [30, 32]. Um estudo meta-analítico [33] reportou que mulheres com IMC superior a 28,4 Kg/m² apresentam um risco significativo de desenvolver CO (RR=1,07, IC99%: 0,99-1,16, $p<0,001$) e que este aumenta a cada 5 Kg/m² que acresçam, com risco acrescido para os carcinomas endometrióide (8%) e mucinoso (12%), e para os tumores *borderline* serosos (29%) [33, 34]. O tecido adiposo é a principal fonte de estrogénio endógeno nas mulheres pós-menopausa, e são responsáveis pela produção de fatores de crescimento que promovem o crescimento tumoral, através da angiogénese [34]. Uma meta-análise [35] de 52 estudos demonstrou que a terapêutica hormonal de substituição (THS), quer com estrogénios isolados ou associados a progestagénios, aumenta o risco de CO dos subtipos histológicos seroso (RR=1,53, IC95%: 1,40-1,66, $p<0,001$) e endometrióide (RR=1,42, IC95%: 1,20-1,67, $p<0,001$), sobretudo se mantida por um período superior a 5 anos, mas o risco diminui com a cessação da terapia [35]. Já os resultados do estudo da *Women's Health Initiative* (WHI) [36], revelaram um risco absoluto de 42 casos em cada 100 mil mulheres associado ao uso da THS combinada, mais que 15 casos em cada 100 mil mulheres em relação ao grupo que não realizou esta terapia hormonal.

A inflamação, que se observa em microambientes de constante regeneração celular e que poderá favorecer os danos genéticos, tem sido sugerido como um fator que predispõe para CO. A própria ovulação induz uma resposta inflamatória, desde a rutura do epitélio do ovário até a sua reparação [28, 37], e as células epiteliais do ovário estão constantemente expostas a várias moléculas pró-inflamatórias presentes na cavidade peritoneal [38]. Esta hipótese foi também baseada no aumento da incidência do CO em condições inflamatórias, como a endometriose (risco 69% superior para CO endometrióide e 13,5% superior para CO de células claras) [39, 40] e doença inflamatória pélvica ($OR=1,36$, IC95%: 0,91-2,02, $p_{trend}=0,007$) [41]. Adicionalmente, a histerectomia e a laqueação das

trompas diminuem o risco de CO possivelmente devido a redução da exposição do ovário a moléculas pró-inflamatórias [37-39].

Segundo alguns autores, a maior parte dos tumores do ovário são tumores originários de outras regiões pélvicas, envolvendo secundariamente os ovários [19]. O estudo das trompas de Falópio em mulheres submetidas a uma salpingooforectomia profilática, por risco genético, demonstrou a presença de células neoplásicas na porção terminal das fímbrias, mas não nos ovários [42, 43]. No momento da ovulação, quando as fímbrias entram em contacto com o ovário para receber o óvulo, as células neoplásicas presentes nas suas extremidades podem ser transferidas para a área do epitélio do ovário lesada pela ovulação. Estas células podem formar quistos de inclusão, com posterior transformação maligna [19], e constituírem assim a lesão precursora dos carcinomas serosos, cujas células se assemelham ao epitélio de revestimento das trompas de Falópio [19, 42]. Por outro lado, a análise molecular dos subtipos histológicos endometrióide e de células claras evidenciou anomalias genéticas semelhantes (*KRAS* e *PTEN*) àquelas encontradas na endometriose, podendo esta ser a lesão pré-maligna destes 2 subtipos [38]. No entanto, os mecanismos pelos quais estas duas patologias se associam continuam por elucidar. Este novo paradigma leva a crer que os tumores dos cordões sexuais-estroma e das células germinativas são os únicos tumores primários do ovário enquanto os tumores epiteliais são, na sua grande maioria, tumores secundários. Isto implicará mudanças nas estratégias de diagnóstico e de prevenção para o CO, como por exemplo, a substituição da ooforectomia profilática pela salpingectomia profilática, preservando-se assim a função ovárica da mulher [44].

Embora a maior parte dos casos de CO sejam de natureza esporádica, parece existir uma componente hereditária de risco em aproximadamente 10% das pacientes [23]. As mulheres com mutações germinais em *BRCA1* e *BRCA2*, genes associados ao síndrome HBOC (*Hereditary Breast and Ovary Cancer*) têm, respetivamente, um risco 39-46% e 12-20% superior de vir a desenvolver CO, quando comparadas com mulheres que não herdaram estas alterações genéticas. Os subtipos histológicos seroso e endometrióide são os mais comumente associados a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* [45]. As mulheres com síndrome de Lynch (cancro hereditário não polipóide do cólon), com mutações em genes de reparação de erros de DNA [23, 45-47] têm um risco 12-15% superior de desenvolver CO [47].

Em mulheres com suspeita de risco genético é recomendado o aconselhamento genético, para análise da história familiar completa, adequada avaliação do risco individual e da necessidade do estudo genético para eventual genotipagem das variantes genéticas [48, 49]. O uso de contraceptivos orais parece reduzir o risco em 36,0% em mulheres portadoras de mutações *BRCA1* e *BRCA2* [50]. A

laqueação das trompas na população em geral e em mulheres portadoras de mutações *BRCA1*, está associada a uma redução de risco de 34,0% e 57,0%, respectivamente [32]. Em situações de risco elevado é recomendada a cirurgia (ooforectomia) profilática [48], não existindo, no entanto, um consenso em relação a idade em que devem realizá-la. Um estudo prospetivo [51] realizado durante 16 anos, sugere que as mulheres com mutações no gene *BRCA1* vêm o seu risco reduzido em 80,0% caso realizem a cirurgia até os 35 anos. Se adiada a cirurgia até aos 40 ou 50 anos, o seu risco aumenta em 4,0% e 14,2%, respectivamente. Por outro lado, as mulheres com mutações no gene *BRCA2* podem retardar esta cirurgia até aos 40 anos, uma vez que não leva a um aumento do risco. Este estudo demonstrou uma redução de 77,0% na mortalidade global com a realização da ooforectomia [51].

1.4. Diagnóstico de CO

O diagnóstico precoce do CO revela-se difícil, dada a ausência de sinais e sintomas específicos nos estádios iniciais. Mais de três quartos dos casos são diagnosticados em estádios avançados (III-IV) [52] sendo a resposta ao tratamento nesta fase da patologia insatisfatória, estando associada a uma taxa de sobrevivência global aos 5 anos muito baixa (18,6-46,7%) [53]. Por outro lado, a deteção em estádios iniciais (I-II) está associada a um bom prognóstico, especialmente se os doentes forem tratados por uma equipa médica com treino em Ginecologia Oncológica [54] em que a taxa de sobrevivência global aos 5 anos atinge os 71,4-89,6% [53]. Considerando-se o difícil diagnóstico e o mau prognóstico para os casos avançados, nos últimos anos tem crescido o interesse na procura de novos biomarcadores e métodos de diagnóstico precoce e de rastreio para esta neoplasia, na tentativa de melhorar a taxa de sobrevivência. A validade destes testes de diagnóstico é baseada de acordo com a sua finalidade, sendo avaliados pelo seus índices de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo (VPP, VPN), e razões de verosimilhança positiva e negativa (LH+, LH-), comparando os resultados com o teste de referência (*gold-standard*). A sensibilidade e a especificidade definem a proporção de doentes e indivíduos que não têm a doença, que apresentam um resultado positivo (verdadeiros positivos) ou negativo (verdadeiros negativos) num teste, respectivamente. O valor preditivo consiste na probabilidade da presença da doença quando o teste é positivo (VPP) ou da ausência de doença quando o teste é negativo (VPN). A razão de verosimilhança é a razão entre a probabilidade de um determinado resultado do teste em doentes e a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos que não têm a doença [55].

Nos estádios iniciais de CO, os sinais e sintomas são raros e quando presentes, são comuns a patologias do trato urinário e gastrointestinal, como dor e distensão abdominal, urgência/ frequência miccional e desconforto pélvico [46, 56]. A falta de sintomatologia específica nos estádios iniciais pode-se dever a localização anatômica dos ovários, tendo o tumor espaço para progredir de forma assintomática [15]. O exame pélvico apresenta uma baixa capacidade em identificar massa anexiais, sobretudo em mulheres com índice de massa corporal (IMC) superior a 30kg/m² [57]. Estima-se que apenas 1 em cada 10 mil mulheres assintomáticas, é detetado uma massa anexial durante um exame pélvico de rotina [56]. Não obstante, ao longo dos últimos anos temos vindo a observar um considerável número de estudos para a deteção precoce do CO baseada em sinais e sintomas [58-67].

A revisão sistemática de Bankhead *et al.* [61] demonstrou que pelo menos 93% das mulheres com CO apresentaram algum tipo de sintomatologia antes do diagnóstico, independentemente do estágio. Nos estádios iniciais, apesar de uma grande proporção de mulheres assintomáticas, os sintomas do foro ginecológico e a presença de massa pélvica são os mais frequentemente relatados. Nos estádios avançados, prevalecem os sintomas gastrointestinais, a fadiga, a distensão abdominal e alterações do peso corporal. Quando comparados os relatos de mulheres com tumores *borderline* e CO, a dor pélvica (66 vs. 71%, $p<0,050$) e as alterações intestinais (35 vs. 47%, $p<0,010$) são mais comuns na neoplasia maligna.

No estudo de Lurie *et al.* [66] em que se relacionou a sintomatologia com o tipo histológico e estágio do tumor, os sintomas intestinais, a distensão abdominal e as metrorragias são relatados com maior frequência por mulheres com tumor seroso (47%), mucinoso (60%) e endometrióide (19%), respetivamente. Nos estádios iniciais de CO seroso, os sintomas têm uma duração significativamente mais longa (16,2 vs. 7,3 meses, $p=0,004$), comparativamente aos estádios avançados. No CO mucinoso verifica-se o inverso (6,1 vs. 20,6 meses, $p=0,009$).

Goff *et al.* [64] desenvolveu um índice diagnóstico designado por “*symptom index*” (SI) e que se baseia na frequência e duração dos sintomas: dor pélvica/abdominal, distensão/inchaço abdominal e dificuldade em comer/sensação de saciedade. O SI é considerado positivo se, num período inferior a 1 ano, pelo menos um dos sintomas ocorrer e persistir por mais de 12 dias por mês. Incluindo tumores *borderline*, este índice identificou corretamente 56,7% das mulheres em estádios iniciais e 79,5% em estádios avançados de CO. Em mulheres com idade superior a 50 anos, o SI obteve uma sensibilidade e uma especificidade de 66,7% e 90,0%, respetivamente, e em mulheres mais jovens obteve uma sensibilidade e uma especificidade de 86,7%.

Em mulheres com suspeita clínica de CO, a avaliação deve ser aprofundada com meios complementares de diagnóstico, como sejam exames imagiológicos e o doseamento de marcadores séricos [57, 68]. A ressonância magnética (RM) é o exame imagiológico que apresenta melhor resolução de imagem, mas devido ao seu elevado custo, a ecografia é a primeira técnica de imagem utilizada para a avaliação de massas anexiais [57, 69, 70]. Em geral, a ecografia apresenta uma boa sensibilidade e VPN (73-100%, para ambos) mas, quando usada isoladamente, apresenta uma especificidade (40-73%) e VPP (24-85%) relativamente baixa em relação aos outros exames de imagem (Tabela 1) [68, 71-75].

Tabela 1 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN, dos exames de imagem em estudos selecionados.

Estudo	Exame de imagem	N	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
[68]	Ecografia transvaginal	95	90	73	62	94
[71]	Ecografia transvaginal	99	92	60	24	98
	RM		83	84	42	97
	TEP		58	76	25	93
	Combinação dos três exames		92	85	46	99
[72]	Ecografia transvaginal	93	85	73	85	73
	RM		89	86	98	89
[73]	Ecografia transvaginal	72	100	40	53	100
	RM		97	84	80	97
[74]	Ecografia transvaginal	125	73	59	-	-
	RM	136	100	80	-	-
	TC	23	87	16	-	-
[75]	Ecografia transvaginal	50	90	61	80	78
	TEP/TC		87	100	100	81

RM= ressonância magnética; TC= tomografia computadorizada; TEP= tomografia por emissão de positrões; “-“ não determinado.

1.4.1. Marcadores tumorais

Um marcador tumoral é uma substância biológica que passa a ser produzida ou é produzida em maior quantidade pelas células tumorais ou por outras células do organismo, em resposta à presença e/ou atividade das células tumorais, passível de ser detetado e doseado no tecido tumoral, no sangue periférico ou outros fluidos biológicos [76, 77]. Como tal, assume um papel importante na prática

clínica de um cancro, não só no diagnóstico como na monitorização clínica e terapêutica. Em teoria, para além de apresentar índices elevados de especificidade, sensibilidade, VPP e VPN, um marcador tumoral ideal deverá ser produzido por todos os tumores da mesma linhagem celular, apresentar níveis proporcionais à dimensão do tumor, ter a capacidade de antecipar recidivas e ser avaliado por métodos não invasivos ou pouco invasivos [76].

Entre os vários marcadores tumorais estudados, o CA-125 (*Carbohydrate Antigen 125* ou *Mucin-16*, UniprotKB: Q8WXI7) continua a ser o principal biomarcador para o diagnóstico, prognóstico, resposta à terapia e monitorização de recidivas do CO [78, 79]. Esta glicoproteína de alto peso molecular (>200kD) foi descoberta em 1981 por Robert Bast, após o isolamento e identificação do anticorpo monoclonal OC125 no líquido ascítico de um doente com cistoadenocarcinoma papilar do ovário [80]. Em termos estruturais, é composta por 3 domínios: i) domínio C-terminal intracelular (284 resíduos, com local de clivagem proteolítica); ii) domínio N-terminal extracelular (12 000 resíduos); iii) domínio intermédio (60 unidades repetitivas de 156 resíduos cada, ao qual se associam O- e N-glicanos) (Figura 3) [81-84]. O primeiro ensaio laboratorial desenvolvido para a identificação do CA-125 baseava-se na utilização do anticorpo monoclonal OC125 como anticorpo de captura e deteção [85]. Uma segunda geração de testes utiliza OC125 como anticorpo de deteção e o anticorpo monoclonal M11, com um epítopo distinto de CA-125 (Figura 3), como anticorpo de captura [86], permitindo-lhe uma maior sensibilidade e precisão intra e inter-ensaio [87-90].

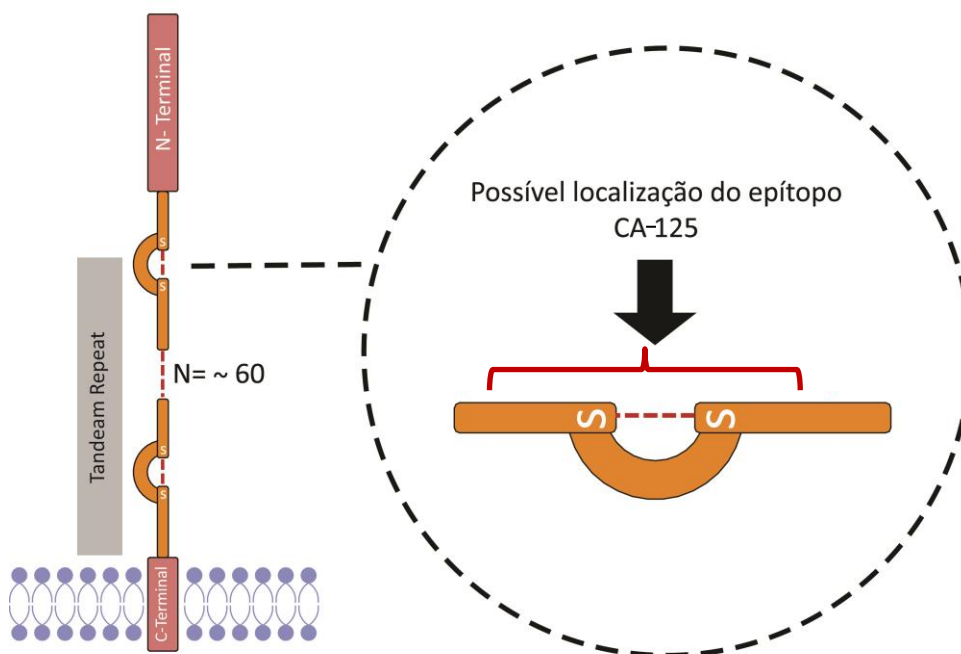


Figura 3 - Estrutura da molécula de CA-125. O modelo mostra os 3 domínios principais e a possível localização do epítopo de CA-125 numa unidade de repetição (Adaptado de [83]).

Embora a sua função fisiológica no organismo humano não seja ainda conhecida, a semelhança estrutural com outras mucinas sugere que exerça uma ação protetiva na superfície das mucosas, ao formar uma barreira lubrificante contra partículas e agentes infecciosos [84]. CA-125 é encontrado no líquido amniótico, no epitélio celômico fetal e seus tecidos derivados (células mesoteliais da pleura, peritoneu e pericárdio), no tecido mülleriano (epitélio das trompas de Falópio, endométrio e endocervical) [91] e nos epitélios da superfície ocular e trato respiratório superior [81]. O CA-125 não é expresso no tecido epitelial da superfície de ovários saudáveis [81, 91].

Baseado na distribuição dos valores de CA-125 em indivíduos saudáveis, de onde apenas 1% tiveram valores acima dos 35 U/mL e 99,8% tiveram valores abaixo dos 65 U/mL, o seu valor de *cut-off* para o diagnóstico clínico de CO foi definido em 35 U/mL [85]. O CA-125 encontra-se elevado em 80% das mulheres com CO, no entanto, a sua sensibilidade depende do tipo histológico e estadiamento do tumor [57, 92, 93]. De acordo com os dados da literatura, a sensibilidade de CA-125 é maior nos estádios avançados que nos estádios iniciais, uma vez que nos estádios avançados encontra-se elevado, em média, em 90% dos CO, variando entre os 84-92%, e nos estádios iniciais, entre os 44-66% [94]. O facto de CA-125 encontrar-se elevado, em média, em apenas 50% das mulheres em estádios iniciais, faz com que a sua utilidade para detetar CO em estádios precoces seja questionável [57, 92, 93]. Para os subtipos histológicos, a sensibilidade é maior para os subtipos seroso (68-94%) e endometrióide (92%) quando comparados com os subtipos mucinoso (52-68%) e células claras (61%) [95].

A especificidade de CA-125 encontra-se comprometida por certas condições ginecológicas benignas (GB) (endometriose, miomas e quistos de ovário) [93, 96, 97], condições não ginecológicas (insuficiência renal, hepática e cardíaca congestiva) [96-98], condições fisiológicas (menstruação e gravidez) [93, 96] e condições não ginecológicas malignas (carcinomas do pâncreas e pulmão) [79, 93, 97, 98], que podem elevar os níveis séricos de CA-125 e resultam em falsos-positivos. A especificidade de CA-125 varia entre os 71-86% quando incluídas mulheres com tumores benignos, caindo para os 62% quando incluídos outras condições malignas [95].

O uso combinado do doseamento sérico de CA-125 e a ecografia melhora a eficácia diagnóstica sendo que, mulheres com níveis alterados de CA-125 e a deteção de uma massa anexial têm um VPP de 78% e um VPN de 97%, com uma sensibilidade e especificidade de 96% e 80%, respetivamente [99], e em apenas mulheres pós-menopausa, têm um VPP, VPN, sensibilidade e especificidade de 89%, 96%, 95% e de 91%, respetivamente [100]. A combinação do SI com o doseamento sérico de CA-125 permite obter uma sensibilidade e uma especificidade de 89% e 84%, respetivamente [101].

Segundo os *guidelines* da *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE), é recomendado o doseamento dos níveis séricos de CA-125 e uma ecografia pélvica como teste de segunda linha, em mulheres que apresentam os seguintes sinais e sintomas de forma frequente ou persistentes, particularmente por mais de 12 dias por mês: perda de apetite; distensão e dor abdominal; micção urgente e frequente; fadiga; distúrbios intestinais e perda de peso [102]. No entanto, o diagnóstico é histológico, com colheita do material por laparotomia, laparoscopia ou imagiologia de intervenção, após estudo imagiológico revelando uma massa anexial suspeita [103].

As limitações evidenciadas para CA-125 têm levado ao estudo de outros biomarcadores que possam complementá-lo ou substituí-lo, e de onde o HE4 (*human epididymis secretor protein 4* ou *WFDC2*, *WAP four-disulfide core domainprotein 2*, UniprotKB: Q14508) tem sido visto como o mais promissor na detecção precoce do CO [104].

O HE4, glicoproteína de baixo peso molecular (13kD) e codificada pelo gene *WFDC2*, foi identificado em 1991 por Kirchof *et al.* no epitélio do epidídimo distal [104, 105]. Em termos estruturais, o HE4 é composto por uma cadeia polipeptídica de 124 resíduos com dois domínios WFDC, sendo cada domínio composto ainda por 50 resíduos, sendo 8 delas de cisteína formando assim 4 ligações de dissulfeto [106]. Tal como CA-125, a sua função fisiológica não é totalmente conhecida, embora a evidência experimental ao nível da proteína sugira uma ação de largo espectro como inibidor de proteases envolvida, por exemplo, na espermatogénese [104-106]. O HE4 é normalmente expresso e secretado pelos tecidos do sistema reprodutivo e pelo epitélio do trato respiratório, sendo que os seus níveis podem ser detetados no soro e em outros fluidos biológicos [107].

A sua aplicação no diagnóstico de CO foi avaliada por Hellström *et al.* [104], que demonstrou um aumento da sua expressão sérica em CO quando comparado com mulheres saudáveis. À data não existe consenso quanto aos valores de *cut-off* a aplicar aos níveis séricos de HE4 para diagnóstico de CO pelo que, mesmo com a utilização dos mesmos métodos de ensaio, o *cut-off* tem variado entre 33,2-150 pmol/L em diferentes estudos [108, 109]. Para além disso, vários autores recomendam a interpretação do HE4 a diferentes *cut-offs*, de acordo com o estado de menopausa [105]. Num intervalo de *cut-off* de 30-150 pmol/L, e com a utilização de diferentes métodos de ensaio, este marcador apresenta uma sensibilidade entre 61-69% em estádios iniciais da doença e de 84-90% em estádios avançados [110]. No entanto, a sua sobreexpressão encontra-se limitada a certos subtipos histológicos [111, 112], principalmente aos subtipos serosos, endometrióide e células claras, não sendo sobreexpresso no subtipo mucinoso [111]. O HE4 apresenta também níveis séricos aumentados em algumas condições fisiológicas (gravidez e pós-menopausa) [105, 113], condições não

ginecológicas (insuficiência renal crónica) e outras condições malignas (cancro do endométrio, pâncreas e pulmão) [98]. Quando incluídos tumores benignos, a sua especificidade encontra-se entre os 90-96% [94].

Embora não haja consenso, a maioria dos estudos refere que a utilização combinada de CA-125 e HE4 aumenta a especificidade e mantém ou aumenta a sensibilidade para o diagnóstico de CO [92, 107, 114, 115]. No entanto, a revisão sistemática em Ferraro *et al.* [108] sugere que sejam desenvolvidos mais estudos para avaliar a capacidade do HE4, isoladamente ou combinado, na deteção de estádios precoces de CO e distinção de subtipos histológicos, assim como no contexto da faixa etária pós-menopausa, de maior risco.

1.4.2. Índices de malignidade

Estima-se que, durante a sua vida, 5-10% das mulheres irão ser submetidas a um procedimento cirúrgico por massa anexial suspeita de CO mas destas, apenas 13-21% revelar-se-ão malignas [116]. Desta forma, torna-se de grande importância encontrar um método fiável para diferenciar estas situações, evitando-se cirurgias desnecessárias e reduzindo-se as complicações pós-operatórias e a morbilidade cirúrgica em casos de baixo risco, que devem ter conduta expectante ou conservadora. Por outro lado, nos casos de CO com massas anexiais imagiologicamente não suspeitas e com baixos níveis de CA-125, o seu diagnóstico pode ser atrasado devido a uma menor prioridade de atendimento.

O índice de risco de malignidade (IRM), descrito por Jacobs nos anos 90 [117], é o mais utilizado para a triagem de mulheres com massa anexial [102]. Este índice baseia-se no produto dos valores séricos de CA-125 com o valor atribuído aos achados da ecografia (com o valor máximo (3) a corresponder a presença de pelo menos 2 achados) e estado de menopausa, com o valor de *cut-off* superior a 200 ser indicativo de alto risco de malignidade [117]. O IRM apresenta uma sensibilidade entre 75,0-85,0% e uma especificidade entre os 85,0-89,0%, com VPN e VPP a variar entre os de 93,0-95,0% e 55,0-63,0%, respetivamente [118]. Em 2009, Moore *et al.* [119] propôs o cálculo do algoritmo ROMA (*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*), com base na quantificação dos marcadores CA-125 e HE4 associada ao estado de menopausa. A sensibilidade e especificidade do ROMA encontradas por este autor foram de 76,5% e 74,8% na pré-menopausa e 92,3% e 74,7% na pós-menopausa, respetivamente. Os VPN e VPP foram de 95,0% e 33,8% no grupo pré-menopausa e 92,6% e 74,0% na pós-menopausa, respetivamente [119]. O ROMA revela-se um método mais

fiável que o IRM, pois é reprodutível entre laboratórios e não precisa de dados ecográficos que são utilizador-dependentes [119], apresentando, no geral, uma melhor sensibilidade, porém uma menor especificidade (Tabela 2) [120-124].

Tabela 2 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do IRM e ROMA, em estudos seleccionados.

Estudo	Índice de malignidade	N	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
[120]	IRM	457*	84,6	75,0‡	59,7	89,3
	ROMA		94,3	75,0‡	62,3	93,6
[121]	IRM	374*	76,0	92,4	87,0	85,2
	ROMA		84,7	76,8	71,0	88,2
[122]	IRM	1061	94,4†/96,0	81,5/75,0‡	-	-
	ROMA		94,4†/94,8	76,5/75,0‡	-	-
[123]	IRM	128*	80,6	65,6	72,0	75,5
	ROMA		91,0	42,6	63,5	81,3
	IRM	111	88,0	65,6	67,7	87,0
	ROMA		94,0	42,6	57,3	89,7
[124]	IRM	103	75,5	75,0‡	-	-
	ROMA		78,9	75,0‡	-	-

* incluem tumores *borderline* no grupo CO; † sensibilidade fixada em 94,4%; ‡ especificidade fixada em 75,0%; “-“ não determinado.

No entanto, a meta-análise de Li *et al.* [125] sugere que sejam realizados mais estudos para avaliar a utilidade do algoritmo de ROMA na diferenciação de massas anexiais benignas de malignas, principalmente em estádios precoces do CO, e um ajuste dos valores de *cut-off* para a população estudada, permitindo assim uma melhor estratificação de risco, da diferenciação de cuidados necessária (Ginecologia Geral ou Ginecologia Oncológica) e da programação de tempos cirúrgicos.

1.5. Rastreamento do CO

A baixa prevalência e incidência do CO na população em geral têm dificultado a obtenção de métodos de rastreamento com resultados satisfatórios. Para que se obtenha um VPP mínima de 10% e assim se reduzam o número de exames e cirurgias desnecessárias, os programas de rastreamento devem apresentar sensibilidade e especificidade superiores a 75,0% e 99,6%, respectivamente [46, 126]. No sentido de se atingirem estes índices, há uma tendência para que os estudos incluam não só exames de imagem, mas também marcadores tumorais, de entre os utilizados para diagnóstico [126].

Nos Estados Unidos da América decorreu um estudo prospetivo (PLCO; *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian*) [127] com cerca de 78 mil mulheres pós-menopausa, divididas em 2 grupos: um grupo de rastreamento, seguido por ecografia transvaginal anual, durante 4 anos, e doseamento anual de CA-125, durante 6 anos; um grupo de controlo, não rastreado e seguido com os cuidados de saúde habituais, durante o período de estudo [127, 128]. O VPP do CA-125 e da ecografia transvaginal foram de 3,7% e 1,0%, respectivamente, mas de 23,5% quando usadas em conjunto [127]. No entanto, em comparação com os cuidados habituais, o rastreamento simultâneo com CA-125 e ecografia transvaginal, não houve diferença na deteção do número de carcinomas avançados (77,0% no grupo rastreamento, 78,0% no grupo controlo) ou a mortalidade por CO (118 vs. 100 óbitos). Observou-se ainda um número mais elevado de falsos-positivos no grupo de rastreamento (1080 vs. 176 mulheres), que levaram a cirurgias desnecessárias e, em alguns casos (15,0%), a complicações médicas associadas [128].

No Reino Unido está a decorrer um estudo prospetivo (UKCTOCS; *United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening*) [129] que envolve cerca de 200 mil mulheres pós-menopausa, seguidas por ecografia transvaginal isolada ou doseamento de CA-125, interpretado por um algoritmo multifásico, ROCA (*Risk of Ovarian Cancer Algorithm*) (as mulheres com alterações do CA-125 são referenciadas para uma ecografia transvaginal). Resultados preliminares demonstram uma sensibilidade, especificidade e VPP mais elevados para o rastreamento algorítmico (89,4%, 99,8% e 43,3%, respectivamente) quando comparado com a ecografia transvaginal isolada (84,9%, 98,2% e 5,3%, respectivamente) [129]. Até este momento, o estudo demonstrou uma redução na mortalidade de 15,0% e 11,0% com o rastreamento algorítmico e ecografia transvaginal isolada, respectivamente, em relação ao grupo controlo, mas sem diferença estatística ($p=0,100$ e $p=0,210$, respectivamente). Segundo estes autores, estes resultados preliminares não demonstram evidência que o rastreamento algorítmico reduz a mortalidade por CO, no entanto, em 2018 serão publicados os resultados finais relativos ao impacto do rastreamento na mortalidade [130].

Para as mulheres com alto risco para o CO, existem orientações que recomendam a realização de uma ecografia transvaginal e doseamento do marcador CA-125, semestralmente, a partir dos 30 a 35 anos, ou, 5 a 10 anos mais cedo do primeiro caso positivo na família [131]. Os benefícios dos estudos prospectivos de rastreios, na população em geral, não são superiores aos riscos inerentes ao próprio rastreio, uma vez que não aumentam a detecção precoce de CO nem reduzem a mortalidade pela neoplasia e, como tal, a sua implementação na rotina clínica não é considerada à data [132]. Enquanto se aguarda a divulgação de resultados dos estudos em curso, é necessário continuar a apostar na crescente compreensão da etiologia de CO e dos seus subtipos, no aperfeiçoamento da ecografia, no desenvolvimento de novos algoritmos de interpretação de CA-125 e na descoberta de novos biomarcadores, que possam ser úteis quando isolados ou combinados com o CA-125, como por exemplo o HE4 [133].

1.6. Tratamento e monitorização do CO

O tratamento do CO depende de vários fatores clínico-patológicos, sendo realizado em 1ª linha, quando possível, por cirurgia, e ao mesmo tempo é realizado o estadiamento (Tabela 3), sendo este um dos fatores mais importantes no prognóstico do CO (Figura 4), e a partir do qual é definido o plano terapêutico pós-operatório [12, 52]. As mulheres que queiram preservar a fertilidade, podem optar por uma cirurgia conservadora, contudo, estes casos são raros e excepcionais, sendo possível apenas em mulheres que possuem tumores nos estádios Ia com G1/G2 ou Ic com G1 unilateral e ausência de história de cancro hereditário do ovário. Esta cirurgia, no entanto, é pouco aconselhável, uma vez que apresenta um risco maior de recidiva, requerendo sempre uma vigilância clínica apertada [12, 52]. O CO quando detetado em fases precoces, a aplicação de quimioterapia irá depender do grau (G1-G3), estágio e do tipo histológico do tumor [52, 134]. Nos estádios avançados, deve ser privilegiada a cirurgia citoredutora, para remoção de todos os possíveis tumores presentes na cavidade peritoneal. Por vezes, é necessário recorrer a uma ressecção cirúrgica radical para obter uma taxa de redução tumoral ótima. Contudo, esta cirurgia leva a uma alta morbilidade aliada a uma pior qualidade de vida. A máxima citoredução confere uma melhor resposta quimioterapêutica e por isso, deve ser realizada por uma equipa com treino em ginecologia oncológica, de modo a que todas as lesões residuais macroscopicamente visíveis sejam removidas [103]. Além disso, apresenta grande impacto tanto na sobrevivência global como na sobrevivência sem progressão tumoral [135]. Em casos seleccionados, o tratamento inicial para os estádios avançados, após o diagnóstico histológico, pode ser a quimioterapia neoadjuvante [52, 134].

Tabela 3 - Estadiamento FIGO para o CO e tumores *borderline* [53].

Estádio I Tumor limitado aos ovários
<p>Ia Tumor limitado a um ovário; ausência de ascite com células malignas; ausência de tumor na superfície ovárica; cápsula intacta</p> <p>Ib Tumor limitado a ambos os ovários; ausência de ascite com células malignas; ausência de tumor na superfície ovárica; cápsula intacta</p> <p>Ic Tumor nos estádios Ia ou Ib mas com tumor na superfície ovárica de um ou ambos os ovários e/ou com cápsula rota e/ou com ascite com células malignas ou no lavado peritoneal</p>
Estádio II O tumor envolve um ou ambos os ovários com extensão pélvica
<p>IIa Extensão e/ou metástases no útero e/ou trompa</p> <p>IIb Extensão a outras estruturas pélvicas</p> <p>IIc Extensão e/ou metástases no útero e/ou trompa ou a outras estruturas pélvicas com tumor na superfície de um ou ambos os ovários; ou com cápsula rota; ou com ascite com células malignas ou no lavado peritoneal</p>
Estádio III O tumor envolve um ou ambos os ovários com metástases peritoneais confirmadas fora da pélvis e/ou metástases ganglionares. Metástases superficiais no fígado. Tumor limitado à pélvis com metástases no intestino delgado ou omento.
<p>IIIa Metástases peritoneais microscópicas fora da pélvis e gânglios negativos para células malignas</p> <p>IIIb Metástases peritoneais macroscópicas fora da pélvis ≤ 2 cm de maior dimensão e gânglios negativos</p> <p>IIIc Metástases peritoneais macroscópicas fora da pélvis > 2 cm de maior dimensão e/ou metástases nos gânglios regionais</p>
Estádio IV Metástases à distância (excluindo metastização peritoneal)

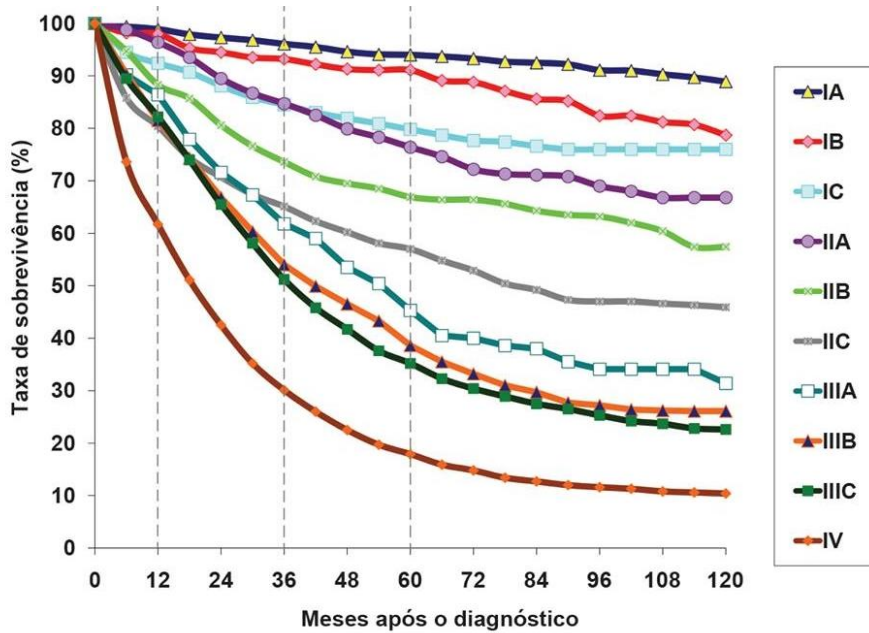


Figura 4 - Taxa de sobrevivência (%) de mulheres com CO e idade ≥ 20 anos, em meses após o diagnóstico, por estágio FIGO (Adaptado de [136]).

A quimioterapia nos estádios avançados de CO, é baseada em taxanos e platinos [52, 134, 135] sendo os fármacos Paclitaxel e Carboplatina o duplete padrão utilizado [52, 78]. Infelizmente, o tratamento primário nem sempre leva à remissão completa da neoplasia, uma vez que 50-95% das mulheres têm recidiva nos primeiros dois anos após o diagnóstico [137].

O protocolo terapêutico para as recidivas é complexo, pode incluir cirurgia recidiva e quimioterapia, sendo o plano quimioterapêutico baseado na sensibilidade aos platinos (se a recidiva surge num período inferior (resistente) ou igual ou superior a 6 meses (sensível), após conclusão do primeiro plano quimioterapêutico) [52]. Contudo, até aos dias de hoje, as recidivas de CO são consideradas incuráveis, uma vez que 95% das mulheres que respondem completamente ao segundo tratamento, têm uma segunda recidiva de CO num curto espaço de tempo [56]. Na maioria das vezes, recorre-se a uma cirurgia para amenizar os sintomas e prevenir complicações, para permitir uma melhor qualidade de vida e prolongar a sobrevida [52, 56].

Para a monitorização da eficiência terapêutica, prognóstico e detecção de recidivas, são utilizados os níveis séricos de CA-125. A persistência de níveis elevados após 3 ciclos de quimioterapia ou meia vida de CA-125 superior a 20 dias são indicativos de mau prognóstico e resposta ineficaz ao tratamento [77, 82, 138]. No entanto, valores normais de CA-125 durante o tratamento não

representam ausência de doença residual [82, 138], uma vez que esta situação ocorre em 50% das pacientes [82]. Em 70% das mulheres com remissão completa, a elevação dos níveis de CA-125 consegue predizer recidivas entre 3 a 5 meses antes de qualquer evidência clínica [77, 82]. A sensibilidade e especificidade de CA-125 na detecção de recidivas encontra-se entre os 62-94% e 91-100%, respectivamente [139]. O HE4 pode acrescentar utilidade clínica na monitorização da resposta terapêutica e detecção precoce de recidivas já que, em 85% das mulheres com CO, os seus níveis estão correlacionados com a resposta tumoral e em 92% quando avaliado juntamente com o CA-125 [140]. A sua sensibilidade e especificidade na detecção de recidivas é de 74 e 100% [141], respectivamente, com predição entre 5 a 8 meses antes de qualquer evidência clínica, em 63% das mulheres [142].

2. Objetivos do estudo

Com a realização do presente estudo, pretendeu-se avaliar a utilidade clínica dos marcadores CA-125 e HE4, isoladamente ou em conjunto, no diagnóstico de CO, de acordo com o estado menopausa das pacientes e no diagnóstico diferencial com outras condições ginecológicas. Para o efeito, seguiu-se o desenho de um estudo caso-controlo, com a constituição de grupos amostrais bem caracterizados do ponto de vista clínico e hematológico/bioquímico, e nos quais foram determinados os níveis séricos de CA-125 e HE4. Os parâmetros foram comparados entre os vários grupos amostrais e determinados os respetivos índices de especificidade, sensibilidade, valores preditivos, razões de verosimilhança e precisão. Avaliou-se igualmente a utilidade do algoritmo ROMA, em prever o risco de malignidade de uma massa pélvica e assim distinguir CO de condições ginecológicas benignas (GB).

A avaliação do HE4 e do algoritmo ROMA, numa amostra independente e não estudada até a data, podem acrescentar evidência quanto à utilidade deste marcador e algoritmo no diagnóstico clínico e deteção precoce de CO, ou distinção das condições benignas e *borderline* de CO, com o intuito de auxiliar a prática clínica, priorizar os casos para intervenção cirúrgica e reduzir a mortalidade pela doença, com eventual ajuste aos valores de *cut-off* de HE4 e do algoritmo ROMA, para a população estudada.

3. Material e Métodos

3.1. Seleção e recrutamento de participantes

A seleção e recrutamento de pacientes (46) teve lugar no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Dr. Nélio Mendonça, SESARAM, E.P.E., entre pacientes com massa anexial suspeita de CO, detetada imagiologicamente (Ecografia, TC ou RM) ou clinicamente. Na sequência do procedimento cirúrgico e diagnóstico histológico do material examinado no Laboratório de Anatomia Patológica do mesmo hospital, as pacientes foram classificadas em CO (12), GB (31) e *borderline* (3). A classificação histológica foi realizada segundo a OMS [8] e o estadiamento dos tumores *borderline* e CO segundo os critérios da FIGO [53]. Foram adotados como critérios de exclusão as seguintes condições: ooforectomia bilateral, gravidez, história individual de cancro, insuficiência hepática, renal ou cardíaca congestiva. O grupo controlo inclui 30 mulheres aparentemente saudáveis, provenientes do Gabinete de Investigação do Hospital Dr. Nélio Mendonça, SESARAM, E.P.E.. O recrutamento de participantes teve lugar entre outubro de 2013 e agosto de 2015. O estudo foi

aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Dr. Nélio Mendonça, SESARAM, E.P.E. sob o parecer nº 33/2013. Após uma breve descrição do âmbito do estudo e disponibilização do Documento de Informação ao Sujeito da Investigação (Anexo A), foram prestados todos os esclarecimentos que entenderem pertinentes e todas as participantes assinaram o consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

Foram consideradas como pós-menopausa todas as mulheres que não tinham a menstruação há 1 ano e aquelas com idade acima dos 55 anos, se a data da sua última menstruação era desconhecida [119]. As mulheres com idade inferior a 48 anos e sem conhecimento da data da sua última menstruação, foram classificadas como pré-menopausa [119]. Nas participantes com idades compreendidas entre os 48-55 anos que desconheciam a data da última menstruação [119], foram doseados os níveis de FSH e estradiol. Foram classificadas como pós-menopausa as participantes em que os níveis de FSH se mostraram superiores a 40mIU/mL e estradiol inferiores a 20-30 pg/mL, sendo as restantes consideradas como pré-menopausa [143]. As mulheres na menacma foram avaliadas fora do período menstrual.

3.2. Amostragem e análise laboratorial

A colheita de amostras de sangue foi realizada por punção venosa com sistema de vácuo, por profissionais de saúde devidamente qualificados do Laboratório de Patologia Clínica e do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Dr. Nélio Mendonça, SESARAM, E.P.E., de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Para cada participante foram colhidos um tubo de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 3mL (vacuette® K3EDTA, Áustria, REF: 454086) e um tubo seco 5mL (vacuette® Z Serum Sep Clot Activator, Áustria, REF: 456018), aos quais foi atribuído um código, para fácil identificação e de forma a garantir o anonimato durante a análise laboratorial. Para uma adequada retração do coágulo, o tubo seco permaneceu 30 minutos à temperatura ambiente e foi então centrifugado a 4200 rpm durante 8 minutos. No dia da colheita, para cada participante, foram determinados o hemograma e o perfil bioquímico (proteínas totais, albumina, bilirrubina total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, creatinina e ureia), nos analisadores LH 780 e AU 5400 (Beckman Coulter), respetivamente. O doseamento de FSH foi realizado no analisador *UniCel™Dxl* (Beckman Coulter) e o estradiol no cobas e411 (Roche). O restante soro foi separado em alíquotas e armazenado a -20°C até ao processamento dos marcadores tumorais, em média, 4 a 5 meses após a colheita.

Os marcadores tumorais HE4 e CA-125 foram quantificados no analisador Cobas e411 (Roche), pelo princípio de electroquimioluminescência (ECLIA; *ElectroChemiLuminescence ImmunoAssay*) (Figura 5), com os *kits* comerciais HE4 (Roche *Diagnostics, Indianapolis*, Ref: 05950929 190) e CA 125 II (Roche *Diagnostics, Indianapolis*, Ref: 11776223 322). Os *kits* comerciais foram oferecidos pela Roche.

O HE4 CalSet (Roche *Diagnostics, Indianapolis*, Ref: 05950945 190) e CA 125 II CalSet (Roche *Diagnostics, Indianapolis*, Ref: 11776240 322) foram utilizados para obter as curvas de calibração do HE4 e CA-125, respetivamente. Como controlos de qualidade internos utilizaram-se o *Elecsys® PreciControl HE4* (Nível 1 e 2) (Roche) e *Lyphochek® Tumor Marker Plus Control* (Nível 1 e 2) (BioRad), respetivamente para HE4 e CA-125. Os intervalos de medição foram de 15,0-1500 pmol/L para HE4 e de 0,600-5000 U/mL para CA-125. Todas as análises foram realizadas e validadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, SESARAM, E.P.E., em conformidade com as instruções do fabricante.

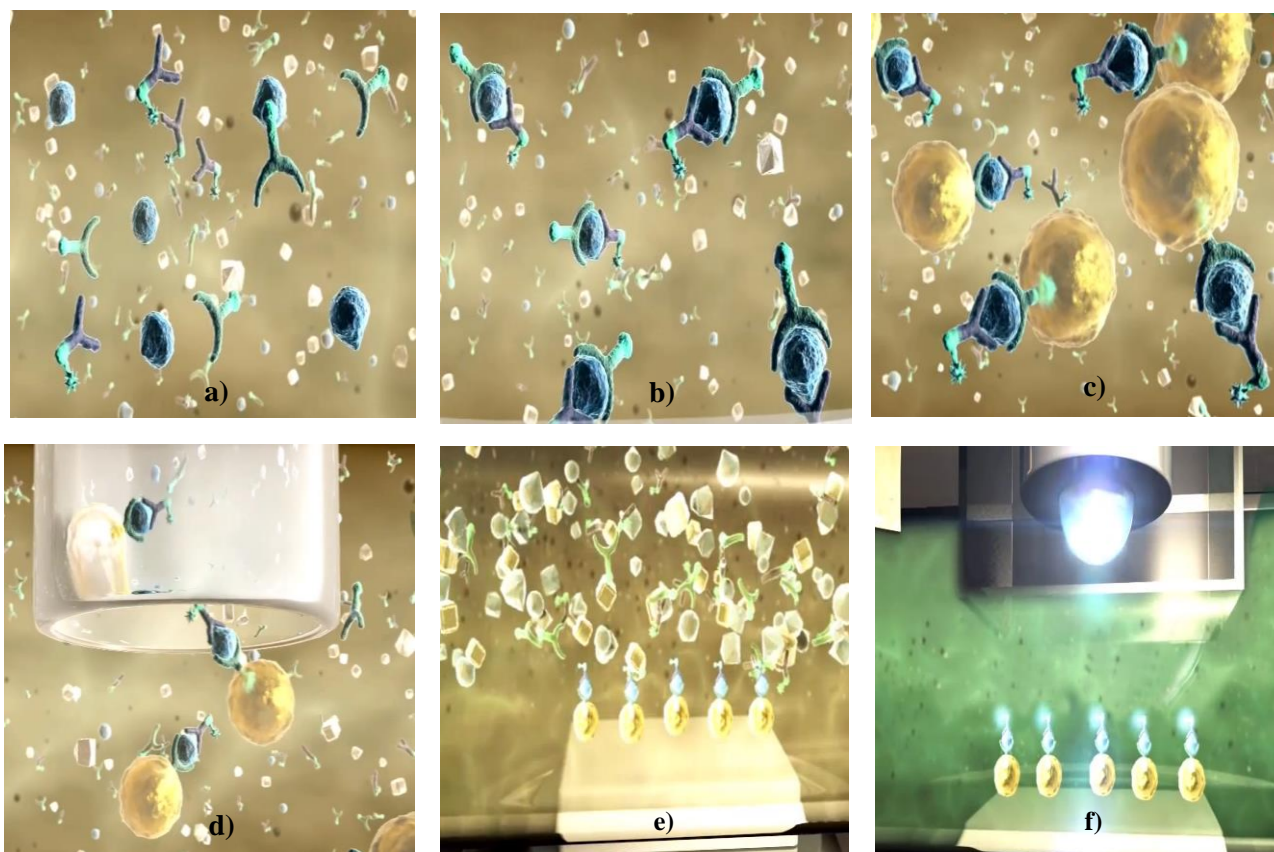


Figura 5 - Representação esquemática do princípio ECLIA e procedimento experimental para quantificação de HE4 e CA-125 [144].

a) Incubação da amostra com o anticorpo de detecção (anticorpo monoclonal específico anti-HE4/CA125,biotinilado) e anticorpo de captura (anticorpo monoclonal específico anti-HE4/CA125, marcado com complexo $\text{Tris}(2,2\text{'-bipiridil})\text{ruténio(II)}(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})$); b) Formação do complexo *sandwich*; c) Adição e ligação de micropartículas revestidas de estreptavidina ao anticorpo de detecção; d) Aspiração da mistura de ligação para a célula de leitura; e) Fixação magnética das micropartículas à superfície do eléctrodo; f) Remoção dos elementos não-ligantes e aplicação de corrente eléctrica para indução da emissão quimioluminescente, a ser medida pelo fotomultiplicador.

O algoritmo ROMA foi determinado conforme descrito por Moore *et al.* [119], tomando-se em consideração o estado menopausa e os níveis séricos de HE4 e CA-125 (Figura 6).

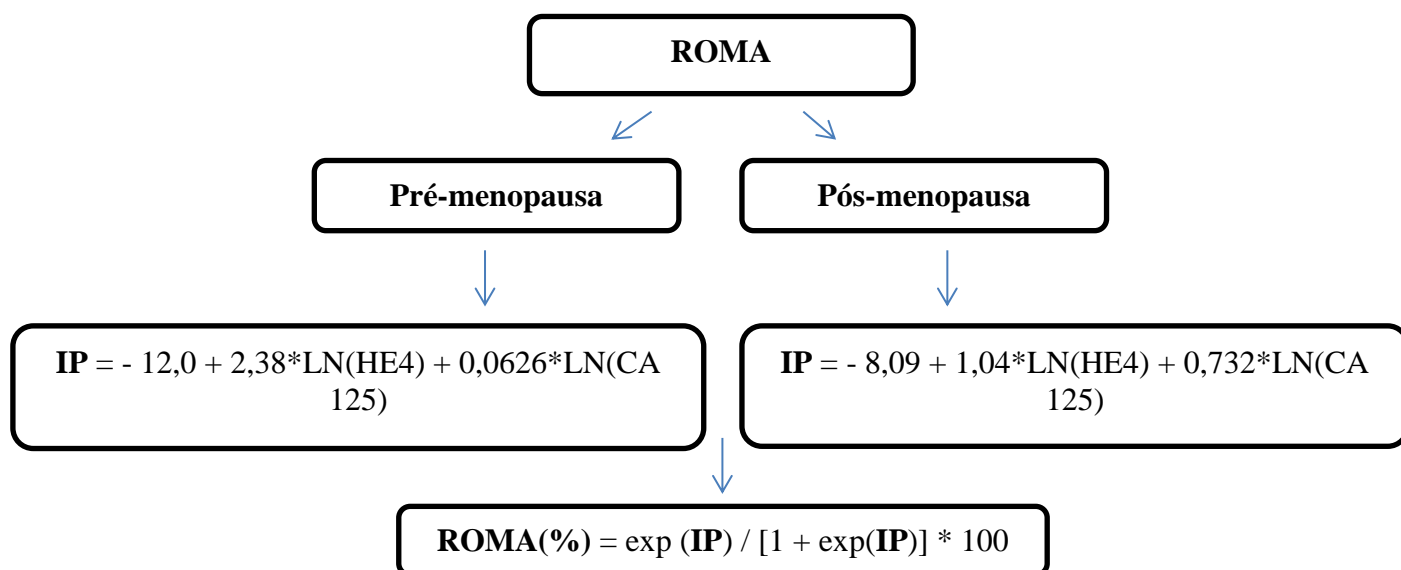


Figura 6 - Determinação do algoritmo ROMA.

exp = exponencial; IP = Índice Preditivo; LN = Logaritmo Natural; HE4 = valor do HE4 em pmol/L; CA-125 = valor do CA-125 em U/mL.

3.3. Recolha e análise dos resultados

No âmbito do presente estudo, foi concedida autorização pela referida Comissão de Ética para acesso à base de dados do Laboratório de Patologia Clínica e da Anatomia Patológica e recolha de resultados das variáveis em estudo (Anexo C). Seguiram-se normas e procedimentos restritos de confidencialidade, segurança, controlo de qualidade e cumprimento das considerações éticas.

Para a caracterização de cada grupo amostral, foram determinadas a frequência de participantes em pré- e pós-menopausa e a média e o desvio-padrão das variáveis contínuas em análise, nomeadamente a idade e os parâmetros hematológicos e bioquímicos. A comparação da proporção de mulheres pré- e pós-menopausa em cada grupo amostral, como variável discreta, foi determinada pelo teste qui-quadrado. Tendo-se observado diferenças estatisticamente significativas na proporção do estado de menopausa entre CO e os restantes grupos, a análise que se segue foi feita separadamente para pré- e pós-menopausa.

Para as variáveis contínuas, determinou-se a normalidade das distribuições com o teste *Shapiro-Wilk*. Uma vez que se obtiveram distribuição normal para algumas variáveis e distribuição não normal para outras (provavelmente pelo baixo tamanho amostral em CO; dados não apresentados), aplicou-se estatística paramétrica e não paramétrica a todas as variáveis e verificou-se a sua concordância do ponto de vista estatístico. Os resultados foram concordantes para todas as variáveis, com exceção para a idade e creatinina, e por apresentar uma distribuição normal aplicou-se o teste ANOVA (n x n grupos) e *t-student* (2 x 2 grupos), respetivamente, e as restantes variáveis optou-se pela aplicação dos testes não paramétricos *Kruskall-Wallis* (n x n grupos) e *Mann-Whitney* (2 x 2 grupos), por serem mais conservadores*. Para as comparações múltiplas das mesmas variáveis entre os grupos amostrais controlos, GB e CO foi utilizado o *Kruskall-Wallis 1-way ANOVA*.

A caracterização dos grupos amostrais com condições ginecológicas, em particular GB, *borderline* e CO, teve por base a sua classificação histológico [8] e, no caso dos tumores *borderline* e malignos, o estadiamento FIGO [53]. Os níveis séricos de marcadores tumorais CA-125 e HE4 (média \pm desvio-padrão) foram determinados para os principais subtipos, estádios iniciais (I-II) e estádios avançados (III-IV) e comparados entre grupos pela aplicação do teste *Mann-Whitney*.

Para análise dos marcadores tumorais CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, estes foram considerados positivos quando acima dos valores de *cut-off* sugeridos pelos *kits* comerciais (Roche) e pelos resultados do presente estudo. Na avaliação da combinação dos marcadores tumorais, a combinação CA-125 ou HE4 foi considerado positivo se pelo menos um marcador foi positivo, e negativo quando ambos os marcadores foram negativos. Na combinação CA-125 + HE4, foi considerado positivo quando ambos os marcadores foram positivos, e negativo quando pelo menos um marcador foi negativo. Os valores de *cut-off* referenciados pelo fabricante foram de 35 U/mL para o CA-125, 92,1pmol/L/121pmol/L para o HE4 e 11,4%/29,9% para o ROMA, de acordo com o percentil 95 dos marcadores tumorais e especificidade de 75% para o algoritmo ROMA. Para o marcador HE4 e algoritmo ROMA, são também referidos diferentes valores de *cut-off* de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa). Neste estudo, os valores de *cut-off* de HE4 foram estimadas a um percentil 93,33% da distribuição dos seus níveis em controlos saudáveis do presente estudo, tanto para pré- (59,3 pmol/L) e pós-menopausa (94,7 pmol/L), dado a impossibilidade de obter a partir de um percentil 95, devido ao número limitado de amostras por estado de menopausa. Devido à não existência de um valor *cut-off standard* e da falta de consenso na literatura sobre os valores de *cut-off* de HE4, optou-se por estudar apenas os valores sugeridos pelo *kit* comercial e aqueles que foram estimadas no presente estudo. Os valores de *cut-off* de CA-125 estimadas a um

* Comunicação pessoal por Abreu A. (Faculdade de Ciências Exatas e da Engenharia. Universidade da Madeira), em 17 de fevereiro de 2016.

percentil 95 da distribuição dos seus níveis em controlos saudáveis do presente estudo (34,5 U/mL), foram idênticos ao do *kit* comercial. Para o algoritmo ROMA, os valores de *cut-off* foram definidos a uma especificidade de 75% estimada a partir das amostras em estudo, uma vez que a sensibilidade mínima reportada para o algoritmo ROMA que é clinicamente útil, é aquela em que 75% das mulheres com tumores benignos são corretamente classificadas como de baixo risco de malignidade [119, 145]. Para o algoritmo ROMA foram ainda considerados os valores de *cut-off* que foram estabelecidos por Moore *et al.* (pré-menopausa 13,1%; pós-menopausa 27,7%) [119]. A frequência (%) de tumores do ovário acima do *cut-off* dos marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA entre os grupos de estudo, foi realizada através do teste qui-quadrado.

Para cada marcador tumoral e algoritmo ROMA, abaixo designados por diagnóstico bioquímico, foram calculados os índices de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e razões de verosimilhança, positivo e negativo, em identificar casos de CO. Para o efeito, foram consideradas tabelas de contingência de duas entradas, tomando como teste de referência (*gold-standard*) a análise histológica do tumor (Tabela 4). A sensibilidade foi calculada pela razão entre o número de mulheres diagnosticadas com CO pelo diagnóstico bioquímico e o número de mulheres com diagnóstico histológico positivo. O cálculo da especificidade foi realizado pela razão entre o número de mulheres com o diagnóstico bioquímico negativo e o número de mulheres com diagnóstico histológico negativo. O VPP resulta da razão entre o número de mulheres com diagnóstico histológico positivo e o número de mulheres com diagnóstico bioquímico positivo. Por sua vez, o VPN foi calculado pela razão entre o número de mulheres com o diagnóstico histológico negativo e o número de mulheres com o diagnóstico bioquímico negativo. A LH+ foi determinada como a razão da proporção de mulheres com o diagnóstico bioquímico positivo em relação as mulheres com diagnóstico histológico positivo (sensibilidade), e a proporção de mulheres com diagnóstico bioquímico positivo relativamente as que tiveram o diagnóstico histológico negativo. A LH- resulta da razão entre a proporção de mulheres com diagnóstico bioquímico negativo em relação as mulheres com o diagnóstico histológico positivo, e a proporção de mulheres com diagnóstico histológico e bioquímico negativos (especificidade) (Tabela 4). O poder de diagnóstico de CO pelos marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA foi avaliado pela análise ROC (*Receiver Operating Characteristics*), com representação gráfica da sensibilidade vs. especificidade (95%IC), em que a precisão é dada pelo índice AUC (*Area Under Curve*). Para a análise ROC-AUC dos marcadores tumorais combinados (CA-125 ou HE4), foi aplicada previamente a regressão logística.

Tabela 4 – Índices que avaliam um teste de diagnóstico a partir de uma tabela 2x2 [55].

		Doença (<i>gold-standard</i>)		
		Presente	Ausente	
Teste de diagnóstico	+	Verdadeiro-positivo a	Falso-positivo b	VPP= $a/(a+b)$
	-	Falso-negativo c	Verdadeiro-negativo d	VPN= $d/(c+d)$
		Sensibilidade= $a/(a+c)$		Especificidade= $d/(b+d)$
$LH + = \frac{\frac{a}{a+c}}{\frac{b}{b+d}} \qquad LH - = \frac{\frac{c}{a+c}}{\frac{d}{b+d}}$				

A análise estatística foi realizada com os softwares *SPSS (Statistical Package for Social Sciences)* for Windows (release 16,0, Chicago, USA), *R* (<http://cran.r-project.org/>) e MedCalc versão 16.2.1 (<https://www.medcalc.org/>) e interpretada a um nível de significância de $p < 0,050$.

4. Resultados

4.1. Caracterização dos grupos amostrais

As 76 amostras recrutadas foram classificadas como 12 CO, 3 *borderline*, 31 GB e 30 controlos. De entre as amostras GB, uma amostra foi excluída da análise por apresentar insuficiência renal (creatinina= 3,1 mg/dL; ureia= 185,0 mg/dL). As características clínicas e laboratoriais dos grupos amostrais, encontram-se descritas na Tabela Suplementar A. Considerando o baixo número de amostras com tumores *borderline* (n=3), este grupo não foi considerado para a análise comparativa.

Não se observaram diferenças estatísticas significativas quanto a média de idades entre os grupos ($p=0,050$) ($49,6 \pm 12,2$ em controlos, $49,0 \pm 14,8$ em GB e $59,8 \pm 11,2$ em CO). No entanto, o estado de menopausa revelou-se significativamente diferente ($p=0,015$) (pós-menopausa em 50,0% dos controlos, 43,3% das mulheres com GB e 91,7% das mulheres com CO) (Tabela 5). Este resultado está de acordo com a literatura [2], que sugere que uma massa anexial em mulheres pós-menopausa tem uma maior probabilidade de ser CO, pelo que a análise que se segue foi feita separadamente para pré- e pós-menopausa.

Quanto à análise das variáveis laboratoriais, as suas médias encontram-se dentro dos intervalos de referência para a população portuguesa [146, 147], com exceção dos neutrófilos ($7,3 \pm 2,9$) e marcadores tumorais CA-125 ($443,6 \pm 476,2$) e HE4 ($509,5 \pm 640,1$) em mulheres pós-menopausa com CO, e CA-125 ($47,2 \pm 44,3$) em mulheres pré-menopausa com GB (Tabela 5). De entre as comparações múltiplas entre grupos amostrais pós-menopausa (Tabela 5), destacam-se as que se revelaram estatisticamente significativas: as médias das contagens de leucócitos e de neutrófilos em GB ($8,7 \pm 2,1$ e $5,8 \pm 2,0$, respetivamente) e CO ($9,8 \pm 2,8$ e $7,3 \pm 2,9$, respetivamente) são significativamente mais altas (GB $p=0,005$ e $p=0,001$, respetivamente; CO $p=0,001$ e $p<0,001$, respetivamente) e o VGM significativamente mais baixo (GB $88,6 \pm 3,7$, $p=0,002$; CO $88,0 \pm 4,7$, $p=0,004$), quando comparadas com as médias em controlos (sendo que a contagem de neutrófilos em CO é o dobro da média dos controlos); a média da contagem de eritrócitos ($4,6 \pm 0,4$) e o CHGM ($33,1 \pm 0,4$) em GB são significativamente mais altas ($p=0,030$ e $p=0,016$, respetivamente) e o HGM significativamente mais baixo ($29,3 \pm 1,2$, $p=0,026$), quando comparados com os mesmos índices em controlos; a média da contagem de plaquetas ($308,4 \pm 107,3$) e monócitos ($0,7 \pm 0,3$) em CO são significativamente mais altas ($p=0,008$ e $p=0,035$, respetivamente) e as proteínas totais ($60,6 \pm 10,4$) e a concentração média de albumina ($35,0 \pm 5,6$) significativamente mais baixas ($p=0,015$ e $p=0,019$,

respetivamente), quando comparadas com os mesmos índices em controlos; as médias dos níveis séricos dos marcadores tumorais CA-125 ($443,6 \pm 476,2$) e HE4 ($509,5 \pm 640,1$) em CO são significativamente mais altas, em relação aos controlos ($p < 0,001$ e $p = 0,026$, respetivamente) e GB ($p = 0,001$ para ambos).

Nas mulheres pré-menopausa, as médias do hematócrito ($37,8 \pm 0,9$), VGM ($86,0 \pm 6,3$), HGM ($28,1 \pm 2,9$) e da concentração de proteínas totais ($67,0 \pm 8,3$) estão significativamente mais baixas ($p = 0,019$, $p = 0,001$, $p = 0,018$ e $p = 0,031$, respetivamente) e o CA-125 significativamente mais alto ($47,2 \pm 44,3$, $p = 0,002$) em GB, quando comparados com os controlos (Tabela 5).

Tabela 5 - Características clínicas e laboratoriais dos grupos amostrais na pós- e pré-menopausa. Os resultados encontram-se expressos nas suas médias e desvio-padrão.

	Controlos (n=30)	GB (n=30)	Borderline (n=3)	CO (n=12)	P-value* (Kruskal-Wallis)	Comparações múltiplas	P-value* (Kruskal-Wallis 1-way ANOVA)
% menopausa	50,0	43,3	66,7	91,7	0,015[†]	-	-
Idade (anos ± desvio-padrão)	49,6 ± 12,2	49,0 ± 14,8	57,7 ± 8,6	59,8 ± 11,2	0,050 [‡]	-	-
Pós-Menopausa	(n=15)	(n=13)	(n=2)	(n=11)			
Idade (anos ± desvio-padrão)	59,7 ± 6,7	61,4 ± 9,9	61,5 ± 7,8	62,1 ± 8,2	-	-	-
Hemograma (valores de referência)							
Eritrócitos (3,8-5,8 x 10 ⁶ µL)	4,3 ± 0,3	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,7	0,031	Controlos vs. GB	0,030
Hematócrito (37-47 %)	40,6 ± 3,2	40,9 ± 3,8	39,7 ± 1,3	38,7 ± 5,6	0,538	-	-
Hemoglobina (11,5-16 g/dL)	13,2 ± 0,9	13,5 ± 1,3	13,6 ± 0,9	12,8 ± 1,8	0,415	-	-
VGM (80-100 fL)	93,7 ± 2,5	88,6 ± 3,7	89,9 ± 3,4	88,0 ± 4,7	0,001	Controlos vs. GB Controlos vs. CO	0,002 0,004
HGM (> 27 pg)	30,4 ± 0,7	29,3 ± 1,2	30,8 ± 0,3	29,1 ± 2,1	0,015	Controlos vs. GB	0,026
CHGM (30-35 g/dL)	32,5 ± 0,6	33,1 ± 0,4	34,3 ± 1,1	33,1 ± 1,1	0,020	Controlos vs. GB	0,016
Plaquetas (150 - 450 x 10 ³ µL)	207,0 ± 48,3	251,7 ± 64,1	268,5 ± 10,6	308,4 ± 107,3	0,009	Controlos vs. CO	0,008
Leucócitos (4,5-11 x 10 ³ µL)	6,1 ± 1,1	8,7 ± 2,1	7,1 ± 0,4	9,8 ± 2,8	<0,001	Controlos vs. GB Controlos vs. CO	0,005 0,001
Neutrófilos (1,5-7,1 x 10 ³ µL)	3,2 ± 0,8	5,8 ± 2,0	4,6 ± 0,9	7,3 ± 2,9	<0,001	Controlos vs. GB Controlos vs. CO	0,001 <0,001
Linfócitos (1,5-4,0 x 10 ³ µL)	2,2 ± 0,6	2,1 ± 0,7	1,9 ± 0,3	1,62 ± 0,6	0,045	-	-
Monócitos (0,0-1,0 x 10 ³ µL)	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,041	Controlos vs. CO	0,035
Eosinófilos	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,063	-	-

(0,0-0,5 x 10 ³ µL)								
Basófilos (0,0-0,2 x 10 ³ µL)	0,13 ± 0,04	0,02 ± 0,04	0,05 ± 0,07	0,27 ± 0,05	0,666	-	-	
Bioquímica (valores de referência)								
Proteínas Totais (60-80 g/L)	71,5 ± 4,3	64,3 ± 14,4	75,7 ± 3,6	60,6 ± 10,4	0,020	Controlos vs. CO	0,015	
Albumina (35-48 mg/dL)	42,7 ± 1,9	40,7 ± 7,4	43,6 ± 1,7	35,0 ± 5,6	0,002	Controlos vs. CO GB vs. CO	0,019 0,002	
Bilirrubina Total (0,3-1,2 mg/dL)	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,117	-	-	
ALT (14-54 U/L)	18,1 ± 7,7	34,0 ± 37,4	24,4 ± 7,1	24,6 ± 16,9	0,444	-	-	
AST (8-35 U/L)	25,1 ± 6,4	30,2 ± 24,3	22,4 ± 2,4	26,7 ± 14,0	0,728	-	-	
Fosfatase Alcalina (30-120 U/L)	87,4 ± 29,7	64,8 ± 19,9	74,0 ± 15,6	100,8 ± 48,9	0,068	-	-	
Creatinina (0,7-1,2 mg/dL)	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,2	0,279	-	-	
Ureia (8,0-50 mg/dL)	37,3 ± 7,2	35,8 ± 7,6	33,5 ± 2,1	37,1 ± 14,6	0,606	-	-	
CA-125 (< 35 U/mL)	11,0 ± 7,8	23,7 ± 34,1	20,5 ± 4,4	443,6 ± 476,2	<0,001	Controlos vs. CO GB vs. CO	<0,001 0,001	
HE4 (≤ 121 pmol/L)	57,7 ± 15,3	56,9 ± 38,1	56,7 ± 15,4	509,5 ± 640,1	0,002	Controlos vs. CO GB vs. CO	0,026 0,001	
Pré-Menopausa	(n=15)	(n=17)						(Mann-Whitney)
Idade (anos ± desvio-padrão)	39,6 ± 6,9	39,5 ± 10,1	-	-	-	-	-	
Hemograma (valores de referência)								
Eritrócitos (3,8-5,8 x 10 ⁶ µL)	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,5	-	-	0,473	-	-	
Hematócrito (37-47 %)	40,4 ± 1,4	37,8 ± 0,9	-	-	0,019	-	-	
Hemoglobina (11,5-16 g/dL)	13,2 ± 0,6	12,4 ± 1,4	-	-	0,075	-	-	
VGM (80-100 fL)	93,5 ± 4,3	86,0 ± 6,3	-	-	0,001	-	-	
HGM	30,4 ± 1,3	28,1 ± 2,9	-	-	0,018	-	-	

(> 27 pg)							
CHGM (30-35 g/dL)	32,6 \pm 0,6	32,9 \pm 0,9	-	-	0,204	-	-
Plaquetas (150 - 450 $\times 10^3$ μ L)	247,6 \pm 36,6	263,5 \pm 59,3	-	-	0,473	-	-
Leucócitos (4,5-11 $\times 10^3$ μ L)	6,7 \pm 1,3	7,2 \pm 1,9	-	-	0,385	-	-
Neutrófilos (1,5-7,1 $\times 10^3$ μ L)	3,6 \pm 0,9	4,3 \pm 1,4	-	-	0,174	-	-
Linfócitos (1,5-4,0 $\times 10^3$ μ L)	2,4 \pm 0,7	2,2 \pm 0,7	-	-	0,289	-	-
Monócitos (0,0-1,0 $\times 10^3$ μ L)	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	-	-	0,923	-	-
Eosinófilos (0,0-0,5 $\times 10^3$ μ L)	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	-	-	0,515	-	-
Basófilos (0,0-0,2 $\times 10^3$ μ L)	0,03 \pm 0,05	0,01 \pm 0,03	-	-	0,289	-	-
Bioquímica (valores de referência)							
Proteínas Totais (60-80 g/L)	72,9 \pm 3,9	67,0 \pm 8,3	-	-	0,031	-	-
Albumina (35-48 mg/dL)	41,8 \pm 3,8	40,1 \pm 4,7	-	-	0,299	-	-
Bilirrubina Total (0,3-1,2 mg/dL)	0,6 \pm 0,2	0,5 \pm 0,3	-	-	0,416	-	-
ALT (14-54 U/L)	15,3 \pm 5,2	14,7 \pm 4,7	-	-	0,895	-	-
AST (8-35 U/L)	18,5 \pm 4,0	19,6 \pm 4,4	-	-	0,623	-	-
Fosfatase Alcalina (30-120 U/L)	62,5 \pm 17,8	56,4 \pm 19,9	-	-	0,461	-	-
Creatinina (0,7-1,2 mg/dL)	0,9 \pm 0,8	0,8 \pm 0,1	-	-	0,053 [§]	-	-
Ureia (8,0-50 mg/dL)	28,4 \pm 6,9	25,7 \pm 7,5	-	-	0,461	-	-
CA-125 (< 35 U/mL)	12,1 \pm 7,7	47,2 \pm 44,3	-	-	0,002	-	-
HE4 ($\leq 92,1$ pmol/L)	43,8 \pm 6,4	54,5 \pm 31,7	-	-	0,955	-	-

*resultados estatisticamente significativos ($p < 0,050$) salientados a negrito; †teste qui-quadrado; ‡teste ANOVA; §teste *t-student*; “-“ não determinado; para as comparações múltiplas são apenas apresentados os resultados significativos; VGM, volume globular médio; HGM, hemoglobina globular média; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase.

4.2. Caracterização das condições ginecológicas (benigno, *borderline* e maligno) e avaliação dos níveis séricos de CA-125 e HE4

Nas amostras em estudo, os tumores benignos mais comumente encontrados foram os cistoadenomas/ cistoadenofibroma/ adenofibroma (60,0%), seguido por endometriomas (16,7%) e quistos funcionais (10,0%). De entre os cistoadenomas/cistoadenofibromas/adenofibromas foram encontrados os subtipos histológicos seroso (88,9%) e mucinoso (11,1%) (Tabela 6).

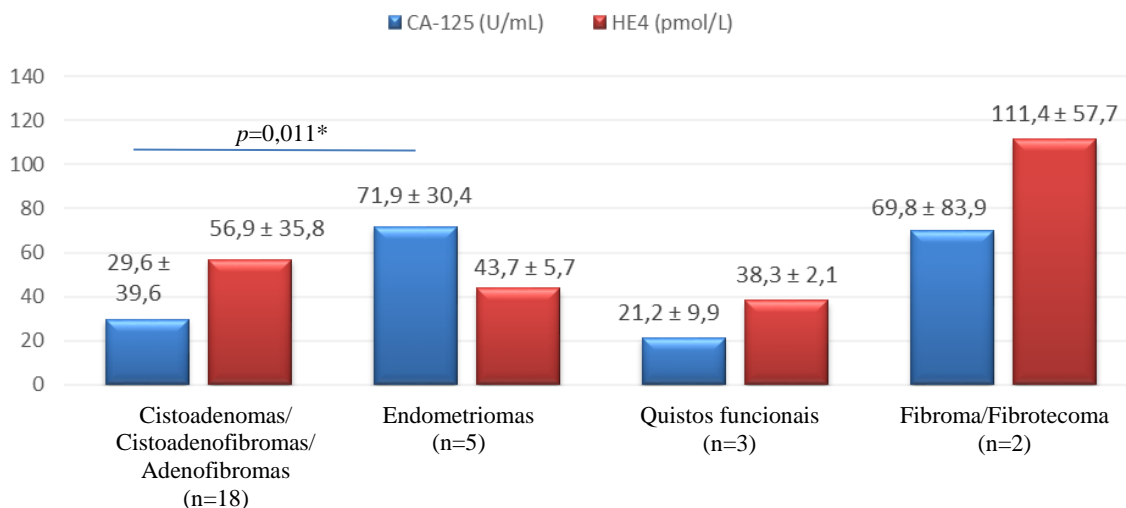
Tabela 6 - Classificação histológica dos tumores benignos.

Tumores benignos	n (%)
Cistoadenomas/Cistoadenofibromas/Adenofibromas	18 (60,0)*
Endometriomas	5 (16,7)
Quistos funcionais	3 (10,0)
Fibromas/Fibrotecoma	2 (6,7)
Teratoma	1 (3,3)
Quistos de inclusão	1 (3,3)
Total	30 (100)

*incluem 16 (88,9%) tumores do subtipo seroso e 2 (11,1%) do subtipo mucinoso.

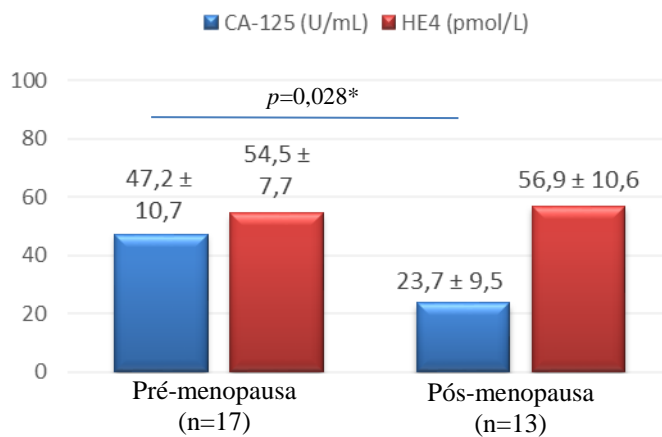
A média dos valores séricos dos marcadores tumorais foram avaliados em mulheres diagnosticadas com tumores benignos, observando-se que o CA-125 encontrava-se mais alto nos endometriomas ($71,9 \pm 30,4$), seguido dos fibromas/fibrotecoma ($69,8 \pm 83,9$), estando mais baixo nos cistoadenomas/ cistoadenofibromas /adenofibromas ($29,6 \pm 39,6$) e quistos funcionais ($21,2 \pm 9,9$). Para HE4, os seus valores séricos médios encontravam-se mais altos nos fibromas/fibrotecoma ($111,4 \pm 57,7$), seguidos dos cistoadenomas/cistoadenofibromas/adenofibromas ($56,9 \pm 35,8$), endometriomas ($43,7 \pm 5,7$) e quistos funcionais ($38,3 \pm 2,1$) (Figura 7A). As mulheres com endometrioma apresentaram níveis séricos médios de CA-125 significativamente mais altos quando comparado com os cistoadenomas/cistoadenofibromas/adenofibromas ($71,9$ U/mL e $29,6$ U/mL, respetivamente; $p=0,011$). Por outro lado, o HE4 apresentou níveis médios mais baixos nos endometriomas, mas sem diferença estatística ($43,7$ pmol/L e $56,9$ pmol/L, respetivamente; $p=0,823$) (Figura 7A). As mulheres na pré-menopausa apresentaram valores séricos médios de CA-125 significativamente mais altos ($47,2 \pm 10,7$) em relação as mulheres na pós-menopausa ($23,7 \pm 9,5$)

($p=0,028$), sendo o dobro em pré-menopausa, com o HE4 a apresentar valores séricos semelhante entre os dois grupos (pré-menopausa média $54,5 \pm 7,7$ e pós-menopausa $56,9 \pm 10,6$, $p=0,851$) (Figura 7B).



* teste Mann-Whitney

Figura 7A - Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio-padrão), em mulheres diagnosticadas com as principais classes de tumores benignos.



* teste Mann-Whitney

Figura 7B - Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio-padrão), em mulheres diagnosticadas com tumores benignos, de acordo com o estado de menopausa.

Entre os tumores malignos, foram classificados cinco carcinomas serosos (41%), dois endometrióides (17%), dois de células claras (17%), duas metástases (17%, com origem em tumores primários no trato gastrointestinal e mama) e um carcinoma indiferenciado (8%) (Tabela 7). Metade dos carcinomas primários encontravam-se em estádios avançados (III-IV), sendo 80% do subtipo histológico seroso. Os três tumores *borderline* encontravam-se nos estádios iniciais, sendo dois do subtipo seroso e um do subtipo mucinoso (Tabela 7).

Tabela 7 - Classificação dos tumores malignos e *borderline*, de acordo com o subtipo histológico e estágio FIGO.

Subtipo histológico (classificação OMS)	n (%)	Estádio FIGO			
		I (a;b;c)	II (a;b;c)	III (a;b;c)	IV
Malignos					
Seroso	5 (41%)	1 (c)	-	2 (b;c)	2
Endometrióide	2 (17%)	2 (c)	-	-	-
Células claras	2 (17%)	1 (c)	-	1 (b/c)	-
Metástases*	2 (17%)	-	-	-	-
Carcinoma indiferenciado	1 (8%)	1 (a)	-	-	-
Borderline					
Seroso	2 (67%)	2(c)	-	-	-
Mucinoso	1 (33%)	1(c)	-	-	-

*Carcinoma metastático de mama; adenocarcinoma metastático de trato gastrointestinal.

Os níveis séricos médios de CA-125 e HE4 também foram avaliados em mulheres diagnosticadas com os diferentes subtipos histológicos de tumores malignos, apresentando-se mais altos no subtipo seroso ($806,0 \pm 504,8$ e $845,2 \pm 827,0$, respetivamente), intermédio em tumores de células claras ($224,3 \pm 30,3$ e $360,7 \pm 361,1$, respetivamente), estando mais baixo no subtipo endometrióide ($70,6 \pm 35,0$ e $46,8 \pm 21,8$, respetivamente) e nas metástases ($22,0 \pm 16,2$ e $43,4 \pm 36,1$, respetivamente) (Figura 8A). Comparando as médias séricas por subtipo histológico, verificou-se um aumento estatisticamente significativo nos tumores do subtipo seroso em relação aos não serosos para o CA-125 (respetivamente $806,0 \pm 225,8$ e $122,0 \pm 99,5$ U/mL, $p=0,004$), ao contrário do HE4 (respetivamente $845,2 \pm 827,0$ e $199,4 \pm 247,2$ pmol/L, $p=0,062$) (Figura 8B). Os níveis séricos dos marcadores tumorais encontravam-se mais elevados nos estádios avançados (III-IV) (CA-125 $768,7 \pm 548,3$ e HE4 $830,0 \pm 842,8$) relativamente aos estádios iniciais (I-II) (CA-125 $200,5 \pm 135,3$, HE4 $277,0 \pm 263,6$), sendo a média três vezes superior à dos estádios avançados, mas sem diferença estatística (CA-125 $p=0,047$ e HE4 $p=0,251$) (Figura 8C).

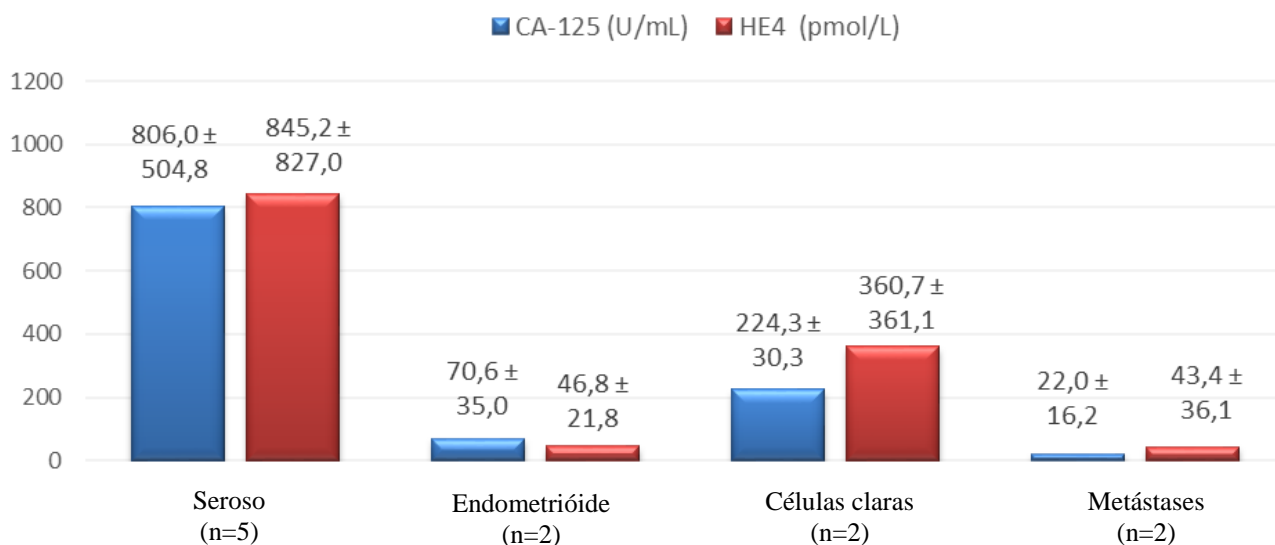
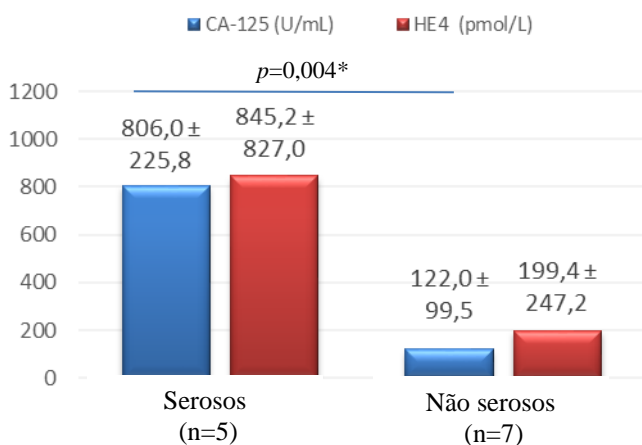


Figura 8A - Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio padrão), em mulheres diagnosticadas com tumores malignos, por subtipo histológico.



* teste Mann-Whitney

Figura 8B – Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio-padrão), em mulheres diagnosticadas com tumores serosos em relação aos não serosos.

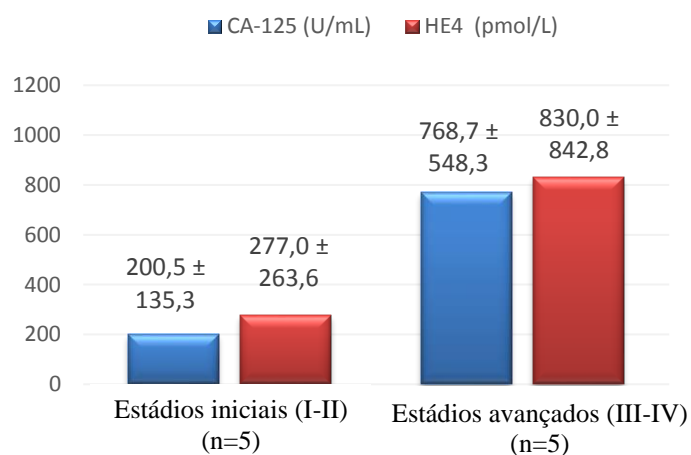


Figura 8C - Valores séricos de CA-125 e HE4 (média e desvio-padrão), em mulheres diagnosticadas com tumores malignos, de acordo com o estágio FIGO.

A frequência tumores do ovário acima dos valores de *cut-off* dos marcadores CA-125 (≥ 35 U/mL) e HE4 (pré-menopausa $>92,1$ pmol/L; pós-menopausa $>121,0$ pmol/L) e algoritmo ROMA (pré-menopausa $\geq 11,4\%$; pós-menopausa $\geq 29,9\%$) referenciados pelos *kits* comerciais, e por tal considerados como positivos, encontram-se descritos na Tabela 8. A percentagem de tumores benignos positivos para CA-125, foi de 33,3% (10/30), em contraste com 10,0% (3/30) de tumores positivos para HE4. A principal diferença entre CA-125 e HE4 reside na elevação dos níveis de CA-125 em 80,0% dos endometriomas, enquanto que todos os 5 endometriomas foram negativos para HE4. Em adição, 27,8% dos cistoadenomas/cistoadenofibromas/adenofibromas foi positivo em CA-125, e apenas 11,1% em HE4. Os resultados do ROMA são iguais aos obtidos para HE4 nos endometriomas (0%), e ao CA-125 em relação aos cistoadenomas/ cistoadenofibromas/ adenofibroma (27,8%). Quando tendo em consideração o estado de menopausa, o CA-125 foi positivo em 41,2% das mulheres pré-menopausa em contraste com os 23,1% nas mulheres pós-menopausa, quase metade do valor da pré-menopausa. O HE4 foi positivo em 11,8% das mulheres pré-menopausa e em 7,7% pós-menopausa, enquanto que o ROMA foi em 23,5% e 23,1%, respetivamente. Em relação aos tumores malignos, todos os carcinomas primários revelaram-se positivos para CA-125 e ROMA (excetuando os carcinomas endometrióides neste último), enquanto que os níveis séricos de HE4 foram considerados positivos em apenas 80% dos carcinomas serosos e 50% das células claras. Os tumores *borderline* e as metástases de tumores malignos com localização extra-ovárica revelaram-se negativos para ambos os marcadores tumorais em estudo e o algoritmo ROMA.

Tabela 8 - Frequência (%) de tumores do ovário acima do valor de *cut-off* para os marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, por subtipo histológico e por estado de menopausa.

	N	CA-125 (U/mL) ≥35*	HE4 (pmol/L) > 92,1/121*	ROMA (%) ≥11,4/29,9*
Benignos				
Cistoadenomas/Cistoadenofibromas/Adenofibromas	18	5 (27,8%)	2 (11,1%)	5 (27,8%)
Endometriomas	5	4 (80,0%)	0 (0%)	0 (0%)
Quistos funcionais	3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Fibroma/Fibrotecoma	2	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2 (100%)
Teratoma	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Quistos de inclusão	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	30	10 (33,3%)	3 (10,0%)	7 (23,3%)
<i>Pré-menopausa</i>	17	7 (41,2%)	2 (11,8%)	4 (23,5%)
<i>Pós-menopausa</i>	13	3 (23,1%)	1 (7,7%)	3 (23,1%)
Borderline				
Seroso	2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Mucinoso	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Pré-menopausa</i>	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Pós-menopausa</i>	2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Malignos				
Seroso	5	5 (100%)	4 (80,0%)	5 (100%)
Endometrióide	2	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Células claras	2	2 (100%)	1 (50,0%)	2 (100%)
Metástases	2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Carcinoma indiferenciado	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Total	12	10 (83,3%)	6 (50,0%)	8 (66,7%)
<i>Pré-menopausa</i>	1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Pós-menopausa</i>	11	10 (90,9%)	6 (54,5%)	8 (72,7%)

* *cut-off* referenciado pelos *Kits* comerciais (Roche), de acordo com o percentil 95 dos marcadores CA-125 e HE4 e especificidade de 75% para o algoritmo ROMA; para o marcador HE4 e algoritmo ROMA são referidos diferentes *cut-offs* de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa).

4.3. Índices de avaliação e curvas ROC dos marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA

A sensibilidade, a especificidade, o VPP e o VPN para o diagnóstico de CO foram determinados para os marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, tendo por base a comparação de testes positivos entre mulheres com GB e mulheres com CO, no seu conjunto e por estado de menopausa, utilizando-se como valores de *cut-off* aqueles referenciados pelos *kits* comerciais (Tabela 9). Considerando o baixo número de amostras com tumores *borderline* (n=3), e uma vez que estes tumores interferem na sensibilidade dos marcadores tumorais e algoritmo ROMA no diagnóstico de CO [123, 148] não foram incluídos no grupo de CO. Para além dos índices referidos acima, encontram-se descritos outros índices de avaliação dos marcadores tumorais e algoritmo ROMA, no conjunto, por estado de menopausa e a diferentes valores de *cut-off*, na Tabela Suplementar B. Uma análise semelhante, em que se incluíram os controlos saudáveis no grupo GB, para comparação com CO, encontra-se descrita na Tabela Suplementar C. Devido ao baixo número de amostras de CO analisadas neste estudo, não foi possível avaliar os índices dos marcadores tumorais entre os subtipos histológicos e de acordo com o estágio FIGO.

A sensibilidade e o VPN de CA-125 isolado (83,3% e 90,9%, respetivamente) e da combinação CA-125 ou HE4 (83,3% e 90,5%, respetivamente) são mais elevados do que HE4 isolado (50,0% e 81,8%, respetivamente), combinação CA-125 + HE4 (50,0% e 82,4%) ou ROMA (66,7% e 85,2%, respetivamente) (Tabela 9). Por outro lado, o HE4 isolado e a combinação CA-125 + HE4 apresentam uma maior especificidade e VPP (HE4 90,0% e 66,7%, respetivamente; HE4 + CA-125 93,3% e 75,0%, respetivamente) do que o algoritmo ROMA (76,7% e 53,3%, respetivamente) e CA-125 isolado (66,7% e 50,0%, respetivamente). Quando tendo em conta apenas o estado pós-menopausa, os índices mantêm-se ou melhoraram para todos os testes, à exceção do VPN, que decresce para HE4 (70,6%), combinação CA-125 + HE4 (70,6%) e ROMA (76,9%), e da especificidade da combinação CA-125 + HE4 (92,3%). Na pré-menopausa, uma vez que existe apenas uma amostra de CO, não foi possível calcular a sensibilidade, o VPP ou o VPN dos marcadores tumorais, isolados ou em conjunto, e do algoritmo ROMA. A especificidade no estado pré-menopausa diminuiu consideravelmente para CA-125 isolado (58,8%) e combinação CA-125 ou HE4 (52,9%), e apenas ligeiramente para HE4 (88,2%) e ROMA (76,5%) (Tabela 9).

Tabela 9 - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, no diagnóstico de cancro do ovário (incluindo apenas mulheres com condições GB e CO).

	CA-125 (U/mL)	HE4 (pmol/L)	CA-125 + HE4	CA-125 ou HE4	ROMA (%)
valores de <i>cut-off</i>	< 35*	≤ 92,1/121*			< 11,4/29,9*
GB vs. CO					
Conjunto					
Sensibilidade (%)	83,3	50,0	50,0	83,3	66,7
Especificidade (%)	66,7	90,0	93,3	63,3	76,7
VPP (%)	50,0	66,7	75,0	47,6	53,3
VPN (%)	90,9	81,8	82,4	90,5	85,2
Pós-Menopausa					
Sensibilidade (%)	90,9	54,6	54,6	90,9	72,7
Especificidade (%)	76,9	92,3	92,3	76,9	76,9
VPP (%)	76,9	85,7	85,7	76,9	72,7
VPN (%)	90,9	70,6	70,6	90,9	76,9
Pré-Menopausa					
Especificidade (%)	58,8	88,2	94,1	52,9	76,5

* *cut-off* referenciado pelos *Kits* comerciais (Roche), de acordo com o percentil 95 dos marcadores CA-125 e HE4 e especificidade de 75% para o algoritmo ROMA; para o marcador HE4 e algoritmo ROMA são referidos diferentes *cut-offs* de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo.

Na comparação entre mulheres com GB e CO (GB vs. CO) a diferentes valores de *cut-off*, a sensibilidade e o VPN de HE4 isolado (58,3% e 83,3%, respetivamente), e da combinação CA-125 + HE4 (58,3% e 84,4%, respetivamente), melhoram ligeiramente se aplicar o *cut-off* ajustado no presente estudo, com o algoritmo ROMA a apresentar uma melhoria considerável na sensibilidade (91,7%) e ligeira no VPP (61,1%) e VPN (95,8%). O mesmo se verifica para estes testes quando tendo em conta apenas o estado pós-menopausa, com também o VPP a melhorar ligeiramente para o HE4 isolado e combinação CA-125 + HE4 (87,5% para ambos). A especificidade no estado pré-menopausa melhora consideravelmente para a combinação CA-125 ou HE4 (88,2%). Os restantes índices mantêm-se ou apresentam melhores resultados com os *cut-offs* referenciados pelos *kits* comerciais. Os índices do algoritmo ROMA mantêm-se quando aplicado os valores de *cut-off* determinados por Moore *et al.* [119] (Tabela Suplementar B). Com o ajuste dos valores de *cut-off* do presente estudo, o algoritmo ROMA apenas deixou de classificar um CO (contra 2 CO não classificados pelo CA-125), classificando 7 tumores benignos como de alto risco de malignidade (contra 10 classificados pelo CA-125). Na pós-menopausa, fez com que todos os CO fossem corretamente classificados pelo ROMA (contra 1 CO não classificado pelo CA-125), classificando 3 tumores benignos como de alto risco (os mesmos classificados pelo CA-125). O HE4 não classificou corretamente 5 CO, classificando 5 tumores benignos como de alto risco. Na pós-menopausa, não classificou corretamente 4 CO, classificando apenas 1 tumor benigno como de alto risco.

Na inclusão dos controlos saudáveis no grupo GB para comparação com CO ((GB + controlos) vs. CO), e na comparação com GB vs. CO, com os valores de *cut-off* referenciados pelos *kits*, a especificidade e o VPN melhoram para todos os testes, observando o mesmo no estado pós-menopausa, e na especificidade na pré-menopausa. O mesmo se observa com os valores ajustados no presente estudo, com exceção na pré-menopausa, na especificidade para a combinação CA-125 ou HE4. Os restantes índices mantêm-se ou diminuem (Tabela Suplementar C).

Foram confeccionadas curvas ROC para os marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, em que a precisão foi calculada pelo AUC. O CA-125 demonstrou uma maior AUC (0,878), seguido do ROMA (0,875) e HE4 (0,786). Quando combinados os marcadores tumorais, a AUC obtida foi de 0,856, um valor mais alto que o HE4 isolado e quase idêntico a do CA-125 isolado e ROMA (Figura 9). No estado pós-menopausa, há um aumento da precisão dos marcadores tumorais e algoritmo ROMA, sendo a AUC mais alta para CA-125 isolado e para a sua combinação com HE4 (0,958 para ambos), seguidos do ROMA (0,937) e HE4 (0,860) (Figura 10).

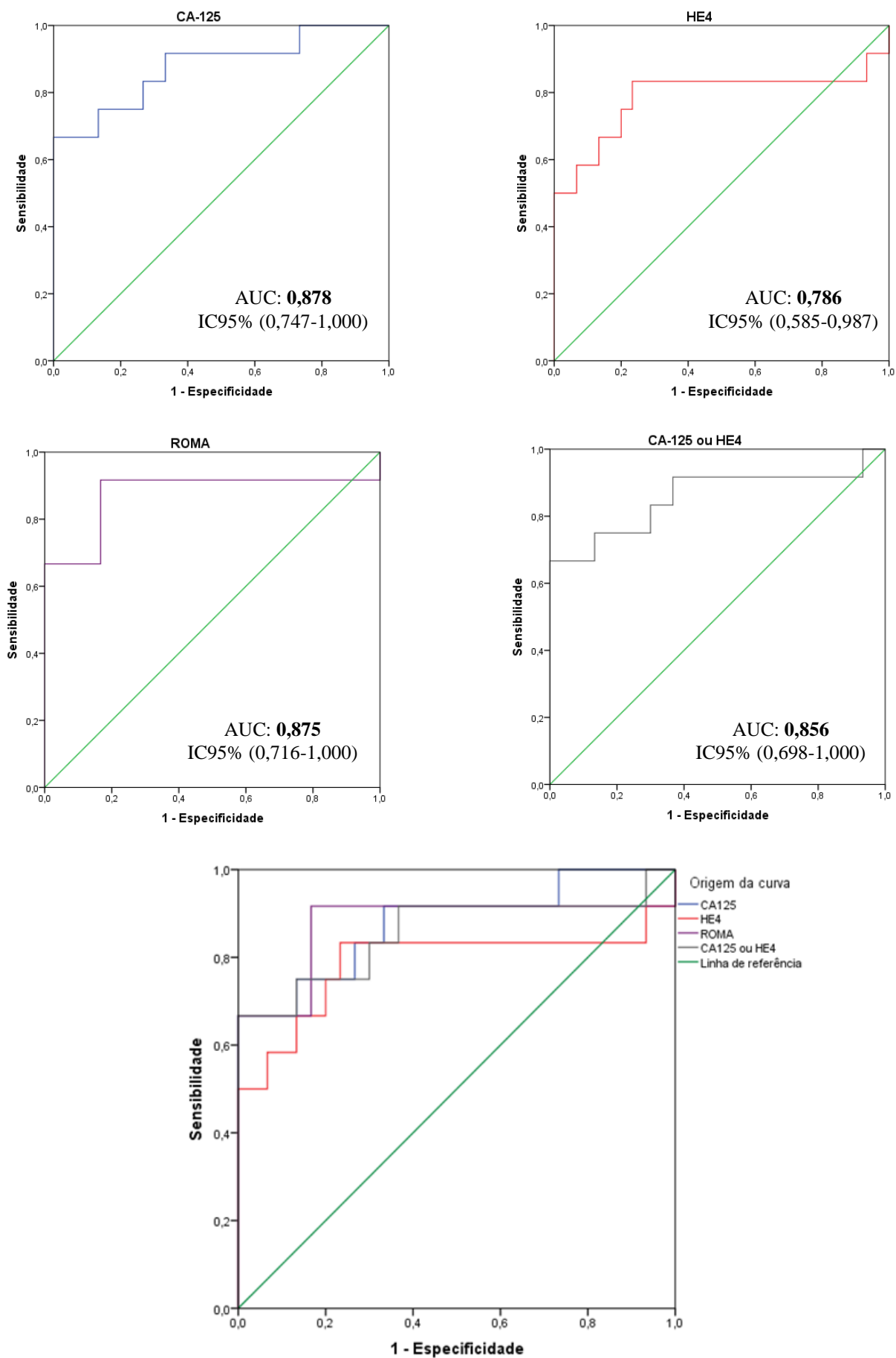


Figura 9 - Curvas ROC e AUC para os marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, no diagnóstico de cancro do ovário em relação as condições ginecológicas benignas.

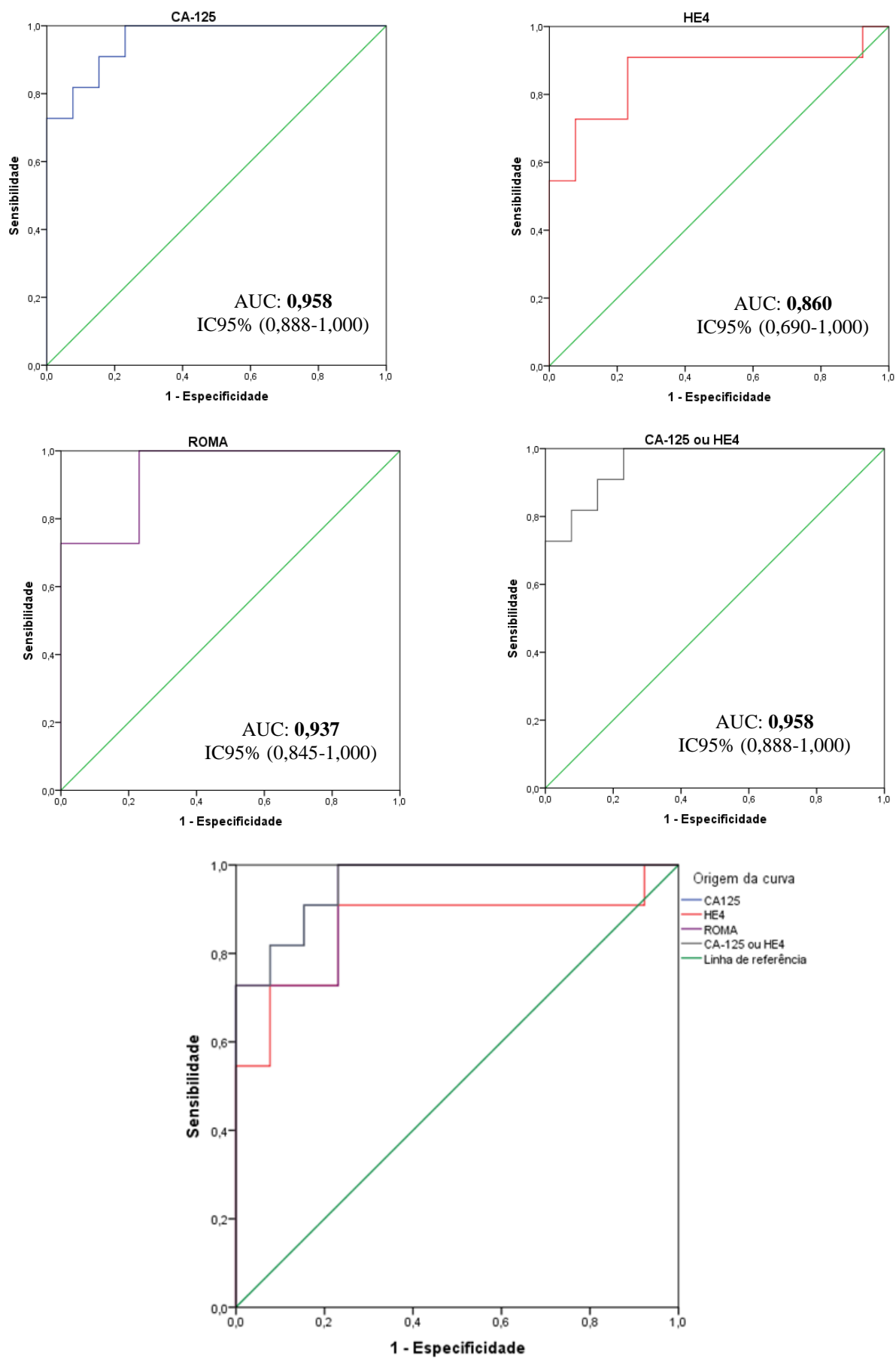


Figura 10 - Curvas ROC e AUC para os marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, no diagnóstico de cancro do ovário em relação as condições ginecológicas benignas, na pós-menopausa.

5. Discussão

Para além de não possuir um programa de rastreio consolidado, ao contrário de outras neoplasias na área ginecológica, o CO possui uma sintomologia rara e pouco específica, levando assim a que a maioria dos casos de CO sejam diagnosticados já em estádios avançados [93, 98]. Apesar de nos últimos anos terem havido avanços no campo da cirurgia citoreductiva e quimioterapia, levaram apenas a uma melhoria modesta na sobrevivência global [149]. A avaliação de uma massa anexial suspeita passa essencialmente por um exame pélvico, ecografia e doseamento de marcadores tumorais [150]. A utilidade da ecografia na avaliação de uma massa anexial é colocada em causa por certos autores, devido à análise utilizador-dependente dos dados ecográficos [119]. Os marcadores tumorais, dado à sua relação custo-efeito, objetividade e comparabilidade, são habitualmente os primeiros exames complementares a que se recorrem como auxiliares de diagnóstico de CO [102, 151]. No entanto, o diagnóstico clínico é cirúrgico, com estudo histológico do tumor [103]. O CA-125 continua a ser o único marcador tumoral aprovado para o diagnóstico clínico de CO [150], apesar das limitações evidenciadas na sua especificidade [93, 96-98] e sensibilidade em estádios iniciais [94]. Torna-se assim fundamental descobrir marcadores tumorais com a capacidade de diferenciação pré-operatória entre massas anexiais benignas e malignas, que possam complementar ou substituir o CA-125. O seu estabelecimento na prática clínica seria de relevante importância, não só para a referência priorizada e atempada de mulheres com CO para serviços especializados em ginecologia oncológica, mas também para evitar cirurgias eventualmente desnecessárias em mulheres com massas anexiais benignas que seguem uma conduta expectante ou conservadora, e que não necessitam assim de tratamento cirúrgico, como no caso dos quistos funcionais [152]. O HE4 tem sido proposto como um marcador emergente no diagnóstico diferencial de massas anexiais, mas os resultados não são consistentes entre os estudos e as populações estudadas [121, 145, 153-155]. Para distinção da malignidade das massas anexiais, Moore *et al.* [119] propôs a interpretação combinada dos níveis séricos de CA-125 e HE4 através do algoritmo ROMA, mostrando um melhor poder de diagnóstico que o IRM, o índice de malignidade utilizado atualmente [120]. No sentido de acrescentar mais evidência quanto a utilidade de CA-125 e HE4 na deteção de CO e diferenciação de massas anexiais benignas, o presente estudo propôs-se a analisar ambos os marcadores (isoladamente, em conjunto ou interpretados pelo algoritmo ROMA), numa amostra de mulheres saudáveis, com condições ginecológicas benignas, *borderline* e CO, na Região Autónoma da Madeira.

No recrutamento de participantes para o presente estudo, realizado pela equipa do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Dr. Nélio Mendonça durante 22 meses, 12 mulheres foram

diagnosticadas com CO. Esta proporção vai de encontro à prevalência e incidência muito baixa de CO na população em geral [1] e aos últimos dados estatísticos do nosso conhecimento, quanto à incidência desta neoplasia na R.A.M. [5]. Em relação aos achados clínicos, observou-se uma maior prevalência dos tumores benignos nas mulheres pré-menopausa (56,7%), e de CO nas mulheres pós-menopausa (91,7%), o que vem a confirmar os resultados de outros estudos [97, 119, 121] e a corroborar a maior probabilidade de uma massa anexial em mulheres pós-menopausa de ser maligna. A média de idades encontrada no grupo CO ($59,8 \pm 11,2$) foi semelhante à de outros países europeus [121, 156].

Quanto aos achados laboratoriais, foram observadas algumas diferenças estatísticas entre os grupos amostrais em alguns dos parâmetros hematológicos (eritrócitos, hematócrito, VGM, HGM, CHGM, plaquetas, leucócitos, neutrófilos e monócitos) e perfil bioquímico (proteínas totais e albumina), apesar das suas médias se encontrar dentro dos respetivos intervalos de referência, com exceção dos neutrófilos ($7,3 \pm 2,9$) em mulheres com CO. Estas diferenças estatísticas observadas poderão se dever: i) às variáveis dependentes do paciente, tais como: os hábitos tabágicos (que pode levar a um ligeiro aumento da concentração de albumina, dos valores do hematócrito, VGM e HGM) [157, 158]; a ansiedade ou *stress* mental (ansiedade antes da flebotomia ou *stress* pré-operatório) que pode levar a um aumento da contagem de leucócitos [159] e a uma diminuição das concentrações de albumina em até 5% [157]; a variação circadiana que pode afetar a contagem de neutrófilos, podendo verificar um aumento de 61% em relação a sua contagem nadir, e a concentração das proteínas totais que pode variar em até 10% ao longo do dia, sendo esta variação maior para as proteínas individuais, como a albumina [157]; ii) às variáveis não dependentes do paciente, como a idade, em que as concentrações de albumina tendem a decrescer [157] e o VGM e a contagem de eritrócitos aumentar com o avanço da idade [158]. Em relação à contagem plaquetar, 10 a 50% dos tumores sólidos têm a capacidade de promover a estimulação plaquetar, provavelmente no sentido de coadjuvar a sua progressão tumoral [160], e daí o possível aumento observado nas mulheres com CO. Um aumento na contagem de neutrófilos e monócitos também pode ser observado em mulheres com tumores sólidos [161].

Como esperado e observado na maioria dos estudos [98, 107, 115, 145], os níveis séricos de HE4 e CA-125 nas mulheres pós-menopausa em estudo encontravam-se significativamente mais elevados no grupo CO em relação aos grupos saudáveis e GB. Não foram encontradas diferenças nos níveis de HE4 e CA-125 entre GB e controlos saudáveis pós-menopausa. Por outro lado, na pré-menopausa, CA-125 é significativamente mais elevado (4-fold) em GB do que em controlos saudáveis, com CA-125 a encontrar-se acima dos valores de *cut-off* no grupo GB, não se observando diferenças para HE4. Apesar de estudar apenas 12 mulheres saudáveis e não indicar o estado de menopausa, Montagnana

et al. [162] observou um aumento significativo de HE4 nos tumores benignos (2-fold) e em CO (10-fold), relativamente às mulheres saudáveis.

O valor de *cut-off* de CA-125 foi introduzido por Bast *et al.* [85] a partir da distribuição dos seus valores em 888 indivíduos saudáveis, em que 99% apresentaram valores abaixo dos 35 U/mL. Embora alguns autores [163] recomendam a utilização de diferentes valores de *cut-off* de acordo com o estado de menopausa, 35 U/mL tem sido o valor de *cut-off standard* de CA-125 para o diagnóstico de CO, independentemente do estado de menopausa [102] e imunoensaio [109]. Os resultados do nosso estudo corroboram a utilização de um único *cut-off*, uma vez que os valores de CA-125 não apresentam diferença estatística nos grupos pré- e pós-menopausa em mulheres saudáveis (respetivamente $12,1 \pm 7,7$ U/mL e $11,0 \pm 7,8$ U/mL, $p=0,694$) (Tabela Suplementar F). Quanto a HE4, a sua avaliação como potencial marcador para diagnóstico precoce de CO tem sido limitado pelo não estabelecimento de um valor de referência [108, 109]. Na avaliação do HE4 em 1101 mulheres saudáveis, Moore *et al.* [113] obteve uma média significativamente mais alta para as mulheres pós-menopausa em relação às pré-menopausa (respetivamente 57,6 e 46,6 pmol/L, $p<0,001$). Outros estudos [153, 164] e kits comerciais [146, 153] apontam nesse sentido, recomendando a utilização de diferentes valores de *cut-off* de acordo com o estado de menopausa. Não obstante, a literatura não é consensual e a maioria dos estudos avalia o desempenho de HE4 no diagnóstico de CO utilizando apenas um valor de *cut-off*, independente do estado de menopausa (Tabela Suplementar G). No presente estudo, os níveis séricos de HE4 em mulheres saudáveis variaram entre 36,7 e 95,8 pmol/L (dados não apresentados). Observou-se ainda que os níveis séricos em mulheres saudáveis pós-menopausa encontram-se significativamente mais elevados do que em mulheres saudáveis pré-menopausa ($57,7 \pm 15,3$ pmol/L vs. $43,8 \pm 6,4$ pmol/L, $p=0,003$) (Tabela Suplementar F). Tendo em conta estes resultados e considerando a recomendação do kit comercial utilizado, a análise de HE4 no presente estudo baseou-se em diferentes *cut-off* pré- e pós-menopausa. Utilizando-se os valores de *cut-off* indicados pelos kits comerciais, o CA-125 (35 U/mL) classificou corretamente 96,7% das mulheres saudáveis deste estudo, e o HE4 (pré-menopausa 92,1 pmol/L; pós-menopausa 121 pmol/L) classificou corretamente todas as mulheres saudáveis (Tabela Suplementar D). Os valores de *cut-off* de HE4 do kit comercial são muito semelhantes aqueles determinados por Moore *et al.* [113] a um percentil 95 (pré-menopausa 89,1 pmol/L; pós-menopausa 128 pmol/L), embora com um imunoensaio diferente (EIA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*).

A literatura aponta que condições ginecológicas benignas podem elevar os níveis séricos de CA-125 em 30-41% das mulheres e de HE4 em 8-10% das mulheres [107, 148]. Estes dados vão de encontro aos resultados encontrados deste estudo, em que os níveis de CA-125 encontraram-se falsamente

elevados em 33,3% dos tumores benignos, em contraste com 10,0% de HE4. Estes resultados devem-se sobretudo aos valores encontrados nos endometriomas, que apesar de representarem apenas 16,7% dos tumores benignos, 80,0% revelaram-se positivos para CA-125 e todos revelaram-se negativos para HE4 enquanto que, nos tumores epiteliais benignos observaram-se 27,8% e 11,1% positivos para CA-125 e HE4, respetivamente. O algoritmo ROMA demonstrou um igual desempenho ao CA-125 em relação aos tumores epiteliais benignos (27,8%), e ao HE4 em relação aos endometriomas (0%). Holcomb *et al.* [148], em seu estudo, também observou um aumento dos níveis de CA-125 em 80,0% das mulheres com endometrioma/endometriose, em contraste com os 37,0% observados nos tumores epiteliais benignos, enquanto que o HE4 apenas revelou-se positivo em 16,0% dos tumores epiteliais e em nenhum dos endometriomas/endometriose. Por outro lado, Bandiera *et al.* [153], observou 40,6% de falsos positivos de CA-125 nas mulheres pré-menopausa em relação aos 17,1% nas mulheres pós-menopausa, com ambos HE4 e o ROMA a se encontrar elevado em apenas 5,8% das mulheres pré-menopausa e em 1,0% e 15,6% das mulheres pós-menopausa, respetivamente. Comparavelmente, em nosso estudo, o CA-125 encontrou-se positivo em 41,2% das mulheres pré-menopausa, em contraste com os 23,1% nas mulheres pós-menopausa, com o HE4 em 11,8% e 7,7%, e o ROMA em 23,5% e 23,1%, respetivamente.

Chung *et al.* [165], na comparação das médias séricas dos marcadores tumorais entre os tumores benignos, observou um aumento significativo de CA-125 nos endometriomas em relação aos restantes tumores benignos (respetivamente 32,0 U/mL e 17,9 U/mL, $p=0,030$), ao contrário do que foi observado para o HE4 (respetivamente 19,0 pmol/L e 18,2 pmol/L, $p=0,490$). No presente estudo, e embora comparando apenas entre os dois subtipos predominantes, foram encontrados resultados similares, observando um aumento significativo de CA-125 nos endometriomas em relação aos tumores epiteliais benignos ($71,9 \pm 30,4$ U/mL vs. $29,6 \pm 39,6$ U/mL, $p=0,011$), e para o HE4 não se verificou esta diferença estatística ($43,7 \pm 5,7$ pmol/L vs. $56,9 \pm 35,8$ pmol/L, $p=0,823$). Consequentemente, como a maior parte dos tumores benignos da nossa amostra, e os endometriomas em particular, ocorrem em mulheres pré-menopausa, verifica-se um aumento significativo de CA-125 na pré-menopausa quando comparada com a pós-menopausa ($47,2 \pm 10,7$ U/mL vs. $23,7 \pm 9,5$ U/mL, $p=0,028$). O aumento sérico e a elevada proporção de falsos positivos apresentado pelo CA-125 nas mulheres pré-menopausa, leva a que na prática clínica, mulheres na pré-menopausa com massa anexial e um valor de CA-125 superior a 200 U/mL e mulheres na pós-menopausa com um valor de CA-125 superior a 35 U/mL, tendo ainda em consideração outras determinantes (como por exemplo, a presença de ascites ou evidência de metástases à distância ou abdominais), sejam reencaminhadas para centros especializados em ginecologia oncológica [57]. No grupo pré-menopausa do presente estudo, nenhuma mulher com um tumor benigno apresentou valores de CA-

125 acima dos 200 U/mL, e de entre as mulheres pós-menopausa, duas mulheres (15,4%) apresentaram valores acima dos 35 U/mL, mas nenhuma das duas apresentou níveis de HE4 acima do seu *cut-off* (dados não apresentados).

Na avaliação da frequência de tumores malignos acima dos valores de *cut-off* dos marcadores tumorais e algoritmo ROMA, o CA-125 foi o marcador a mostrar melhor capacidade na detecção dos carcinomas primários, sendo todos positivos para este marcador. Para o HE4 e ROMA, a frequência de positivos dependeu do subtipo histológico, com 80% dos serosos e 50% das células claras a serem positivos para o HE4, e os carcinomas endometrióides a serem negativos para o HE4 e também para o algoritmo ROMA, com este último a ser positivo para os restantes carcinomas primários. As diferenças na frequência de tumores positivos de ambos os marcadores tumorais, de acordo com o subtipo histológico, realçam a heterogeneidade na expressão celular apresentada por esta neoplasia. Galgano *et al.* [111], na avaliação da expressão génica de HE4 por imuno-histoquímico em tecido ovárico maligno, observou uma forte expressão de HE4 em quase todos os tumores serosos, variando nos tumores das células claras e endometrióide.

A avaliação das médias séricas de ambos os marcadores tumorais mostrou-se associada ao subtipo histológico do tumor maligno, corroborando a proporção de tumores malignos positivos observados neste estudo para ambos os marcadores tumorais, com os níveis mais elevados a serem observados no subtipo seroso (CA-125 $806,0 \pm 506,8$ U/mL; HE4 $845,2 \pm 827,0$ pmol/L) e os mais baixos no subtipo endometrióide (CA-125 $70,6 \pm 35,0$ U/mL; HE4 $46,8 \pm 21,8$ pmol/L), em que apenas a média de HE4 neste último grupo está abaixo do seu valor de *cut-off*, ao contrário do que foi encontrado em alguns estudos [107, 153, 166], em que se observou um aumento da média sérica de HE4 acima do seu *cut-off*, no subtipo endometrióide. Esta diferença poderá ser devido ao baixo número de amostras do subtipo endometrióide analisadas no presente estudo. Fujiwara *et al.* [145], avaliou as médias séricas de ambos os marcadores tumorais de acordo com o subtipo histológico, e observou um aumento estatístico de ambos os marcadores, na relação dos tumores serosos com os mucinosos ($p=0,011$, para ambos os marcadores) e células claras ($p<0,010$ para ambos). Lenhard *et al.* [166], com um maior número de tumores endometrióides analisados, observou um aumento estatístico de CA-125 no subtipo seroso em relação aos endometrióides (656,5 vs. 70,3 U/mL, $p=0,006$), e de ambos os marcadores com os mucinosos (CA-125 656,5 vs. 126,5 U/mL, $p=0,001$; HE4 386,0 vs. 74,1 pmol/L, $p=0,003$). Devido ao baixo número de amostras por subtipo histológico analisadas no presente estudo, não foi possível a comparação estatística das médias séricas dos marcadores tumorais entre cada subtipo. Contudo, avaliando a relação entre o subtipo seroso com os restantes subtipos histológicos encontrados, e embora sem ter observado diferença estatística para o HE4, verificou-se

um aumento sérico de ambos os marcadores tumorais no subtipo seroso em relação aos não serosos (CA-125 $806,0 \pm 225,8$ vs. $122,0 \pm 99,5$ U/mL, $p=0,004$; HE4 $845,2 \pm 827,0$ vs. $199,4 \pm 247,2$ pmol/L, $p=0,062$).

Considerando o estágio FIGO, pôde-se observar no presente estudo que 80% dos carcinomas detetados nos estádios avançados eram do subtipo seroso, enquanto que nos estádios iniciais apenas 20% eram serosos, o que vem realçar a rápida capacidade de disseminação destes tumores pela pélvis ainda durante o seu desenvolvimento. Estes resultados e proporções vão de encontro aos resultados de Gilks *et al.* [167] e de Azzam *et al.* [115]. A predominância do subtipo seroso nos estádios avançados é responsável pelo aumento sérico dos marcadores tumorais nos estádios avançados (CA-125 $768,7 \pm 548,3$ U/mL; HE4 $830,0 \pm 842,8$ pmol/L), em relação aos estádios iniciais (CA-125 $200,5 \pm 135,3$ U/mL; HE4 $277,0 \pm 263,6$ pmol/L). Uma análise de expressão de 21 biomarcadores de acordo com o subtipo histológico, demonstrou que os marcadores CA-125 e HE4 diferem entre os vários subtipos histológicos e acrescenta que, dentro de cada subtipo histológico, a sua expressão é constante ao longo dos estádios FIGO [112].

A sensibilidade do HE4 e do algoritmo ROMA, encontrada neste estudo (respetivamente 50,0% e 66,7%), demonstraram ser inferior ao CA-125 (83,3%) no diagnóstico de CO. Além disso, o CA-125 demonstrou melhor VPN (90,9%) que HE4 (81,8%) e ROMA (85,2%). Estes resultados similares também foram observados por vários grupos de investigação [153, 168, 169] mas não vão de encontro aos resultados da maior parte dos estudos [92, 107, 114, 115, 119, 145, 148, 154, 170]. Por exemplo, no estudo de Moore *et al.* [114], quando comparado com os outros 7 potenciais marcadores, a diferentes especificidades (90,0%, 95,0% e 98,0%) e usando como referência a sensibilidade de CA-125 (61,2%, 43,3% e 23,9%, respetivamente), o HE4 isolado demonstrou uma melhor sensibilidade (77,6%, 72,9% e 64,2%, respetivamente) assim como quando combinado com CA-125 (80,7%, 76,4% e 71,6%, respetivamente), e ainda com o HE4 a encontrar-se elevado em metade dos CO com valores normais para CA-125, o que também não foi observado no nosso estudo, com todos os CO diagnosticados por HE4 a serem também positivos para CA-125. Num estudo posterior [119], a uma especificidade fixada em 75,0%, a sensibilidade e o VPN encontrado por este autor para o ROMA foram de 88,7% e 93,9%, respetivamente. Resultados muito acima daqueles encontrados no nosso estudo. As diferenças encontradas entre estudos podem dever-se a diferentes critérios de seleção de pacientes, proporção e heterogeneidade dos subtipos histológicos encontrados, métodos de ensaio e/ou valores de *cut-off* utilizados. No estado de menopausa de maior risco, o CA-125 voltou a demonstrar uma melhor sensibilidade (90,9%) do que HE4 (54,5%) e ROMA (72,7%). Na pré-menopausa, não foi possível avaliar a sensibilidade dos marcadores e algoritmo ROMA, porque só

foi diagnosticado uma mulher na pré-menopausa com CO. Contudo, certos estudos [168, 169] demonstraram uma melhor sensibilidade de CA-125 em relação ao HE4 e ROMA na pré-menopausa, embora o inverso também foi verificado por outros [145, 148].

No que diz respeito aos tumores *borderline*, apesar da grande maioria apresentar um comportamento biológico benigno [16], o tratamento *standard* é cirúrgico [52]. A inclusão destes tumores no grupo CO, e como observado por outros [123, 148], levou a uma diminuição dos valores de sensibilidade dos marcadores CA-125 (66,7%), HE4 (40,0%) e algoritmo ROMA (53,3%) (resultados não apresentados). Contudo, estes tumores apresentam um melhor prognóstico do que os CO, com a taxa de sobrevivência aos 5 anos a ser de quase de 100% nos estádios iniciais e a variar entre os 86-92% nos estádios avançados [16]. Assim, um atraso no seu diagnóstico ou no seu reencaminhamento para centros especializados, tem um menor impacto no seu prognóstico. Por outro lado, a exclusão das metástases do grupo CO, levou a um aumento da sensibilidade dos marcadores CA-125 (100%) e HE4 (60,0 %) e algoritmo ROMA (80,0%) (resultados não apresentados). Este resultado pode dever-se ao facto dos marcadores CA-125 e HE4 não serem específicos para as neoplasias do trato gastrointestinal e da mama. Uma vez que 6-7% dos CO são metástases, sobretudo provenientes de tumores primários do trato gastrointestinal e da mama [8], quando clinicamente indicados, os marcadores tumorais CA-125 e HE4 devem ser acompanhados por outros marcadores específicos [52].

A especificidade e VPP de CA-125 encontrada por vários estudos variou entre 59 a 86% [92, 107, 153, 154, 168, 169] e 36 a 81% [107, 153, 154, 168], respetivamente. Em nosso estudo, a especificidade e VPP obtida para o CA-125 no diagnóstico de CO foi, respetivamente, 66,7% e 50,0%, o que está de acordo com o observado na literatura. De entre as restantes análises deste estudo, aquela que obtém melhor especificidade e VPP refere-se à combinação CA-125 + HE4 (93,3% e 75,0%, respetivamente), seguida de HE4 isolado (90,0% e 66,7%, respetivamente) e algoritmo ROMA (76,7% e 53,3%, respetivamente). Como esperado, devido ao elevado número de falsos positivos apresentado pelo CA-125, em particular na pré-menopausa, a combinação CA-125 ou HE4 não reduz o número de falsos positivos de CA-125 (especificidade 63,3%), observando ainda uma redução de 26,7% na especificidade de HE4 isolado (90,0% vs. 63,3%). A especificidade e VPP de CA-125 aumenta no grupo pós-menopausa (76,9% para ambos) mas os melhores índices são igualmente apresentados por HE4 isolado e combinado com CA-125 (CA-125 + HE4) (ambos 92,3% e 87,5%, respetivamente). Chang *et al.* [171] observou resultados semelhantes aos nossos quando considerou a combinação CA-125 + HE4, alcançando uma especificidade máxima de 99,0%, a qual representa um aumento de 13,0% e 2,0% na especificidade do CA-125 (86,0%) e HE4 (97,0%)

isolados, respetivamente. Quando considerou à combinação CA-125 ou HE4, observou uma redução de 12% na especificidade de HE4 isolado (97,0% vs. 85,0%).

Neste estudo, a boa especificidade alcançada pelo HE4, isolado e combinado com CA-125, é realçada aquando na avaliação da sua sensibilidade no diagnóstico de tumores benignos (Tabela Suplementar E). A sensibilidade de CA-125 no diagnóstico dos tumores benignos (33,3%) foi muito superior à de HE4 (10,0%), e a combinação CA-125 + HE4 não melhorou este índice (6,7%). Pelo estudo de mulheres pré-menopausa com tumores benignos, verificou-se ainda um aumento da sensibilidade de CA-125 (41,2%) e apenas um ligeiro aumento para o HE4 (11,8%), com a combinação CA-125 + HE4 a resultar novamente na sensibilidade mais baixa (5,9%) (Tabela Suplementar E).

Quando aplicado ao ROMA os valores de *cut-off* definidos a uma especificidade de 75% estimada a partir das amostras do presente estudo (pré-menopausa 11,9; pós-menopausa 17,7), houve um aumento de 25% na sensibilidade (91,7%), com ligeira diminuição da especificidade para diagnóstico de CO. Observou-se também um aumento de 8% e 11% no VPP e VPN, respetivamente (Tabela Suplementar B). Alguns estudos também observaram um aumento na sensibilidade do ROMA, com ligeira diminuição da sua especificidade, aquando do ajuste dos seus valores de *cut-off*, para a respetiva população estudada [123], enquanto que outros não verificaram grandes melhorias [121, 155]. Com o ajuste dos valores para HE4 (pré-menopausa, 59,3 pmol/L; pós-menopausa, 94,7 pmol/L) estimadas a um percentil 93,33% da distribuição dos seus níveis nos controlos saudáveis, a especificidade (83,3%) e VPP (58,3%) foram inferiores às referenciadas pelo *kit* (90,0% e 66,7%, respetivamente). Contudo, houve um ligeiro aumento da sua sensibilidade (58,3 vs. 50,0%) e VPN (83,3 vs. 81,8%). A combinação CA-125 ou HE4 não trouxe melhorias ao nível de qualquer índice. Para o HE4, em alguns estudos obtiveram melhores resultados com o ajuste dos seus valores à população em estudo [123, 155, 168], enquanto outros demonstraram melhores resultados com aqueles referenciados pelos *kits* [171]. Realça-se assim a necessidade de cada laboratório averiguar a transferibilidade dos valores de *cut-off* indicados pelos *kits* comerciais para a sua própria população, e se necessário ajustá-los, uma vez que diferentes *cut-offs* têm diferentes impactos na sensibilidade e especificidade.

No que concerne à avaliação da precisão na diferenciação das massas anexiais benignas de malignas, o CA-125, o marcador tumoral recomendado pelas *guidelines* atuais [150] obteve a melhor precisão (AUC 0,878) no nosso estudo. A análise dos níveis séricos de HE4 não revela um aumento da precisão (AUC 0,786) e a sua análise combinada (CA-125 ou HE4, AUC 0,856; ROMA, AUC 0,875) apresenta valores de precisão equivalentes aos de CA-125 isolado. O algoritmo ROMA demonstra assim um equilíbrio de ambos os marcadores tumorais, conseguindo alcançar a boa sensibilidade de

CA-125 e a especificidade de HE4. São poucos os estudos [153, 156] que estão de acordo com os nossos resultados, com a maioria a demonstrar uma melhor precisão para o HE4 [92, 96, 107, 145, 165, 172] ou para o algoritmo ROMA [97, 123, 154, 155, 168]. Por exemplo, num recente estudo de Richards *et al.* [172], a melhor precisão observada foi para o HE4 (0,756), seguido do ROMA (0,741) com o CA-125 a demonstrar uma precisão inferior (0,607). Já no estudo de Cho *et al.* [154], a melhor precisão foi para o ROMA (0,860), seguido do HE4 (0,859) e novamente com o CA-125 a demonstrar a menor precisão (0,755). Se considerar o estado de menopausa, o CA-125 isolado ou combinado com HE4 (CA-125 ou HE4) demonstraram a melhor precisão (AUC 0,958 para ambos) na pós-menopausa, equivalente ao ROMA (AUC 0,937) e superior a HE4 (AUC 0,860). Gorp *et al.* [121] observou resultados semelhantes, demonstrando ainda um melhor poder de diagnóstico para o CA-125 (AUC 0,856) e ROMA (AUC 0,846) em relação ao HE4 (AUC 0,833) na distinção de massas anexiais benignas e malignas em mulheres pré-menopausa. Pelas razões já referidas, no nosso estudo não foi possível avaliar o poder de diagnóstico dos marcadores e algoritmo ROMA na pré-menopausa.

Sendo o CO uma neoplasia cujo o seu diagnóstico definitivo é adquirido apenas através de cirurgia, um teste de diagnóstico terá que ter um VPP razoavelmente alto, sendo esta mais dependente da especificidade, de modo a maximizar os verdadeiros-positivos e minimizar assim as cirurgias eventualmente desnecessárias. No entanto, sendo o tratamento de CO mais eficaz aquando da sua deteção precoce, um teste também terá que ter uma alta sensibilidade de modo a minimizar os falsos-negativos. Infelizmente, o CA-125 continua a apresentar debilidades em pelo menos um dos índices, porém, o HE4 e algoritmo ROMA não ficam atrás. Os bons resultados demonstrados pelo HE4 na monitorização de recorrências e prognóstico da doença [140-142], levou a sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) [84]. Contudo, como teste de diagnóstico, os estudos realizados até agora demonstram resultados desconcordantes ou inconclusivos, que o HE4, quer isolado ou acompanhado pelo CA-125, é melhor que CA-125 isolado no diagnóstico de CO. Na verdade, estudos meta-analíticos já realizados não demonstraram ser conclusivos, com uns serem a favor do HE4 [173] e algoritmo ROMA [125], e outros do CA-125 com melhor especificidade para o HE4 [94]. Segundo um dos *guidelines* atuais [150], o CA-125 continua a ser o único marcador tumoral recomendado para o diagnóstico de CO, e por isso, uma eventual aplicação de HE4 na prática clínica para diagnóstico de CO terá que ter em conta algumas prudências, como consideração da população que está a ser estudada e o método de ensaio e/ou o valor de *cut-off* usado pelo laboratório.

Neste momento, são diversos os imunoensaios disponíveis para a quantificação dos marcadores CA-125 e HE4, e o nosso estudo, é um dos poucos que avaliou o desempenho de ambos os marcadores

tumorais e algoritmo ROMA, com utilização do método ECLIA, e o único, que seja do nosso conhecimento, nesta população. Contudo, devido ao facto do tamanho amostral deste estudo ser relativamente pequena, será necessário o estudo de um maior número de amostras para avaliar a utilidade do HE4 e ROMA no diagnóstico de CO, de modo a consolidar e validar os resultados deste estudo, incluindo os índices de avaliação na deteção de estádios precoces de CO e distinção de subtipos histológicos. Segundo os *guidelines* do CLSI C28-A3, um número mínimo de 120 indivíduos saudáveis é o necessário para definir os valores de referência para cada subgrupo, a um percentil 95 [174].

6. Conclusão

O HE4 e o algoritmo ROMA demonstraram uma melhor especificidade e VPP em relação ao marcador CA-125, porém, uma menor sensibilidade e VPN. O CA-125 continua a ser o teste de diagnóstico a apresentar a melhor precisão na diferenciação de massas anexiais benignas de malignas, com o algoritmo ROMA a demonstrar equivalente precisão a do CA-125.

Apesar das limitações existentes neste trabalho, sobretudo no tamanho amostral, neste estudo o CA-125 demonstrou uma utilidade clínica superior à de HE4 e algoritmo ROMA na diferenciação de massas anexiais. Contudo, devido à sua boa especificidade, o HE4 poderá ter aplicação clínica na estratificação de risco de algumas massas anexiais, nomeadamente nos endometriomas.

7. Referências

- 1- Ferlay J, Shin HR, Bray F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127:2893-2917.
- 2- Berek JS, Natarajan S. Ovarian and fallopian tube cancer. In: Berek JS, editors. *Berek & Novak's Gynecology*. 14th Edition. New Delhi: Lippincott Williams & Wilkins. 2007; p. 1458-1547.
- 3- Berek JS, Crum C, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. FIGO CANCER REPORT 2012. *Int J Gynaecol Obstet*. 2012; 119S2:S118-S129.
- 4- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013; 49:1374-1403.
- 5- <http://www.roreno.com.pt/pt/publicacoes/publicacoes-nacionais.html>. Acedido a 23 de agosto de 2016.
- 6- <http://eco.iarc.fr/eucan>. Acedido a 9 de dezembro de 2013.
- 7- Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, *et al.* Pathology and Classification of Ovarian Tumors. *CANCER Supplement*. 2003; 97:2631-2642.
- 8- Lee KR, Tavassoli FA, Prat J, *et al.* Tumours of the ovary and peritoneum. In: Tavassoli FA, Devilee P, eds. *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press. 2003; 113-202.
- 9- Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch*. 2012; 460:237-249.
- 10- Gerhenson DM, Goff B, Garcia RL. Overview of sex cord-stromal tumors of the ovary. 2015. UpToDate.
- 11- Young RH. Sex cord-stromal tumors of the ovary and testis: their similarities and differences with consideration of selected problems. *Mod Pathol*. 2005; 18:81-98.
- 12- Oliveira CF, Amaral N. Cancro do ovário (tumores epiteliais). In: Oliveira CF, editor. *Manual de ginecologia*. Vol. I. Lisboa: Permanyer Portugal. 2009; p. 391-412.
- 13- Cheng W, Liu J, Yoshida H, *et al.* Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nat Med*. 2005; 11:531-537.

- 14- Naora H. Developmental Patterning in the Wrong Context: The Paradox of Epithelial Ovarian Cancer. *Cell Cycle*. 2005; 4:1033-1035.
- 15- Karst AM, Drapkin R. Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution. *Journal of Oncology*. 2010.
- 16- Tropé CG, Kaern J, Davidson B. Borderline ovarian tumours. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012; 26:325-336.
- 17- Abascal-Saiz A, Sotillo-Mallo L, Santiago J, *et al*. Management of borderline ovarian tumours: a comprehensive review of the literature. *Ecancer*. 2014; 8:403.
- 18- Kurman RJ, Shih I-M. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004; 164:1511-1518.
- 19- Kurman RJ, Shih IM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34:433-443.
- 20- Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis re-visited. *FVV in ObGyn*. 2013; 5:292-297.
- 21- Risch HA. Hormonal Etiology of Epithelial Ovarian Cancer, With a Hypothesis Concerning the Role of Androgens and Progesterone. *JNCI*. 1998; 90:1774-1786.
- 22- Choi JH, Wong AST, Huang HF, *et al*. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocrine Reviews*. 2007; 28:440-461.
- 23- Schorge JO, Modesitt SC, Coleman RL, *et al*. SGO White Paper on Ovarian Cancer: Etiology, Screening and Surveillance. *Gynecol Oncol*. 2010; 119:7-17.
- 24- Gaitskell K, Green J, Pirie K, *et al*. OP26. Parity and ovarian cancer in the Million Women Study: variation by histological subtype [abstract]. *J Epidemiol Community Health*. 2014; 68: A15-A16.
- 25- Li DP, Du C, Zhang ZM, *et al*. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis of 40 epidemiological studies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15:4829-4837.
- 26- Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery WJ, *et al*. Oral contraceptive pills as primary prevention for ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2013; 122:139-147.

- 27- Trabert B, Lamb EJ, Scoccia B, *et al.* Ovulation-inducing drugs and ovarian cancer risk: results from an extended follow-up of a large United States infertility cohort. *Fertil Steril.* 2013; 100:1660-1666.
- 28- Levanon K, Crum C, Drapkin R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol.* 2008; 26:5284-5293.
- 29- Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, *et al.* Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2009; 19:398-405.
- 30- Dumesic DA, Lobo RA. Cancer risk and PCOS. *Steroids.* 2013; 78:782-785.
- 31- Ose J, Fortner RT, Rinaldi S, *et al.* Endogenous androgens and risk of epithelial invasive ovarian cancer by tumor characteristics in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer.* 2015; 136:399-410.
- 32- Walker JL, Powell CB, Chen LM, *et al.* Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer. *Cancer.* 2015; 1-13.
- 33- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian Cancer and Body Size: Individual Participant Meta-Analysis Including 25,157 Women with Ovarian Cancer from 47 Epidemiological Studies. *Plos Medicine.* 2012; 9:1-12.
- 34- Webb PM. Obesity and gynecologic cancer etiology and survival. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2013; e222-228.
- 35- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *Lancet.* 2015; 385:1835-1842.
- 36- Anderson GL, Judd HL, Kaunitz AM, *et al.* Effects of Estrogen Plus Progestin on Gynecologic Cancers and Associated Diagnostic Procedures. The Women's Health Initiative Randomized Trial (WHI). *JAMA.* 2003; 290:1739-1748.
- 37- Macciò A, Madeddu C. Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine.* 2012; 58:133-147.
- 38- Kisielewski R, Tolwinska A, Mazurek A, *et al.* Inflammation and ovarian cancer - current views. *Ginekol Pol.* 2013; 84:293-297.

- 39- Ness RB, Cottreau C. Possible Role of Ovarian Epithelial Inflammation in Ovarian Cancer. *JNCI*. 1999; 91:1459-1467.
- 40- Zafrakas M, Grimbizis G, Timologou A, *et al.* Endometriosis and ovarian cancer risk: a systematic review of epidemiological studies. *Front Surg*. 2014; 1:1-6.
- 41- Risch HA, Howe GR. Pelvic Inflammatory Disease and the Risk of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1995; 4:447-451.
- 42- Diniz PM, Carvalho JP, Baracat EC, *et al.* Fallopian tube origin of supposed ovarian high-grade serous carcinomas. *Clinics*. 2011; 66:73-76.
- 43- Callahan M, Crum C, Medeiros F, *et al.* Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction. *J Clin Oncol*. 2007; 25:3985-3990.
- 44- Kurman RJ, Shih I-M. Molecular Pathogenesis and Extraovarian Origin of Epithelial Ovarian Cancer. Shifting the Paradigm. *Hum Pathol*. 2011; 42:918-931.
- 45- Santos TA. Tumores hereditários ginecológicos. In: Oliveira CF, editor. *Manual de ginecologia*. Vol. II. Lisboa: Permanyer Portugal. 2011; p. 143-150.
- 46- Bast RC Jr, Brewer M, Zou C, *et al.* Prevention and Early Detection of Ovarian Cancer: Mission Impossible?. In: Schlag PM, Senn HJ, Gallen St, editors. *Cancer prevention*. springer. 2007; 174:91-100.
- 47- Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, *et al.* Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009; 76:1-18.
- 48- U.S. Preventive Services Task Force. Genetic Risk Assessment and BRCA Mutation Testing for Breast and Ovarian Cancer Susceptibility: Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 2005; 143:355-361.
- 49- Forman AD, Hall MJ. Influence of race/ethnicity on genetic counseling and testing for hereditary breast and ovarian cancer. *The breast journal*. 2009; 1-7.
- 50- Iodice S, Barile M, Rotmensz N, *et al.* Oral contraceptive use and breast or ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2010; 46:2275-2284.
- 51- Finch APM, Lubinski J, Møller P, *et al.* Impact of Oophorectomy on Cancer Incidence and Mortality in Women With a *BRCA1* or *BRCA2* Mutation. *J Clin Oncol*. 2014; 32:1547-1553.

- 52- Sociedade Portuguesa de Ginecologia. Cancro Ginecológico: Consensos Nacionais 2013. Acedido a 12 de setembro de 2015. Disponível em: <http://www.spginecologia.pt/notcias-da-spg/consenso-cancro-ginecologico-consensos-nacionais-2013.html>.
- 53- Heintz APM, Odicino F, Maisonneuve P, *et al.* Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006; 95 Suppl 1:S161-192.
- 54- Woo YL, Kyrgiou M, Bryant A, *et al.* Centralisation of services for gynaecological cancers - A Cochrane systematic review. *Gynecol Oncol.* 2012; 126:286-290.
- 55- Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. Artigos sobre Testes Diagnósticos. In: Wagner Brant Moreira, editor. *Leitura crítica de artigos científicos.* 2012; p 83-90.
- 56- Jelovac D, Armstrong D. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61:183-203.
- 57- Graham L. ACOG Releases Guidelines on Management of Adnexal Masses. *Am Fam Physician.* 2008; 77:1320-1323.
- 58- Vine MF, Calingaert B, Berchuck A, *et al.* Characterization of prediagnostic symptoms among primary epithelial ovarian cancer cases and controls. *Gynecol Oncol.* 2003; 90:75-82.
- 59- Attanucci CA, Ball HD, Zweizig SL, *et al.* Differences in symptoms between patients with benign and malignant ovarian neoplasms. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190:1435-1437.
- 60- Goff BA, Mandel LS, Melancon CH, *et al.* Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA.* 2004; 291:2705-2712.
- 61- Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG: An International J Obstet Gynaecol.* 2005; 112:857-865.
- 62- Paulsen T, Kaern J, Kjaerheim K, *et al.* Symptoms and referral of women with epithelial ovarian tumors. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005; 88:31-37.
- 63- Smith LH, Morris CR, Yasmeeen S, *et al.* Ovarian cancer: can we make the clinical diagnosis earlier? *Cancer.* 2005; 104:1398-1407.
- 64- Goff BA, Mandel LS, Drescher CW, *et al.* Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer.* 2007; 109:221-227.

- 65- Kim MK, Kim K, Kim SM, *et al.* A hospital-based case-control study of identifying ovarian cancer using symptom index. *Gynecol Oncol.* 2009; 20:238-242.
- 66- Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, *et al.* Symptom presentation in invasive ovarian carcinoma by tumor histological type and grade in a multiethnic population: A case analysis. *Gynecol Oncol.* 2010; 119:278-284.
- 67- Lim AWW, Mesher D, Gentry-Maharaj A. Predictive Value of Symptoms for Ovarian Cancer: Comparison of Symptoms Reported by Questionnaire, Interview, and General Practitioner Notes. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104:1-11.
- 68- Itakura T, Kikkawa F, Kajiyama H, *et al.* Doppler flow and arterial location in ovarian tumors. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003; 83:277-283.
- 69- Kurtz AB, Tsimikas JV, Tempany CMC, *et al.* Diagnosis and Staging of Ovarian Cancer: Comparative Values of Doppler and Conventional US, CT and MR Imaging Correlated with Surgery and Histopathologic Analysis Report of the Radiology Diagnostic Oncology Group. *Radiology* 1999; 212:19-27.
- 70- Sohaib SAA, Reznick RH. MR imaging in ovarian cancer. *Cancer Imaging.* 2007; 7: S119-S129.
- 71- Fenchel S, Grab D, Nuessle K, *et al.* Asymptomatic Adnexal Masses: Correlation of FDG PET and Histopathologic Findings. *Radiology* 2002; 223:780-788.
- 72- Huber S, Medl M, Baumann L, *et al.* Value of ultrasound and magnetic resonance imaging in the preoperative evaluation of suspected ovarian masses [abstract]. *Anticancer Res.* 2002; 22:2501-2507.
- 73- Sohaib SA, Mills TD, Sahdev A, *et al.* The role of magnetic resonance imaging and ultrasound in patients with adnexal masses. *Clin Radiol.* 2005; 60:340-348.
- 74- Balan P. Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging in the assessment of pelvic pathology. *European Journal of Radiology.* 2006; 58:147-155.
- 75- Castellucci P, Perrone AM, Picchio M, *et al.* Diagnostic accuracy of 18F-FDG PET/CT in characterizing ovarian lesions and staging ovarian cancer: correlation with transvaginal ultrasonography, computed tomography, and histology [abstract]. *Nucl Med Commun.* 2007; 28:589-595.

- 76- Malati T. TUMOUR MARKERS: AN OVERVIEW. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2007; 22:17-31.
- 77- Chan DW, Booth RA, Diamandis EP. Tumor Markers. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Sawyer BG, editors. Fundamentals of Clinical Chemistry. Elsevier. 6th edition. 2008; 337-362.
- 78- Aebi S, Castiglione M. ESMO Guidelines Working Group. Newly and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2009; 20:21-23.
- 79- Su Z, Graybill WS, Zhu Y. Detection and monitoring of ovarian cancer. Clinica Chimica Acta 415. 2013; 341-345.
- 80- Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, *et al.* Reactivity of a Monoclonal Antibody with Human Ovarian Carcinoma. J Clin Invest. 1981; 68:1331-1337.
- 81- Bafna S, Kaur S, Batra SK. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. Oncogene. 2010; 29:2893-2904.
- 82- Diamandis EP, Bast RC Jr, Gold P, *et al.* Reflection on the discovery of carcinoembryonic antigen, prostate-specific antigen, and cancer antigens CA125 and CA19-9. Clin Chem. 2013; 59:22-31.
- 83- Felder M, Kapur A, Gonzalez-Bosquet J, *et al.* MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. Molecular Cancer. 2014; 13:129.
- 84- Bottoni P, Scatena R. The Role of CA125 as Tumor Marker: Biochemical and Clinical Aspects. Adv Exp Med Biol. 2015; 867:229-244.
- 85- Bast RC Jr., Klug TL, St John E, *et al.* A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer [abstract]. N Engl J Med. 1983; 309:883-887.
- 86- Bast RC Jr, Knapp RC. CA 125: History, Current Status, and Future Prospects. McGill Journal of medicine. 1998; 3:67-71.
- 87- Kenemans P, Bon GG, Kessler AC, *et al.* Multicenter technical and clinical evaluation of a fully automated enzyme immunoassay for CA 125. Clin Chem. 1992; 38:1466-1471.

- 88- Kenemans P, van Kamp GJ, Oehr P, *et al.* Heterologous double-determinant immunoradiometric assay CA 125 II: reliable second-generation immunoassay for determining CA 125 in serum. *Clin Chem.* 1993; 39:2509-2513.
- 89- Kenemans P, Verstraeten AA, van Kamp GJ, *et al.* The second generation CA 125 assays. *Ann Med.* 1995; 27:107-113.
- 90- Bonfre`r JMG, Baan AW, Jansen E, *et al.* Technical evaluation of three second generation CA 125 assays. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1994; 32:201-207.
- 91- Nossov V, Amneus M, Su F, *et al.* The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125?. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199:215-223.
- 92- Abdel-Azeez HA, Labib HA, Sharaf SM, Refaie AN. HE4 and Mesothelin: Novel Biomarkers of Ovarian Carcinoma in Patients with Pelvic Masses. *Asian Pacific J Cancer Prev.*2010; 11:111-116.
- 93- Aggarwal P, Kehoe S. Serum tumour markers in gynaecological cancers. *Maturitas.* 2010; 67: 46-53.
- 94- Wang J, Gao J, Yao H, *et al.* Diagnostic accuracy of serum HE4, CA125 and ROMA in patients with ovarian cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014; 35:6127-6138.
- 95- Kathryn LT, Patrick MS, Steven JS, *et al.* Blood and urine markers for ovarian cancer: A comprehensive review. *Disease Markers.* 2004; 20:53-70.
- 96- Escudero JM, Auge JM, Filella X, *et al.* Comparison of Serum Human Epididymis Protein 4 with Cancer Antigen 125 as a Tumor Marker in Patients with Malignant and Nonmalignant Diseases. *Clin Chem.* 2011; 57:1534-1544.
- 97- Molina R, Escudero JM, Augé JM, *et al.* HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumor Biol.* 2011; 32:1087-1095.
- 98- Park Y, Lee JH, Hong DJ, *et al.* Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian cancer from patients with various gynecologic and non-gynecologic diseases. *Clinical Biochemistry.* 2011; 44:884-888.

- 99- Brazert J, Pietryga M, Szabłowski W, *et al.* Diagnostic value of the morphological ultrasound score system and the serum concentration of CA 125 in the diagnosis of malignant ovarian cancer [abstract]. *Ginekol Pol.* 2003; 74:1542-1548.
- 100- Maggino T, Gadducci A, D'Addario V, *et al.* Prospective multicenter study on CA 125 in postmenopausal pelvic masses. *Gynecol Oncol.* 1994; 54:117-123.
- 101- Andersen MR, Goff BA, Lowe KA, *et al.* Combining a Symptoms Index With CA 125 to Improve Detection of Ovarian Cancer. *Cancer.* 2008; 113:484-489.
- 102- National Institute for Health and Clinical Excellence. Ovarian Cancer. The recognition and initial management of ovarian cancer. NICE clinical guideline 122. 2011.
- 103- Sociedade Portuguesa de Ginecologia. Consenso sobre Cancros do Colo, Corpo do Útero e Ovário. 2003. Acedido a 30 de abril de 2014. Disponível em: <http://www.spginecologia.pt/notcias/consenso-sobre-cancros-do-colo-corpo-do-utero-e-ovario.html>.
- 104- Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, *et al.* The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63:3695-3700.
- 105- Ferraro S, Schiumarini D, Panteghini M. Human epididymis protein 4: Factors of variation. *Clinica Chimica Acta.* 2015; 438:171–177.
- 106- Chhikara N, Saraswat M, Tomar AK, *et al.* Human Epididymis Protein-4 (HE-4): A Novel Cross-Class Protease Inhibitor. *PLoS ONE.* 2012; 7:e47672.
- 107- Hamed EO, Ahmed H, Sedeek OB, *et al.* Significance of HE4 estimation in comparison with CA125 in diagnosis of ovarian cancer and assessment of treatment response. *Diagn Pathol.* 2013; 8.
- 108- Ferraro S, Braga F, Lanzoni M, *et al.* Serum human epididymis protein 4 vs carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: a systematic review. *J Clin Pathol.* 2013; 66:273-281.
- 109- Ferraro S, Panteghini M. Is serum human epididymis protein 4 ready for prime time?. *Annals of Clinical Biochemistry.* 2014; 51:128-136.
- 110- Macedo ACL, Rosa MI, Lumertz S, *et al.* Accuracy of Serum Human Epididymis Protein 4 in Ovarian Cancer Diagnosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2014; 24:1222-1231.

- 111- Galgano MT, Hampton GM, Frierson Jr. HF. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissue. *Modern Pathology*. 2006; 19:847-853.
- 112- Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, *et al*. Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: Implications for Biomarker Studies. *PLoS Med*. 2008; 5:1749-1760.
- 113- Moore RG, Miller MC, Eklund EE, *et al*. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol*. 2012; 349e1-349e7.
- 114- Moore RG, Brown AK, Miller MC, *et al*. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*. 2008; 108:402-408.
- 115- Azzam AZ, Hashad DI, Kamel NAF. Evaluation of HE4 as an extrabiomarker to CA125 to improve detection of ovarian carcinoma: is it time for a step forward? *Arch Gynecol Obstet*. 2013; 288:167-172.
- 116- National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Ovarian Cancer: screening, treatment, and follow-up. *Gynecol Oncol*. 1994; 55,3:4-14.
- 117- Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, *et al*. A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol*. 1990; 97:922-929.
- 118- Aktürk E, Karaca RE, Alanbay I, *et al*. Comparison of four malignancy risk indices in the detection of malignant ovarian masses. *Gynecol Oncol*. 2011; 22:177-182.
- 119- Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, *et al*. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol*. 2009; 112:40-46.
- 120- Moore RG, Jabre-Raughley M, Brown AK, *et al*. Comparison of a novel multiple marker assay vs the Risk of Malignancy Index for the prediction of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol*. 2010; 203:228.e1-6.
- 121- Van Gorp T, Cadron I, Despierre E, *et al*. HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Br J Cancer*. 2011; 104:863-870.

- 122- Karlsen MA, Sandhu N, Høgdall C, *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; 127:379-383.
- 123- Winarto H, Laihad BJ, Nuranna L. Modification of cutoff values for HE4, CA125, the risk of malignancy index and the risk of malignancy algorithm for ovarian cancer detection in Jakarta, Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15:1949-1953.
- 124- Lennox GK, Eiriksson LR, Reade CJ, *et al.* Effectiveness of the Risk of Malignancy Index and the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm in a Cohort of Women With Ovarian Cancer: Does Histotype and Stage Matter?. *Int J Gynecol Cancer.* 2015; 25:809-814.
- 125- Li F, Tie R, Chang K, *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.* 2012; 12:258.
- 126- Cohen JG, White M, Cruz A, *et al.* In 2014, can we do better than CA125 in the early detection of ovarian cancer? *World J Biol Chem.* 2014; 5:286-300.
- 127- Buys SS, Partridge E, Greene MH, *et al.* Ovarian cancer screening in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) cancer screening trial: Findings from the initial screen of a randomized trial. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193:1630-1639.
- 128- Buys SS, Partridge E, Black A, *et al.* Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 2011; 305:2295-2303.
- 129- Menon U, Gentry-Maharaj A, Hallett R, *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; 10:327-340.
- 130- Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, *et al.* Ovarian Cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomized controlled trial. *Lancet.* 2015.
- 131- Sociedade Portuguesa de Ginecologia. Cancro Ginecológico: Consensos Nacionais 2010. Acedido a 23 de agosto de 2016. Disponível em: <http://www.spginecologia.pt/notcias/consenso-cancro-ginecologico.html>.

- 132- Moyer VA, Force USPST. Screening for ovarian cancer: U.S. Preventive Services Task Force reaffirmation recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2012; 157:900-904.
- 133- Gentry-Maharaj A, Menon U. Screening for ovarian cancer in the general population. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012; 26:243-256.
- 134- Gubbels JAA, Claussen N, Kapur AK, *et al.* The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research.* 2010; 3:8.
- 135- du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, *et al.* Role of Surgical Outcome as Prognostic Factor in Advanced Epithelial Ovarian Cancer: A Combined Exploratory Analysis of 3 Prospectively Randomized Phase 3 Multicenter Trials. *Cancer.* 2009; 115:1234-1244.
- 136- Kosary CL. Cancer of the ovary. In: Reis LAG, Young JL, Keel GE, Eisner MP, Lin YD, Horner MJ, editors. *Seer Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: US SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics.* Publication No. 07-6215. Bethesda, MD: National Cancer Institute. 2007; p. 133-144.
- 137- Pignata S, Cannella L, Leopardo D, *et al.* Follow-up with CA125 after primary therapy of advanced ovarian cancer: in favor of continuing to prescribe CA125 during follow-up. *Ann Oncol.* 2011; 22:viii40-viii44.
- 138- Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. *Clin Chem.* 2008; 54:e11-e79.
- 139- Marcus CS, Maxwell GL, Darcy KM, *et al.* Current Approaches and Challenges in Managing and Monitoring Treatment Response in Ovarian Cancer. *Journal of Cancer.* 2014; 5:25-30.
- 140- Escudero JM, Molina R, Fusté P. PL-30. HE-4 in ovarian cancer therapy monitoring: comparison with CA 125 [abstract]. *Tumour Biol.* 2014; 35:S1-S19.
- 141- Plotti F, Capriglione S, Terranova C, *et al.* Does HE4 have a role as biomarker in the recurrence of ovarian cancer? *Tumour Biol.* 2012; 33:2117-2123.
- 142- Anastasi E, Marchei GG, Viggiani V, *et al.* HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2010; 31:113-119.
- 143- Administração Regional de Saúde do Norte, I.P. Circular Informativa nº01/2011. Menopausa - Conceitos e Estratégias. Acedido a 18 de setembro de 2013. Disponível em:

<http://portal.arsnorte.min-saude.pt/portal/page/portal/ARSNorte/Documentos/Circulares%20da%20ARSNorte/Circulares%20Informativas%202011>.

144- <http://www.cobas.com>. Acedido a 15 de junho de 2015.

145- Fujiwara H, Suzuki M, Takeshima N, *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. *Tumor Biol*. 2015; 36:1045-1053.

146- https://dialog1.roche.com/pt/pt_pt/elabdoc. Acedido a 3 de outubro de 2013.

147-

<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/page/techdocSearch?sortColumn=title&sortOrder=asc&startIndex=1&searchByUrl=no&searchType=searchByProduct&marketSegmentId=1000356&productLineId=1000204&productSeriesId=1001406&productId=1000660&documentCategoryId=4&languageCode=pt&pageSize=10&downloadTechDocFileFormat=exe&activeCategoriesFlag=false>. Acedido a 3 de outubro de 2013.

148- Holcomb K, Vucetic Z, Miller C, *et al*. Human epididymis protein 4 offers superior specificity in the differentiation of benign and malignant adnexal masses in premenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*. 2011; 205:358.e1-6.

149- Engel J, Eckel R, Schubert-Fritschle G, *et al*. Moderate progress for ovarian cancer in the last 20 years: prolongation of survival, but no improvement in the cure rate. *Eur J Cancer*. 2002; 38:2435-2445.

150- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology. Ovarian cancer. Version 2.2015. Washington, PA: National Comprehensive Cancer Network, Inc; 2015.

151- Nowak M, Janas T, Stachowiak G, *et al*. Current clinical application of serum biomarkers to detect ovarian cancer. *Prz menopauzalny*. 2015; 14:254-259.

152- Muto MG, Sharp HT, Goff B. Management of an adnexal mass. 2016. UpToDate.

153- Bandiera E, Romani C, Specchia C, *et al*. Serum Human Epididymis Protein 4 and Risk for Ovarian Malignancy Algorithm as New Diagnostic and Prognostic Tools for Epithelial Ovarian Cancer Management. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011; 20:2496-2506.

- 154- Cho HY, Park SH, Park YH, *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; 30:1777-1783.
- 155- Xu Y, Zhong R, He J, *et al.* Modification of cut-off values for HE4, CA125 and the ROMA algorithm for early-stage ovarian cancer detection: Results from 1021 cases in South China. *Clinical Biochemistry.* 2016; 49:32-40.
- 156- Partheen K, Kristjansdottir B, Sundfeldt K. Evaluation of ovarian cancer biomarkers HE4 and CA-125 in women presenting with a suspicious cystic ovarian mass. *Gynecol Oncol.* 2011; 22:244-252.
- 157- Young DS. Preanalytical Variables and Biological Variation. In: Burtis CA, Ashwood RC, Burns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* Elsevier. 5th edition. p119-144.
- 158- Azevedo AP, Silva P, Marcelo C, *et al.* VALORES DE REFERÊNCIA PARA HEMOGRAMA Na População da Zona Metropolitana de Lisboa. *Acta Med Port.* 2010; 23:597-604.
- 159- Segerstrom SC, Miller GE. Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychological Bulletin.* 2004; 130:601-630.
- 160- Rao AK, Rao DA. Platelets signal and tumors take off. *Blood.* 2012; 120:4667-4668.
- 161- Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, *et al.* Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012; 109:2491-2496.
- 162- Montagnana M, Lippi G, Ruzzenete O, *et al.* The utility of serum human epididymis protein 4 (HE4) in patients with a pelvic mass. *J Clin Lab Anal.* 2009; 23:331-335.
- 163- Bon GG, Kenemans P, Verstraeten R, *et al.* Serum tumor marker immunoassays in gynecologic oncology: Establishment of reference values. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174:107-114.
- 164- Yang J, Sa M, Huang M, *et al.* The reference intervals for HE4, CA-125 and ROMA in healthy female with electrochemiluminescence immunoassay. *Clinical Biochemistry.* 2013; 46:1705-1708.
- 165- Chung SH, Lee SY, Ju W, *et al.* Clinical efficacy of serum human epididymis protein 4 as a diagnostic biomarker of ovarian cancer: A pilot study. *Obstet Gynecol Sci.* 2013; 56:234-241.

- 166- Lenhard M, Stieber P, Hertlein L, *et al.* The diagnostic accuracy of two human epididymis protein 4 (HE4) testing systems in combination with CA125 in the differential diagnosis of ovarian masses. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49:2081-2088.
- 167- Gilks CB, Ionescu D, Kalloger SE, *et al.* Tumor cell type can reproducibly diagnosed and is of independent prognostic significance in patients with maximally debulked ovarian carcinoma. *Hum Pathol.* 2008; 39:1239-1251.
- 168- Chan KKL, Chen Chi-An, Nam Joo-Hyun, *et al.* The use of HE4 in the prediction of ovarian cancer in Asian women with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2013; 128:239-244.
- 169- Farzaneh F, Honarvar Z, Yaraghi M, *et al.* Preoperative evaluation of risk of ovarian malignancy algorithm index in prediction of malignancy of adnexal masses. *Iran Red Crescent Med J.* 2014;16:e17185.
- 170- Ruggeri G, Bandiera E, Zanotti L, *et al.* HE4 and epithelial ovarian cancer: Comparison and clinical evaluation of two immunoassays and a combination algorithm. *Clinica Chimica Acta.* 2011; 412:1447-1453.
- 171- Chang X, Ye X, Dong L, *et al.* Human Epididymis Protein 4 (HE4) as a Serum Tumor Biomarker in Patients With Ovarian Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2011; 21:852-858.
- 172- Richards A, Herbst U, Manalang J, *et al.* HE4, CA125, the Risk of Malignancy Algorithm and the Risk of Malignancy Index and complex pelvic masses - a prospective comparison in the pre-operative evaluation of pelvic masses in an Australian population. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2015; 55:493-497.
- 173- Yu S, Yang HJ, Xie SQ, *et al.* Diagnostic value of HE4 for ovarian cancer: a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2012; 50:1439-1446.
- 174- Clinical and laboratory standards institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, 3rd edition. 2010; 28:1-59.
- 175- Yang Z, Wei C, Luo Z, *et al.* Clinical value of serum human epididymis protein 4 assay in the diagnosis of ovarian cancer: a meta-analysis. *OncoTargets and Therapy.* 2013; 6:957-966.
- 176- Zhen S, Bian Li-Hong, Chang Li-Li, *et al.* Comparison of serum human epididymis protein 4 and carbohydrate antigen 125 as markers in ovarian cancer: A meta-analysis. *Molecular and Clinical Oncology.* 2014; 2:559-566.

8. ANEXOS

ANEXO A - DOCUMENTO DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA INVESTIGAÇÃO

NOME DO ESTUDO: CA-125 e HE4: o seu papel como biomarcadores em cancro do ovário.

INVESTIGADOR: _____, Orientadora _____, Co-orientador

Contactos: _____

Foi-lhe pedido para participar num estudo de **investigação**, no âmbito de desenvolvimento de Projeto/Dissertação de Mestrado, que pretende ajudar a compreender melhor o papel dos biomarcadores CA-125 e HE4 na deteção precoce de cancro do ovário. Para este estudo serão recrutados participantes com cancro do ovário, condições ginecológicas benignas e de baixo potencial maligno e indivíduos saudáveis, para efeitos de comparação dos níveis séricos destes marcadores, já que podem estar também elevados em outras situações patológicas e não patológicas que não cancro do ovário. A sua participação neste estudo implica a contribuição com uma amostra de sangue e significa que a sua informação e resultados das análises laboratoriais serão analisados juntamente com as informações recolhidas de outras pessoas, que integram um dos grupos de estudo. A sua identificação bem como os resultados das análises serão confidenciais.

QUAL É O OBJECTIVO DESTE ESTUDO?

Este estudo tem como objetivo avaliar a utilidade dos marcadores tumorais CA-125 e HE4 como auxiliares no diagnóstico clínico do cancro do ovário e sua deteção precoce, em estádios tratáveis. O estudo irá recolher informação e resultados das análises laboratoriais de utentes que acedem aos serviços do Hospital Dr. Nélio Mendonça. Os dados recolhidos poderão ajudar na ação médica e reduzir a mortalidade pela doença.

O QUE É QUE ESTE ESTUDO ENVOLVE?

Ser-lhe-á pedido para contribuir com uma amostra de sangue, cujo o seu procedimento de recolha levará cerca de 5 minutos. Os tubos serão armazenados a -20°C até ao doseamento. A informação recolhida será armazenada juntamente com as informações de outras pessoas com as mesmas condições de saúde.

A QUEM É PEDIDO PARA PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Foi-lhe pedido para participar neste estudo por pertencer a um dos seguintes grupos:

- Pacientes com cancro do ovário;
- Pacientes com condições ginecológicas benignas e de baixo potencial maligno;
- Participantes saudáveis.

EXISTEM RISCOS NESTA PARTICIPAÇÃO?

Os riscos associados são unicamente os inerentes à recolha de sangue por venipunctura, procedimento que já é habitual no respetivo serviço.

EXISTEM BENEFÍCIOS POR PARTICIPAR?

Não irá receber nenhum benefício imediato por participar neste estudo. No entanto, a informação recolhida no estudo poderá vir a beneficiar no futuro pessoas com cancro do ovário.

QUEM TERÁ ACESSO À MINHA INFORMAÇÃO?

Não há identificação do seu nome em nenhum relatório. Todos os relatórios e materiais pertencentes a este estudo serão mantidos confidenciais. Contudo, não podemos garantir confidencialidade absoluta. A sua informação pessoal pode ser revelada se solicitada pelas vias legais. É também possível que a informação deste estudo seja divulgada e/ou publicada no futuro. Neste caso, a sua identidade será confidencial e não será revelada na divulgação. No final do estudo destruiremos todos os relatórios.

EXISTEM CUSTOS ENVOLVIDOS?

A sua participação não envolve quaisquer encargos ou despesas da sua parte, com exceção do tempo necessário para a recolha de sangue.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS?

A sua participação neste estudo é inteiramente voluntária. Pode recusar participar neste estudo ou desistir em qualquer altura. Se decidir não participar, isto não afetará o seu futuro tratamento, ou direitos de saúde e legais.

A QUEM POSSO CONTACTAR SE TIVER ALGUMA QUESTÃO OU PREOCUPAÇÃO?

Se tiver alguma dúvida sobre os seus direitos como participante, pode contactar os números de telefone acima indicados, Hospital Dr. Nélio Mendonça, Funchal.

ANEXO B - DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Entendo que toda a informação derivada do estudo CA-125 e HE4: o seu papel como biomarcadores em cancro do ovário é propriedade de SESARAM, E.P.E.. Dou o meu consentimento para que se proceda à recolha de sangue e que dados anónimos a meu respeito possam ser guardados e processados pela Mestranda Dina Rodrigues de Abreu para fins de avaliação científica. Li (Foi-me lida) a informação mencionada acima. Entendo o significado desta informação, e as minhas perguntas foram satisfatoriamente respondidas. Tive tempo suficiente para decidir sobre a participação neste estudo. Venho por este meio consentir a minha participação e consentir na recolha, uso e revelação de informação. Irei receber uma cópia deste documento de consentimento informado assinada e datada.

Assinatura do participante

Data

Nome do Representante legal -Se aplicável

Data

Nome do Investigador

Data

ANEXO C - INSTRUMENTO DE RECOLHA DE DADOS

1. Idade

	anos
--	------

1.1 Menopausa

Pré Pós

--	--

Comorbilidades

--

2. Tipo de participante

2.1 CO

--

2.1.1

Classificação
histológica

--

2.1.2 Estadiamento

--

2.2 GB

--

2.2.1

Qual?

--

2.3 *Borderline*

--

2.3.1

Qual?

--

2.3.2 Estadiamento

--

2.4 Saudável

--

2.4.1

Observações

--

Resultados

3. laboratoriais

3.1 CA-125

	< 35 U/mL
--	-----------

3.2 HE4

	pmol/L
--	--------

3.3 Eritrócitos

	3,8-5,8 x10 ⁶ µL
--	-----------------------------

3.4 Plaquetas

	150-450 x10 ³ µL
--	-----------------------------

3.5 Hematócrito

	37-47 %
--	---------

3.6	Hemoglobina		11,5-16 g/dL
3.7	VGM		80-100 fL
3.8	HGM		> 27pg
3.9	CHGM		30-35g/dL
3.10	Leucócitos		14,5-11 x10 ³ µL
3.11	Basófilos		0,0-0,2 x10 ³ µL
3.12	Eosinófilos		0,0-0,5 x10 ³ µL
3.13	Linfócitos		1,5-4,0 x10 ³ µL
3.14	Monócitos		0,0-1,0 x10 ³ µL
3.15	Neutrófilos		1,5-7,1 x10 ³ µL
3.16	Proteínas totais		60-80 g/L
3.17	Albumina		35-48 mg/dL
3.18	Bilirrubina total		0,3-1,2 mg/dL
3.19	ALT		14-54 U/L
3.20	AST		8-35 U/L
3.21	ALP		30-120 U/L
3.22	Creatinina		0,7-1,2 mg/dL
3.23	Ureia		8,0-50 mg/dL
3.24	FSH	<input type="text"/>	mUI/mL
3.25	Estradiol	<input type="text"/>	pg/mL

Tabela A - Características clínicas e laboratoriais dos grupos amostrais. Os resultados encontram-se expressos nas suas médias e desvio-padrão.

	Controlos (n=30)	GB (n=30)	Borderline (n=3)	CO (n=12)	P-value* (Kruskal-Wallis)	Comparações múltiplas	P-value* (Kruskal-Wallis 1-way ANOVA)
% menopausa	50,0	43,3	66,7	91,7	0,015[†]	-	-
Idade (anos ± desvio-padrão)	49,6 ± 12,2	49,0 ± 14,8	57,7 ± 8,6	59,8 ± 11,2	0,050 [‡]	-	-
Hemograma (valores de referência)							
Eritrócitos (3,8-5,8 x 10 ⁶ µL)	4,3 ± 0,3	4,5 ± 0,4	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,6	0,051	-	-
Hematócrito (37-47 %)	40,5 ± 2,4	39,1 ± 4,0	39,5 ± 1,0	38,4 ± 5,4	0,452	-	-
Hemoglobina (11,5-16 g/dL)	13,2 ± 0,8	12,9 ± 1,4	13,3 ± 0,8	12,7 ± 1,7	0,910	-	-
VGM (80-100 fL)	93,6 ± 3,4	87,1 ± 4,8	92,2 ± 4,6	87,5 ± 4,8	<0,001	Controlos vs. GB Controlos vs. CO	<0,001 0,001
HGM (> 27 pg)	30,4 ± 1,0	28,6 ± 2,3	31,0 ± 0,4	29,0 ± 2,0	0,001	Controlos vs. GB Controlos vs. CO	0,001 0,027
CHGM (30-35 g/dL)	32,5 ± 0,6	33,0 ± 0,7	33,6 ± 1,4	33,2 ± 1,1	0,015	Controlos vs. GB	0,017
Plaquetas (150 - 450 x 10 ³ µL)	227,3 ± 46,9	258,4 ± 60,6	283,7 ± 27,3	311,7 ± 102,7	0,010	Controlos vs. CO	0,011
Leucócitos (4,5-11 x 10 ³ µL)	6,4 ± 1,2	7,8 ± 2,1	7,6 ± 1,0	9,6 ± 2,7	<0,001	Controlos vs. GB Controlos vs. CO	0,013 <0,001
Neutrófilos (1,5-7,1 x 10 ³ µL)	3,4 ± 0,9	5,0 ± 1,8	5,2 ± 1,2	7,1 ± 2,8	<0,001	Controlos vs. GB Controlos vs. CO	0,001 <0,001
Linfócitos (1,5-4,0 x 10 ³ µL)	2,3 ± 0,6	2,2 ± 0,7	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,6	0,008	Controlos vs. CO	0,002
Monócitos (0,0-1,0 x 10 ³ µL)	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,007	Controlos vs. CO GB vs. CO	0,007 0,022
Eosinófilos	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,9	0,123	-	-

(0,0-0,5 x 10 ³ µL)							
Basófilos	0,02 ± 0,04	0,02 ± 0,05	0,03 ± 0,06	0,03 ± 0,05	0,486	-	-
(0,0-0,2 x 10 ³ µL)							
Bioquímica (valores de referência)							
Proteínas Totais (60-80 g/L)	72,2 ± 4,1	65,8 ± 11,2	75,3 ± 2,6	61,5 ± 10,4	0,002	Controlos vs. CO	0,003
Albumina (35-48 mg/dL)	42,3 ± 3,0	40,4 ± 5,6	42,0 ± 2,9	35,5 ± 5,6	0,002	Controlos vs. CO GB vs. CO	0,001 0,016
Bilirrubina Total (0,3-1,2 mg/dL)	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,185	-	-
ALT (14-54 U/L)	16,7 ± 6,6	23,1 ± 26,2	25,6 ± 5,4	23,6 ± 16,5	0,622	-	-
AST (8-35 U/L)	21,8 ± 6,2	24,2 ± 16,9	22,3 ± 1,7	25,9 ± 13,7	0,784	-	-
Fosfatase Alcalina (30-120 U/L)	74,9 ± 27,2	60,0 ± 20,0	87,0 ± 25,1	97,4 ± 48,1	0,015	GB vs. CO	0,018
Creatinina (0,7-1,2 mg/dL)	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,041	Controlos vs. GB	0,034
Ureia (8,0-50 mg/dL)	32,8 ± 8,3	30,0 ± 9,0	31,3 ± 4,0	36,2 ± 14,3	0,442	-	-
CA-125 (< 35 U/mL)	11,5 ± 7,6	37,0 ± 41,3	18,0 ± 5,3	407,5 ± 471,0	<0,001	Controlos vs. GB Controlos vs. CO GB vs. CO	0,024 <0,001 0,004
HE4 (≤ 92,1/121 pmol/L) [§]	50,8 ± 13,5	55,5 ± 34,0	51,0 ± 14,7	468,5 ± 626,6	0,004	Controlos vs. CO GB vs. CO	0,022 0,003

*resultados estatisticamente significativos ($p < 0,050$) salientados a negrito; †teste qui-quadrado; ‡teste ANOVA; § valores de *cut-off* de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); “-“ não determinado; para as comparações múltiplas são apenas apresentados os resultados significativos; VGM, volume globular médio; HGM, hemoglobina globular média; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase.

Tabela B - Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e LR+/- dos marcadores CA-125 e HE4 e algoritmo ROMA, no diagnóstico de cancro do ovário (comparando mulheres com condições GB e CO).

	CA-125 (U/mL)	HE4 (pmol/L)		CA-125 + HE4		CA-125 ou HE4		ROMA (%)	
valores de <i>cut-off</i>	< 35*	≤ 92,1/121*	≤ 59,3/94,7†	*	†	*	†	< 11,4/29,9*	< 11,9/17,7‡ <13,1/27,7§
GB vs. CO									
Conjunto									
Sensibilidade (%)	83,3	50,0	58,3	50,0	58,3	83,3	83,3	66,7	91,7
Especificidade (%)	66,7	90,0	83,3	93,3	90,0	63,3	60,0	76,7	75,0
VPP (%)	50,0	66,7	58,3	75,0	70,0	47,6	45,5	53,3	61,1
VPN (%)	90,9	81,8	83,3	82,4	84,4	90,5	90,0	85,2	95,8
LR+	2,50	5,00	3,50	7,50	5,83	2,27	2,08	2,86	3,93
LR-	0,25	0,56	0,50	0,54	0,46	0,26	0,28	0,43	0,11
Pós-Menopausa									
Sensibilidade (%)	90,9	54,6	63,6	54,6	63,6	90,9		72,7	100
Especificidade (%)	76,9	92,3	92,3	92,3	92,3	76,9		76,9	75,0
VPP (%)	76,9	85,7	87,5	85,7	87,5	76,9		72,7	78,6
VPN (%)	90,9	70,6	75,0	70,6	75,0	90,9		76,9	100
LR+	3,94	7,09	8,27	7,09	8,27	3,94		3,15	4,33
LR-	0,12	0,49	0,39	0,49	0,39	0,12		0,35	0
Pré-Menopausa									
Especificidade (%)	58,8	88,2	76,5	94,1	88,2	52,9	88,2		76,5

* *cut-off* referenciado pelos *kits* comerciais (Roche), de acordo com o percentil 95 dos marcadores CA-125 e HE4 e especificidade de 75% para o algoritmo ROMA; para o marcador HE4 e algoritmo ROMA são referidos diferentes *cut-offs* de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); † *cut-off* estimado a partir do percentil 93,33% da distribuição dos níveis de HE4 em controlos saudáveis no presente estudo, e de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); ‡ *cut-off* estimado a uma especificidade de 75% estimada a partir das amostras em estudo, e de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); § *cut-off* sugerido em Moore *et al.* [119], de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; LR+/-, razões de verosimilhança positiva e negativa.

Tabela C - Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e LR+/- dos marcadores CA-125 e HE4 no diagnóstico de cancro de ovário (comparando mulheres CO com condições GB e controlos saudáveis).

	CA-125 (U/mL)	HE4 (pmol/L)		CA-125 + HE4		CA-125 ou HE4		
	valores de <i>cut-off</i>	< 35*	≤ 92,1/121*	≤ 59,3/94,7†	*	†	*	†
CO vs. (GB + Controlos)								
Conjunto								
Sensibilidade (%)	83,3	50,0	58,3	50,0	58,3	83,3	83,3	
Especificidade (%)	81,7	95,0	88,3	96,7	93,3	80,0	76,7	
VPP (%)	47,6	66,7	50,0	75,0	63,6	45,5	41,7	
VPN (%)	96,1	90,5	91,4	90,6	91,8	96,0	95,8	
LR +	4,55	10,00	5,00	15,02	8,75	4,17	3,57	
LR -	0,20	0,53	0,47	0,72	0,45	0,21	0,22	
Pós-Menopausa								
Sensibilidade (%)	90,9	54,6	63,6	54,6	63,6	90,9		
Especificidade (%)	85,7	96,4	92,9	96,4	92,9	85,7		
VPP (%)	71,4	85,7	77,8	85,7	77,8	71,4		
VPN (%)	96,0	84,4	86,7	84,4	86,7	96,0		
LR +	6,36	15,28	8,91	15,28	8,91	6,36		
LR -	0,10	0,47	0,39	0,47	0,39	0,10		
Pré-Menopausa								
Especificidade (%)	78,1	93,8	84,4	96,9	93,8	75,0	68,8	

* *cut-off* referenciado pelos *kits* comerciais (Roche), de acordo com o percentil 95 dos marcadores CA-125 e HE4; para o marcador HE4 são referidos diferentes *cut-offs* de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); † *cut-off* estimado a partir do percentil 93,33% da distribuição dos níveis de HE4 em controlos saudáveis no presente estudo, e de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; LR+/-, razões de verosimilhança positiva e negativa.

Tabela D - Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos marcadores CA-125 e HE4 no diagnóstico de cancro de ovário (comparando mulheres CO com controlos saudáveis).

	CA-125 (U/mL)	HE4 (pmol/L)		CA-125 + HE4		CA-125 ou HE4	
valores de <i>cut-off</i>	< 35*	≤ 92,1/121*	≤ 59,3/94,7†	*	†	*	†
CO vs. Controlos							
Conjunto							
Sensibilidade (%)	83,3	50,0	58,3	50,0	58,3	83,3	83,3
Especificidade (%)	96,7	100	93,3	100	96,7	96,7	93,3
VPP (%)	90,9	100	77,8	100	87,5	90,9	83,3
VPN (%)	93,6	83,3	84,9	83,3	85,3	93,6	93,3
Pós-Menopausa							
Sensibilidade (%)	90,9	54,6	63,6	54,6	63,6	90,9	
Especificidade (%)	93,3	100	93,3	100	93,3	93,3	
VPP (%)	90,9	100	87,5	100	87,5	90,9	
VPN (%)	68,1	75,0	77,8	75,0	77,8	68,1	
Pré-Menopausa							
Especificidade (%)	100	100	93,3	100		100	93,3

* *cut-off* referenciado pelos *kits* comerciais (Roche), de acordo com o percentil 95 dos marcadores CA-125 e HE4; para o marcador HE4 são referidos diferentes *cut-offs* de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); † *cut-off* estimado a partir do percentil 93,33% da distribuição dos níveis de HE4 em controlos saudáveis no presente estudo, e de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo.

Tabela E – Sensibilidade e especificidade dos marcadores CA-125 e HE4 no diagnóstico de condições ginecológicas benignas (comparando mulheres com condições GB e controlos saudáveis).

	CA-125 (U/mL)	HE4 (pmol/L)		CA-125 + HE4		CA-125 ou HE4		
		valores de <i>cut-off</i>	< 35*	≤ 92,1/121*	≤ 59,3/94,7†	*	†	*
GB vs. Controlos								
Conjunto								
Sensibilidade (%)	33,3	10,0	16,7	6,7	10,0	36,7	40,0	
Especificidade (%)	96,7	100	93,3	100	96,7	96,7	93,3	
Pós-Menopausa								
Sensibilidade (%)	23,1		7,7		7,7		23,1	
Especificidade (%)	93,3	100	93,3	100	93,3		93,3	
Pré-Menopausa								
Sensibilidade (%)	41,2	11,8	23,5	5,9	11,8	47,1	52,9	
Especificidade (%)	100	100	93,3	100	100	100	93,3	

* *cut-off* referenciado pelos *kits* comerciais (Roche), de acordo com o percentil 95 dos marcadores CA-125 e HE4; para o marcador HE4 são referidos diferentes *cut-offs* de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); † *cut-off* estimado a partir do percentil 93,33% da distribuição dos níveis de HE4 em controlos saudáveis no presente estudo, e de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa).

Tabela F – Comparação das médias séricas dos marcadores CA-125 e HE4 nos controlos saudáveis de acordo com o estado de menopausa. Os resultados encontram-se expressos nas suas médias e desvio-padrão.

	Pré-Menopausa	Pós-Menopausa	<i>P-value*</i> <i>(Mann-Whitney)</i>
CA-125 (U/mL)	12,1 ± 7,7	11,0 ± 7,8	0,694
HE4 (pmol/L)	43,8 ± 6,4	57,7 ± 15,3	0,003

*resultados estatisticamente significativos ($p < 0,050$) salientados a negrito.

Tabela G - Estudos metanalíticos selecionados dos marcadores tumorais CA-125 e HE4 no diagnóstico de cancro de ovário.

Marcadores Tumorais	Estudo	Valores de <i>cut-off</i>		Kit comercial ou método de ensaio		Sensibilidade (%) (IC95%)	Especificidade (%) (IC95%)
		HE4 (pmol/L)	CA-125 (U/mL)	HE4	CA-125		
CA-125	[173]					66 (62 a 70)	87 (85 a 89)
	[94]		28,89; 32,8; 35; 36; 55,1; 124; 69,8/21,7*		CMIA; EIA; ECLIA; ICMA; IRMA; xMAP	79 (74 a 84)	82 (77 a 87)
	[173]	51,6; 70; 72; 74,2; 150		ELISA; CMIA		80 (77 a 83)	92 (90 a 93)
HE4	[175]					74 (72 a 76)	89 (88 a 90)
	[110]	30;33,2;54,8; 67;67,3;70;72;74,2;85; 86; 112;118,9;139;140;150 ;70/140*		ELISA; CMIA; xMAP		78 (77 a 79)	86 (85 a 87)
	[94]	30,3; 72; 74,2;75,75; 89; 94,6; 118,9; 150; 41,6/96,9*; 70/140*		EIA; CMIA; xMAP		76 (72 a 80)	94 (90 a 96)
	[108]	70;72;73,7; 150	35; 93,15	Abbott/Architect; CanAg ELISA; Fujirebio ELISA; Luminex Multiplexed ELISA	Abbott/Architect; CanAg ELISA; Luminex Multiplexed ELISA; Roche Diagnostics	82 (78 a 86)	76 (72 a 80)
CA-125 ou HE4	[176]	46,15;70;72; 75;150	35	ELISA; EIA	ELISA; ECLIA	90 (87 a 92)	85 (82 a 87)

* valores de *cut-off* de acordo com o estado de menopausa (pré-menopausa/pós-menopausa); CMIA, *chemiluminescencemicroparticle immunoassay*; ECLIA, *electrochemiluminescence assay*; EIA, *enzyme immunoassay*; ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*; ICMA, *immunochemiluminometric assay*; IRMA, *immunoradiometric assay*; xMAP, *multianalyte profiling*; IC95%, Intervalo de confiança a 95%.

