



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DA UTILIDADE DE PARÂMETROS CINÉTICOS
DERIVADOS DO CA-125 NO ACOMPANHAMENTO DO
CANCRO EPITELIAL DO OVÁRIO**

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR APRESENTADA À FACULDADE DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

António João Sales Mano
2012

Trabalho desenvolvido sob orientação científica dos Professores Doutores Amílcar Falcão e Maria Margarida Caramona, no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia
no âmbito do programa PRAXIS XXI
(SFRH / BD / 3248 / 2000)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Amílcar Falcão pela orientação científica, pela sua notável disponibilidade, pelo constante incentivo, apoio e fundamentalmente pela amizade.

À Professora Doutora Margarida Caramona pela orientação científica, por todo o apoio, amizade e facilidades concedidas para a realização deste trabalho no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Ao Professor Doutor Carlos de Oliveira pela cedência da informação clínica das doentes do Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, pelos diversos convites feitos para a divulgação deste trabalho, pelo apoio e interesse evidenciados e pela estima e amizade demonstradas.

Ao Laboratório de Hormonologia e Monitorização de Fármacos do Serviço de Patologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, nas pessoas da Dr.^a Fátima Leitão e do Dr. Jorge Santos, pela cedência da informação do CA-125, pelo apoio e consideração demonstradas.

À Dr.^a Isabel Godinho (a título póstumo) o meu obrigado.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia agradeço o apoio financeiro sob a forma de uma bolsa de doutoramento.

(SFRH / BD / 3248 / 2000)

ÍNDICE

Resumo	13
Abstract	17
Lista de Abreviaturas	19
Lista de Tabelas	23
Lista de Figuras	27
1. Introdução	31
1.1. Cancro Epitelial do Ovário	33
1.1.1. Introdução	33
1.1.2. Diagnóstico e Estadiamento	36
1.1.3. Tratamento	39
1.1.3.1. Cirurgia	39
1.1.3.2. Quimioterapia	42
1.1.3.3. Radioterapia	49
1.1.3.4. Outras Terapias	49
1.1.4. Factores de Prognóstico	50
1.1.5. Biomarcadores Utilizados no Cancro Epitelial do Ovário	51
1.2. CA-125	52
1.3. Referências	57
2. Objectivo	65
3. Material e Métodos	69
3.1. População	71
3.2. Métodos Estatísticos Convencionais	74
3.2.1. Introdução	74

3.2.2. Avaliação de Testes de Classificação Binária (Análise de Sensibilidade e Especificidade)	74
3.2.3. Curvas ROC	76
3.2.4. Teste de Mann-Whitney.....	78
3.2.5. Teste de Kruskal-Wallis	81
3.2.6. Análise de Sobrevida - Curva de Kaplan-Meier	83
3.2.7. Análise de Sobrevida - Modelo de Risco Proporcional de Cox	87
3.3. Redes Neurais Artificiais.....	90
3.3.1. Introdução.....	90
3.3.2. Definição de Redes Neurais Artificiais	91
3.3.3. História Breve das Redes Neurais Artificiais	93
3.3.4. O Cérebro Biológico	94
3.3.5. O Neurónio Artificial.....	97
3.3.6. Topologia das Redes.....	105
3.3.7. Classificação das Redes Neurais Artificiais	107
3.3.8. Processos de Aprendizagem.....	108
3.3.9. O “STATISTICA Neural Networks”	111
3.4. Referências.....	113

**4. CA 125 half-life breakpoint between a “good” and
“poor” prognosis in patients with ovarian cancer** 115

4.1. Introduction	117
4.2. Material, Methods and Results.....	117
4.3. Discussion	119
4.4. References	121

5. CA-125 AUC as a new prognostic factor for patients with ovarian cancer	123
5.1. Introduction.....	127
5.2. Patients and Methods.....	128
5.3. Results	130
5.4. Discussion	138
5.5. References	141
6. CA-125 AUC robustness as a predictor for a complete response to primary chemotherapy in ovarian cancer: a multivariant analysis using ANN	143
6.1. Introduction.....	147
6.2. Patients and Methods.....	149
6.3. Results	153
6.4. Discussion	157
6.5. References	159
7. The Potential for the Rate of CA-125 Increase to Predict Ovarian Cancer Relapse	163
7.1. Introduction.....	167
7.2. Objective, Patients and Methods.....	168
7.3. Results	169
7.4. Discussion	173
7.5. References	176
8. CA-125 AUC as a predictor for epithelial ovarian cancer relapse	179
8.1. Introduction.....	183

8.2. Patients and Methods	185
8.3. Results.....	191
8.4. Discussion	196
8.5. References	201
9. Conclusões Finais	207
9.1. Referências.....	215

RESUMO

O cancro do ovário ocupa a posição cimeira no que diz respeito à mortalidade das neoplasias invasivas do aparelho genital feminino. O uso de marcadores tumorais é de enorme utilidade na prática clínica podendo ser utilizados em diferentes fases da doença, incluindo testes de rastreio, diagnóstico, factores de prognóstico, e para monitorizar o tratamento e/ou detecção de uma recaída.

Na prática clínica do cancro do ovário o marcador tumoral mais utilizado para monitorizar a evolução da doença é o CA-125.

O objectivo primário do trabalho proposto para a presente dissertação de doutoramento consistia no desenvolvimento de uma ferramenta informática capaz de melhorar a interpretação do CA-125, nomeadamente no que diz respeito à sua capacidade de prever a recidiva em doentes com cancro do ovário.

Ao longo do presente trabalho foram então testados vários parâmetros cinéticos descritores das concentrações do CA-125, tendo sido inclusivamente introduzido pela primeira vez um novo parâmetro, a área sob a curva do CA-125 normalizada pelo tempo.

Procurou-se numa primeira fase, estudar a cinética do CA-125 durante o tratamento primário com o objectivo de inferir sobre o prognóstico da doença e, numa fase posterior, estudar o comportamento do CA-125 após o tratamento primário com o objectivo da detecção da recidiva da doença.

Durante a fase de tratamento primário, o tempo de semi-vida do CA-125 é um dos parâmetros cinéticos mais estudados sendo um factor de prognóstico para o cancro do ovário. Com a nossa população

concluimos que com a determinação do tempo de semi-vida do CA-125 é possível classificar o prognóstico da doença. No entanto, a determinação numérica do tempo de semi-vida nem sempre era possível. Atendendo a esta limitação foi experimentado um novo parâmetro cinético: a área sob a curva do CA-125 normalizada pelo tempo (ASC).

A ASC do CA-125 apresenta vantagens sobre outros parâmetros cinéticos pois não assume qualquer condição sobre o valor sérico individual do CA-125 para o seu cálculo, como por exemplo a estabilização do CA-125 abaixo do seu valor normal, permitindo assim a sua determinação numérica sem quaisquer constrangimentos.

A ASC do CA-125 durante o tratamento primário, por estar estreitamente relacionada com uma resposta completa à quimioterapia adjuvante, pode permitir classificar numericamente o resultado do tratamento, especialmente útil na comparação de diferentes tipos de tratamento, nomeadamente em estudos prospectivos.

Na segunda fase do trabalho foi estudado o comportamento do CA-125 e qual a sua relação com a recidiva. Foram estudados a velocidade de aumento do CA-125 e a aplicação da ASC do CA-125 na detecção da recidiva.

Mais uma vez a aplicação da ASC do CA-125 apresenta vantagem sobre a velocidade de aumento (melhor exactidão e tempo médio até à recidiva mais consistente) e sem depender de nenhuma concentração individual do CA-125, havendo um efeito atenuante devido à variabilidade das concentrações do CA-125. E permitiu apresentar um tempo mediano até à recidiva muito superior ao

sugerido por Rustin e colaboradores (111 vs 63 dias), com valores de exactidão semelhantes (85% vs 88%), o que pode ter implicações clínicas de grande alcance.

Finalmente, importa salientar que os parâmetros cinéticos derivados do CA-125, com destaque para a ASC, podem ser utilizados em estudos clínicos prospectivos na comparação de novos tratamentos com os utilizados na actualidade, ou então servir para ajustar o modo como determinada doente deve ser acompanhada.

ABSTRACT

Ovarian cancer comes in first place when we consider mortality related to malignant neoplasms of the female reproductive tract. The use of tumour markers is very useful in clinical practice for screening, diagnostic and treatment monitoring purposes.

In clinical practice, CA-125 is the most commonly used tumour marker to monitor ovarian cancer progression.

Therefore, the primary aim of this doctoral thesis was the development of software to assist interpretation of CA-125, given that it is a very useful tool to predict recurrence within individuals with ovarian cancer.

Several kinetic parameters that relate to CA-125 concentrations were examined. For the first time, time-standardised area under the curve (AUC) of CA-125 was introduced as an additional parameter.

The primary objective was to analyse the kinetics of CA-125 during the initial stages of treatment to verify disease prognosis. Post-early treatment CA-125 was then studied in an attempt to predict cancer recurrence.

The half-life of CA-125 is one of the most closely investigated kinetic parameters during the initial stages of treatment. The half-life is also used to determine prognosis. However, it was not always possible to determine a precise half-life from our population data. For this reason, AUC was introduced as an additional parameter.

The advantage of CA-125 AUC is that its calculations do not require any assumption of individual CA-125 levels. Consequently it allows an accurate numerical classification.

During early treatment CA-125 AUC may permit a numerical classification of disease response following a course of adjuvant chemotherapy. This would prove useful when comparing different treatment regimens, particularly in prospective studies.

The second part of the overall investigation involved study of potential correlations between CA-125 and disease relapse. The increasing speed of CA-125 and the use of CA-125 AUC on relapse detection were both considered.

As before, CA-125 AUC provided benefits of greater calculation accuracy without assumption of individual CA-125 levels. This resulted in less data variability. It allowed us to calculate an average time to relapse that was higher than that suggested by Rustin et al (111 vs 63 days), with a similar degree of accuracy (85% vs 88%). This may have important implications for clinical practice.

Finally, it is important to say that kinetic parameters, which come from CA-125, such as AUC, may be used to evaluate novel treatments and ultimately revolutionise patient management.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADALINE	Adaptive linear element
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFP	Alpha-fetoproteína
AI	Artificial intelligence
ANNs	Artificial neural networks
ANOVA	Analysis of variance
ART	Adaptative resonance theory
ASC	Área sob a curva
AUC	Area under the curve
beta-HCG	Subunidade beta gonadotrofina coriônica humana
BP	Back-propagation
CA	Cancer antigen
CA-125	Cancer antigen 125
CR	Complete response
CT	Computed tomography
CUH	Coimbra University Hospitals
DNA	Deoxyribonucleic acid
DT	Doubling time
EDVAC	Electronic discrete variable automatic computer
ENIAC	Electronic numerical integrator and computer
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FN	False negative
FP	False positive
GOG	Gynecologic Oncology Group
HE4	Human epididymis protein 4
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2

ICON	International Collaborative Ovarian Neoplasm
LASA	Lipid-associated sialic acid
LMS	Least mean-square
M11	Monoclonal antibodies M11
MLP	Multilayer perceptron
MUC16	Mucin 16
NPV	Negative predictive value
OC125	Murine monoclonal antibody 125 (125 th antibody produced against the ovarian cancer cell line)
OV 197	Monoclonal antibodies OV 197
OVX1	Monoclonal antibody OVX1
PE	Processing elements
PET	Tomografia por emissão de positrões
PFS	Progression-free survival
PLCO	Prostate, lung, colorectal and ovarian
PPV	Positive predictive value
PR	Partial response
RBF	Radial basis function networks
RD	Residual disease
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROC	Receiver operator characteristic
SE	Standard error
SQL	Structured query language
$t_{1/2}$	Tempo de semi-vida
TAC	Tomografia axial computadorizada
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNM	Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos [Tamanho do tumor (T), grau de extensão aos nódulos linfáticos (N) e presença de metástases distantes (M)]
UICC	Union for International Cancer Control

UKCTOCS UK collaborative trial of ovarian cancer screening
VLSI Very large scale integration
WFDC2 WAP four-disulfide core domain 2 gene
WR Without response

LISTA DE TABELAS

1. Introdução

Tabela 1.1 - Classificação FIGO para os cancros do ovário.....	38
Tabela 1.2 - Relação entre a classificação FIGO com a classificação TNM.....	39
Tabela 1.3 - Agentes citotóxicos mais comuns na quimioterapia do cancro epitelial do ovário	43

3. Material e Métodos

Tabela 3.1 - Tabela de contingência onde estão registados os resultados que relacionam os resultados de um teste com uma dada condição	75
Tabela 3.2 - Comparação entre o sistema biológico e artificial	104
Tabela 3.3 - Comparação entre termos utilizados em estatística e redes neuronais artificiais	104

4. CA 125 half-life breakpoint between a “good” and “poor” prognosis in patients with ovarian cancer

Table 4.1 - Overall survival for the different prognostic group concerning the $t_{1/2}$ breakpoint.....	120
---	-----

5. CA-125 AUC as a new prognostic factor for patients with ovarian cancer

Table 5.1 - Summary of patient characteristics.....	133
Table 5.2 - CA-125 AUC behaviour among patients according to several covariates.....	134

Table 5.3 - Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and accuracy of several CA-125 AUC cut-offs for predicting the patient final state, overall survival and chemotherapy complete response	136
Table 5.4 - Cox proportional hazard model results for CA-125 AUC as an independent factor for predicting patient overall survival	137

6. CA-125 AUC robustness as a predictor for a complete response to primary chemotherapy in ovarian cancer: a multivariant analysis using ANN

Table 6.1 - Input and output variables conversion used in the artificial neural network models	150
Table 6.2 - Summary of patient characteristics	154
Table 6.3 - Input combinations used for each ensemble	155
Table 6.4 - Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), false positive (FP) rate, false negative (FN) rate and accuracy for each ensemble tested to predict a complete chemotherapy response	156
Table 6.5 - Rank of each variable given by the sensitivity analysis performed on each ensemble.....	156

7. The Potential for the Rate of CA-125 Increase to Predict Ovarian Cancer Relapse

Table 7.1 - Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and accuracy for several CA-125 increase rate cut-offs to predict ovarian cancer patient relapse	172
--	-----

8. CA-125 AUC as a predictor for epithelial ovarian cancer relapse

Table 8.1 - Increase factors (F) used in Criterion A 192

Table 8.2 - Summary of patient characteristics..... 193

Table 8.3 - Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV),
negative predictive value (NPV), false positives (FP %),
false negatives (FN %) and accuracy achieved for each
criterion 194

Table 8.4 - Lead time to recurrence using the best accuracies
for each criterion 196

LISTA DE FIGURAS

1. Introdução

Figura 1.1 - Estrutura proposta da molécula de CA-125..... 54

3. Material e Métodos

Figura 3.1 - Ecrã principal da aplicação “Filtra Dados” 72

Figura 3.2 - Fluxograma da recolha e tratamento dos dados 73

Figura 3.3 - Exemplo de uma curva ROC..... 77

Figura 3.4 - Exemplo de uma curva ROC estimada, também designada por curva ROC não paramétrica..... 78

Figura 3.5 - Exemplo de uma curva de sobrevivência obtida pelo método de Kaplan-Meier..... 85

Figura 3.6 - Representação em diagrama do sistema nervoso 95

Figura 3.7 - Ilustração de um neurónio biológico..... 96

Figura 3.8 - Modelo de um neurónio artificial..... 98

Figura 3.9 - Gráfico da função limiar..... 99

Figura 3.10 - Gráfico da função tipo rampa com $a=2$ 100

Figura 3.11 - Gráfico da função logística com $a=1$ 101

Figura 3.12 - Gráfico da função tangente hiperbólica..... 102

Figura 3.13 - Modelo de um neurónio artificial no qual está representada o “bias” 103

Figura 3.14 - Representação gráfica de uma rede neuronal artificial com uma camada de entrada (com quatro neurónios artificiais); duas camadas ocultas (uma com seis e outra com cinco neurónios) e uma camada de saída (com apenas um neurónio) 105

4. CA 125 half-life breakpoint between a “good” and “poor” prognosis in patients with ovarian cancer

Figure 4.1 - Survival curve (Kaplan-Meier) in agreement with CA-125 half-life breakpoint of 16 days 119

5. CA-125 AUC as a new prognostic factor for patients with ovarian cancer

Figure 5.1 - CA-125 AUC hypothetical determination in a patient with ovarian cancer treated with first line chemotherapy after cytoreductive surgery; (A) patient with an optimal CA-125 serum levels evolution during treatment; (B) patient with an unstable CA-125 serum levels during treatment 129

Figure 5.2 - CA-125 Mean plot according to patients FIGO Tumor Stage 135

Figure 5.3 - CA-125 Mean plot according to patient response to primary chemotherapy..... 135

Figure 5.4 - Survival function for hypothetical CA-125 AUC values..... 137

6. CA-125 AUC robustness as a predictor for a complete response to primary chemotherapy in ovarian cancer: a multivariant analysis using ANN

Figure 6.1 - Multilayer perceptron (MLP) network model for each member in the ensemble formation (3 inputs connected to 6 input neurons, one hidden layer with 3 neurons and 1 output neurons connected to 1 output) 152

Figure 6.2 - Response graph for ensemble 2 prediction of a complete response to chemotherapy test using CA-125 AUC value as an independent continuous variable 157

7. The Potential for the Rate of CA-125 Increase to Predict Ovarian Cancer Relapse

Figure 7.1 - Mean CA-125 increase rate in patients with or without relapse 171

Figure 7.2 - ROC curve CA-125 increase rate to predict patient relapse 171

8. CA-125 AUC as a predictor for epithelial ovarian cancer relapse

Figure 8.1 - Hypothetical CA-125 evolution after primary treatment of patient with ovarian cancer 190

Figure 8.2 - Algorithm for implementation of both criteria (A and B) in clinical practice..... 200

1. INTRODUÇÃO

1.1. CANCRO EPITELIAL DO OVÁRIO

1.1.1. Introdução

Os cancros epiteliais do ovário são tumores constituídos por um ou mais tipos de epitélio e estroma em combinações variadas. A maioria destes tumores é derivada do epitélio de revestimento do ovário e representam aproximadamente 90% de todas as neoplasias invasivas primitivas do ovário. Para além dos tumores epiteliais do ovário podemos encontrar tumores de células germinais, tumores do estroma gonádico (cordões sexuais – mesenquimatosos), gonadoblastoma, tumores não específicos do ovário, tumores metastáticos e sarcomas. Histologicamente, os tumores epiteliais do ovário classificam-se em tumores serosos, mucinosos, endometrióides, mesonéfricos e carcinomas concomitantes [1].

Em termos epidemiológicos, a incidência do cancro epitelial do ovário é mais alta na Europa, Estados Unidos e Israel e mais baixa no Japão e países em desenvolvimento [2].

De acordo com a *American Cancer Society* (“*Global Cancer Facts & Figures. 2011; 2nd Edition*”) a incidência ajustada para a idade nos países desenvolvidos é de 9,4 por 100.000 mulheres com uma mortalidade ajustada para a idade de 5,1 por 100.000 mulheres em contraste com os países em desenvolvimento em que a incidência ajustada para a idade é de 5,0 por 100.000 mulheres com uma mortalidade ajustada para a idade de 3,1 por 100.000 mulheres [3].

O cancro do ovário ocupa a posição cimeira no que diz respeito à mortalidade no grupo das neoplasias invasivas do aparelho genital

feminino atingindo preferencialmente mulheres peri- e pós-menopáusicas [1].

Vários factores influenciam o risco de aparecimento de cancro do ovário [1, 4, 5].

Como factores protectores temos:

- a) O uso de contraceptivos orais apresenta um forte efeito protector, que se acentua com a maior duração da sua administração;
- b) Paridade, sendo que mulheres múltiparas apresentam um decréscimo de risco para o cancro do ovário em comparação com as nulíparas;
- c) Lactação com um efeito de protecção menor.

Como factores que amplificam o risco temos:

- a) História familiar. Trata-se de um dos factores de risco mais importantes para o aparecimento do cancro do ovário. Aproximadamente 5-10% de todos os cancros do ovário estão associados a uma predisposição genética. Mulheres com uma história familiar de cancro da mama e/ou do ovário, especialmente numa idade mais jovem, pode indicar várias mutações genéticas nos genes supressores tumorais BRCA1 e/ou BRCA2, com os produtos de ambos estando envolvidos na reparação do DNA.
- b) Idade;
- c) Ovulação;
- d) Nuliparidade;
- e) Obesidade;

Observações epidemiológicas servem de base para diferentes teorias que tentam explicar a etiopatologia do cancro epitelial do

ovário. Existem quatro hipóteses major que em conjunto suportam a explicação da carcinogénese do cancro do ovário [1, 6]:

- a) Hipótese da “ovulação incessante”, segundo a qual, de acordo com Fathalla [7], a rotura continuada do epitélio do ovário e sua reparação por ocasião da ovulação seria responsável pela transformação maligna;
- b) Hipótese de hipergonadotrofismo, segundo a qual uma exposição excessiva do epitélio do ovário à gonadotrofina leva à transformação maligna;
- c) Hipótese hormonal, a qual descreve as várias influências hormonais, negativas ou protectoras, a que o epitélio do ovário está sujeito;
- d) Hipótese inflamatória, para a qual o processo ovulatório se assemelha a uma reacção inflamatória com infiltração de leucócitos e produção de mediadores inflamatórios como citocinas associadas à remodelação tecidual.

Sem sintomas clínicos específicos e sem um teste de rastreio, o cancro do ovário é na maioria das vezes diagnosticado num estado avançado originando uma mortalidade elevada. Apesar de amplamente utilizado durante o seguimento da doente com cancro do ovário, o marcador CA-125 não apresenta especificidade e sensibilidade suficiente para ser utilizado isoladamente como teste de rastreio pois apenas 50% das doentes no estágio I apresentam um valor sérico de CA-125 elevado. Esta elevação também pode ocorrer em situações benignas ou em outras patologias [8]. Vários estudos clínicos randomizados estão em curso, com destaque para o *UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening* (UKCTOCS) [9] e o *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial* [10] os quais combinam o uso do CA-125 com ecografia com sonda vaginal.

O uso combinado de vários biomarcadores é uma das estratégias seguidas para melhorar a detecção antecipada da doença [11-14].

Mais recentemente, com o desenvolvimento da tecnologia genómica e proteómica, vários estudos estão em curso para sinalizar e integrar informação produzida por estas técnicas nos ensaios clínicos e em particular no rastreio do cancro do ovário [15-17].

1.1.2. Diagnóstico e Estadiamento

Aproximadamente 90% das mulheres diagnosticadas com cancro do ovário apresentam sinais e sintomas meses antes do diagnóstico, no entanto, não são específicos [1, 18]. Entre outros, estes sintomas podem incluir [2]:

- a) Dilatação, pressão ou desconforto abdominal;
- b) Dor abdominal;
- c) Anorexia, perda de apetite, perda de peso não intencional;
- d) Dores nas costas;
- e) Diarreia;
- f) Fadiga;
- g) Saciedade rápida;
- h) Intolerância gástrica;
- i) Náuseas, vômitos, flatulência;
- j) Dor pélvica;
- k) Dor rectal;
- l) Dificuldades respiratórias;
- m) Disúria.

Nas mulheres pós-menopáusicas o ovário torna-se não palpável, pelo que um ovário palpável deve ser investigado não obstante apenas 10% estarem associados ao cancro do ovário. Mulheres mais

jovens com um ovário quístico e com diâmetro superior a 5cm deverão igualmente ser investigadas [1].

O diagnóstico antecipado pode ser possível, se houver um reconhecimento da combinação de sintomas aparentemente não relacionados [19]. Sintomas mais graves e frequentes que o esperado devem ser investigados pois podem estar associados a massas ováricas benignas ou malignas [20].

Normalmente o diagnóstico do cancro do ovário requer laparotomia exploratória. Se na base da história e exame clínico, existirem suspeitas de cancro epitelial do ovário, uma ecografia endovaginal é normalmente aconselhada. Na presença de quistos complexos no ovário a biopsia percutânea não se deve realizar sob risco de derramamento do tumor sendo necessária uma cirurgia para definir o diagnóstico [2].

A laparoscopia aberta como ferramenta de diagnóstico, pode ser útil para avaliar a extensão da doença com estágio avançado, permitindo avaliar as doentes que puderem ser sujeitas a cirurgia de citorredução e com melhorias na taxa de citorredução óptima [21].

A utilização da tomografia por emissão de positrões (PET) combinada com a tomografia axial computadorizada (TAC) (PET-TAC ou PET/CT) parece ser superior à ecografia pélvica, à TAC abdomino-pélvica e à ressonância magnética nuclear (RMN) pélvica no diagnóstico do cancro do ovário [22].

Apesar de exames imagiológicos poderem, até certo ponto, detectar a extensão intra-abdominal da doença, o estadiamento do cancro do ovário é cirúrgico e utiliza-se a classificação da *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) de acordo com

os procedimentos descritos em “*Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecologic Cancers*” [23] (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Classificação FIGO para os cancros do ovário.

Estádio	Características Tumorais
I	Tumor limitado aos ovários
Ia	Tumor limitado a um ovário; cápsula intacta; ausência de tumor na superfície ovárica
Ib	Tumor limitado a ambos os ovários; cápsula intacta; ausência de tumor na superfície ovárica
Ic	Tumor limitado a um ou a ambos os ovários com: cápsula rota e/ou tumor na superfície ovárica e/ou células neoplásicas na ascite ou no lavado peritoneal
II	O tumor envolve um ou ambos os ovários com extensão pélvica
IIa	Extensão e/ou implantes no útero e/ou trompa
IIb	Extensão a outras estruturas pélvicas
IIc	IIa ou IIb com vegetações externas nos ovários (uni ou bilateral) ou cápsula rota ou ascite com células malignas ou lavado peritoneal positivo para células tumorais.
III	O tumor interessa um ou ambos os ovários com metástases peritoneais confirmadas fora da pélvis e/ou metástases ganglionares
IIIa	Metástases peritoneais microscópicas para além da pélvis
IIIb	Metástases peritoneais macroscópicas fora da pélvis ≤ 2 cm na sua maior dimensão
IIIc	Metástases peritoneais fora da pélvis > 2 cm na maior dimensão e/ou metástases nos gânglios regionais ou inguinais*
IV	Metástases à distância (metástases peritoneais excluídas)

*Metástases na cápsula hepática correspondem ao estágio III e metástases no parênquima hepático representam estágio IV. Para poder ser considerado como estágio IV o derrame pleural deverá ter uma citologia positiva.

É também útil a classificação TNM [tamanho do tumor (T), grau de extensão aos nódulos linfáticos (N) e presença de metástases distantes (M)] da *Union for International Cancer Control* (UICC) e a sua ligação com a classificação da FIGO (Tabela 1.2).

Na suspeita de cancro do ovário, as doentes devem ser referenciadas para centros especializados com a intervenção de ginecologistas oncológicos [24].

Considera-se doença inicial um tumor classificado do estágio I a IIa e doença avançada dos estágios IIb a IV

Tabela 1.2 - Relação entre a classificação FIGO com a classificação TNM

FIGO	UICC TNM
Ia	T1a+N0+M0
Ib	T1b+N0+M0
Ic	T1c+N0+M0
IIa	T2a+N0+M0
IIb	T2b+N0+M0
IIc	T2c+N0+M0
IIIa	T3a+ N0+M0
IIIb	T3b+ N0+M0
IIIc	T3c+ N0+M0 ou qualquer T+N1+M0
IV	qualquer T+ qualquer N+M1

1.1.3. Tratamento

1.1.3.1. Cirurgia

A cirurgia representa o primeiro passo de quase todos os protocolos terapêuticos, seja realizada com objectivo de diagnóstico, terapêutico ou para remoção tumoral máxima [1].

A cirurgia citorrredutora primária, para além do estadiamento, tem como objectivo a máxima redução tumoral, de modo a que as lesões residuais sejam tão pequenas quanto possível.

A teoria por detrás da citorredução tumoral está na curva Gompertziana do crescimento tumoral (curva sigmoide) segundo a qual, quando os tumores são pequenos, a taxa de crescimento é maior, o mesmo acontecendo com a taxa de morte celular. Em teoria, a remoção máxima do tumor aumenta as hipóteses de resposta à quimioterapia [25]. Tumores volumosos com irrigação sanguínea

insuficiente ou zonas tumorais com crescimento celular lento, são insensíveis a fármacos citotóxicos. Nos tumores pequenos bem perfundidos e com crescimento celular aumentado a difusão de agentes quimioterapêuticos é maior, resultando num aumento da sua eficácia e com uma necessidade de um menor número de ciclos de quimioterapia e com redução da resistência aos fármacos citotóxicos. A remoção de tumores volumosos teoricamente também melhora a resposta imune e com uma melhoria sintomática das doentes [1, 25, 26].

Uma cirurgia citorredutora implica a remoção de mais de 90% do tumor, no entanto tal só é possível em 40% das doentes com doença peritoneal no estágio III [1].

Doença residual é definida como sendo o maior diâmetro da maior massa tumoral que permanece após cirurgia de citorredução. O termo “citorredução óptima” tem sofrido alterações ao longo das últimas décadas com um *cut-off* a variar entre 0 e 3 cm [27].

De acordo com o *Gynecologic Oncology Group* (GOG), considera-se uma citorredução óptima quando as maiores lesões tumorais são inferiores a 1 cm.

Vários ensaios clínicos demonstraram que a citorredução óptima trás benefícios na resposta à quimioterapia e sobrevivência global [25, 26].

No cancro do ovário não avançado, o uso da laparoscopia é uma técnica segura e efectiva com uma sobrevivência global aceitável [28].

Estudos recentes mostram que procedimentos cirúrgicos cujo alvo é a doença localizada na parte superior do abdómen, aumenta significativamente a taxa de citorredução óptima sem o aumento do risco de complicações [27].

Vários estudos indicam que sendo o objectivo final da cirurgia de citorredução a eliminação total da doença residual visível, ocorre um aumento da sobrevivência global [25].

A introdução e a definição de indicadores de qualidade podem ser usados para monitorizar e melhorar a qualidade da cirurgia no cancro do ovário [29].

A cirurgia primária radical pode ser usada em doentes com cancro avançado com disseminação extensa mas não existem estudos que demonstrem maior sobrevivência e com uma morbilidade maior e pior qualidade de vida.

A cirurgia conservadora é praticada somente em mulheres férteis com menos de 30 anos de idade e se a doente desejar preservar a fertilidade, não tiver história de cancro hereditário do ovário e se a neoplasia se encontrar num estágio Ia [1].

Na recidiva, o papel da cirurgia de citorredução é controverso pela ausência de estudos prospectivos. No entanto, vários estudos retrospectivos mostram uma melhoria na sobrevivência global com o uso da cirurgia de citorredução na recidiva da doença [25, 30].

Assim, a cirurgia de citorredução deve ser considerada em caso de recidiva se for possível uma citorredução óptima.

A cirurgia de “second-look”, realizada por laparotomia, está indicada em doentes num contexto de ensaios clínicos, visto que não contribui para o aumento da sobrevivência e tem como objectivo definir o estado da doença tumoral. Nem todos os estudos suportam citorredução na cirurgia de “second-look” [30].

Cirurgia de citorredução de intervalo (cirurgia de intervalo), realizada após resposta à quimioterapia neoadjuvante ou em doentes a meio de quimioterapia adjuvante é controversa no que toca à melhoria da sobrevivência global [26, 30].

1.1.3.2. Quimioterapia

Como a grande maioria dos cancros do ovário são epiteliais, estes são relativamente mais sensíveis aos fármacos citotóxicos que noutros tumores sólidos. A maioria das mulheres requer quimioterapia adjuvante após cirurgia de citorredução e de estadiamento. Historicamente, durante as últimas décadas vários ensaios clínicos levaram à adopção de um regime terapêutico padrão baseado na combinação de carboplatina e paclitaxel. Esta escolha decorre de vários ensaios randomizados controlados e da descoberta e síntese de vários agentes citotóxicos. Durante a década de 50 ocorre a síntese dos agentes alquilantes clorambucilo e melfalano com a sua aplicação isolada nos anos 60. Durante as décadas de 70 e de 80 ocorre o desenvolvimento da cisplatina e da carboplatina respectivamente, ocorrendo ensaios que comparam a eficácia destes agentes. Na década de 90 ocorre a introdução do paclitaxel e a realização de estudos de combinação deste agente com os compostos de platina (Tabela 1.3). Apesar do desenvolvimento dos vários agentes citotóxicos e da realização de vários ensaios clínicos, existe ainda controvérsia e debate sobre as doses a administrar e a via de administração [31-33].

Tabela 1.3 - Agentes citotóxicos mais comuns na quimioterapia do cancro epitelial do ovário.

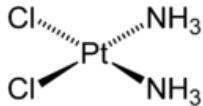
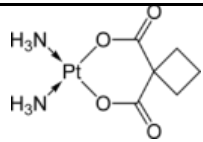
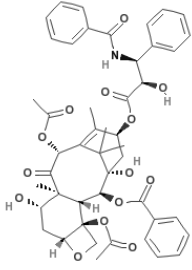
Década	70
Agente	<p style="text-align: center;">Cisplatina</p> 
Mecanismo de acção	<p>Efeito citotóxico é causado por alterações na transcrição e replicação, induzindo a apoptose. Este mecanismo é devido à ligação ao ADN, com formação de ligações intra e intercadeias com alterações estruturais no ADN.⁽¹⁾</p>
Ensaio Clínicos ⁽⁴⁾	<p>Agentes alquilantes vs. cisplatina Cisplatina isolada vs. cisplatina combinada</p>
Década	80
Agente	<p style="text-align: center;">Carboplatina</p> 
Mecanismo de acção	O mesmo da cisplatina
Ensaio Clínicos ⁽⁴⁾	<p>Carboplatina vs. cisplatina Carboplatina isolada vs carboplatina combinada Via endovenosa vs. via intraperitoneal</p>

Tabela 1.3 - Continuação

Década	90 Paclitaxel
Agente	 <p>(2)</p>
Mecanismo de acção	O paclitaxel liga-se aos microtubulos interrompendo o ciclo celular na parte final da fase G2 e na fase M inibindo a replicação celular. ⁽³⁾
Ensaio Clínicos ⁽⁴⁾	Combinação platina com paclitaxel vs. combinações de platina sem taxanos Carboplatina com paclitaxel vs. cisplatina com paclitaxel

(1) [34]; (2) <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; (3) [35] (4) adaptado de [31]

Vários ensaios mostram que a carboplatina apresenta a mesma eficácia que a cisplatina, no entanto, regimes com carboplatina são melhores tolerados devido ao seu perfil toxicológico, com redução da toxicidade no aparelho auditivo, rim e sistema nervoso. Apresenta também menos náuseas e vômitos [1, 31, 32].

Devido à carboplatina ser excretada maioritariamente pela urina, a exposição sistemática depende da função renal. Assim, para o doseamento da carboplatina utiliza-se a fórmula de Calvert, na qual se tem em conta a taxa de filtração glomerular e a área sob a curva concentração/tempo [dose carboplatina (mg) = ASCxTFG+25].

Na década de 90, com a descoberta dos taxanos nomeadamente do paclitaxel, o tratamento do cancro do ovário sofre um avanço significativo. Ensaios de fase II demonstraram que o paclitaxel era activo na recaída do cancro do ovário, mesmo nos casos de recaídas poucos meses após a administração do tratamento com cis ou carboplatina.

Como resultado de vários estudos, a combinação de carboplatina com paclitaxel é a terapia padrão de primeira linha para a quimioterapia adjuvante no cancro do ovário, com o paclitaxel a ser administrado com uma dose de $175\text{mg}/\text{m}^2$ durante 3 horas, seguido da carboplatina doseada pela fórmula de Calvert com uma ASC entre 5,0 a 7,5 durante 1 hora e normalmente em 6 ciclos de 3 semanas [4, 31].

A combinação cisplatina, paclitaxel e doxorrubicina demonstrou uma melhoria marginal no intervalo livre de doença mas sem benefícios na sobrevivência global quando comparado com o regime carboplatina-paclitaxel [36].

Apesar do tratamento padrão levar a uma remissão completa na maioria das doentes, é estimado que 50% irão sofrer uma recidiva [32].

Como visto anteriormente, devido à falta de testes de rastreio e sintomas específicos, a maioria das mulheres com cancro do ovário é diagnosticada num estágio avançado. Na doença inicial, apesar da cura cirúrgica ser efectiva, na maioria das vezes, ainda ocorrem um número elevado de recidivas. A quimioterapia adjuvante nestes casos ainda é controversa. De acordo com estudos do *International Collaborative Ovarian Neoplasm* (ICON) e da *European Organisation*

for Research and Treatment of Cancer (EORTC) a quimioterapia na doença inicial é capaz de diminuir o risco de recidiva e prolongar a sobrevivência global. No entanto, mulheres no estágio Ia ou Ib, sem tipo histológico células claras, tumores bem diferenciados (G1) e sujeitas a uma citorredução ótima, não apresentam benefícios resultantes da quimioterapia. Em todos os casos restantes a quimioterapia adjuvante está indicada com um regime de carboplatina ou a combinação de carboplatina com paclitaxel [33] e a introdução de 6 ciclos em vez de 3 ciclos de quimioterapia nas doentes de alto risco para o cancro do ovário mas com doença inicial pode reduzir a recidiva [37].

Apesar da aceitação do tratamento corrente, existem várias questões pendentes:

- a) A adição de mais agentes citotóxicos;
- b) Substituição do paclitaxel por outro taxano como o docetaxel;
- c) O número de ciclos e a via de administração;
- d) Duração do tratamento e administração de terapia de manutenção;

Nas mulheres mais idosas e com cancro do ovário avançado deve ser feito um esforço na utilização de quimioterapia baseada nas combinações de platina [38]. A redução de dose carboplatina-paclitaxel pode ser melhor tolerada com igual eficácia e a idade e vários parâmetros geriátricos devem ser considerados na dosagem da quimioterapia nas doentes idosas [39].

O cancro do ovário, durante a sua evolução fica confinado ao abdómen fazendo com que a administração dos agentes citotóxicos por via intraperitoneal seja em teoria atractiva pois permite a chegada de uma maior concentração do agente às células tumorais [31, 40].

As propriedades farmacocinéticas do paclitaxel e cisplatina variam quando são administradas por via intraperitoneal com uma concentração e tempo de semi-vida superiores na cavidade peritoneal [40]. Esta via de administração tem evoluído ao longo dos anos com vários estudos a indicarem melhorias até 30% no intervalo livre de doença e sobrevivência global. No entanto, existem críticas a estes ensaios e esta opção não tem sido universalmente aceite por vários motivos [2, 40-44]:

- a) Maiores efeitos tóxicos com pior aceitação das doentes;
- b) Problemas técnicos com o uso e manutenção do cateter;
- c) Infecções;
- d) Outras complicações como adesões intraperitoneais;
- e) Regime óptimo e números de ciclos ainda não estabelecidos.

A via intraperitoneal para ser mais praticável, pode requerer medidas de suporte como hidratação programada e introdução de factor estimulante das colónias de granulócitos [45].

Está ainda em investigação o uso de quimioterapia intraperitoneal hipertérmica com objectivo de atrasar o desenvolvimento da doença e prolongar a sobrevivência [46-48].

Quimioterapia de manutenção pode melhorar os resultados clínicos no cancro do ovário mas é necessária investigação adicional para demonstrar vantagens na sobrevivência tendo em conta o impacto na utilização de recursos e qualidade de vida [49].

Apesar de elevadas taxas de resposta à quimioterapia adjuvante a maioria das mulheres sofre recidiva sendo uma grande proporção delas sujeita a nova quimioterapia. No entanto a sensibilidade à platina (com a medição do intervalo livre de platina) não é uma regra

biológica que segue um padrão temporal exacto. Assim, podemos considerar vários grupos [33, 50]:

- a) Doentes sensíveis à platina: doentes nas quais a recidiva ocorreu num período superior a 12 meses após a conclusão do tratamento inicial. Neste caso a terapêutica consiste na administração em associação de derivados de platina.
- b) Doentes parcialmente sensíveis à platina: quando a recaída ocorre num período entre 6 a 12 meses após o tratamento inicial. Neste caso o tratamento padrão ainda não é definido.
- c) Doentes resistentes à platina: quando a recaída se dá num período inferior a 6 meses após a conclusão do tratamento inicial.

Designa-se por doença refractária como aquela onde ocorre progressão da doença ainda durante o tratamento inicial.

Nas doentes parcialmente sensíveis ou resistentes à platina podem ser usados outros agentes citostáticos, normalmente em monoterapia. Entre outros, podemos incluir neste grupo o paclitaxel (caso não tenha sido usado anteriormente), doxorubicina liposómica, topotecam, gemcitabina, decetaxel, eposido oral, trabectedina, ifosfamida, altretamina (hexametilmelamina), pemetrexed [33, 50-52]. A combinação de bevacizumab, platina e gemcitabina também foi estudada mas com altos perfis de toxicidade [53]. A importância do intervalo livre de paclitaxel deve também ser avaliada em estudos futuros [54]. Em geral e quando possível estas doentes são incluídas em ensaios clínicos.

Vários mecanismos podem estar envolvidos na resistência à cisplatina ou à carboplatina. Entre eles podemos incluir: excesso de

um factor de resistência; saturação, mutação ou alteração dos factores requeridos na morte da célula; diminuição do fluxo sanguíneo às células tumorais; condições extracelulares; redução da absorção da platina nas células; desintoxicação intracelular (ex. via glutathiona); diminuição da ligação ao ADN (ex. o aumento do pH intracelular); reparação do ADN; diminuição dos erros de reparação de ADN; apoptose imperfeita; aumento de factores antiapoptose; efeitos sobre várias vias de sinalização celular; presença de células quiescentes [55].

1.1.3.3. Radioterapia

A radioterapia não está indicada no tratamento adjuvante do cancro do ovário. Após vigilância de longo prazo, doentes com doença inicial e tratadas com radioterapia abdominal total adjuvante, mostrou toxicidade gastrointestinal prolongada [56]. No entanto o papel da radioterapia no cancro avançado deve ser investigado em ensaios clínicos prospectivos e randomizados [57]. Estudos mais recentes defendem a utilização da radioterapia abdominal total após cirurgia e quimioterapia baseada em platina, por permitir um maior controlo da doença em regiões localizadas com um risco aceitável de toxicidade aguda [58].

Onde a radioterapia se pode destacar é no controlo paliativo dos sintomas da doente sintomática com diminuição da dor e hemorragia [59].

1.1.3.4. Outras Terapias

O papel do tratamento hormonal é indefinido com poucos ensaios clínicos randomizados. Pode no entanto ter um perfil de toxicidade

melhor que a quimioterapia e pode ser usado na doença terminal para fins paliativos.

A imunoterapia é uma área em desenvolvimento pois as células cancerígenas do ovário expressam várias proteínas antigénicas que poderão servir como potenciais alvos terapêuticos.

Terapia genética, inibidores da transdução de sinal e inibidores da angiogénese são também investigações em curso [4, 60, 61].

1.1.4. Factores de Prognóstico

O cancro do ovário é caracterizado pelo seu comportamento biológico diverso, desde tumores com um excelente prognóstico até tumores com um prognóstico muito reservado [1]. Vários elementos clínicos, biológicos, patológicos e cirúrgicos podem ser utilizados como factores de prognóstico para o cancro do ovário.

Um dos mais importantes factores de prognóstico é o estágio FIGO no diagnóstico, revelando assim a importância da sua correcta aferição. Um outro factor de prognóstico independente para a sobrevivência é a doença residual após cirurgia citorrredutora [62-66].

O grau histológico, em conjunto com o estágio, pode também ser importante para antever a sobrevivência. O tipo histológico geralmente não apresenta significância prognóstica excepto nos tumores de células claras e de células pequenas, que estão associados a um pior prognóstico [62].

As características das doentes, como a idade e o índice de performance (*performance status*) são também importantes e estão correlacionados com o resultado da doença [62], enquanto a co-

morbilidade aparentemente não apresenta um efeito no prognóstico [67].

Vários parâmetros cinéticos e a concentração sérica do marcador tumoral CA-125 apresentam-se como factores de prognóstico incluindo a taxa de regressão durante a quimioterapia neoadjuvante, o tempo de semi-vida do CA-125 ou o tempo de normalização do CA-125 durante o tratamento primário e a concentração sérica pós operatória [68-73].

Além do CA-125 outros biomarcadores séricos, tecidulares e genéticos são incluídos em investigações para aferir do seu potencial na utilização clínica como factores de prognóstico para o cancro epitelial do ovário [74].

1.1.5. Biomarcadores Utilizados no Cancro Epitelial do Ovário

O uso de biomarcadores (marcadores tumorais, no caso do cancro) é de enorme utilidade na prática clínica podendo ser utilizados em diferentes fases da doença, incluindo testes de rastreio, diagnóstico, factores de prognóstico, e para monitorizar o tratamento e/ou detecção de uma recaída [75].

Na prática clínica do cancro do ovário o marcador tumoral mais utilizado para monitorizar a evolução da doença é o CA-125. No entanto muitos outros biomarcadores estão sob investigação separada ou em conjunto com o CA-125. Entre eles podemos encontrar glicoproteínas como o CA 15-3, CA 72-4, CA 19-9, ácidos siálicos associados a lípidos (*LASA*) e OVX1. Demonstrou-se que a amplificação do gene HE4 (*WFDC2*) ocorre no carcinoma do ovário [76], estando em curso estudos sobre a sua aplicação na monitorização no cancro epitelial do ovário [77]. A alpha-fetoproteína

(AFP), beta-HCG e a concentração sérica de inibinas podem ser igualmente úteis em determinados tipos de cancro do ovário [78].

Como marcadores podemos também encontrar citocinas, calicreínas humanas, factor de crescimento do endotélio vascular, D-Dímero, proteínas reguladoras do ciclo celular e da apoptose (ciclina D, ciclina E, p53, Cip/Kip, entre outras), telomerase transcriptase reversa, receptores tirosina cinase e metaloproteinases da matriz [79].

Muitos destes marcadores são expressos em outros tipos de cancro ou outras patologias, tornando difícil a sua aplicação específica e isolada.

Com o evento da genómica e proteómica e a possibilidade de estudar qualitativamente e quantitativamente proteínas expressas em células cancerígenas de um modo diferencial quando comparada com tecidos saudáveis poderá permitir a descoberta de novos marcadores tumorais [74, 76, 80].

1.2. CA-125

O antigénio CA-125 (*Cancer Antigen 125*) é uma mucina e foi identificada pela primeira vez em 1981 por Bast e colaboradores utilizando o anticorpo monoclonal OC-125 [81]. Outros anticorpos foram descritos como sendo capazes de reconhecer o CA-125 e após vários estudos imuno-histoquímicos podemos dividir estes anticorpos em 2 grupos: OC-125-*like* ou M11-*like*. Considera-se um terceiro grupo separado relacionado com o anticorpo OV197. A descoberta que a ligação com o M11 não era inibida pelo OC-125 sugere que estes anticorpos reconhecem epitopos distintos em

domínios separados do antigénio CA-125. A interacção antigénio-anticorpo possibilitou o desenvolvimento de radioimunoensaios permitindo a quantificação do CA-125 [82].

De acordo com O'Brien e colaboradores [83] a molécula do CA-125 é caracterizada por 3 domínios principais (Figura 1.1):

- a) Domínio extracelular amino-terminal;
- b) Um grande domínio constituído por unidades repetidas;
- c) Um domínio carboxi-terminal que inclui uma ligação transmembranar com um domínio citoplasmático curto.

Vários estudos permitiram identificar a mucina MUC16 como sendo o antigénio CA-125 [84, 85].

Mucinas epiteliais são glicoproteínas complexas, altamente O-glicosiladas encontradas no muco ou na superfície de células de vários epitélios. Elas são responsáveis pelas propriedades físicas dos mucos e estão envolvidas na protecção das células epiteliais [86] com funções de hidratação, lubrificação e de barreira da superfície epitelial. Por outro lado podem funcionar como moléculas de sinalização [87].

Vários estudos realçam o possível efeito do CA-125 de inibir a resposta imune que é direccionada contra o cancro do ovário [88].

O CA-125 modula selectivamente a sensibilidade das células tumorais do ovário aos agentes genotóxicos com o domínio carboxi-terminal a ser aparentemente suficiente para promover a resistência à cisplatina [89].

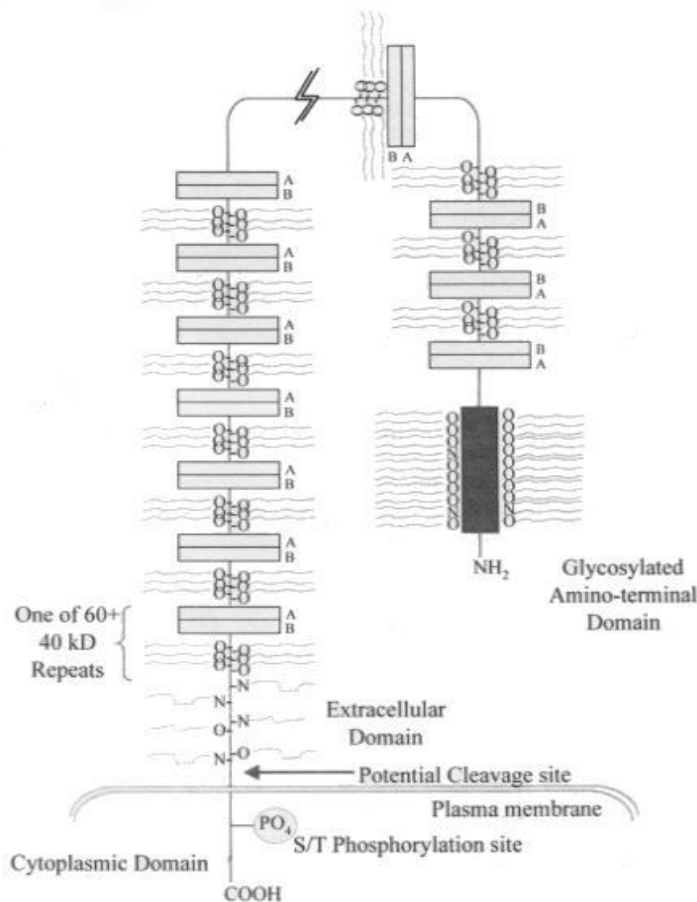


Figura 1.1- Estrutura proposta da molécula de CA-125 (retirado de [83])

O CA-125 (MUC16) apresenta um papel funcional fundamental nas células tumorais do ovário por modulação do crescimento celular, mobilidade celular, propriedades invasivas, metastização e carcinogénia. Aparentemente, o domínio citoplasmático curto apresenta uma função essencial nestes efeitos [90].

O CA-125 é o marcador tumoral mais utilizado no cancro epitelial do ovário. No entanto, o uso isolado da concentração sérica do CA-125 como teste de rastreio para o cancro do ovário num estágio inicial não é adequado. Alguns requisitos devem ser tidos em conta nos testes de rastreio. Devem ter sensibilidade adequada, facilmente realizáveis, baixo custo e ter um alto valor preditivo positivo, sendo que este último factor depende também da prevalência da doença. A

doença a ser rastreada deve ter uma elevada morbidade ou mortalidade e a duração da fase pré-clínica deve ser suficientemente longa para ser detectada num teste de rastreio. A aplicação de testes de rastreio ao cancro do ovário tem sido difícil por desconhecimento da natureza e duração da fase pré-clínica e pela baixa prevalência do cancro do ovário na população. Na doença num estágio avançado o CA-125 está elevado em cerca de 90% dos casos, mas apenas em 50% no estágio I, para além de que alguns tipos histológicos como adenocarcinomas mucinosos não estão associados a valores elevados de CA-125. Situações não malignas podem apresentar o CA-125 elevado. Entre estas incluem-se a gravidez, menstruação, doença inflamatória pélvica, endometriose, quistos nos ovários, útero fibróide e ascites derivadas a doença hepática. Situações malignas não ginecológicas com metástases peritoneais podem apresentar elevações no CA-125 como acontece nos cancros da mama, cólon, pancreático e do pulmão [91].

O uso mais comum para a concentração sérica do CA-125 é na monitorização da doente com cancro epitelial do ovário diagnosticado, principalmente quando a doença não é mensurável por outros meios. Com o tratamento padrão, uma percentagem das doentes apresentam uma doença intra-abdominal de pequeno volume ou com resíduos microscópicos. No entanto, doentes com tumores com um volume maior após cirurgia inicial, podem não apresentar sintomas e a avaliação da quimioterapia pode não ser possível com o exame físico ou imagiológicos. Os níveis séricos do CA-125 podem fornecer informação útil sobre a resposta ao tratamento inicial assim como durante tratamentos futuros e na detecção de recaídas [92]. Vários estudos confirmam a utilidade do CA-125 em monitorizar o progresso das doentes com cancro epitelial do ovário. O aumento do CA-125 precede a detecção clínica da recaída. Durante a monitorização da doença o CA-125 pode ser

utilizado de várias formas. Como factor de prognóstico, para medir a eficácia do tratamento ou para detectar a recaída. Tendo por base estas utilizações foram estudados vários critérios utilizando o CA-125 [93]:

- a) Valor sérico absoluto do CA-125 pré-quimioterapia e sobrevivência;
- b) Valor sérico absoluto do CA-125 pós-quimioterapia e sobrevivência;
- c) Valor sérico absoluto do CA-125 durante a quimioterapia e sobrevivência;
- d) Valor sérico absoluto do CA-125 pré-cirurgia e sobrevivência;
- e) Valor sérico absoluto do CA-125 pós-cirurgia e sobrevivência;
- f) Tempo de semi-vida do CA-125 e sobrevivência;
- g) Valor sérico nadir (valor mais baixo) do CA-125 e sobrevivência;
- h) Tempo até ao valor sérico nadir do CA-125 e sobrevivência;
- i) Área sob a curva normalizada pelo tempo;
- j) Valores longitudinais (aumentos ou diminuições) séricos do CA-125 e sobrevivência.

1.3. REFERÊNCIAS

1. Oliveira, F.M.e.C.F.d., *Manual de Ginecologia. Volume I - Cancro Epitelial do Ovário*. 2000.
2. Hennesy, B.T., R.L. Coleman, and M. Markman, *Ovarian cancer*. *Lancet*, 2009. **374**(9698): p. 1371-82.
3. *Global Cancer Facts & Figures*. 2011; 2nd Edition:[Available from:
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>.
4. Guppy, A.E., P.D. Nathan, and G.J. Rustin, *Epithelial ovarian cancer: a review of current management*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2005. **17**(6): p. 399-411.
5. Partridge, E.E. and M.N. Barnes, *Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment*. *CA Cancer J Clin*, 1999. **49**(5): p. 297-320.
6. Fleming, J.S., et al., *Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses*. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. **247**(1-2): p. 4-21.
7. Fathalla, M.F., *Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?* *Lancet*, 1971. **2**(7716): p. 163.
8. Urban, N., et al., *Ovarian cancer screening*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2003. **17**(4): p. 989-1005, ix.
9. Menon, U., et al., *Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS)*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(4): p. 327-40.
10. Buys, S.S., 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**(5): p. 1630-9.
11. Havrilesky, L.J., et al., *Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence*. *Gynecol Oncol*, 2008. **110**(3): p. 374-82.
12. Zhang, Z., et al., *Combining multiple serum tumor markers improves detection of stage I epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2007. **107**(3): p. 526-31.
13. Schutter, E.M., et al., *The differential diagnostic potential of a panel of tumor markers (CA 125, CA 15-3, and CA 72-4 antigens) in patients with a pelvic mass*. *Am J Obstet Gynecol*, 2002. **187**(2): p. 385-92.
14. Andersen, M.R., et al., *Use of a Symptom Index, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2010. **116**(3): p. 378-83.

15. Hays, J.L., et al., *Proteomics and ovarian cancer: integrating proteomics information into clinical care*. J Proteomics, 2010. **73**(10): p. 1864-72.
16. Husseinzadeh, N., *Status of tumor markers in epithelial ovarian cancer has there been any progress? A review*. Gynecol Oncol, 2011. **120**(1): p. 152-7.
17. Meani, F., et al., *Clinical application of proteomics in ovarian cancer prevention and treatment*. Mol Diagn Ther, 2009. **13**(5): p. 297-311.
18. Liz Y. Han, R.L.C., *Ovarian Cancer Staging*. Operative Techniques in General Surgery, 2007. **9**(2): p. 53-60.
19. Vine, M.F., et al., *Characterization of prediagnostic symptoms among primary epithelial ovarian cancer cases and controls*. Gynecol Oncol, 2003. **90**(1): p. 75-82.
20. Goff, B.A., et al., *Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics*. JAMA, 2004. **291**(22): p. 2705-12.
21. Angioli, R., et al., *Diagnostic open laparoscopy in the management of advanced ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2006. **100**(3): p. 455-61.
22. Nam, E.J., et al., *Diagnosis and staging of primary ovarian cancer: correlation between PET/CT, Doppler US, and CT or MRI*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(3): p. 389-94.
23. FIGO Committee on Gynecologic Oncology, L.D., NF Hacker, J Gori, HW Jones III, HYS Ngan, S Pecorelli, *Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecological Cancers*, H.N.M. NF Hacker MD, JL Benedet MD, Editor. 2000, Elsevier.
24. Vernooij, F., et al., *The outcomes of ovarian cancer treatment are better when provided by gynecologic oncologists and in specialized hospitals: a systematic review*. Gynecol Oncol, 2007. **105**(3): p. 801-12.
25. Shih, K.K. and D.S. Chi, *Maximal cytoreductive effort in epithelial ovarian cancer surgery*. J Gynecol Oncol, 2010. **21**(2): p. 75-80.
26. Trope, C. and J. Kaern, *Primary surgery for ovarian cancer*. Eur J Surg Oncol, 2006. **32**(8): p. 844-52.
27. Zivanovic, O., et al., *Advanced cytoreductive surgery: American perspective*. Gynecol Oncol, 2009. **114**(2 Suppl): p. S3-9.
28. Tozzi, R., et al., *Laparoscopic treatment of early ovarian cancer: surgical and survival outcomes*. Gynecol Oncol, 2004. **93**(1): p. 199-203.
29. Verleye, L., et al., *EORTC-GCG process quality indicators for ovarian cancer surgery*. Eur J Cancer, 2009. **45**(4): p. 517-26.
30. Kehoe, S., *Maximal cytoreductive surgery in advanced ovarian cancer*. Reviews in Gynaecological Practice, 2005. **5**(4): p. 5.

31. Harries, M. and M. Gore, *Part I: chemotherapy for epithelial ovarian cancer-treatment at first diagnosis*. *Lancet Oncol*, 2002. **3**(9): p. 529-36.
32. Ozols, R.F., *Optimum chemotherapy for ovarian cancer*. *Int J Gynecol Cancer*, 2000. **10**(S1): p. 33-37.
33. Pignata, S., et al., *Chemotherapy in epithelial ovarian cancer*. *Cancer Lett*, 2011. **303**(2): p. 73-83.
34. Muggia, F., *Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2009. **112**(1): p. 275-81.
35. Panchagnula, R., *Pharmaceutical aspects of paclitaxel*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1998. **172**(1-2): p. 1-15.
36. Aravantinos, G., et al., *Carboplatin and paclitaxel versus cisplatin, paclitaxel and doxorubicin for first-line chemotherapy of advanced ovarian cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study*. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(15): p. 2169-77.
37. Chan, J.K., et al., *The potential benefit of 6 vs. 3 cycles of chemotherapy in subsets of women with early-stage high-risk epithelial ovarian cancer: an exploratory analysis of a Gynecologic Oncology Group study*. *Gynecol Oncol*, 2010. **116**(3): p. 301-6.
38. Hershman, D., et al., *Effectiveness of platinum-based chemotherapy among elderly patients with advanced ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2004. **94**(2): p. 540-9.
39. Fader, A.N., et al., *Improved tolerance of primary chemotherapy with reduced-dose carboplatin and paclitaxel in elderly ovarian cancer patients*. *Gynecol Oncol*, 2008. **109**(1): p. 33-8.
40. Fung-Kee-Fung, M., et al., *Intraperitoneal chemotherapy for patients with advanced ovarian cancer: a review of the evidence and standards for the delivery of care*. *Gynecol Oncol*, 2007. **105**(3): p. 747-56.
41. Lesnock, J.L., et al., *Completion of intraperitoneal chemotherapy in advanced ovarian cancer and catheter-related complications*. *Gynecol Oncol*, 2010. **116**(3): p. 345-50.
42. Landrum, L.M., et al., *Intraperitoneal chemotherapy for patients with advanced epithelial ovarian cancer: a review of complications and completion rates*. *Gynecol Oncol*, 2008. **108**(2): p. 342-7.
43. Gray, H.J., et al., *Alternative intraperitoneal chemotherapy regimens for optimally debulked ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2010. **116**(3): p. 340-4.
44. Naumann, R.W., P. Sukumvanich, and R.P. Edwards, *Practice patterns of intraperitoneal chemotherapy in women with ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2009. **114**(1): p. 37-41.

45. Berry, E., et al., *An outpatient intraperitoneal chemotherapy regimen for advanced ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2009. **113**(1): p. 63-7.
46. Ryu, K.S., et al., *Effects of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2004. **94**(2): p. 325-32.
47. Bae, J.H., et al., *Treatment of ovarian cancer with paclitaxel- or carboplatin-based intraperitoneal hyperthermic chemotherapy during secondary surgery*. Gynecol Oncol, 2007. **106**(1): p. 193-200.
48. Deraco, M., et al., *Advanced cytoreduction as surgical standard of care and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy as promising treatment in epithelial ovarian cancer*. Eur J Surg Oncol, 2011. **37**(1): p. 4-9.
49. Foster, T., et al., *A review of the current evidence for maintenance therapy in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2009. **115**(2): p. 290-301.
50. Harries, M. and M. Gore, *Part II: chemotherapy for epithelial ovarian cancer-treatment of recurrent disease*. Lancet Oncol, 2002. **3**(9): p. 537-45.
51. Colombo, N. and M. Gore, *Treatment of recurrent ovarian cancer relapsing 6-12 months post platinum-based chemotherapy*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **64**(2): p. 129-38.
52. Vergote, I., et al., *A randomised, double-blind, phase II study of two doses of pemetrexed in the treatment of platinum-resistant, epithelial ovarian or primary peritoneal cancer*. Eur J Cancer, 2009. **45**(8): p. 1415-23.
53. Richardson, D.L., et al., *Combination gemcitabine, platinum, and bevacizumab for the treatment of recurrent ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **111**(3): p. 461-6.
54. Linch, M., et al., *Experience in a UK cancer centre of weekly paclitaxel in the treatment of relapsed ovarian and primary peritoneal cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **109**(1): p. 27-32.
55. Stewart, D.J., *Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2007. **63**(1): p. 12-31.
56. Engelen, M.J., et al., *Long-term morbidity of adjuvant whole abdominal radiotherapy (WART) or chemotherapy for early stage ovarian cancer*. Eur J Cancer, 2009. **45**(7): p. 1193-200.
57. Einhorn, N., et al., *Is there place for radiotherapy in the treatment of advanced ovarian cancer?* Radiother Oncol, 1999. **53**(3): p. 213-8.
58. Alberto Biete, I.V., Angels Rovirosa, Blanca Farrús, Francesc Casas, Carlos Conill, *Whole abdominal radiotherapy in ovarian cancer* Reports of Practical Oncology & Radiotherapy, 2010. **15**(2): p. 27-30.

59. E, C., et al., *Effective palliative radiotherapy for symptomatic recurrent or residual ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2006. **102**(2): p. 204-9.
60. See, H.T., et al., *Targeted therapy for epithelial ovarian cancer: current status and future prospects*. *Int J Gynecol Cancer*, 2003. **13**(6): p. 701-34.
61. Vaughan, M., et al., *Improving outcomes in ovarian cancer*. *N Z Med J*, 2006. **119**(1242): p. U2171.
62. Holschneider, C.H. and J.S. Berek, *Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors*. *Semin Surg Oncol*, 2000. **19**(1): p. 3-10.
63. Wimberger, P., et al., *Prognostic factors for complete debulking in advanced ovarian cancer and its impact on survival. An exploratory analysis of a prospectively randomized phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR)*. *Gynecol Oncol*, 2007. **106**(1): p. 69-74.
64. Hornung, R., et al., *Analysis of potential prognostic factors in 111 patients with ovarian cancer*. *Cancer Lett*, 2004. **206**(1): p. 97-106.
65. Akahira, J.I., et al., *Prognostic factors of stage IV epithelial ovarian cancer: a multicenter retrospective study*. *Gynecol Oncol*, 2001. **81**(3): p. 398-403.
66. Polverino, G., et al., *Survival and prognostic factors of women with advanced ovarian cancer and complete response after a carboplatin-paclitaxel chemotherapy*. *Gynecol Oncol*, 2005. **99**(2): p. 343-7.
67. Maas, H.A., et al., *The influence of age and co-morbidity on treatment and prognosis of ovarian cancer: a population-based study*. *Gynecol Oncol*, 2005. **97**(1): p. 104-9.
68. Shinichi Tate, Y.H., Nobuhiro Takeshima, Katuhiko Hasumi, *CA125 regression during neoadjuvant chemotherapy as an independent prognostic factor for survival in patients with advanced ovarian serous adenocarcinoma*. *Gynecologic Oncology*, 2005. **95**: p. 143–149.
69. Bast, R.C., Jr., et al., *CA 125: the past and the future*. *Int J Biol Markers*, 1998. **13**(4): p. 179-87.
70. Colakovic S, L.V., Mitrovic L, Jelic S, Susnjar S, Marinkovic J., *Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer*. *Int J Biol Markers*, 2000. **15**(2): p. 147-152.
71. Hoskins, P.J., N. Le, and R. Correa, *CA 125 normalization with chemotherapy is independently predictive of survival in advanced endometrial cancer*. *Gynecol Oncol*, 2011. **120**(1): p. 52-5.
72. Gadducci, A., et al., *Serum half-life of CA 125 during early chemotherapy as an independent prognostic variable for patients with advanced epithelial ovarian cancer: results of a multicentric Italian study*. *Gynecol Oncol*, 1995. **58**(1): p. 42-7.

73. Rocconi, R.P., et al., *The timing of normalization of CA-125 levels during primary chemotherapy is predictive of survival in patients with epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2009. **114**(2): p. 242-5.
74. Canevari, S., et al., *Molecular predictors of response and outcome in ovarian cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **60**(1): p. 19-37.
75. Aggarwal, P. and S. Kehoe, *Serum tumour markers in gynaecological cancers*. Maturitas, 2010. **67**(1): p. 46-53.
76. Rapkiewicz, A.V., et al., *Biomarkers of ovarian tumours*. Eur J Cancer, 2004. **40**(17): p. 2604-12.
77. Moore, R.G., S. MacLaughlan, and R.C. Bast, Jr., *Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(2): p. 240-5.
78. Gadducci, A., et al., *Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer*. Biomed Pharmacother, 2004. **58**(1): p. 24-38.
79. Gadducci, A., et al., *Serum and tissue biomarkers as predictive and prognostic variables in epithelial ovarian cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **69**(1): p. 12-27.
80. Kong, F., et al., *Using proteomic approaches to identify new biomarkers for detection and monitoring of ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2006. **100**(2): p. 247-53.
81. Bast, R.C., Jr., et al., *Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma*. J Clin Invest, 1981. **68**(5): p. 1331-7.
82. Whitehouse, C. and E. Solomon, *Current status of the molecular characterization of the ovarian cancer antigen CA125 and implications for its use in clinical screening*. Gynecol Oncol, 2003. **88**(1 Pt 2): p. S152-7.
83. O'Brien, T.J., et al., *The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences*. Tumour Biol, 2001. **22**(6): p. 348-66.
84. Yin, B.W., A. Dnistrian, and K.O. Lloyd, *Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene*. Int J Cancer, 2002. **98**(5): p. 737-40.
85. Yin, B.W. and K.O. Lloyd, *Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27371-5.
86. Desseyn, J.L., D. Tetaert, and V. Gouyer, *Architecture of the large membrane-bound mucins*. Gene, 2008. **410**(2): p. 215-22.
87. Perez, B.H. and I.K. Gipson, *Focus on Molecules: human mucin MUC16*. Exp Eye Res, 2008. **87**(5): p. 400-1.
88. Patankar, M.S., et al., *Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125*. Gynecol Oncol, 2005. **99**(3): p. 704-13.

89. Boivin, M., et al., *CA125 (MUC16) tumor antigen selectively modulates the sensitivity of ovarian cancer cells to genotoxic drug-induced apoptosis*. *Gynecol Oncol*, 2009. **115**(3): p. 407-13.
90. Theriault, C., et al., *MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth, tumorigenesis and metastasis*. *Gynecol Oncol*, 2011. **121**(3): p. 434-43.
91. Werness, B.A. and G.H. Eltabbakh, *Familial ovarian cancer and early ovarian cancer: biologic, pathologic, and clinical features*. *Int J Gynecol Pathol*, 2001. **20**(1): p. 48-63.
92. Markman, M., *The Role of CA-125 in the Management of Ovarian Cancer*. *Oncologist*, 1997. **2**(1): p. 6-9.
93. Gupta, D. and C.G. Lis, *Role of CA125 in predicting ovarian cancer survival - a review of the epidemiological literature*. *J Ovarian Res*, 2009. **2**: p. 13.

2. OBJETIVO

O objectivo primário do trabalho proposto para a presente dissertação de doutoramento consistia no desenvolvimento de uma ferramenta informática capaz de melhorar a interpretação do CA-125, nomeadamente no que diz respeito à sua capacidade de prever a recidiva em doentes com cancro do ovário.

No entanto, para se conseguir desenvolver uma ferramenta informática, houve a necessidade de combinar a informação demográfica e clínica das doentes, incluindo obviamente as concentrações do CA-125.

A análise preliminar da informação disponível relativamente à nossa população cedo permitiu concluir que havia dificuldades na utilização das concentrações séricas de CA-125 enquanto tal, pois o número de concentrações variava de doente para doente, o mesmo acontecendo com o intervalo de tempo entre concentrações consecutivas (informação retrospectiva não sujeita a protocolo específico).

A forma encontrada para contornar esta dificuldade baseou-se num trabalho de revisão (Bidart et al. 1999) que descreve a utilização de diferentes parâmetros cinéticos na interpretação da evolução temporal de vários marcadores tumorais, incluindo o CA-125. Assim, em vez de utilizar isoladamente a concentração do CA-125 passaríamos a descrever o seu comportamento através do uso de parâmetros cinéticos derivados.

Ao longo da presente dissertação foram então testados vários parâmetros cinéticos descritores das concentrações do CA-125, tendo sido inclusivamente introduzido pela primeira vez um novo parâmetro, a área sob a curva do CA-125 normalizada pelo tempo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO

A população inicial foi recolhida retrospectivamente a partir da base de dados do Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. A base de dados estava desenvolvida em *FileMaker Pro* da *FileMaker, Inc* versão 5 e partiu da recolha de informação clínica das doentes a partir dos respectivos processos clínicos, sob a orientação da Dra. Isabel Godinho.

A informação foi exportada para *Microsoft Excel*, resultando num total de 339 doentes diagnosticadas maioritariamente na década de 90 do século passado.

Apesar de algumas concentrações do CA-125 estarem disponíveis na informação recolhida no Serviço de Ginecologia, neste trabalho optou-se pela recolha integral de todas as concentrações séricas do CA-125 registadas na base de dados do Laboratório de Hormonologia e Monitorização de Fármacos do Serviço de Patologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra. A base de dados estava desenvolvida em *Microsoft Visual FoxPro* versão 6. Foram exportadas para *Microsoft Excel* 14818 concentrações séricas do CA-125.

Ambas as tabelas de *Excel* foram incluídas numa base de dados no *Microsoft Access* e foi desenvolvida uma aplicação informática designado por “Filtro Dados” na qual se procedeu à combinação de ambas as tabelas utilizando *querys* de SQL (*Structured Query Language* – linguagem de programação usada para trabalhar com base de dados relacionais) (Figura 3.1).

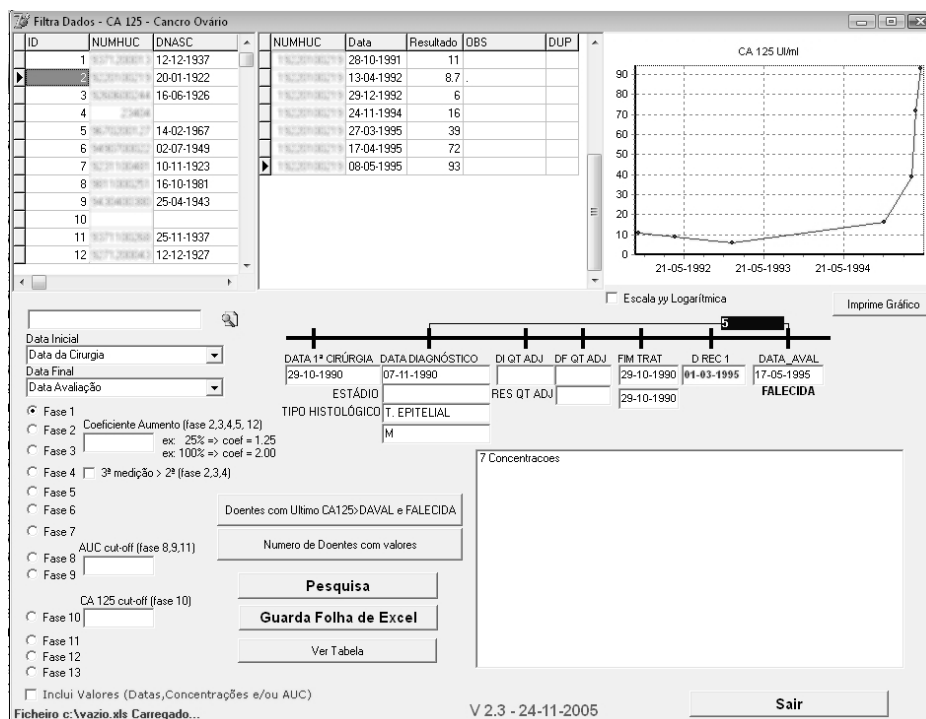


Figura 3.1 - Ecrã principal da aplicação “Filtro Dados”.

No cruzamento da informação foi essencial o uso nos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) de um número de identificação único para cada doente que recorra a esta unidade de saúde.

Na tabela dos valores séricos do CA-125 os valores foram ordenados numa primeira fase pelo número dos HUC seguida por uma ordenação ascendente por data.

Com esta aplicação criada especificamente para o efeito foi possível executar todos os cálculos relacionados com os parâmetros cinéticos testados e exportar a informação das doentes e resultados obtidos para tabelas de *Excel* que iriam ser analisadas em programas de estatística e/ou de redes neuronais artificiais (Figura 3.2).

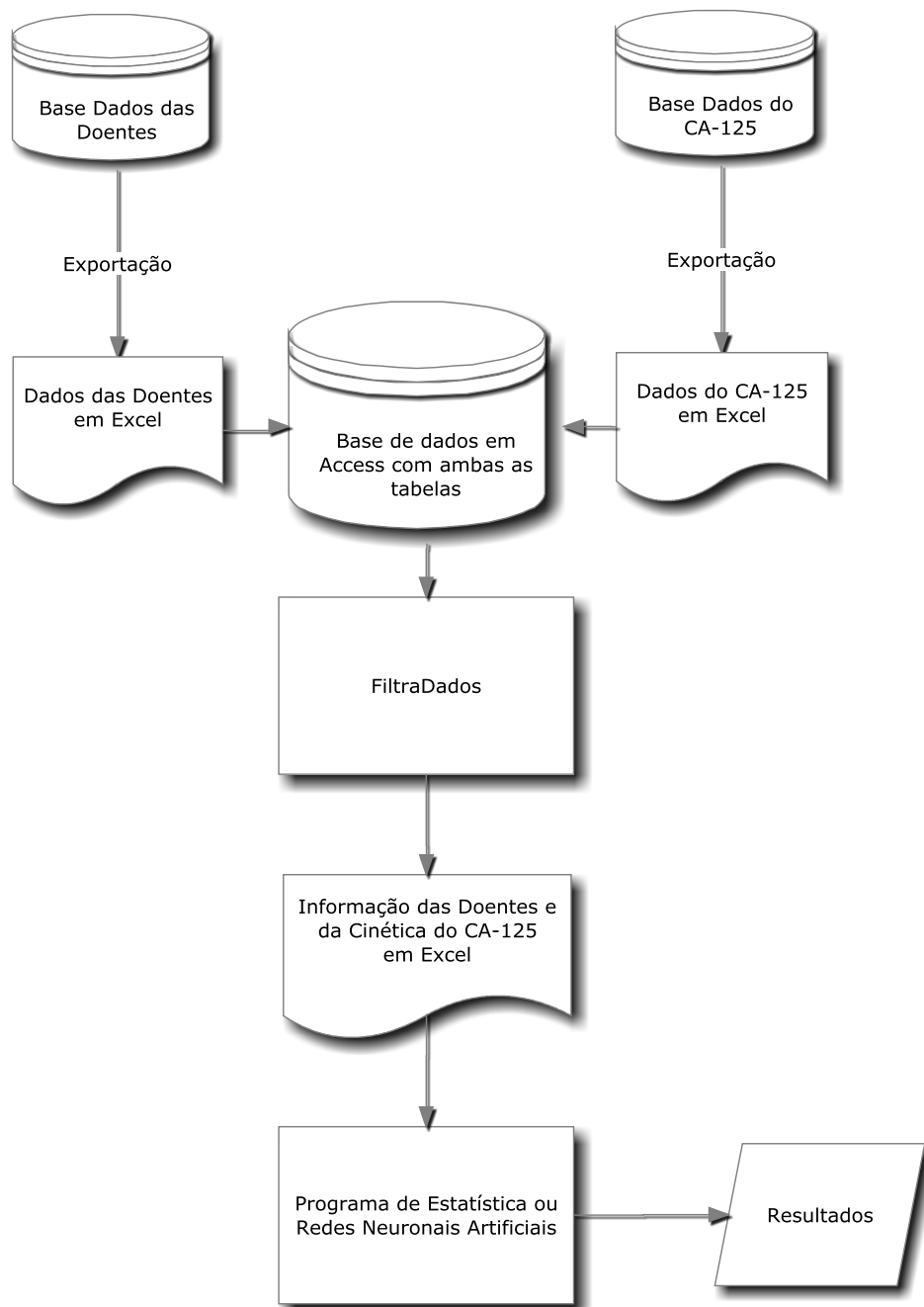


Figura 3.2 - Fluxograma da recolha e tratamento dos dados.

3.2. MÉTODOS ESTATÍSTICOS CONVENCIONAIS

3.2.1. Introdução

No decorrer do trabalho, para além da estatística descritiva normal, foram utilizados outros métodos estatísticos. Passaremos à sua descrição tendo sido usados com o objectivo de analisar as subpopulações em estudo com a finalidade de determinar a relação entre a evolução do CA-125, nas diferentes fases de seguimento das doentes, com características da doença e sua evolução.

3.2.2. Avaliação de Testes de Classificação Binária (Análise de Sensibilidade e Especificidade)

Na avaliação de testes de classificação binária são usadas medidas estatísticas como a sensibilidade e a especificidade.

Na prática clínica, estes testes podem ser incluídos nos testes de rastreio, testes de diagnóstico ou nos testes de caracterização de determinada doença. Observações clínicas ou testes laboratoriais podem assim caracterizar uma pessoa como saudável (ou não) ou inclui-la (ou não) numa dada categoria patológica. No entanto, uma pessoa pode ser erradamente classificada, pois podem ocorrer erros nas observações clínicas ou nos testes laboratoriais. Torna-se então necessário o uso de medidas que permitam medir a robustez de determinado teste.

Matriz confusão (ou tabelas de informação cruzada) é o nome dado à matriz $C \times C$, em que o valor de um item i, j representa quantos casos na amostra com diagnóstico j foram diagnosticados como i . Por convenção o diagnóstico padrão é representado nas colunas.

Quando $C=2$, ou seja, quando há apenas dois diagnósticos possíveis (como “sim” ou “não”), a matriz 2×2 é chamada de tabela de contingência.

Atendendo à seguinte tabela de contingência (Tabela 3.1) podemos definir varias medidas estatísticas [1-3].

Tabela 3.1 - Tabela de contingência onde estão registados os resultados que relacionam os resultados de um teste com uma dada condição.

		Condição Presente (número de doentes)	
		Sim	Não
Resultado do Teste	Positivo	<i>a</i>	<i>b</i>
	Negativo	<i>c</i>	<i>d</i>

Assim temos:

a é o número de verdadeiros positivos

b é o número de falsos positivos

c é o número de falsos negativos

d é o número de verdadeiros negativos

A sensibilidade é a capacidade que um teste tem em detectar os positivos dentro dos individuos que apresentam a condição, ou seja, é a proporção de indivíduos com a condição que apresentam um teste positivo:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c} \quad (\text{fórmula 3.1})$$

A especificidade é a capacidade que um teste tem em detectar os negativos dentro dos individuos que não apresentam a condição, ou

seja, é a proporção de indivíduos sem a condição e que têm um teste negativo:

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b+d} \quad (\text{fórmula 3.2})$$

Valor preditivo positivo (VPP) é a probabilidade de, tendo um teste positivo, apresentar a condição, ou seja, é a proporção de indivíduos que apresentam a condição dentro de aqueles que têm um teste positivo:

$$\text{VPP} = \frac{a}{a+b} \quad (\text{fórmula 3.3})$$

Valor preditivo negativo (VPN) é a probabilidade de, tendo um teste negativo, não apresentar a condição, ou seja, é a proporção de indivíduos que não apresentam a condição dentro de aqueles que têm um teste negativo:

$$\text{VPN} = \frac{d}{c+d} \quad (\text{fórmula 3.4})$$

Exactidão é a probabilidade de obter um resultado verdadeiro com o teste em causa, ou seja, é a proporção de indivíduos que tiveram um resultado verdadeiro:

$$\text{Exactidão} = \frac{a+d}{a+b+c+d} \quad (\text{fórmula 3.5})$$

3.2.3. Curvas ROC

Como referido anteriormente, o uso de medidas ou técnicas que permitam medir a robustez de determinado teste, torna-se importante

de um ponto de vista clínico. No entanto, em várias situações a aplicação de determinado teste origina um valor quantitativo sendo necessário transformar esta variável contínua numa variável dicotómica (binária). Para se atingir este objectivo temos que utilizar um determinado valor na escala contínua que discrimine entre duas classes. A esse valor dá-se o nome de ponto de corte (*cut-off point*) [2].

A análise utilizando curvas ROC (*Receiver Operator Characteristic*) foi originalmente desenvolvida no início da década de 50 no contexto de detecção electrónica de sinais e introduzida como método para avaliar as interpretações de verdadeiros e falsos positivos em sinais de radar. Nas décadas seguintes este tipo de análise foi introduzida na área da medicina com um elevado crescimento de trabalhos publicados [4, 5].

Uma curva ROC é a representação gráfica da sensibilidade (ordenadas) em função de 1-especificidade (abcissas), resultante da variação do valor do ponto de corte ao longo dos seus possíveis valores (Figura 3.3 e 3.4) [2, 5].

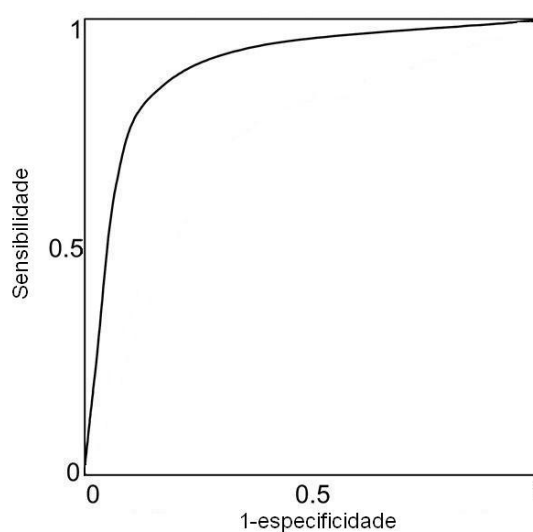


Figura 3.3 - Exemplo de uma curva ROC.

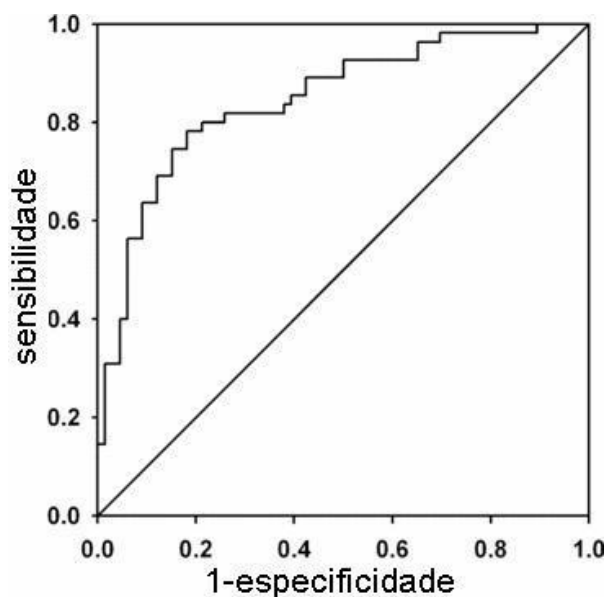


Figura 3.4 - Exemplo de uma curva ROC estimada, também designada por curva ROC não paramétrica.

A curva ROC permite determinar o ponto de corte óptimo, sendo este o que mais se aproxima do ponto superior esquerdo (0,1) que corresponde a 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. A área sob a curva ROC permite quantificar a exactidão de um determinado teste. Assim, as curvas ROC são também úteis na comparação de diferentes testes, tendo um teste uma exactidão tanto maior, quanto maior for a área sob a curva ROC [5].

3.2.4. Teste de Mann-Whitney

O teste de Mann-Whitney, também conhecido pelo teste de Mann-Whitney-Wilcoxon (ou teste MWW), é um teste equivalente não-paramétrico ao teste t-Student para comparar amostras independentes. Pode utilizar-se este teste para avaliar a hipótese nula que assume que as medianas populacionais são idênticas para os dois grupos. Este teste não exige que as populações tenham a mesma variância. Como este teste é baseado na classificação por

número de ordens (“*ranks*”) das observações, o teste consegue utilizar mais informação que um teste de mediana [3, 6, 7]

Este teste pressupõe que:

- a) As duas amostras tenham sido retiradas, respectivamente, das suas populações de uma forma independente e aleatória;
- b) As amostras sejam no mínimo ordinais em termos de escala;
- c) Se as populações divergem de todo, elas apenas divergem em relação às suas medianas.

Na hipótese nula, admite-se que as medianas de ambas as amostras coincidem, e na hipótese alternativa postula-se que a diferença entre as medianas não é nula, é positiva ou é negativa:

$$H_0 : \eta_1 = \eta_2$$

$$H_1 : \eta_1 \neq \eta_2$$

ou $H_1 : \eta_1 > \eta_2$, ou ainda $H_1 : \eta_1 < \eta_2$

Sejam n_1 e n_2 os tamanhos das duas amostras, a estatística de teste U é calculada da seguinte forma:

- a) As observações das duas amostras são combinadas numa única variável de tamanho $N=n_1+n_2$, sendo identificadas as respectivas proveniências;
- b) O conjunto de observações assim constituído pela junção das duas amostras é ordenado por ordem crescente, atribuindo o número de ordem 1 à observação menor e o número de ordem n_1+n_2 à observação maior (r_{ij} ; $i = 1, 2$; $j = 1, \dots, n_1$ ou n_2);
- c) No caso de empates (“*ties*”), a cada uma das observações empatadas é atribuído o número de ordem médio que essas observações teriam se não estivessem empatadas;

- d) Calculam-se as somas dos números de ordem das observações para cada amostra:

$$S_1 = \sum_{j=1}^{n_1} r_{1j} \quad \text{e} \quad S_2 = \sum_{j=1}^{n_2} r_{2j} \quad (\text{fórmulas 3.6 e 3.7})$$

observamos que:

$$S_1 + S_2 = \frac{N(N+1)}{2} \quad (\text{fórmula 3.8})$$

- e) Calculam-se as quantidades:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1+1)}{2} - S_1 \quad (\text{fórmula 3.9})$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2+1)}{2} - S_2 \quad (\text{fórmula 3.10})$$

observamos que:

$$U_1 + U_2 = n_1 n_2 \quad (\text{fórmula 3.11})$$

- f) A estatística do teste é então:

$$U = \min(U_1, U_2) \quad (\text{fórmula 3.12})$$

- g) Através de tabelas dos quantis da distribuição U de Mann-Whitney fazemos a decisão estatística de rejeitar ou não a hipótese nula para determinado valor de p .

Se n_1 e n_2 forem iguais ou superiores a 10 observações, demonstra-se que os valores de U seguem uma distribuição normal de média:

$$\mu_U = \frac{n_1 n_2}{2} \quad (\text{fórmula 3.13})$$

e desvio padrão:

$$\sigma_U = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}} \quad (\text{fórmula 3.14})$$

sendo, neste caso, a estatística do teste dada por:

$$t = \frac{U - \mu_U}{\sigma_U} \quad (\text{fórmula 3.15})$$

3.2.5. Teste de Kruskal-Wallis

O teste de Kruskal-Wallis ou análise de variância pelos números de ordem (“*ranks*”) pode ser considerado como a alternativa não-paramétrica à *one-way* ANOVA (daí também ser designado por ANOVA em ordens de Kruskal-Wallis). Este teste é uma generalização do teste de Mann-Whitney que permite comparar um conjunto de amostras independentes. Pode então ser usado para testar se duas ou mais amostras provenientes de uma mesma população (ou de populações diferentes) ou provêm de populações com a mesma distribuição [3, 6, 7].

Sejam k as amostras em análise, o teste de hipóteses é:

H_0 : As distribuições das k amostras são idênticas;

H_A : Existe pelo menos uma amostra onde a distribuição é diferente das distribuições das outras amostras em estudo

De notar que quando $k=2$, este é idêntico ao teste de Mann-Whitney-Wilcoxon.

A aplicação deste teste envolve as seguintes etapas:

- a) Tal como no teste anterior, as n_1, n_2, \dots, n_k observações dos k grupos são combinadas numa serie com dimensão N e distribuídas numa ordem de magnitude da mais pequena para a maior mas mantendo a origem observação. De seguida as observações são substituídas pelo número de ordem (“*ranks*”) de 1 (atribuído à observação mais pequena) até N (atribuído à observação maior). No caso de empates, a cada uma das observações empatadas é atribuído o número de ordem médio que essas observações teriam se não estivessem empatadas;
- b) Calcula-se para cada amostra (k) a soma (S_j) dos respectivos números de ordens;
- c) Calcula-se o teste estatístico:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{S_j^2}{n_j} - 3(N+1) \quad (\text{fórmula 3.16})$$

- d) Se existem números de ordem empatados, o valor de H deve ser corrigida através do factor de correcção:

$$C = 1 - \frac{\sum_{i=1}^m (u_i^3 - u)}{N^3 - N} \quad (\text{fórmula 3.17})$$

onde u_i é o número de empates em cada amostra e m é o número de grupos de números de ordem empatados, e o valor corrigido (H') é:

$$H' = \frac{H}{C} \quad (\text{fórmula 3.18})$$

- e) Quando $k \leq 5$ ou quando existem poucas observações em cada amostra, os valores críticos da distribuição do teste

estatístico são apresentados numa tabela. No entanto, para amostras com um elevado número de observações, ou para $k > 5$, prova-se que este teste H aproxima-se de uma distribuição χ^2 (qui-quadrado) com $k - 1$ graus de liberdade (sendo H comparado com os valores tabelados de χ^2).

3.2.6. Análise de Sobrevivência - Curva de Kaplan-Meier

A análise de sobrevivência é um conjunto de técnicas estatísticas utilizadas para analisar o tempo até a ocorrência de um evento de interesse ao qual chamamos de um modo genérico de tempo de sobrevivência. Este evento pode ser, em medicina, entre outros, a ocorrência de determinada patologia, uma resposta a um tratamento, uma recaída ou óbito. Para além da área biomédica, a análise de sobrevivência pode ser aplicada em áreas tão distintas como ciências sociais (ex. duração do primeiro casamento), economia (ex. duração de subscrições de produtos financeiros ou outros), engenharia (ex. tempo de vida de sistemas electrónicos).

A distribuição dos tempos de sobrevivência é normalmente descrita ou caracterizada por três funções: função de sobrevivência; função de densidade de probabilidade e a função de risco. Estas funções são matematicamente equivalentes pois basta conhecer uma para se obter as restantes.

A função de sobrevivência $S(t)$ é definida como sendo a probabilidade de um indivíduo sobreviver para além de t [8].

$$S(t) = P(T > t) \quad (\text{fórmula 3.19})$$

Tipicamente alguns elementos têm tempos de sobrevivência censurados (ou truncados), ou seja, nestes elementos o tempo de

sobrevivência não foi totalmente observado (possuímos informação acerca do tempo de sobrevivência, mas não temos o tempo de sobrevivência exacto, o elemento em causa durante o estudo não alcançou o limite de interesse). Este tipo de situações deve-se a vários factores como: o evento de interesse num conjunto de elementos não ocorre antes do fim do estudo; um elemento não é seguido até ao fim do estudo ou esse elemento abandona o estudo mas sabemos o seu tempo de sobrevivência até esse instante.

Um dos métodos mais populares em bioestatística para estimar a função de sobrevivência é o método do produto limite para estimar taxas de sobrevivência também conhecido pelo método de Kaplan-Meier [2, 9].

Sejam $t_1 < t_2 < \dots < t_k$ os tempos de óbito distintos observados numa amostra de tamanho “n” retirada de uma população homogénea ($k \leq n$ pois alguns elementos da amostra podem ser censurados e/ou terem o evento ao mesmo tempo), seja n_i o numero de elementos com risco num tempo imediatamente antes de t_i ($1 \leq i \leq k$, são casos na qual a duração é pelo menos t_i) e seja d_i o número de óbitos no tempo t_i , então a função de sobrevivência $S(t)$ é estimada por:

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_i \leq t} \left(1 - \frac{d_i}{n_i}\right) \quad (\text{fórmula 3.20})$$

sendo designada por estimador do produto limite ou estimador de Kaplan-Meier e com um intervalo de confiança a 95% dado por:

$$\hat{S}(t)e^{(\pm 1.96\hat{s}(t))} \quad (\text{fórmula 3.21})$$

com:

$$\hat{s}^2(t) = \sum_{t_i \leq t} \frac{d_i}{n_i(n_i - d_i)} \quad (\text{fórmula 3.22})$$

Notar que: $\frac{d_i}{n_i}$ é a probabilidade estimada do elemento sofrer o evento no intervalo de tempo entre t_{i-1} a t_i ; $1 - \frac{d_i}{n_i}$ é a probabilidade estimada do elemento de não sofrer o evento no mesmo intervalo e o produto na fórmula (3.20) é a regra do produto para as probabilidades [2].

A construção da curva de Kaplan-Meier implica a determinação de $\hat{S}(t)$ para cada t_i (com a construção da tabela com os elementos t_i , n_i , d_i e $\hat{S}(t)$) e respectiva representação gráfica (Figura 3.5).

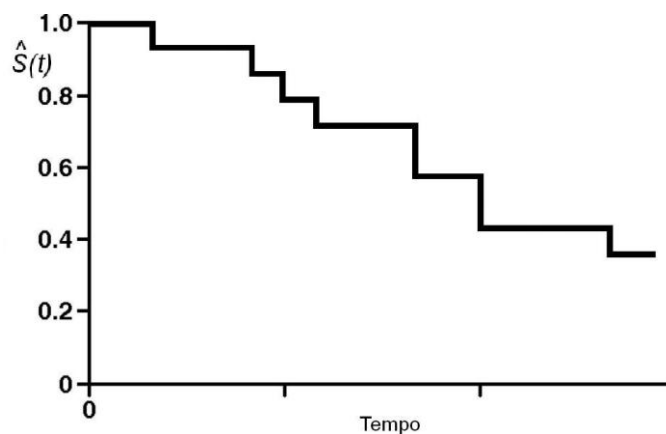


Figura 3.5 - Exemplo de uma curva de sobrevivência obtida pelo método de Kaplan-Meier.

A comparação entre distribuições de sobrevivência é bastante importante na investigação biomédica (por exemplo, a comparação entre a capacidade de dois tratamentos em aumentar a sobrevivência). As diferenças podem ser ilustradas pela construção das curvas de sobrevivência estimada, mas apenas se obtém uma ligeira ideia sobre a diferença entre as distribuições não

demonstrando se estas diferenças são estatisticamente significativas. Assim torna-se necessário a aplicação de um teste estatístico.

Tomando como exemplo a comparação entre a capacidade de dois tratamentos em aumentar a sobrevivência com as funções de sobrevivência $S_1(t)$ e $S_2(t)$ respectivamente, a hipótese nula a considerar é:

$$H_0: S_1(t) = S_2(t)$$

(ambos os tratamentos são igualmente eficazes)

contra as hipóteses alternativas:

$$H_1: S_1(t) > S_2(t)$$

(tratamento 1 mais eficaz que o tratamento 2)

ou

$$H_1: S_1(t) < S_2(t)$$

(tratamento 2 mais eficaz que o tratamento 1)

ou

$$H_1: S_1(t) \neq S_2(t)$$

(ambos os tratamentos são igualmente não eficazes)

Quando não existem observações censuradas (considerado um caso especial) podem ser utilizados testes não paramétricos padrão como o teste de Wilcoxon ou o teste U de Mann-Whitney. No entanto para conjuntos de dados com observações censuradas (situação mais comum) devem utilizar-se os seguintes testes: teste de Gehan's, teste de Cox-Mantel, teste de log-rank, teste de Peto ou o F-teste de Cox [8].

3.2.7. Análise de Sobrevivência - Modelo de Risco Proporcional de Cox

Os métodos paramétricos de análise de sobrevivência são importantes na identificação de factores de prognóstico significativos apenas em situações onde a distribuição subjacente à sobrevivência é conhecida. No entanto, na prática, a forma exacta da distribuição não é conhecida tornando limitada a aplicação dos métodos paramétricos. O modelo de riscos proporcionais de Cox não requer o conhecimento da forma da distribuição de sobrevivência, podendo a função de risco neste modelo assumir qualquer forma, assumindo-se que a função de risco para diferentes indivíduos é proporcional e independente do tempo.

O efeito de um ou mais factores de prognóstico (covariáveis) sobre o tempo de sobrevivência pode ser analisado pelo modelo de riscos proporcionais de Cox, cujos resultados são expressos em estimativas de rácios de risco (“*hazard ratio*”) [8].

Considerando $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \dots, x_p)$ como sendo o conjunto de factores de prognóstico, podemos escrever a função de risco $h(t|\mathbf{x})$ em função da função de risco subjacente (função de risco basal ou de base) e uma outra função, seja $g(\mathbf{x})$, apenas com o conjunto de factores de prognóstico, ou seja:

$$h(t | x_1, x_2, \dots, x_p) = h_0(t)g(x_1, x_2, \dots, x_p) \quad (\text{fórmula 3.23})$$

A função de risco subjacente, $h_0(t)$, representa como o risco varia com o tempo e a função $g(\mathbf{x})$ representa o efeitos dos factores de prognóstico. A função de risco de base (“*baseline hazard function*”), $h_0(t)$, pode ser interpretada como sendo a função de risco quando todos os factores de prognóstico são ignorados, $g(\mathbf{x})=1$.

O rácio de risco de dois indivíduos com dois conjuntos de factores de prognóstico \mathbf{x}_1 e \mathbf{x}_2 é dado por:

$$\frac{h(t | x_1)}{h(t | x_2)} = \frac{h_0(t)g(x_1)}{h_0(t)g(x_2)} = \frac{g(x_1)}{g(x_2)} \quad (\text{fórmula 3.24})$$

e é uma constante independente do tempo.

O modelo de riscos proporcionais de Cox, assume que a função $g(\mathbf{x})$ é uma função exponencial dos factores de prognóstico, ou seja:

$$g(x) = e^{\sum_{j=1}^p b_j x_j} \quad (\text{fórmula 3.25})$$

sendo $\mathbf{b}=(b_1, b_2, \dots, b_p)$ o conjunto de coeficientes (parâmetros do modelo) dos factores de prognóstico. Estes coeficientes podem ser estimados a partir dos dados observados e indicam a magnitude do efeito dos factores de prognóstico correspondentes. Assim a função de risco pode ser escrita:

$$h(t | x) = h_0(t)e^{\sum_{j=1}^p b_j x_j} = h_0(t) \exp\left(\sum_{j=1}^p b_j x_j\right) \quad (\text{fórmula 3.26})$$

ou

$$\ln(h(t | x)) = \ln(h_0(t)) + \sum_{j=1}^p b_j x_j \quad (\text{fórmula 3.27})$$

Demonstra-se que:

$$S(t | x) = [S_0(t)]^{\exp\left(\sum_{j=1}^p b_j x_j\right)} \quad (\text{fórmula 3.28})$$

Assim factores de prognóstico podem ser incorporados em funções de sobrevivência.

Para estimar o conjunto de coeficientes, Cox propôs uma função de verosimilhança parcial com o pressuposto de não haver empates nos tempos de sobrevivência observados. No entanto, na prática ocorrem empates nos tempos de sobrevivência e esta função foi modificada para lidar com empates [8].

3.3. REDES NEURONAIS ARTIFICIAIS

3.3.1. Introdução

Nos últimos anos a utilização de redes neuronais artificiais tem vindo a captar cada vez mais o interesse de diferentes áreas científicas como a medicina, física, geologia, economia, engenharia, biologia entre outras, onde estão a ser aplicadas com um enorme sucesso numa vasta gama de problemas. Problemas que envolvam a previsão, a classificação e o controlo podem ser alvo de aplicação de redes neuronais artificiais. As razões deste sucesso podem estar subjacentes a dois aspectos: o poder das redes neuronais artificiais como técnicas sofisticadas de modelação capazes de modelar funções complexas, nomeadamente funções não lineares, e a facilidade de uso das redes neuronais. Este último aspecto prende-se com o facto da aprendizagem executada pelas redes neuronais artificiais ser através de exemplos. Assim, a partir de um conjunto de dados representativos do problema há a aplicação de algoritmos de treino capazes de “aprenderem” a estrutura do conjunto de dados. Um outro aspecto reside no nível de conhecimento que o utilizador necessita para aplicar as redes num dado problema é mais baixo do que o nível de conhecimento necessário para, por exemplo, usar métodos estatísticos tradicionais não lineares [10].

Nas áreas da saúde as redes neuronais podem, pelas suas características, serem ferramentas úteis na pesquisa de padrões com o objectivo de acelerar o desenvolvimento de técnicas e meios capazes de tornar o diagnóstico e o combate às doenças mais eficaz.

No caso do cancro são variados os exemplos da utilização de redes neuronais nas publicações médicas, muitas vezes com resultados promissores. O número de ensaios clínicos e ensaios randomizados

controlados que envolveram a utilização de redes neuronais no diagnóstico e prognóstico aumentou de 1 para 38 desde 1994 a 2006. No entanto, dos 396 estudos sobre cancro nos quais as redes neuronais estão presentes, apenas 27 eram ensaios clínicos ou ensaios randomizados controlados, nos quais 21 mostraram um aumento no benefício da prestação de cuidados e 6 não. Todavia, nenhum destes estudos mostrou uma diminuição no benefício [11].

3.3.2. Definição de Redes Neuronais Artificiais

Desde o início do desenvolvimento dos computadores, vários esforços têm sido feitos com o objectivo de elevar os computadores de meras máquinas calculadoras automáticas a máquinas “inteligentes” [12]. Podemos definir inteligência artificial como sendo o estudo do comportamento inteligente e a implementação de sistemas computacionais que exibam comportamento inteligente [13].

Ao contrário da aproximação simbólica, que utiliza símbolos e suas propriedades, a aproximação através das redes neuronais adopta a metáfora cerebral, que sugere que a inteligência emerge a partir de um conjunto de elementos de processamento ligados entre si e cada um executando uma tarefa computacional simples. Assim, a base de desenvolvimento das redes neuronais artificiais não é mais do que a constatação do funcionamento do cérebro biológico e como este processa a informação de um modo totalmente diferente de um computador convencional [13].

Podemos então, definir redes neuronais artificiais como sendo sistemas computacionais constituídos por unidades de processamento simples maciçamente distribuídas paralelamente, que tentam simular algumas funcionalidades do cérebro biológico como [14, 15]:

- a) Aprendizagem, na qual o conhecimento é adquirido pela rede, a partir um conjunto de treino, através de um algoritmo de aprendizagem;
- b) Conhecimento, que é armazenado sob a forma dos pesos das ligações entre as unidades de processamento;
- c) Generalização, onde o conhecimento armazenado anteriormente pode ser utilizado na presença de novos casos.

Com o objectivo de atingir estas três funcionalidades as redes neuronais apresentam outras características úteis e que justificam também a sua aplicabilidade face a outros métodos. Entre outras, destacam-se:

- a) Auto-organização: a rede constrói a sua própria representação da informação à medida que o treino decorre;
- b) Aprendizagem adaptativa: a capacidade da rede em resolver problemas a partir de uma experiência inicial (“prever o futuro conhecendo o passado”) podendo, à medida que é colocada em contacto com informação recente, aprender e ir melhorando a sua capacidade de previsão;
- c) Tolerância a falhas: caso ocorra uma destruição parcial da rede a sua capacidade de generalização sofre uma degradação suave e não brusca devido à distribuição da informação ao longo da rede;
- d) Computação em paralelo: importante na implementação em hardware (por exemplo em VLSI, “*Very Large Scale Integration*”) capaz de tirar partido deste tipo de computação para melhorar o desempenho.

3.3.3. História Breve das Redes Neurais Artificiais

Apesar de aparentemente ser uma tecnologia recente, o trabalho em redes neurais começou na década de quarenta ainda antes do desenvolvimento dos computadores. Podemos dividir a história das redes neurais artificiais em três épocas. Um primeiro período de descoberta e entusiasmo seguido de um período de frustração e, finalmente, um período de inovação e ressurgimento.

O início da computação neuronal começou com o trabalho inovador e pioneiro de McCulloch (psiquiatra e neurofisiologista) e Pitts (matemático) em 1943. Estes autores unificaram os estudos de neurofisiologia com a lógica matemática formulando um modelo de um neurónio que seguia a lei “do tudo ou nada”. O trabalho de McCulloch e Pitts influenciou muitos outros investigadores como von Neumann que desenvolveu o EDVAC a partir do ENIAC (primeiro computador de propósito geral construído entre 1943 e 1946).

Em 1949, Hebb publicou o livro “The Organization of Behaviour” no qual formula pela primeira vez uma regra de aprendizagem fisiológica para a modificação sináptica.

Rosenblatt em 1958 apresenta uma nova abordagem para o estudo do reconhecimento de padrões ao introduzir o perceptrão (com a demonstração do teorema da convergência do perceptrão). Em 1960 foi desenvolvido por Widrow e Hoff o ADALINE (“ADaptive Linear Element”) destacando-se do perceptrão no processo de aprendizagem pela implementação do algoritmo do mínimo quadrado médio (LMS, “Least Mean-Square”). Depois de um período de grande desenvolvimento com o perceptrão, com o qual se pensava em resolver qualquer tipo de problema, é então que surge em 1969 o

livro de Minsky e Papert no qual demonstraram matematicamente as limitações dos perceptrões de camada única dando início a uma época de descrédito nas redes neuronais artificiais levando ao desinteresse dos investigadores e ao corte de fundos para esta área. Podemos considerar a década de setenta como uma época de inércia na investigação em redes neuronais artificiais.

No início da década de oitenta, vários trabalhos surgiram pela mão de vários investigadores levando ao ressurgimento do interesse na área das redes neuronais artificiais.

Grossberg em 1980 desenvolveu a teoria da ressonância adaptativa (ART, “Adaptative Resonance Theory”). Em 1982, Hopfield desenvolveu redes com realimentação. Também em 1982, Kohonen publicou um artigo sobre mapas auto-organizáveis.

Em 1986 surgiu um marco importante na história das redes neuronais artificiais, o desenvolvimento do popular algoritmo de retropropagação do erro (“backpropagation”) por Rumelhart, Hinton e Williams. Apesar de este algoritmo não representar o processo de aprendizagem no cérebro biológico, ele permite o treino de perceptrões de camadas múltiplas de um modo eficaz e elegante e a sua introdução representa um corte entre modelação do cérebro biológico e o uso de redes neuronais artificiais como analisadores de dados [15, 16].

3.3.4. O Cérebro Biológico

Apesar de não ser objectivo deste trabalho a descrição minuciosa da anatomia e fisiologia do cérebro biológico impõe-se uma descrição breve de alguns conceitos básicos.

O sistema nervoso pode ser visto como um sistema constituído por três elementos (Figura 3.6), os receptores, a rede neural, e os efectivadores. A rede neural (o cérebro) é o elemento central que toma as decisões e que recebe e transmite informação para os receptores e para os efectivadores. Podemos olhar para as setas que apontam para a direita como a transmissão para a frente da informação e as que apontam para a esquerda como a retro-alimentação do sistema.

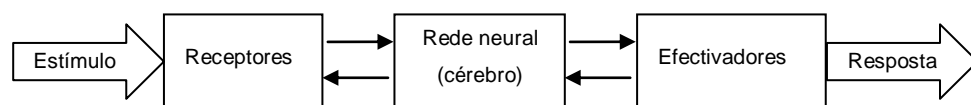


Figura 3.6 - Representação em diagrama do sistema nervoso.

O cérebro biológico é constituído por um número elevado de células nervosas chamadas de neurónios. Por exemplo, estima-se que no cérebro humano existam mais de 10 biliões de neurónios [14]. Os neurónios apresentam duas propriedades importantes: a excitabilidade (capacidade de responder a estímulos) e a condutividade (capacidade de conduzir um sinal).

Os neurónios estão entre as células mais especializadas, estão ligados entre si organizados em redes intensamente interligadas e apesar de exibirem diferentes formas e tamanhos, apresentam três zonas diferenciadas, cada uma com uma função específica: o corpo celular, dendrites e um axónio (Figura 3.7) [17].

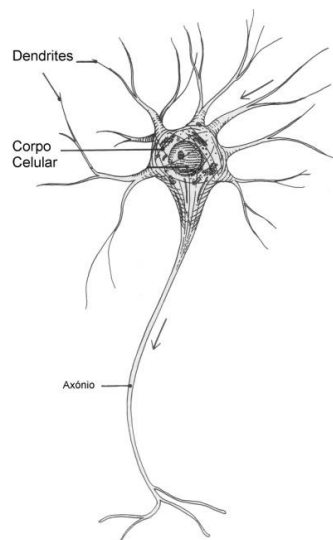


Figura 3.7 - Ilustração de um neurónio biológico.
(Retirado de [17])

Apesar de os neurónios serem cinco a seis ordens de grandeza mais lentos que os circuitos em silício, o cérebro biológico é uma estrutura extremamente eficiente. Esta eficiência é devida não só ao elevado número de neurónios mas também ao elevado número de interligações entre eles, estimando-se que no cérebro humano existam aproximadamente 60 triliões de interligações entre neurónios [14]. À interligação entre dois neurónios ou entre um neurónio e uma célula muscular ou glandular dá-se o nome de sinapse. O neurónio que leva o impulso nervoso em direcção à sinapse é chamado de pré-sináptico e a célula que se encontra depois da sinapse é chamada de pós-sináptica. Enquanto a célula pré-sináptica é sempre um neurónio a pós-sináptica pode ser um neurónio, uma célula muscular ou uma célula glandular.

A transmissão de um impulso nervoso numa sinapse pode ser química ou eléctrica. Na sinapse eléctrica, apesar de rara, as duas células comunicantes estão electricamente ligadas por canais intercelulares das membranas plasmáticas adjacentes. A este tipo de ligação dá-se o nome de ligação tipo “gap”. O movimento livre dos

iões nestes canais faz com que o impulso nervoso passe da célula pré-sináptica para a pós-sináptica de um modo quase instantâneo. No homem, este tipo de ligação entre neurónios pode ser encontrada na retina [17].

A sinapse química é a mais comum e existe a intervenção de uma substância química transmissora – o neurotransmissor. Depois do impulso nervoso chegar à zona terminal do axónio pré-sináptico, ocorre a libertação do neurotransmissor para o espaço sináptico entre os neurónios. O neurotransmissor actua na célula pós-sináptica ocorrendo ou não a continuação da transmissão do impulso nervoso. Na sinapse química há a conversão de um sinal eléctrico em químico, no neurónio pré-sináptico, podendo ocorrer a conversão de um sinal químico em eléctrico na célula pós-sináptica [14, 17].

Existe um estímulo mínimo a partir do qual um neurónio pós-sináptico reage, ocorrendo a transmissão do impulso nervoso a outro neurónio. Mas o aumento do estímulo não provoca o aumento da intensidade do impulso nervoso transmitido pelo neurónio. A esta característica dá-se o nome de princípio do “tudo ou nada”, no qual o neurónio dispara com a máxima força ou não dispara. Assim, os impulsos nervosos que chegam a um neurónio, podem excitá-lo ou inibi-lo.

3.3.5. O Neurónio Artificial

O neurónio artificial, também designado por unidade de processamento, é o elemento básico que constitui as redes neuronais artificiais. A Figura 3.8 mostra um modelo de um neurónio artificial.

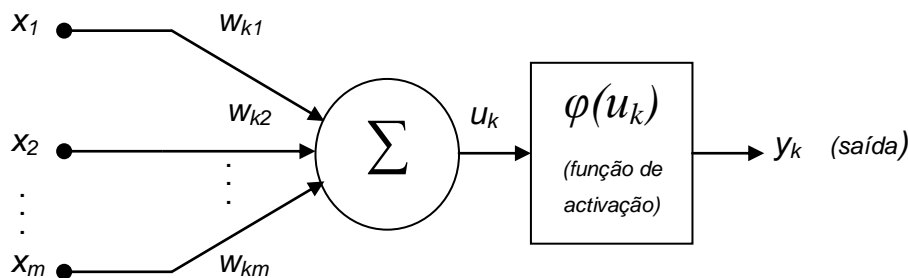


Figura 3.8 - Modelo de um neurónio artificial.

A cada unidade de processamento chega um conjunto de entrada (“input”), e cada entrada é multiplicada de um valor designado por peso (w_k) (análogo à força sináptica). Todas as entradas depois de multiplicadas pelos respectivos pesos são somadas dando origem à entrada final ou total (“input” final ou total) [13]. Matematicamente podemos escrever que para o neurónio k a entrada final u_k é dada por:

$$u_k = \sum_{j=1}^m w_{kj} x_j \quad (\text{fórmula 3.29})$$

em que m é o número total de entradas; x_1, x_2, \dots, x_m são os sinais de entrada; $w_{k1}, w_{k2}, \dots, w_{km}$ são os pesos sinápticos do neurónio k . À entrada total é aplicada uma função designada por função de activação (φ) também conhecida por função de transferência. Assim, matematicamente, podemos dizer que o valor da saída (y_k) do neurónio k é dada por:

$$y_k = \varphi(u_k) \Leftrightarrow y_k = \varphi\left(\sum_{j=1}^m w_{kj} x_j\right) \quad (\text{fórmula 3.30})$$

À saída y_k dá-se também o nome de nível de activação do neurónio k . De notar, que o objectivo da função de activação é limitar o valor

da saída do neurónio a um intervalo finito, normalmente $[0,1]$ ou $[-1,1]$. Vários tipos de funções de activação podem ser aplicadas, podendo estas ser discretas ou contínuas num dado intervalo. Como exemplos de funções de activação temos [14]:

a) Função de limiar representada na Figura 3.9 e definida por:

$$\varphi(u_k) = \begin{cases} 1, & u_k \geq 0 \\ 0, & u_k < 0 \end{cases} \quad (\text{fórmula 3.31})$$

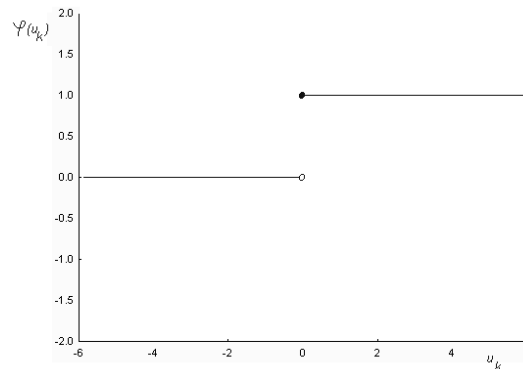


Figura 3.9 - Gráfico da função limiar.

Quando se utiliza esta função de activação o modelo descrito na figura anterior é o modelo de McCulloch e Pitts.

b) Função de sinal:

$$\varphi(u_k) = \begin{cases} 1, & u_k > 0 \\ 0, & u_k = 0 \\ -1, & u_k < 0 \end{cases} \quad (\text{fórmula 3.32})$$

c) Função de limiar por partes (função tipo rampa) representada da Figura 3.10 e definida por:

$$\varphi(u_k) = \begin{cases} 1, u_k \geq a \\ u_k, -a < u_k < a, a \in \mathbb{R} \\ -1, u_k \leq -a \end{cases} \quad (\text{fórmula 3.33})$$

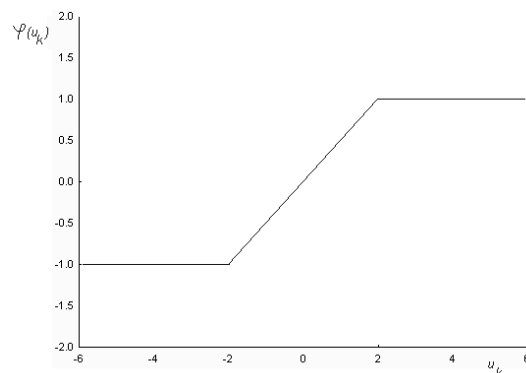


Figura 3.10 - Gráfico da função tipo rampa com $a=2$.

d) Funções sigmóides:

O “disparo suave” de um neurónio, utilizando a função logística, foi introduzido por Cowan em 1967. As funções sigmóides, cujos gráficos têm a forma de S, são as funções de activação mais utilizadas na construção de redes neuronais artificiais. São funções estritamente crescentes e apresentam uma relação adequada entre o comportamento linear e não linear. Têm também a vantagem de poderem acomodar valores elevados sem saturação enquanto permitem a passagem de valores mais pequenos sem atenuação excessiva.

Exemplos de funções sigmóides:

1) Função logística, definida por:

$$\varphi(u_k) = \frac{1}{1 + e^{-au_k}} \quad (\text{fórmula 3.34})$$

em que a é o parâmetro da inclinação da função sigmoide.

Trata-se de uma função continua no intervalo $]0,1[$ e quando u_k tende para infinito a função torna-se na função de limiar (Figura 3.11). Uma característica importante desta função reside na sua derivada ser dada pela expressão:

$$\varphi'(u_k) = \varphi(u_k)(1 - a\varphi(u_k)) \quad (\text{fórmula 3.35})$$

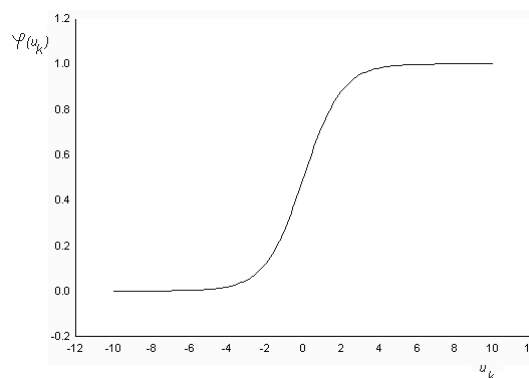


Figura 3.11 - Gráfico da função logística com $a=1$.

A equação (3.25) é uma propriedade conveniente desta função pois a sua derivada pode ser obtida a partir da própria função utilizando apenas duas operações aritméticas, traduzindo-se assim numa vantagem computacional [18].

2) Função tangente hiperbólica, definida por:

$$\varphi(u_k) = \tanh(u_k) \quad (\text{fórmula 3.36})$$

esta função pode ser também escrita da seguinte forma:

$$\varphi(u_k) = \frac{e^{u_k} - e^{-u_k}}{e^{u_k} + e^{-u_k}} \quad (\text{fórmula 3.37})$$

e a sua derivada é dada por:

$$\varphi'(u_k) = (1 - \tanh^2(u_k)) \quad (\text{fórmula 3.38})$$

Esta função tem a vantagem, face à função descrita pela equação (3.34), de poder assumir valores negativos (Figura 3.12) trazendo vantagens analíticas [14].

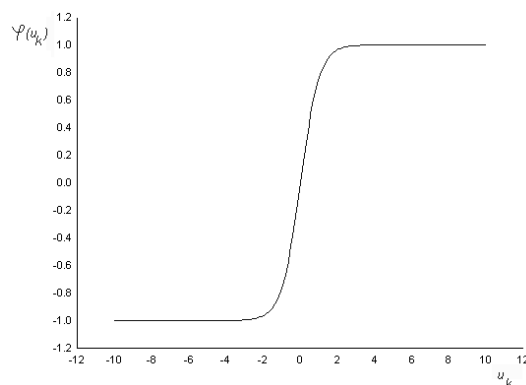


Figura 3.12 - Gráfico da função tangente hiperbólica.

Muitas outras funções de activação podem ser utilizadas, dependendo essencialmente do tipo de rede a ser aplicada ao problema em estudo (por exemplo, a função raiz quadrada utilizada em redes de Kohonen).

A cada ligação ao neurónio k está associada um peso. Os pesos sinápticos podem ser números inteiros ou reais, podendo pertencer um intervalo limitado. Antes do treino, o esquema de inicialização dos pesos pode ser específico a uma rede particular mas normalmente são inicialmente randomizados a números inteiros pequenos. Durante o treino são ajustados, apesar de alguns poderem ser fixados deliberadamente (como no caso do “bias”). Quando terminar o treino todos os pesos são fixados [13].

Podemos adicionar uma entrada fixa na qual $x_0 = +1$ ou -1 (designamos por x_0 pois é uma entrada diferente das restantes) e o peso sináptico relacionado com esta nova entrada (w_{k0}) designa-se por “bias” do neurónio k (b_k). Podemos traduzir “bias” como “o peso que provoca desequilíbrio” (Figura 3.13).

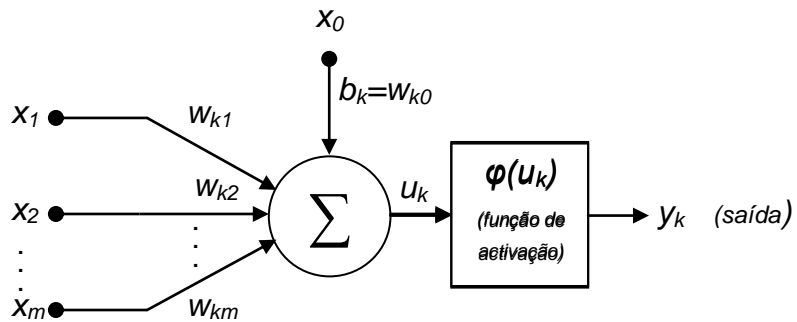


Figura 3.13 - Modelo de um neurónio artificial no qual está representada o “bias”.

Assim as equações (3.29) e (3.30) tomam a forma:

$$u_k = b_k + \sum_{j=1}^m w_{kj} x_j \quad (\text{fórmula 3.39})$$

o que equivale a

$$u_k = \sum_{j=0}^m w_{kj} x_j \quad (\text{fórmula 3.40})$$

e

$$y_k = \varphi(u_k) \Leftrightarrow y_k = \varphi\left(\sum_{j=0}^m w_{kj} x_j\right) \quad (\text{fórmula 3.41})$$

O “bias” (b_k) tem o efeito de aumentar ou diminuir a entrada total aplicada à função de activação dependendo se é positivo ou negativo

respectivamente e podemos considerá-lo como um parâmetro externo do neurónio k [14].

Estudado o neurónio artificial, podemos agora, realizar algumas comparações úteis. A Tabela 3.2 mostra algumas comparações entre o cérebro biológico e as redes neuronais artificiais e a Tabela 3.3 mostra a comparação entre os termos utilizados na estatística e os termos utilizados nas redes neuronais artificiais.

Tabela 3.2 - Comparação entre o sistema biológico e artificial.

Cérebro biológico	Redes Neuronais Artificiais
Concentração do neurotransmissor	Peso sináptico
Neurónios	Neurónios artificiais ou unidades de processamento
Sinapses	Interligações entre os neurónios artificiais
Aprendizagem	Treino da rede
Memória	Valores dos Pesos sinápticos
Princípio do “tudo ou nada”	Função de activação usada no modelo de McCulloch e Pitts

Tabela 3.3 - Comparação entre termos utilizados em estatística e redes neuronais artificiais.

Estatística	Redes Neuronais Artificiais
Modelo	Rede
Estimação	Aprendizagem
Regressão	Aprendizagem supervisionada
Interpolação	Generalização
Observações	Conjunto de treino
Parâmetros	Pesos sinápticos
Variáveis independentes	Variáveis de entrada (“input”)
Variáveis dependentes	Variáveis de saída (“output”)

3.3.6. Topologia das Redes

A topologia de uma rede refere-se à organização e interligação dos diferentes neurónios artificiais [13]. Podemos representar graficamente uma rede neuronal como um conjunto de nós, que representam os neurónios artificiais e linhas que representam as ligações (sinapses) entres eles (Figura 3.14).

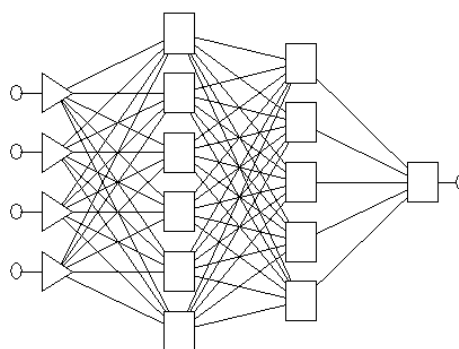


Figura 3.14 - Representação gráfica de uma rede neuronal artificial com uma camada de entrada (com quatro neurónios artificiais); duas camadas ocultas (uma com seis e outra com cinco neurónios) e uma camada de saída (com apenas um neurónio).

A organização de uma rede é frequentemente especificada como sendo o número de camadas (apesar de nem todas as redes possuam uma estrutura em camadas) e o número de nós por camada.

As camadas podem ser divididas em:

- a) Camada de entrada (de “input”): é a que recebe a informação codificada que está a ser apresentada à rede num dado instante. As unidades desta camada não processam informação, apenas a distribuem para as outras unidades, daí serem normalmente representadas graficamente de maneira diferente;

- b) Camada(s) oculta(s): não é directamente observável (daí o seu nome). É a camada que confere às redes características de não linearidade;
- c) Camada de saída (de “output”): é a camada que codifica o sinal de saída das redes podendo representar por exemplo um número ou uma classe.

Em relação ao esquema de interligações entre os neurónios artificiais, as redes podem ser:

- a) Redes alimentadas para a frente, nas quais as ligações apontam num só sentido (da camada de entrada para a de saída);
- b) Redes recorrentes, nas quais existem ligações de retro-alimentação (“feedback”) ou saltos (“loops”).

As ligações podem ser simétricas quando há uma ligação do neurónio i para o j então, há também uma ligação do neurónio j para o i e os pesos associados às ligações são iguais ($w_{ij}=w_{ji}$). Nos restantes casos as ligações são assimétricas.

As ligações podem também ser:

- a) Intra-camada, quando se trata de uma ligação entre nós da mesma camada;
- b) Inter-camada, quando se trata de uma ligação entre nós de camadas diferentes mas adjacentes;
- c) Supra-camada, quando se trata de uma ligação entre nós de camadas diferentes mas não adjacentes.

Quando todos os nós de uma camada estão ligados a todos os nós da camada adjacente diz-se que a rede está totalmente ligada (conectada), no caso inverso diz que está parcialmente ligada (conectada).

Podemos também descrever a estrutura de uma rede neuronal artificial de uma forma compacta que a resume. Assim para uma rede alimentada para a frente com m nós de entrada, h_1 nós na primeira camada oculta, h_2 nós na segunda camada oculta e p nós de saída é referida como uma rede $m-h_1-h_2-p$. Por exemplo podemos dizer que a rede representada na Figura 3.14 é uma rede 4-6-5-1 [14].

Convencionalmente, em redes com camadas múltiplas, a camada de entrada não é contabilizada, assim, numa rede com n camadas tem $n-1$ camadas ocultas, uma camada de saída e uma camada de entrada [13].

3.3.7. Classificação das Redes Neurais Artificiais

Uma possível classificação para os diferentes tipos de redes será a divisão em três grupos: redes associativas, redes de extracção de características e redes não adaptativas.

As redes associativas são o tipo mais comum de redes e são modelos que necessitam para o seu treino um conjunto de treino no qual estão incluídos a informação de entrada e de saída sendo o treino realizado através de aprendizagem supervisionada. Estas redes produzem uma função interna, através dos valores dos pesos sinápticos, capaz de realizar tarefas de previsão e de classificação. A capacidade de previsão da rede está no entanto limitada à interpolação dentro do espaço de entrada-saída, sendo a extrapolação (fora deste espaço) normalmente errada. O modelo mais representativo deste tipo de redes são os perceptrões de múltiplas camadas.

Nas redes de extracção de características a aprendizagem é normalmente feita utilizando métodos não supervisionados ou aprendizagem competitiva. São normalmente aplicadas em redução da dimensionalidade muitas vezes utilizadas em conjunto com as redes associativas, originando redes híbridas, desempenhando um papel na filtragem de dados. Dentro deste grupo podemos incluir as redes hebbianas e as redes de Kohonen.

As redes não adaptativas são normalmente usadas no reconhecimento de padrões como por exemplo imagens. Estas redes aprendem padrões tipos das variáveis de entrada, reconstruindo-os quando é apresentada à rede um padrão incompleto (danificado) ou com ruído. Estão incluídas neste grupo as redes de Hopfield.

3.3.8. Processos de Aprendizagem

A construção de um sistema baseado em redes neuronais artificiais irá geralmente envolver os seguintes passos:

- a) Selecção e construção de um modelo de redes neuronais adequado ao problema em causa;
- b) Treino da rede neuronal artificial usando um algoritmo de treino adequado;
- c) Uso da rede neuronal artificial treinada para resolver o problema em causa.

A propriedade mais importante de uma rede neural artificial é a capacidade de aprender (de treinar) e de melhorar o seu desempenho ao longo do tempo. Uma rede neuronal artificial aprende através de um processo interactivo de ajustes aos pesos sinápticos [14]. Baseada na definição de Mendel e McClaren (1970) [14] e na definição de Hebert Simon (1983) [13], podemos definir aprendizagem (ou treino) como um processo pelo qual os parâmetros

livres da rede são moldados através da estimulação do ambiente onde a rede está inserida, permitindo à rede executar a mesma tarefa a partir do mesmo ambiente mais eficazmente no tempo seguinte.

O algoritmo de aprendizagem não é mais do que um conjunto de regras para a resolução de um problema de aprendizagem existindo vários exemplos de algoritmos mas basicamente divergindo entre si na forma como o ajuste dos pesos sinápticos irá ser feito [14].

A aprendizagem pode ser supervisionada ou não supervisionada. Na primeira o conjunto de treino, para além dos sinais de entrada tem também incorporado os sinais de saída que irão ser comparados com os sinais de saída originados pela rede. Esta comparação é utilizada no processo de aprendizagem para influenciar o modo como os pesos sinápticos são ajustados. No segundo tipo, a aprendizagem é feita utilizando um conjunto de treino no qual só estão disponíveis os sinais de entrada. Na aprendizagem supervisionada, também designada por aprendizagem com um professor, ocorre então a detecção do erro entre a saída calculada pela rede e a saída desejada, ocorrendo a incorporação desse erro no ajuste dos pesos sinápticos. Na aprendizagem não supervisionada (sem professor) já não ocorre a comparação entre a saída calculada pela rede e a saída desejada pois esta não está disponível no conjunto de treino. Normalmente a aprendizagem não supervisionada apresenta uma menor complexidade computacional apesar de ser menos precisa que a supervisionada, sendo útil em situações de tempo-real onde não há tempo suficiente para aplicar a aprendizagem supervisionada [13] e na análise exploratória permitindo a descoberta de padrões no conjunto de treino e relacionar esses padrões entre si e organizá-los em classes [10].

Considerando um conjunto de treino T com n elementos, podemos descrever o algoritmo de aprendizagem de uma forma generalizada:

- 1º passo: iniciar os pesos sinápticos (geralmente este passo envolve a randomização dos pesos num dado intervalo);
- 2º passo : apresentar à camada de entrada da rede o elemento de treino t pertencente ao conjunto T (t varia de 1 a n);
- 3º passo : calcular a saída da rede;
- 4º passo : alterar os pesos sinápticos de acordo com a regra de aprendizagem estabelecida;
- 5º passo : quando o desempenho da rede for o desejado, então sair, caso contrário incrementar t em 1 e ir para o 2º passo e repetir. Se $t=n$ faz-se $t=1$ e vai-se para o 2º passo e repete-se ou sai-se e anota-se o desempenho final da rede.

Notar que a cada apresentação de um elemento de treino dá-se o nome de época de treino ou de interacção de treino devendo ser feita de uma forma aleatória, tornando a procura, dos valores dos pesos sinápticas, de natureza estocástica.

Vários algoritmos de aprendizagem estão disponíveis para o treino de redes neuronais artificiais os quais podem usar diversas regras de aprendizagem.

O objectivo do algoritmo de aprendizagem é então, o ajuste dos pesos sinápticos de modo a minimizar o erro da previsão feita pela rede neuronal. Várias regras de aprendizagem podem ser utilizadas, entre elas temos a aprendizagem: por correcção de erro; competitiva; de Boltzman e Hebbiana (por correlação).

3.3.9. O “STATISTICA Neural Networks”

No nosso trabalho foi utilizado um software geral de redes neuronais artificiais. Foi escolhido o STATISTICA Neural Networks versão 6 da StatSoft, Inc.

Trata-se de um software que apresenta a vantagem de permitir numa mesma aplicação uma análise dos dados quer recorrendo a métodos estatísticos convencionais quer recorrendo às redes neuronais de uma forma directa, dentro do mesmo ambiente de trabalho, com a mesma interface gráfica e sem produzir alterações à maneira como os dados estão formatados e tabelados.

Com este software vários tipos de redes podem ser desenvolvidos (ex. perceptrões de múltiplas camadas, redes RBF, SFOM entre outras). Vários algoritmos de aprendizagem podem ser utilizados como a retropropagação, propagação rápida (“quick propagation”), “quasi-newton”, Levenberg-Marquardt, assim como várias técnicas de pré e pós-processamento como escalonamento e codificação de variáveis. Os dados podem ser automaticamente ou manualmente separados em dados de treino, teste e validação para garantir uma correcta generalização por parte da rede podendo também proceder a reamostragens (“resampling”).

Em muitos casos a construção de uma rede neuronal envolve várias tentativas nas quais se experimentam vários tipos de redes diferentes até se encontrar a melhor possível para resolver o problema. Esta fase pode ser tediosa principalmente se todos os parâmetros (i.e. o número de neurónios ocultos, o número de camadas, a taxa de aprendizagem, o momento, etc,) tenham de ser ajustados a cada treino de cada rede.

Nesta fase o STATISTICA Neural Networks apresenta uma ferramenta muito útil. Trata-se do “Inteligente Problem Solver” (IPS), o qual permite testar vários tipos de redes com diferentes características dentro de cada tipo, podendo no final resumir as melhores redes encontradas comparando-as utilizando uma medida de desempenho e de erro para cada um dos subconjuntos (de treino e validação).

Este software permite também realizar análises de sensibilidade úteis para obter informação sobre a importância das variáveis de entrada. É ainda possível desenvolver conjuntos de redes neurais (“ensembles”) que cooperam para melhorar a previsão e evitar os possíveis erros cometidos pela rede (variância e “bias”) [10].

3.4. REFERÊNCIAS

1. Ton Cleophas, A.Z., *Statistics Applied to Clinical Studies*. Fifth Edition ed. 2012: Springer Science+Business Media B.V.
2. Le, C., *Introductory Biostatistics*. 2003: John Wiley & Sons, Inc.
3. Carrasco, J., *El Método Estadístico en la Investigación Médica*. Sexta Edición ed. 1995: Editorial Ciencia 3.
4. Shultz, E.K., *Multivariate receiver-operating characteristic curve analysis: prostate cancer screening as an example*. Clin Chem, 1995. **41**(8 Pt 2): p. 1248-55.
5. Zweig, M.H. and G. Campbell, *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine*. Clin Chem, 1993. **39**(4): p. 561-77.
6. Daniel, W., *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. Fourth Edition ed. 1987: John Wiley & Sons, Inc.
7. Rui Guimarães, J.C., *Estatística*. 1997: McGraw-Hill, Portugal.
8. Elisa Lee, J.W., *Statistical Methods for Survival Data Analysis*. Third edition ed. 2003: John Wiley & Sons, Inc.
9. P. Armitage, G.B., *Estatística para la Investigación Biomédica (Trad. J.Peret)*. Tercera Edición ed. 1997: Harcourt Brance de España, S.A.
10. StatSoft, *STATISTICA 6.0 Neural Networks Manual*: © StatSoft, Inc., 1984-2000.
11. Lisboa, P.J. and A.F. Taktak, *The use of artificial neural networks in decision support in cancer: a systematic review*. Neural Netw, 2006. **19**(4): p. 408-15.
12. Masters, T., *Practical Neural Network Recipes in C++*. 1993: Academic Press, Inc.
13. Fu, L., *Neural Networks in Computer Intelligence*. 1994: McGraw-Hill, Inc.
14. Haykin, S., *Redes Neurais, Princípios e Prática. (Trad. Paulo Engel)*. 2nd Edition ed. 2001: Porto Alegre: Bookman.
15. Bourquin, J., et al., *Basic concepts of artificial neural networks (ANN) modeling in the application to pharmaceutical development*. Pharm Dev Technol, 1997. **2**(2): p. 95-109.
16. Drew, P.J. and J.R. Monson, *Artificial neural networks*. Surgery, 2000. **127**(1): p. 3-11.
17. Robert Carola, J.H., Charles Noback, *Human Anatomy & Physiology*. Second edition ed. 1992: McGraw-Hill, Inc.
18. Bishop, C., *Neural Networks for Pattern Recognition*. 2000: Oxford University Press Inc.

**4. CA-125 HALF-LIFE
BREAKPOINT BETWEEN A “GOOD” AND “POOR”
PROGNOSIS IN PATIENTS WITH OVARIAN CANCER***

**International Journal of Gynecology and Obstetrics (2005).*

4.1. INTRODUCTION

Ovarian cancer, generally treated with combination first line chemotherapy after cytoreduction surgery [1], has the highest mortality of all invasive cancers of the female reproductive system. CA-125 serum concentration is usually adopted to evaluate the clinical situation in ovarian cancer patients [2]. An approach to rapid evaluation of clinical response and monitoring, instead of using the coarse CA-125 serum concentration, is the determination of tumor marker kinetic parameters, associated with changes in its concentrations, such as half-life ($t_{1/2}$) and doubling time (DT) [3]. The rate of decline in CA-125 during primary chemotherapy has been an important independent prognostic factor in several multivariate analyses [2]. Several studies report the greatest difference in progression rate, found at a $t_{1/2}$ of 20 days while the normal CA-125 half-life value to be determined varied from 5 to 10 days [3,4].

4.2. MATERIAL, METHODS AND RESULTS

The aim of the present work is the determination of CA-125 half-life breakpoint between a “good” or “poor” prognosis in our population. Retrospective clinical information was obtained from 339 patients with a diagnosis of ovarian cancer at the Gynaecology Service of Coimbra University Hospitals (CUH) main database from 1990 to 2000. Only 63 patients (mean age: 58.5 years old, range 16.3-82.4 years) were included in the present analysis due to the restriction of our inclusion criteria: patients that underwent primary line chemotherapy within 3 months after submission to cytoreductive surgery. Six patients had FIGO stage I; five had stage II; forty one had stage III; seven had stage IV and in four patients this information was missing. Fifty eight had epithelial ovarian cancer; four patients have other histological

types and one patient with no information. None borderline tumor was include. Seven patients had a tumor grade 1; twenty two a tumor grade 2; nine had a tumor grade 3 and twenty five patients had no tumor grade information. The mean duration of primary chemotherapy was 4.2 (0.7-10.2; S.E.=0.2) months: twenty seven patients had a complete response to primary chemotherapy; eighteen had a partial response; fourteen had no response or a disease progression and four patients had missing information. At evaluation date, forty three patients were deceased while twenty three were alive. The mean overall survival was 30.0 (1.96-94.2; S.E.=2.7) months.

For each patient we determined the CA-125 half-life using the formula:

$$t_{1/2} = \frac{(\ln 2)(t_2 - t_1)}{\ln\left(\frac{C_1}{C_2}\right)} \quad (\text{formula 4.1})$$

where C_1 is the first CA-125 serum concentration after cytoreduction surgery (must be superior to the 35 IU/mL cut-off), C_2 is the first CA-125 serum concentration below 35 IU/mL or the last CA-125 concentration after five CA-125 normal half-lives (50 days) in case CA-125 did not normalize below 35 IU/mL, and t_1 and t_2 are the corresponding dates for C_1 and C_2 respectively. Regarding the half-life value the patient’s prognosis was classified into two classes: “good” or “poor” prognosis if $t_{1/2} \leq X$ or $t_{1/2} > X$ respectively, where X is equal to 10, 15, 20, 25, 30, 35 or 40 days. All patients with $t_{1/2} \leq 0$ were classified as “poor”. A statistical analysis was conducted and the Mann-Whitney U test was used to compare the overall survival across subgroups of patients depending on CA-125 $t_{1/2}$ behavior ($p \leq 0.05$ was considered statistically significant) (Table 4.1). Figure 4.1 shows the survival curve (Kaplan-Meier) in agreement with CA-125 half-life breakpoint of 16 days.

4.3. DISCUSSION

Čolaković et al [4], reported that patients with a CA-125 half-life < 20 days had 1.8 times longer survival times than those with a longer CA-125 half-life while in our study the obtained breakpoint was 16 days and patients with CA-125 half-life below this value have a mean survival 1.67 times greater than others with longer CA-125 half-life values. Nevertheless, the existence of CA-125 half-life breakpoint to allow the discrimination between “good” or “poor” prognosis confirms the suitability of this kinetic parameter for an earlier prediction of the patient’s overall survival. However, the CA-125 half-life kinetic parameter should not be used alone but in combination with other recognized prognostic factors.

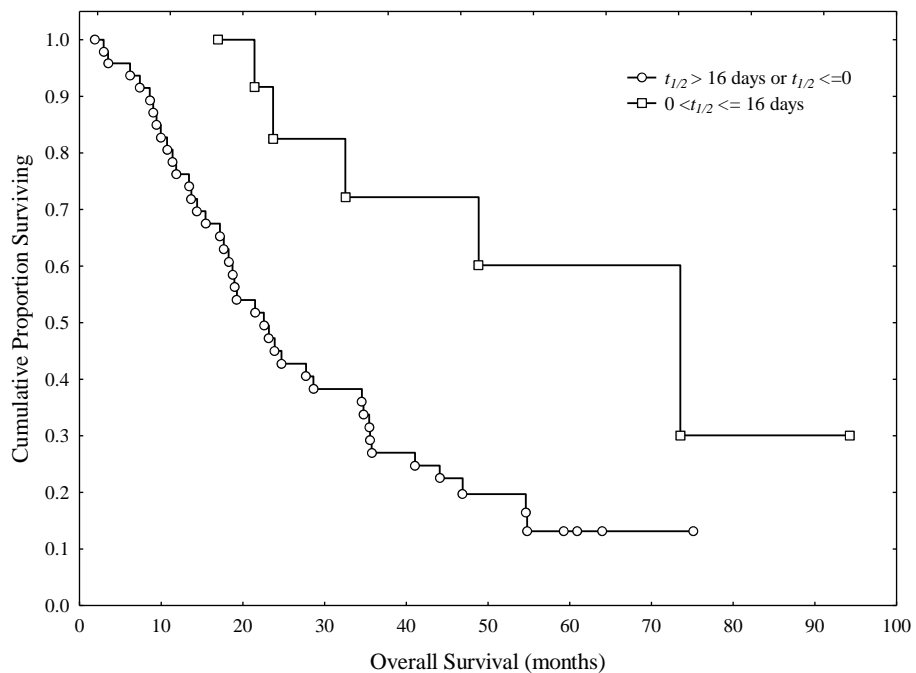


Figure 4.1 - Survival curve (Kaplan-Meier) in agreement with CA-125 half-life breakpoint of 16 days.

CA-125 half-life breakpoint
between a “good” and “poor” prognosis in patients with ovarian cancer

Table 4.1. - Overall survival for the different prognostic group concerning the $t_{1/2}$ breakpoint.

CA-125 $t_{1/2}$ (days)	Classification	N	Mean Overall	Median Overall	<i>p</i> -value
			Survival (SD) [months]	Survival (Q ₂₅ -Q ₇₅) [months]	
10	Good ($t_{1/2} \leq 10$ days)	4	47.7 (33.7)	39.7 (23.8-71.5)	<i>p</i> = 0.2149
	Poor ($t_{1/2} > 10$ days)	59	28.8 (19.8)	22.6 (13.4-44.1)	
15	Good ($t_{1/2} \leq 15$ days)	10	39.5 (24.4)	31.6 (22.3-48.9)	<i>p</i> = 0.1058
	Poor ($t_{1/2} > 15$ days)	53	28.2 (20.2)	21.5 (11.8-44.1)	
20	Good ($t_{1/2} \leq 20$ days)	24	38.8 (22.1)	34.7 (21.9-51.4)	<i>p</i> = 0.0069
	Poor ($t_{1/2} > 20$ days)	39	24.5 (18.7)	18.7 (9.4-35.6)	
25	Good ($t_{1/2} \leq 25$ days)	32	38.7 (21.3)	35.3 (21.9-54.3)	<i>p</i> = 0.0003
	Poor ($t_{1/2} > 25$ days)	31	21.0 (16.9)	17.2 (9.0-27.7)	
30	Good ($t_{1/2} \leq 30$ days)	40	37.4 (21.8)	34.7 (20.4-54.3)	<i>p</i> = 0.0001
	Poor ($t_{1/2} > 30$ days)	23	17.1 (11.8)	16.9 (8.6-21.5)	
35	Good ($t_{1/2} \leq 35$ days)	42	36.5 (21.7)	33.5 (19.4-54.0)	<i>p</i> = 0.0002
	Poor ($t_{1/2} > 35$ days)	21	16.9 (12.0)	16.9 (8.6-19.0)	
40	Good ($t_{1/2} \leq 40$ days)	44	35.9 (21.4)	31.6 (19.4-51.4)	<i>p</i> = 0.0002
	Poor ($t_{1/2} > 40$ days)	19	16.4 (12.5)	15.4 (6.2-19.0)	
Between $t_{1/2} = 16$ and $t_{1/2} = 19$ days statistically significant difference was first found for					
$t_{1/2} = 16$ days					
16	Good ($t_{1/2} \leq 16$ days)	14	43.5(24.3)	34.8(22.3-66.9)	<i>p</i> = 0.0086
	Poor ($t_{1/2} > 16$ days)	49	26.1(18.6)	19.3(11.4-35.8)	

(All patients with $t_{1/2} \leq 0$ were classified as “Poor”)

4.4. REFERENCES

1. Baker VV: Treatment Options for Ovarian Cancer. *Clinl. Obstetr. Gynecol.* 2001; 44(3):522-530.
2. Bast Jr. RC, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB: CA 125: The past and the future. *Int. J. Biol. Markers* 1998; 13(4):179-187.
3. Bidart JM, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N, Labrousse F, Voitot H: Kinetic of Serum Marker Concentrations and Usefulness in Clinical Monitoring. *Clin. Chem.* 1999; 45(10):1695-1707.
4. Čolaković S, Lukić V, Mitrović L, Jelić S, Šušnjar S, Marinković J: Prognostic Value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer. *Int. J. Biol. Markers* 2000; 15(2):147-152.

5. CA-125 AUC
AS A NEW PROGNOSTIC FACTOR FOR PATIENTS
WITH OVARIAN CANCER*

**Gynecologic Oncology (2005).*

Abstract

Objective: The aim of the present study was to investigate the usefulness of the CA-125 area under the curve (AUC) as a new kinetic parameter for predicting overall survival in patients with ovarian cancer. In addition, the relationship of CA-125 AUC with other prognostic factors of ovarian cancer was evaluated.

Methods: Ninety-two patients that underwent primary line chemotherapy within 4 months after submission to cytoreductive surgery were included. For each patient, CA-125 AUC was calculated and a statistical analysis was conducted to compare CA-125 AUC behaviour among patients according to several covariates.

Results: The mean age at diagnostic time was found to be 55.5 (16.1-82.4) years with a mean survival of 39.2 (3.5-100.1; S.E.=2.6) months. Across FIGO stage I, II, III and IV patients had a mean CA-125 AUC of 18.2, 24.6, 147.8, and 574.6 IU/mL, respectively ($p < 0.05$). At the evaluation date, living patients had a mean CA-125 AUC of 40.1 in contrast to 234.1 IU/mL ($p < 0.05$) for deceased ones. Patients with a complete response to primary chemotherapy had a mean CA-125 AUC of 48.8, while patients with a partial response had a mean of 251.7 IU/mL, and patients with no response or disease progression had a mean of 316.5 IU/mL ($p < 0.05$). The best CA-125 AUC performance is in predicting patient complete response to chemotherapy with a cut-off of 100 IU/mL and an accuracy of 82%.

Conclusions: Despite CA-125 AUC high correlation with the FIGO stage, residual disease and patient final outcome, the main interest of CA-125 AUC calculation is to evaluate the treatment efficacy and to foresee a full chemotherapy response. Further studies should be carried out before extrapolating these results to others data sets.

Key Words: CA-125 kinetics; ovarian cancer; prognostic factors.

5.1. INTRODUCTION

Ovarian cancer, generally treated with combination first line chemotherapy after cytoreduction surgery [1-2], has the highest mortality rate of all invasive cancers of the gynaecological system. Bast *et al.* (1983) first described a radioimmunoassay that could detect CA-125 (Cancer Antigen 125) in the serum of ovarian cancer patients [3]. CA-125 serum concentration is usually adopted to evaluate the clinical situation in ovarian cancer patients and the rate of decline in CA-125 during primary chemotherapy has been an important prognostic factor in several multivariate analyses [4]. The postoperative serum CA-125 level is an independent prognostic factor in patients with invasive ovarian cancer [5], and CA-125 tumor marker half-life ($t_{1/2}$) and tumor marker doubling time (DT) are often used as kinetic parameters for the evaluation of clinical response and follow-up of patients with ovarian cancer [6]. Serum CA-125 half-life during early chemotherapy is an independent prognostic factor for both the achievement of a pathologically complete response and the survival of patients with advanced epithelial ovarian cancer [7], and several studies report that the greatest difference in progression rate was found at a $t_{1/2}$ of 20 days [8-11]. Nevertheless, although CA-125 level before the 3rd course of chemotherapy was considered the best prognostic indicator by Fayers *et al.*, it was classified inaccurately for clinical use [12].

In addition to CA-125 kinetic parameters, several other prognostic factors can be used in the management of ovarian cancer: the FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) tumor stage, tumor grade, tumor biology, over expression of the HER-2/neu oncogene, residual disease after initial cytoreductive surgery and rate of response to chemotherapy [13].

CA-125 tumor marker kinetics are more important than the isolated value of CA-125 serum concentration for patient prognosis, and in the present work we propose a new kinetic parameter: the CA-125 area under the curve (AUC) and its relation with the FIGO stage, patient final state, tumor grade, residual disease and primary chemotherapy response. Additionally, the influence of this new prognostic factor to overall survival in patients with ovarian cancer was also studied in our population.

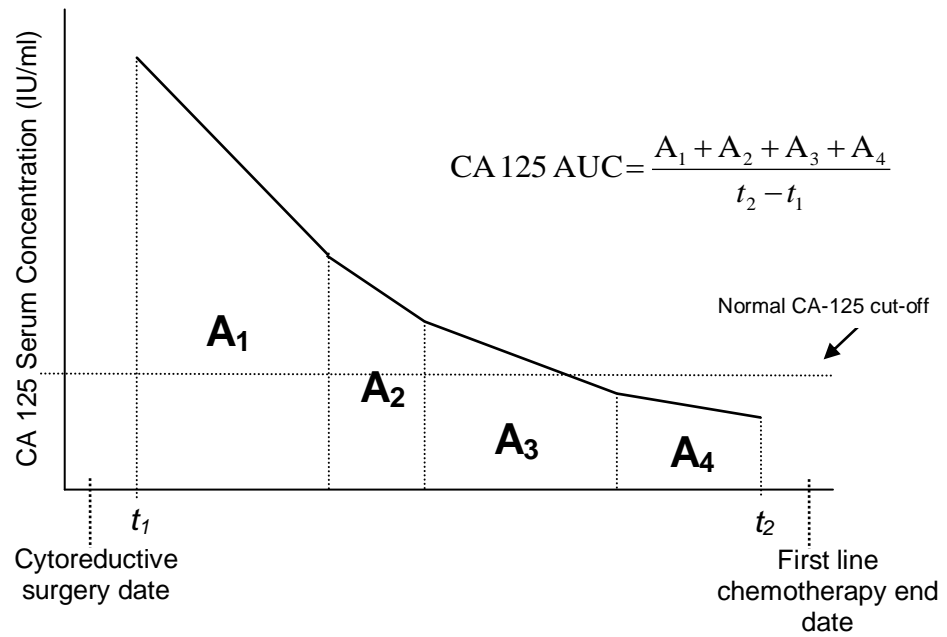
5.2. PATIENTS AND METHODS

Retrospective clinical information was gathered from 339 patients with a diagnosis of ovarian cancer at the Gynaecology Service of Coimbra University Hospital (CUH) main database from 1990 to 2000. In addition, CA-125 serum levels of these patients were obtained from the Pathology Service (Hormonology & Drug Monitoring Laboratory) of CUH. Only 92 patients were included in the present analysis due to the restriction of our inclusion criteria: patients that underwent primary line chemotherapy within 4 months after submission to cytoreductive surgery and with a minimum of three CA-125 serum concentrations between the time of surgery and the end of chemotherapy. For each patient, CA-125 AUC was calculated using the following formula:

$$\text{CA - 125 AUC} = \frac{\text{sum of all trapezoid areas between } C_1 \text{ and } C_2}{t_2 - t_1} \quad (5.1)$$

where C_1 is the first CA-125 serum concentration after the cytoreduction surgery and C_2 is the last CA-125 serum concentration before the end of first line chemotherapy, and t_1 and t_2 are the corresponding dates for C_1 and C_2 , respectively (Figure 5.1).

(A)



(B)

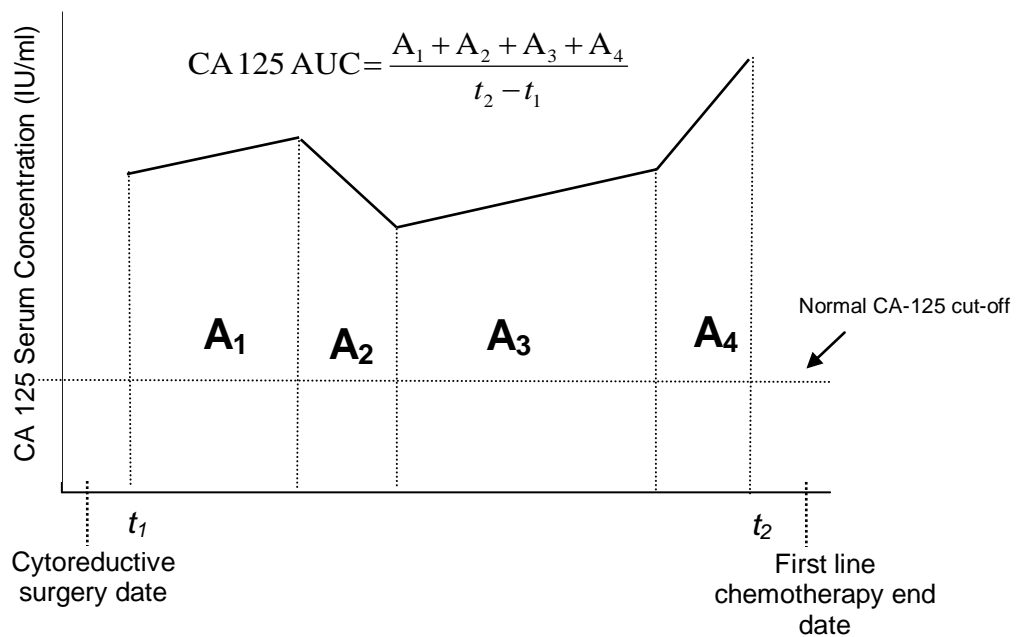


Figure 5.1 - CA-125 AUC hypothetical determination in a patient with ovarian cancer treated with first line chemotherapy after cytoreductive surgery; **(A)** patient with an optimal CA-125 serum levels evolution during treatment; **(B)** patient with an unstable CA-125 serum levels during treatment.

A statistical analysis was conducted. The Mann-Whitney U test (for two groups) and Kruskal-Wallis test (for three or more groups) were used to compare the CA-125 AUC across subgroups of patients, depending on the FIGO stage, patient final state, tumor grade, histological type, residual disease (>2 cm) and response to primary chemotherapy. The area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was established for the discrimination by CA-125 AUC in predicting the patient final state, overall survival equal or superior to one, three and five years, and a full response to chemotherapy. Sensitivity, specificity, positive predictive values (PPV), and overall accuracy were also determined for several CA-125 AUC cut-offs. In addition, a multivariate regression analysis based on the Cox proportional hazard model to test the variation of CA-125 AUC in relation to the overall survival time was also carried out. A p-level ≤ 0.05 was considered significant.

5.3. RESULTS

The mean age at diagnostic time was found to be 55.5 (16.1-82.4; S.E.=1.65) years with a mean overall survival of 39.2 (3.5-100.1; S.E.=2.6) months. According to the FIGO tumor stage, nineteen (20.7%) patients had stage I, eleven (11.9%) had stage II, fifty-one (55.4%) had stage III, nine (9.8%) had stage IV and in two (2.2%) patients this information was missing. Eighty-two (89.1%) patients had epithelial ovarian cancer for histological type. Twelve (13.0%) patients had a tumor grade 1, twenty-nine (31.5%) a tumor grade 2, nine (9.8%) had a tumor grade 3 and forty-two (45.7%) patients had no tumor grade information. Thirty-six (39.1%) patients had a residual tumor greater than 2 cm after surgery. The mean duration of primary chemotherapy was 4.1 (0.7-10.2; S.E.=0.15) months: fifty-two (56.5%) patients had a complete response to primary chemotherapy, twenty-two (23.9%) had a partial response, thirteen (14.1%) had no

response or a disease progression and five (5.4%) patients had missing information for the response to chemotherapy. At evaluation date, fifty (54.3%) patients were deceased while forty-two (45.7%) were alive. Eighty patients (86.9%) had at least one year survival, forty-four (47.8%) had at least three years while only twenty-one (22.8%) had more than five years survival (Table 5.1).

The CA-125 AUC across groups of patients is shown in Table 5.2. Patients with FIGO stage I, II, III and IV had a mean CA-125 AUC of 18.2 (S.E.=2.4) IU/mL, 24.6 (S.E.=7.6) IU/mL, 147.8 (S.E.=30.8) IU/mL, and 574.6 (S.E.=134.6) IU/mL, respectively ($p < 0.05$) (Figure 5.2). Patients with a tumor grade 1, 2 and 3 had a mean CA-125 AUC of 100.1 (45.5) IU/mL, 158.1 (43.0) IU/mL, and 238.8 (114.0) IU/mL, respectively ($p > 0.05$). Patients with residual disease (>2cm) had a mean CA-125 AUC of 207.4 (S.E.=48.3) IU/mL, while patients without residual disease had 97.9 (S.E.=30.0) IU/mL ($p < 0.05$). At the evaluation date, living patients had a mean CA-125 AUC of 40.1 (S.E.=10.5) IU/mL in contrast to deceased patients, who had a CA-125 AUC of 234.1 (S.E.=44.4) IU/mL ($p < 0.05$). Fifty-two patients had a complete response to primary chemotherapy with a mean CA-125 AUC of 48.8 IU/mL (S.E.= 15.9) while twenty-two patients had a partial response and thirteen patients had no response or disease progression with a mean CA-125 AUC of 251.7 IU/mL (S.E.=65.8) and a mean of 316.5 IU/mL (S.E.=107.5), respectively ($p < 0.05$) (Figure 3).

For predicting the patient final state the best accuracy (74%) was achieved at CA-125 AUC \leq 100 IU/mL (ROC AUC=0.77). To predict patient survival the most accurate was 87% (CA-125 AUC \leq 1000 IU/mL), 72% (CA-125 AUC \leq 100 IU/mL) and 66% (CA-125 AUC \leq 25 IU/mL) for a 1, 3 and 5 years overall survival respectively (ROC AUC =0.67, 0.75 and 0.73). In predicting a complete response to

chemotherapy (ROC AUC=0.87) the best CA-125 AUC cut-off was 100 IU/mL with an accuracy of 82% (Table 5.3). We estimated the parameters in the Cox proportional hazard model using overall survival as a dependent variable, CA-125 AUC as an independent variable and the patient final state (“Alive” or “Deceased”) as a censoring variable. FIGO tumor stage, residual disease and primary chemotherapy response were stratification variables (Table 5.4). Figure 5.4 shows the survival functions for different values of CA-125 AUC produced with the Cox model without any stratification variable.

Table 5.1 - Summary of patient characteristics.

FIGO Stage	Patient Count (%)
I	19 (20.7%)
II	11 (11.9%)
III	51 (55.4 %)
IV	9 (9.8 %)
Missing	2 (2.2%)
Patient Final State	
Deceased	50 (54.3%)
Alive	42 (45.7%)
Tumor Grade	
1	12 (13.0%)
2	29 (31.5%)
3	9 (9.8%)
Missing	42 (45.7%)
Histological Type	
Epithelial	82 (89.1%)
Other	8 (8.7%)
Missing	2 (2.2%)
Residual Disease (>2 cm)	
Yes	36 (39.1%)
No	53 (57.6%)
Missing	3 (3.3%)
Primary Chemotherapy Response	
Complete Response (CR)	52 (56.5%)
Partial Response (PR)	22 (23.9%)
Without Response or Disease Progression (WR/DP)	13 (14.1%)
Missing	5 (5.4%)
Overall Survival	
≥ 1 year	80 (86.9%)
≥ 3 years	44 (47.8%)
≥ 5 years	21 (22.8%)

Table 5.2 - CA-125 AUC behaviour among patients according to several covariates.

Group	Mean CA-125 AUC (Standard error) [IU/mL]	Median CA-125 AUC (Q ₂₅ -Q ₇₅) [IU/mL]	p-value
FIGO Stage			
I	18.2 (2.4)	14.6 (12.0-20.1)	p < 0.05
II	24.6 (7.6)	14.4 (9.8-20.5)	
III	147.8 (30.8)	54.2 (23.5-199.5)	
IV	574.6 (134.6)	676.3 (118.6-973.3)	
Patient Final State			
Deceased	234.1 (44.4)	83.2 (23.5-319.5)	p < 0.05
Alive	40.1 (10.5)	16.5 (12.0-34.0)	
Tumor Grade			
1	100.1 (45.5)	19.8 (12.3-146.9)	NS
2	158.1 (43.0)	65.8 (16.6-230.7)	
3	238.8 (114.0)	44.8 (37.3-375.2)	
Residual Disease (>2 cm)			
Yes	207.4 (48.3)	98.1 (31.3-237.9)	p < 0.05
No	97.9 (30.0)	16.6 (12.0-44.8)	
Primary Chemotherapy Response			
Complete Response (CR)	48.8 (15.9)	16.8 (12.0-34.1)	p < 0.05
Partial Response (PR)	251.7 (65.8)	98.1 (51.9-319.5)	
Without Response or Disease Progression (WR/DP)	316.5 (107.5)	116.8 (54.2-344.3)	

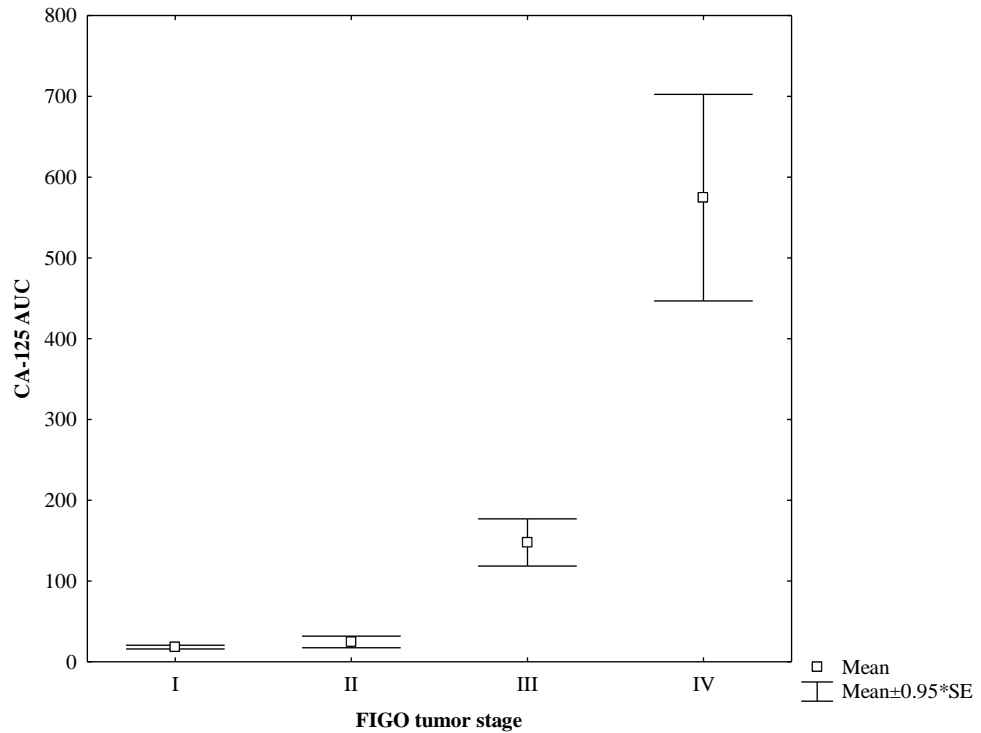


Figure 5.2 - CA-125 Mean plot according to patients FIGO Tumor Stage.

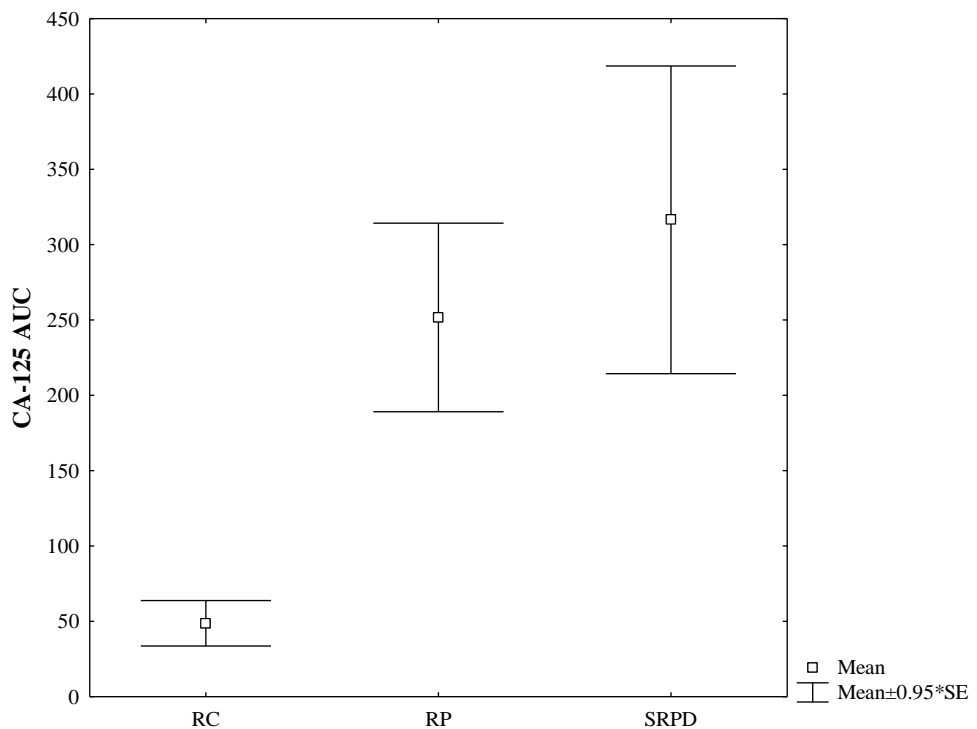


Figure 5.3 - CA-125 Mean plot according to patient response to primary chemotherapy. (CR = Complete Response; PR = Partial Response; WRDP = Without Response or Disease Progression).

Table 5.3 - Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and accuracy of several CA-125 AUC cut-offs for predicting the patient final state, overall survival and chemotherapy complete response.

CA-125 cut-off to predict patient final state "alive"											
CA-125 AUC [IU/mL]	≤25	≤50	≤100	≤200	≤300	≤400	≤500	≤600	≤800	≤1000	ROC AUC (S.E.)
Sensitivity	0.62	0.86	0.86	0.95	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Specificity	0.72	0.64	0.64	0.32	0.30	0.20	0.20	0.14	0.08	0.04	0.77
PPV	0.65	0.67	0.67	0.54	0.54	0.51	0.51	0.50	0.48	0.47	(0.05)
Accuracy	0.67	0.74	0.74	0.61	0.61	0.57	0.57	0.53	0.50	0.48	
CA-125 cut-off to predict patient overall survival ≥ 1 year											
Sensitivity	0.48	0.63	0.63	0.81	0.84	0.90	0.90	0.94	0.98	0.99	
Specificity	0.83	0.67	0.67	0.25	0.25	0.17	0.17	0.17	0.17	0.08	0.67
PPV	0.95	0.93	0.93	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.89	0.88	(0.08)
Accuracy	0.52	0.63	0.63	0.74	0.76	0.80	0.80	0.84	0.87	0.87	
CA-125 cut-off to predict patient overall survival ≥ 3 years											
Sensitivity	0.64	0.82	0.82	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	1.00	
Specificity	0.75	0.63	0.63	0.35	0.31	0.19	0.19	0.13	0.06	0.04	0.75
PPV	0.70	0.67	0.67	0.58	0.57	0.52	0.52	0.51	0.49	0.49	(0.05)
Accuracy	0.70	0.72	0.72	0.65	0.63	0.57	0.57	0.53	0.50	0.50	
CA-125 cut-off to predict patient overall survival ≥ 5 years											
Sensitivity	0.71	0.90	0.90	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Specificity	0.65	0.51	0.51	0.25	0.23	0.14	0.14	0.10	0.08	0.04	0.73
PPV	0.38	0.35	0.35	0.28	0.28	0.26	0.26	0.25	0.44	0.43	(0.06)
Accuracy	0.66	0.60	0.60	0.42	0.40	0.34	0.34	0.30	0.47	0.45	
CA-125 cut-off to predict patient complete response to chemotherapy											
Sensitivity	0.65	0.85	0.85	0.94	0.96	0.98	0.98	0.98	1.00	1.00	
Specificity	0.89	0.77	0.77	0.37	0.34	0.23	0.23	0.14	0.11	0.06	0.87
PPV	0.89	0.85	0.85	0.69	0.68	0.65	0.65	0.63	0.63	0.61	(0.04)
Accuracy	0.75	0.82	0.82	0.71	0.71	0.68	0.68	0.64	0.64	0.62	

(S.E. = Standard Error).

Table 5.4 - Cox proportional hazard model results for CA-125 AUC as an independent factor for predicting patient overall survival.

Dependent: Overall survival Independent: CA-125 AUC Censoring variable: Patient Final State (Deceased/Alive)		
Stratified by:	Chi-Square	p-value
None	18.19	p < 0.05
FIGO Tumor Stage (I,II,III,IV)	6.42	p < 0.05
Residual Disease (>2 cm)	14.80	p < 0.05
Primary Chemotherapy Response (CR,PR,WR/DP)	1.83	NS

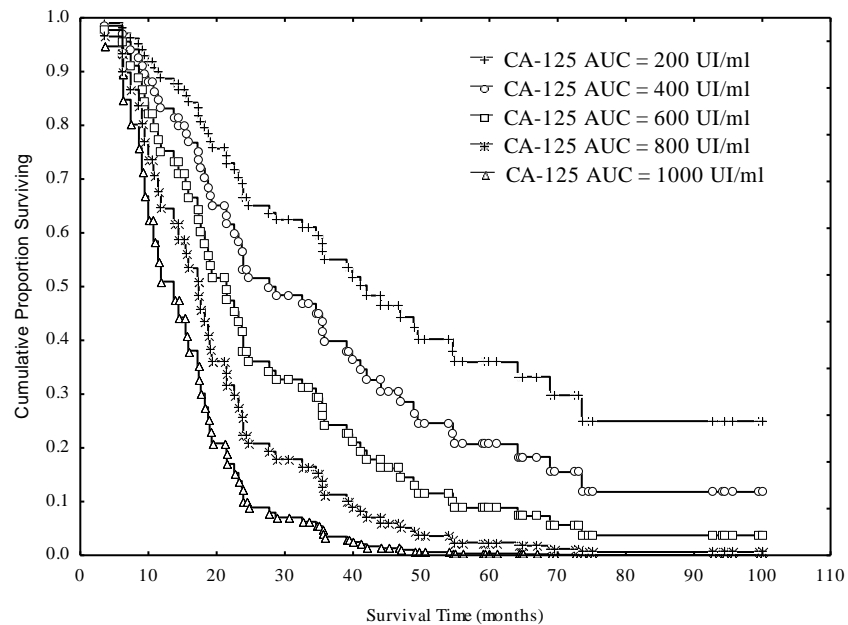


Figure 5.4 - Survival function for hypothetical CA-125 AUC values.

5.4. DISCUSSION

Many authors have studied the CA-125 kinetic in monitoring the ovarian cancer patient. Kinetic parameters prove to be more useful than rough serum concentration alone. Van der Burg *et al.* [7], Hawkins *et al.* [8], Verda J. Hunter *et al.* [9], S. Čolaković *et al.* [10] and others used the CA-125 half-life value to evaluate patient survival, finding a $t_{1/2}$ of 20 days to be a breakpoint between a “good” and “poor” prognosis.

Buller *et al.* showed that the rate of decline of CA-125 in effectively treated ovarian cancer is described by an exponential model and his study suggests that it is possible to predict overall survival, which patients have residual disease at reassessment laparotomy, who will be free of disease and who will have a recurrence [14,15].

In a review article, Jean-Michel Bidart *et al.* [5] accentuated the value of different serum marker kinetic parameters in the monitoring of patients in several types of cancer.

To increase the value of CA-125 kinetics as a prognostic factor in ovarian cancer we proposed and studied a new kinetic parameter: CA-125 AUC. As can be seen in Figure 1A/B, the CA-125 AUC calculation is independent of the shape presented by the CA-125 serum concentrations, making CA-125 AUC a more suitable kinetic parameter than CA-125 half-life (Figure 1A). In addition, the CA-125 AUC is less disturbed by peak phenomena (especially after surgery) and sources of variability (i.e. intra-subject and assay variability).

In the present work the poor correlation between CA-125 AUC and tumour grade is perhaps the consequence of the high number of patients without this information. Inversely, CA-125 AUC is highly

correlated with the FIGO stage in which lower values are related with stage I and II, middle values with stage III and higher values with stage IV. Patients with stage IV have a mean CA-125 AUC 31.6 times greater than patients with stage I. CA-125 AUC is also correlated with residual disease for patients with a residual tumor > 2 cm after initial cytoreductive surgery (mean CA-125 AUC 2.1 times greater). CA-125 AUC is also correlated with patient final state in deceased patients, having a mean CA-125 AUC 5.8 times greater than living. As shown by the Cox proportional hazard model, the CA-125 AUC is an independent prognostic factor for patient overall survival and patients with a lower CA-125 AUC have a better overall survival than patients with a higher CA-125 AUC.

Concerning survival forecast, the best CA-125 AUC cut-off was 100 IU/mL, obtained for predicting an overall survival ≥ 3 years, the patient final state “alive”, and the complete response to chemotherapy, with an accuracy of 72%, 74% and 82%, respectively. In fact, it seems clear that lower CA-125 AUC values are associated with a complete response, while higher values are associated with a partial response or even a disease progression. Therefore, CA-125 AUC could be a useful measure of the primary treatment efficacy, not only to evaluate the cytoreductive surgery but also the chemotherapy cocktail adopted. Regarding the CA-125 AUC kinetic, the objective of initial treatment (cytoreductive surgery and primary chemotherapy) of ovarian cancer is to produce the lowest CA-125 AUC possible. In addition, the CA-125 AUC kinetic parameter could be useful as an end-point in the development of new chemotherapy drugs or to establish new guidelines for the primary treatment of ovarian cancer.

Finally, CA-125 AUC presents some benefits over other kinetic parameters: it is easier to calculate and model-independent. Nevertheless, further studies should be carried out in order to

compare CA-125 AUC with other prognostic factors used in the management of ovarian cancer patients and caution should be exercised before extrapolation of the present results to different data sets.

5.5. REFERENCES

1. Vicki VB. Treatment options for ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44(3):522-30.
2. Eduard EP, Mack NB. Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:297-320.
3. Bast RC Jr, Klug TL, St. John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983; 309:883-7.
4. Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA 125: The past and the future. *Int J Biol Markers* 1998; 13 (4):179-87.
5. Amin PHM, Gunnar BK, Janne K, Ole PB, Vera MA, Claes GT. Prognostic value of pre- and postoperative serum CA 125 levels in ovarian cancer: new aspects and multivariate analysis. *Obstet Gynecol* 1992; 79:1002-10.
6. Jean-Michel B, François T, Christine A, Jacqueline C, Alain D, Nelly J, Françoise L, Hélène V. Kinetic of serum marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem* 1999; 45:10:1695-1707.
6. Angiolo G, Paolo Z, Fabio L, Tiziano M, Enrico S, Tiziana B, Renza C. Serum half-life of CA 125 during early chemotherapy as an independent prognostic variable for patients with advanced epithelial ovarian cancer: results of a multicentric italian study. *Gynecol Oncol* 1995; 58: 42-47.
7. Van Der Burg MEL, Lammes FB, Van Putten WLJ, Stoter G. Ovarian cancer: the prognostic value of the serum half-life of CA 125 during induction chemotherapy. *Gynecol Oncol* 1988; 30: 307-312.
8. Hawkins RE, Roberts K, Wiltshaw E, Mundy J, Fryatt IJ, McCready VR. The prognostic significance of the half-life of

- serum CA 125 in patients responding to chemotherapy for epithelial ovarian carcinoma. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96: 1395-9.
9. Verda JH, Lee D, Michael H, John TS, Andrew B, Daniel LCP, Bast RC Jr. The prognostic significance of CA 125 half-life in patients with ovarian cancer who have received chemotherapy after surgical cytoreduction. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1164-7.
 10. Čolaković S, Lukić V, Mitrović L, Jelić S, Šušnjar S, Marinković J. Prognostic value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer. *Int J Biol Markers* 2000; 15(2):147-52.
 11. Fayers PM, Rusting G, Wood R, Nelstrop A, Leonard RCF, Wilkinson P, Cruickshank D, Mcallister EJ, Redman CWE, Parker D, Scott IV, Slevin ML, Roulston JE. The prognostic value of serum CA 125 in patients with advanced ovarian carcinoma: an analysis of 573 patients by the medical research council working party on gynaecological cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1993; 3:285-292.
 12. Christine HH, Jonathan SB. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 3-10.
 13. Richard EB, Michael LB, Jeffrey DB, Alberto M, Philip JDS. CA 125 regression: a model for epithelial ovarian cancer response. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 360-7.
 14. Richard EB, Michael LB, Jeffery DB, Alberto M, Philip JDS. Serum CA 125 regression in epithelial ovarian cancer: correlation with reassessment findings and survival. *Gynecol Oncol* 1992; 47: 87-92.

**6. CA-125 AUC ROBUSTNESS
AS A PREDICTOR FOR A COMPLETE RESPONSE TO
PRIMARY CHEMOTHERAPY IN OVARIAN CANCER:
A MULTIVARIANT ANALYSIS USING ANN***

**Recent Advances & Research Updates (2006).*

Abstract

Purpose: The aim of the present work is to confirm the potential of CA-125 AUC to predict a complete response to chemotherapy performing a multivariate analysis using Artificial Neural Networks (ANNs) involving the prognostic factors available in our population.

Patients and Methods: 92 patients with a diagnosis of ovarian cancer were included. Multilayer perceptrons (MLPs) with a single hidden layer and three hidden neurons were used with a complete response to chemotherapy (yes/no) working as output variable. Two sets of inputs were tested. In the first, the FIGO stage and residual disease were combined with CA-125 AUC cut-off value ≤ 100 IU/mL (categorical variable), while in the second they were combined with CA-125 AUC value (continuous variable). Back propagation followed by conjugate gradient descent as a second-order optimization algorithm was used to train the MLPs. A sum-squared error function and hyperbolic tangent function for activation function were used. A leave-one-out cross-validation was carried out to prevent overfitting with an ensemble formation, one for each input set. The performance for each input set was measured by calculating the accuracy of the prediction made by each ensemble. The relative importance of each input variable was tested by performing a sensitivity analysis.

Results: Both ensembles achieved the same performance with an accuracy of 0.86. The obtained response graph shows that the breakpoint for CA-125 AUC (continuous variable) was precisely 100 IU/mL to allow the discrimination of the complete response to chemotherapy (yes/no). In addition, according to the sensitivity analysis, the CA-125 AUC value is the most important variable for prediction purposes (CA-125 ≤ 100 IU/mL for ensemble 1, and CA-125 AUC value for ensemble 2).

Conclusion: The sensitivity analysis shows that the CA-125 AUC variable is the most important input for predicting a complete

response to primary chemotherapy. Moreover, the CA-125 cut-off (yes/no) obtained for our population was 100 IU/mL.

6.1. INTRODUCTION

A number of biological markers have been found which can help to diagnose a particular tumour, monitor the treatment response or detect the first signs of relapse. Ovarian cancer has the highest mortality among all invasive cancers of the female gynaecological system in the western world and is generally treated with combination first line chemotherapy after cytoreduction surgery [1,2].

Cancer Antigen 125 (CA-125) has been showed to be the most reliable serum marker for ovarian carcinoma. Due to its poor prognosis, ovarian cancer has been the object of a great deal of effort in developing efficient treatments. The measure of treatment efficiency in ovarian cancer represents a challenge mainly because many patients have a nonevaluable disease using classical criteria such as RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). Patients without macroscopic disease after surgery or patients with widespread diffuse peritoneal disease could not be enrolled in clinical trials because it is difficult to quantify the lesions with radiological imaging such as CT scans.

CA-125 has the potential to be used to calculate the response rate to therapy, making these women eligible for the clinical trials [3,4]. Rustin et al [5] produce definitions based on serial CA-125 levels to quantify the response rate to primary chemotherapy in ovarian cancer, but instead of using criteria that compared isolated values of the marker, the adoption of kinetic parameters for evaluating the clinical response has been proposed as a suitable alternative. CA-125 kinetic parameters may be used to evaluate the clinical response to treatment and follow-up, making CA-125 an important prognostic factor for ovarian cancer [6-8].

Several prognostic factors can be used in ovarian cancer. These include the FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) tumor stage, tumor grade, DNA ploidy, over expression of the HER-2/neu oncogene, residual disease (RD) after initial cytoreductive surgery, rate of response to chemotherapy and patient characteristics such as performance status and age [9]. Furthermore, in a recent work a univariant analysis was performed using CA-125 normalized in time area under the curve (CA-125 AUC) as a prognostic factor for ovarian cancer [8].

Artificial Neural Networks (ANNs) are a branch of artificial intelligence (AI) and consist of computer-based programs that attempt to simulate some features of the biological brain such as learning, generalizing and abstracting from experience. ANNs learn (i.e. train) from appropriate learning examples, gathering “knowledge” by detecting patterns and relationships in data. ANNs consist of several artificial neurons (or processing elements, PE) connected to each other. Each connection is associated with a weight. Each neuron is capable of executing simple information processing, but the power of ANNs resides in the fact that they are connected in a network. According to their topology and function there are several types of ANNs. Multilayer perceptrons (MLPs), radial basis function networks (RBFs) and Kohonen networks are examples of ANN types. To train an ANN, a learning algorithm is applied. There are several learning rules, including back-propagation (BP), conjugate gradient descent, etc. The “knowledge” of the network is stored in the weights of the connections between the artificial neurons. The ANN can generalize when the weights are used in the presence of new data [10-13].

The interface of medicine and artificial intelligence (especially ANNs) has been well emphasized by Lisboa [14], and several works exemplify the use of artificial neural networks in cancer research.

Many studies make use of artificial neural networks to improve cancer diagnosis. ANNs can be used in the diagnosis of malignant ovarian tumors [15]. An ANN can be trained to provide clinically accurate information on whether or not an adnexal mass is malignant, from the patient's menopausal status, serum CA-125 levels and some simple ultrasonographic criteria [16]. In prostate cancer many studies have shown a significant improved accuracy in diagnosing, staging and predicting post-treatment results for ANNs compared to conventional statistical analysis [17]. ANN can be used to examine mammograms in screening breast cancer [18-21]. ANNs are also significantly more accurate than the TNM staging system when both use the TNM prognostic factors alone, and new prognostic factors can be added to the ANN to further increase prognostic accuracy [22].

The aim of this work is to confirm the potential of CA-125 AUC to predict a complete response to chemotherapy in our population. For this purpose, a multivariant analysis was performed with an ANN, using several recognized clinical prognostic factors available in our population.

6.2. PATIENTS AND METHODS

For the purpose of comparison the same population used in the previous univariant study [8] entered this multivariant analysis with an ANN. It included 92 patients with a diagnosis of ovarian cancer at the Gynaecology Service of Coimbra University Hospital (HUC) main database from 1990 to 2000, and CA-125 serum levels were obtained from the Pathology Service (Hormonology & Drug Monitoring Laboratory) of HUC. These patients underwent primary line chemotherapy within 4 months after submission to cytoreductive surgery and with a minimum of three CA-125 serum concentrations between the time of surgery and the end of chemotherapy.

To carry out with the multivariant analysis, MLPs were used in which the output of the neural models was a complete response to chemotherapy (yes/no). In addition, CA-125 AUC input in the artificial neural models was introduced as two input variable formats: as a categorical variable using CA-125 AUC cut-off value inferior or equal to 100 IU/mL (yes/no) or as a continuous variable using the CA-125 AUC value itself. As a consequence of the adopted strategy, two sets of inputs were developed. In the first one, the FIGO tumor stage (I, II, III or IV) and residual disease were combined with CA-125 AUC cut-off value ≤ 100 IU/mL (categorical variable), while in the second, the FIGO stage and residual disease were combined with the CA-125 AUC value (continuous variable). The input and output variable conversion used in the study is shown in Table 6.1.

Table 6.1 - Input and output variables conversion used in the artificial neural network models.

Input Variables	Conversion	Number of Input Neurons (L)
FIGO Stage (I, II, III or IV)	One-of-N (with N=4)	4
Residual Disease (>2cm) (Yes/No)	Two-state	1
CA-125 AUC Value (IU/mL)	Scaled linearly	1
CA-125 AUC ≤ 100 IU/mL (Yes/No)	Two-state	1
Output Variable	Conversion	Number of Output Neurons (P)
Complete primary chemotherapy response (Yes/No)	Two-state	1

A restrictive factor for data analysis was the missing information, which excluded the use of all the ninety-two patients and the use of tumor grade as an input variable.

Due to the restrictions regarding the number of patients, the complexity of the ANN models is an important issue. To keep the models as simple as possible, only MLPs with a single hidden layer were chosen. The number of hidden units (H) was also restricted by using the pyramid guideline [23], where for a single hidden layer H is given by: $H \approx \sqrt{L \times P}$, where L is the number of input neurons and P the number of output neurons. After analyzing the various input combinations and the total number of input neurons, models with only three hidden neurons were used (Figure 6.1). A hundred epochs of back propagation followed by five hundred epochs of conjugate gradient descent as a second-order optimization algorithm were used to train the different MLP models. To speed up training at the beginning, during the back propagation phase the learning rate and the momentum were adjusted in each epoch. The learning rate varied from 0.05 to 0.01 and the momentum varies from 0.6 to 0.3. A sum-squared error function was used where the error is the sum of the squared differences between the target and actual output values in each output unit. For the activation function for the hidden units (H) and for the output unit (O), the hyperbolic tangent function ($\tanh = \frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}}$) was chosen because of its symmetry. This function results in a sigmoid curve, like the logistic function, except that output lies in the range]-1, +1[. In addition, due to the limited number of patients available a leave-one-out cross-validation was carried out to prevent overfitting, a major problem with neural networks in the generalization question, accompanied by the difficulty in quantifying with the same performance in the presence of new data. In leave-one-out cross-validation, a number of experiments equal to the size of the data set are performed. In each experiment a single case is placed in the test subset, and the rest of the data is used for training. In this study, nearly 2/3 of the population was used in the train subset and nearly 1/3 in the validation subset. At the end of this cross-

validation process an ensemble was formed with the individual network created in each experiment of leave-one-out cross-validation. Ensembles are collections of neural networks that cooperate in performing a prediction. In this classification problem the ensemble estimates a value for the output by combining the outputs from the individual networks that constitute the ensemble in which the network's predictions are combined in a winner-takes-all vote. The performance for each input combination was measured by calculating the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), false positive (FP) rate, false negative (FN) rate and accuracy for the prediction made by each ensemble.

The response graph for ensemble 2 was obtained to show the effect on the output variable prediction (complete response to chemotherapy) by the CA-125 AUC value as an independent continuous variable.

To test the importance of the adopted inputs, a sensitivity analysis was carried out on each ensemble. In practice, the sensitivity analysis on the inputs indicates which variables are considered more important by that particular neural network (ranking of variables).

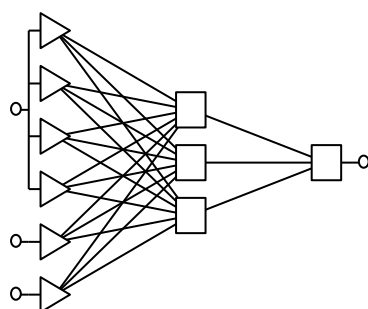


Figure 6.1 - Multilayer perceptron (MLP) network model for each member in the ensemble formation (3 inputs connected to 6 input neurons, one hidden layer with 3 neurons and 1 output neurons connected to 1 output).

6.3. RESULTS

The mean age at diagnostic time was found to be 55.5 (16.1-82.4; S.E.=1.65) years with a mean overall survival of 39.2 (3.5-100.1; S.E.=2.6) months. According to the FIGO tumor stage, nineteen (20.7%) patients had stage I; eleven (11.9%) had stage II; fifty-one (55.4%) had stage III; nine (9.8%) had stage IV and in two (2.2%) patients this information was missing. Eighty-two (89.1%) patients had epithelial ovarian cancer for histological type. Twelve (13.0%) patients had a tumor grade 1, twenty-nine (31.5%) a tumor grade 2, nine (9.8%) had a tumor grade 3 and forty-two (45.7%) patients had no tumor grade information. Thirty-six (39.1%) patients had a residual tumor greater than 2 cm after surgery. The mean duration of primary chemotherapy was 4.1 (0.7-10.2; S.E.=0.15) months: fifty-two (56.5%) patients had a complete response to primary chemotherapy; twenty-two (23.9%) had a partial response; thirteen (14.1%) had no response or a disease progression and five (5.4%) patients had missing information for the response to chemotherapy. At evaluation date, fifty (54.3%) patients were deceased while forty-two (45.7%) were alive (Table 6.2).

Table 6.3 shows the input combination used in each ensemble, and the number and type of members that constitute the ensemble, as well as the number of patients used in training, validation and test subset for the leave-one-out cross-validation. Due to missing information, not all the patients were taken into account by the neural models.

The performance of each ensemble is recorded in table 6.4. Both input sets achieved the same performance with an accuracy of 0.86.

According to the sensitivity analysis, the variable with most weight for the prediction was the CA-125 AUC (CA-125 \leq 100 IU/mL and CA-125 AUC value for ensemble 1 and 2, respectively).

In Figure 6.2 the response graph illustrates the effect on the output variable prediction (complete response to chemotherapy) performed by ensemble 2 using the CA-125 AUC value as an independent continuous variable.

Table 6.2 - Summary of patient characteristics.

FIGO Stage	Patient Count (%)
I	19 (20.7%)
II	11 (11.9%)
III	51 (55.4 %)
IV	9 (9.8 %)
Missing	2 (2.2%)
Patient Final State	
Deceased	50 (54.3%)
Alive	42 (45.7%)
Tumor Grade	
1	12 (13.0%)
2	29 (31.5%)
3	9 (9.8%)
Missing	42 (45.7%)
Histological Type	
Epithelial	82 (89.1%)
Other	8 (8.7%)
Missing	2 (2.2%)
Residual Disease (>2 cm)	
Yes	36 (39.1%)
No	53 (57.6%)
Missing	3 (3.3%)
Primary Chemotherapy Response	
Complete Response (CR)	52 (56.5%)
Partial Response (PR)	22 (23.9%)
Without Response or Disease Progression (WR/DP)	13 (14.1%)
Missing	5 (5.4%)

CA-125 AUC robustness as a predictor for a complete response to primary chemotherapy in ovarian cancer: a multivariate analysis using ANN

Table 6.3 - Input combinations used for each ensemble.

Ensemble	Inputs Combination	Number of members (N)	Type of members MLP I-L:H:P-O	Leave-one-out cross validation		
				Train Subset ($\approx 2/3 \cdot N$)	Validation Subset ($\approx 1/3 \cdot N$)	Test Subset
1	CA 125 AUC \leq 100 IU/mL FIGO Stage Residual disease > 2 cm	83	MLP 3-6:3:1-1	54	28	1
2	CA 125 AUC value FIGO Stage Residual disease > 2 cm	83	MLP 3-6:3:1-1	54	28	1

(MLP I:L-H-P:O multilayer perceptron with I inputs connected to L input neurons, one hidden layer with H neurons and P output neurons connected to O outputs).

Table 6.4 - Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), false positive (FP) rate, false negative (FN) rate and accuracy for each ensemble tested to predict a complete chemotherapy response.

	Ensemble Prediction		Complete Response to Chemotherapy			Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy	FP (%)	FN (%)
			Yes	No	N							
1	Complete Response to Chemotherapy	Yes	45	6	83	0.88	0.81	0.88	0.81	0.86	7.2	7.2
		No	6	26								
2	Complete Response to Chemotherapy	Yes	46	7	83	0.90	0.78	0.87	0.83	0.86	8.4	6.0
		No	5	25								

Table 6.5 - Rank of each variable given by the sensitivity analysis performed on each ensemble.

Ensemble	Sensitivity Analysis	
	Rank	Variable
1	1 st	CA 125 AUC \leq 100 IU/mL
	2 nd	FIGO Stage
	3 rd	Residual disease > 2cm
2	1 st	CA 125 AUC value
	2 nd	FIGO Stage
	3 rd	Residual disease > 2cm

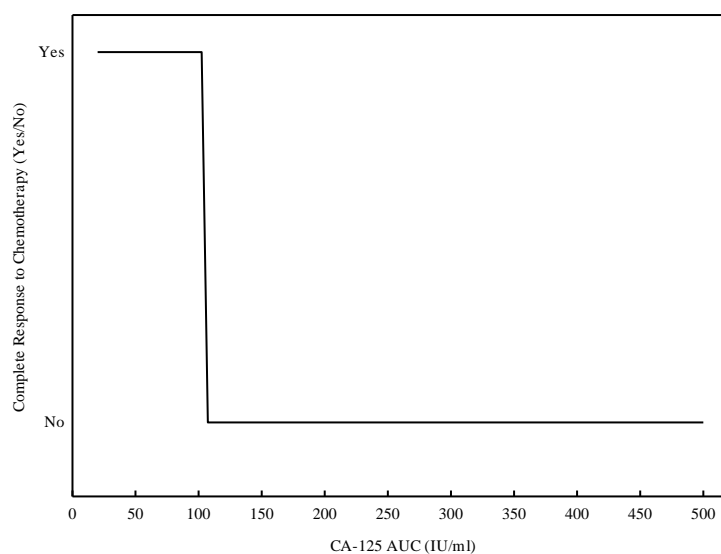


Figure 6.2 - Response graph for ensemble 2 prediction of a complete response to chemotherapy test using CA-125 AUC value as an independent continuous variable.

6.4. DISCUSSION

In a previous study [8] CA-125 normalized in time AUC was checked as a prognostic factor for ovarian cancer. Several CA-125 AUC cut-off values were tested for predicting the complete response to chemotherapy, patient final state, and patient overall survival superior or equal to one, three and five years. The ROC curve AUC was also calculated for each prediction. In spite of a consistent relation between CA-125 AUC and patient survival and final state, it became clear that CA-125 AUC had a higher performance in predicting the full response to chemotherapy, and best accuracy (0.82) was achieved with a CA-125 AUC ≤ 100 IU/mL cut-off. The relation between CA-125 AUC and the complete response was also shown by the highest obtained ROC curve AUC for predicting a full response to chemotherapy. This relation was also shown by the statistical correlation between low values of CA-125 AUC and the complete response against elevated values of CA-125 AUC correlation with a partial response or without response to chemotherapy, without

statistical difference between the partial response and without response groups. In the present work a confirmation of the relation between CA-125 AUC and the full response to chemotherapy using a multivariate approach was expected.

In the present study the development of neural models increases the ability to predict the complete response, when compared with the use of CA-125 AUC ≤ 100 IU/mL cut-off alone, achieving an accuracy of 0.86 in both tested ensembles, with false positive and false negative rates clearly below 10%. This gives a good signal for a possible clinical implementation of the procedure.

The response graph for ensemble 2 (Figure 2) clearly shows that when CA-125 AUC is a continuous value, the cut-off is still 100 IU/mL to discriminate (yes/no) a complete response to chemotherapy. This result confirms the best CA-125 AUC cut-off value obtained in the previously mentioned study [8] and the fact that ensemble 1 achieved the same performance as ensemble 2. The sensitivity analysis clearly shows that in the performed experiments, CA-125 AUC was the most important variable for the prediction made by the MLP ensembles.

Finally, the CA-125 AUC kinetic parameter could be potentially used as an efficiency treatment quantifier, which represents a significant leap, since the comparison between different drugs or different chemotherapy regimens would be more easily and appropriately performed, with especial emphasis on clinical trials.

6.5. REFERENCES

1. Baker VV. Treatment options for ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44(3): 522-530.
2. Harries M, Gore M. Part I: Chemotherapy for epithelial ovarian cancer- treatment at first diagnosis. *Lancet Oncol* 2002; 3: 529-536.
3. Rustin GJ, Bast RC Jr, Kelloff GJ, Barrett JC, Carter SK, Nisen PD, Sigman CC, Parkinson DR, Ruddon RW. Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(11): 3919-3926.
4. Guppy AE, Rustin GJ. CA125 Response: Can it Replace the Traditional Response Criteria in Ovarian Cancer? *Oncologist* 2002; 7: 437-443.
5. Rustin GJ, Nelstrop AE, McClean P, Brady MF, McGuire WP, Hoskins WJ, Mitchell H, Lambert HE. Defining Response of Ovarian Carcinoma to Initial Chemotherapy According to Serum CA 125. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1545-1551.
6. Bast RC, Jr., Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA-125: The past and the future. *Int J Biol Markers* 1998; 13(4): 179-187.
7. Bidart JM, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N, Labrousse F, Voitot H. Kinetic of serum marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem* 1999; 45(10): 1695-1707.
8. Mano A, Falcão A, Godinho I, Santos J, Leitão F, de Oliveira C, Caramona M. CA-125 AUC as a new prognostic factor for patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 97(2): 529-534.
9. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 3-10.

10. Cross SS, Harrison RF, Kennedy RL. Introduction to neural networks. *Lancet* 1995; 346: 1075-1079.
11. Bourquin J, Schmidli H, Van Hoogevest P, Leuenberger H. Basic concepts of artificial neural networks (ANN) modeling in the application to pharmaceutical development. *Pharm Dev Technol* 1997; 2(2): 95-109.
12. Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2000; 22: 717-727.
13. Drew PJ, Monson JRT. Artificial neural networks. *Surgery* 2000; 127: 3-11.
14. Lisboa PJG. A review of evidence of health benefit from artificial neural networks in medical intervention. *Neural Networks* 2002; 15: 11-39.
15. Clayton RD, Snowden S, Weston MJ, Mogensen O, Eastaugh J, Lane G. Neural networks in the diagnosis of malignant ovarian tumours. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106: 1078-1082.
16. Timmerman D, Verrelst H, Bourne TH, De Moor B, Collins WP, Vergote I, Vandewalle J. Artificial neural network models for the preoperative discrimination between malignant and benign adnexal masses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999; 13: 17-25.
17. Remzi M, Djavan B. Artificial neural networks in urology 2004. *Eur Urol Suppl* 2004; 3: 33-38.
18. Fogel DB, Wasson III EC, Boughton EM, Porto VW. Evolving artificial neural networks for screening features from mammograms. *Artif Intell Med* 1998; 14: 317-326.
19. Orr RK. Use of an artificial neural network to quantitate risk of malignancy for abnormal mammograms. *Surgery* 2001; 129: 459-466.

20. Christoyianni I, Koutras A, Dermatas E, Kokkinakis G. Computer aided diagnosis of breast cancer in digitized mammograms. *Comput Med Imag Grap* 2002; 26: 309-319.
21. Markopoulos C, Kouskos E, Koufopoulos K, Kyriakou V, Gogas J. Use of artificial neural networks (computer analysis) in the diagnosis of microcalcifications on mammography. *Eur J Radiol* 2001; 39: 60-65.
22. Burke HB, Goodman PH, Rosen DB, Henson DE, Weinstein JN, Harrel, Jr. FE, Marks JR, Winchester DP, Bostwick DG. Artificial neural networks improve the accuracy of cancer survival prediction. *Cancer* 1997; 74(4): 857-862.
23. Masters T: *Practical Neural Networks Recipes in C++*. Academic Press, Inc. 1993, pp 174-177.

**7. THE POTENTIAL FOR THE
RATE OF CA-125 INCREASE TO PREDICT
OVARIAN CANCER RELAPSE***

**European Journal of Hospital Pharmacy Science (2006).*

Abstract

Aim: To study the applicability of the rate of CA-125 increase in serum as a predictor for ovarian cancer relapse.

Methods: The study involved eighty patients from the Gynaecology Service of Coimbra University Hospital. For each patient the first CA-125 increase determined by the first three consecutive levels were $C_{i+1} > C_i$ and $C_{i+2} > C_{i+1}$ with C_i being the CA-125 level at time i . The Mann-Whitney U test was used to compare the rate of increase in CA-125 serum concentration across the subgroup of patients depending on relapse; the area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) plot was established; and sensitivity, specificity, positive predictive values, and overall accuracy were also determined for several CA-125 increase rate cut-off values.

Results: Patients with relapse had a mean (standard error) CA-125 increase rate of 0.791 (0.306) IU/mL/day in contrast with a mean increase of 0.036 (0.009) IU/mL/day for patients without relapse. The best accuracy (80.9%) for predicting the relapse was achieved with a CA-125 increase rate cut-off ≥ 0.06 IU/mL/day. The area under the ROC plot obtained was 0.870 (0.045).

Conclusion: A simple CA-125 increase rate definition could quickly predict patient relapse with a high level of certainty. Larger datasets should be used to test this method before it can be applied in clinical practice.

7.1. INTRODUCTION

A number of biological markers have been found which can help to diagnose a particular tumour, monitor the treatment response or detect the first signs of relapse. In some cases, instead of using the isolated value of the marker, it is more suitable to use kinetic parameters such as tumor marker half-life ($t_{1/2}$) and tumor marker doubling time (DT) for the evaluation of clinical response and follow-up of patients with cancer [1].

Ovarian cancer has the highest mortality rate of all invasive cancers of the gynecological system. The cancer antigen (CA) 125 serum concentration is usually adopted to evaluate the clinical situation of ovarian cancer patients during treatment or follow-up. CA-125 is a membrane glycoprotein expressed by epithelial cells of different origins and it was first identified in 1981 by the monoclonal antibody OC125 [2]. The rate of decline in CA-125 during primary chemotherapy has been an important prognostic factor and in the majority of studies rising CA-125 values have preceded clinical detection of recurrence [3]. Using the CA-125 half-life, several studies report that the greatest difference in progression rate is found at a $t_{1/2}$ of 20 days. [4-6]. Rustin *et al.* developed definitions based on CA-125 levels to measure response in patients receiving first-line chemotherapy [7], and in a different study, concluded that a confirmed rise of the CA-125 level to more than twice the upper limit of normal during follow-up after first line chemotherapy accurately predicts relapse [8].

7.2. OBJECTIVE, PATIENTS AND METHODS

In this retrospective study, we have examined the ability of the rate of CA-125 serum concentration increase to predict ovarian cancer relapse.

Retrospective clinical information was gathered from the Gynaecology Service of Coimbra University Hospital (HUC) main database from 1990 to 2000 and CA-125 serum levels were obtained from the Pathology Service (Hormonology & Drug Monitoring Laboratory) of HUC. Eighty patients with a diagnosis of ovarian cancer were included in the study. The inclusion criteria were:

- a) Patients who received adjuvant chemotherapy following cytoreductive surgery, with or without consolidation chemotherapy as part of the primary treatment;
- b) A reasonable follow-up time, with a minimum of five CA-125 serum concentrations between the end of treatment and the evaluation date;
- c) The first CA-125 level after the end of treatment must be below or equal to 35 IU/mL.

For each patient, the first CA-125 increase was determined by recording the first three consecutive levels as; $C_{i+1} > C_i$ and $C_{i+2} > C_{i+1}$ with C_i being the CA-125 level at time i . For each patient the CA-125 increase rate was calculated using the first and third concentrations with the formula:

$$\text{CA-125 Increase Rate} = (C_{i+2} - C_i) / (t_{i+2} - t_i) \quad (\text{formula 7.1})$$

The Mann-Whitney U test was used to compare the rate of CA-125 increase across the subgroups of patients defined by a positive or negative relapse. The area under the Receiver Operating

Characteristic (ROC) plot was established as a measure to quantify the test performance [9] for the discrimination by CA-125 increase rate in predicting patient relapse. Sensitivity, specificity, positive predictive values (PPV), and overall accuracy were also determined for several CA-125 increase rate cut-off values. We also calculated the mean time from t_{i+2} to relapse date. A p-level ≤ 0.05 was considered significant.

7.3. RESULTS

The mean (standard error) age at diagnostic time was found to be 52.1 (1.79) years with a mean overall survival of 74.6 (4.81) months. Twenty-eight (35.0%) patients had FIGO stage I while ten (12.5%) had stage II; thirty-seven (46.3%) had stage III; three (3.7%) had stage IV and in two (2.5%) patients this information was missing. Twelve (15.0%) patients had a tumor grade 1, nineteen (23.8%) a tumor grade 2, six (7.5%) had a tumor grade 3 and forty-three (53.7%) patients had no tumor grade information. Seventy-one (88.8%) patients had epithelial ovarian cancer for histological type and three (3.7%) patients had a borderline tumour. Twenty-four (30.0%) patients had a residual tumor greater than 2cm after surgery. Only six (7.4%) patients received consolidation chemotherapy after adjuvant chemotherapy as part of the primary treatment.

Using the CA-125 increase criteria, in seventy patients it was possible to calculate the rate of increase and in ten patients no CA-125 increase was detected.

The mean (standard error) duration of primary treatment was 182.3 (9.4) days. The mean time interval between CA-125 samples was 117.5 (7.74) days, ranging from 21 to 312 days. Twenty-six (32.5%) patients had a confirmed relapse in contrast with fifty-two (65.0%)

patients without a relapse and in two (2.5%) patients this information was missing. Among all patients with a confirmed relapse, two (7.7%) had a FIGO stage I; four (15.4%) had a stage II; nineteen (73%) had a stage III; one (3.8%) had a stage IV; three (11.5%) had a tumor grade 1; eight (30.8%) had a tumor grade 2; three (11.5%) had a tumor grade 3 and in twelve (46.2%) this information was missing.

At the evaluation date, fifty-three (66.3%) patients were alive while twenty-seven (33.7%) were deceased.

Patients with relapse had a mean CA 125 increase rate of 0.791 (0.306) IU/mL/day while patients without relapse had a mean increase of 0.036 (0.009) IU/mL/day (Figure 1). For predicting the patients with tumour recurrence the best accuracy (80.9%) was achieved with a CA 125 increase rate cut-off ≥ 0.06 IU/mL/day (a higher PPV in relation to the 0.04 IU/mL/day cut-off and greater than the 0.05 cut-off, making it more suitable for separation of the two groups of patients - Table 1). The area under the ROC plot was 0.870 (0.045) (Figure 2). For patients with relapse and a CA 125 increase rate superior or equal to 0.06 IU/mL/day, the mean time between the third level (C_{i+2}) and relapse was 204.2 (55.0) days, ranging from -55 to 906 days.



Figure 7.1- Mean CA-125 increase rate in patients with or without relapse.

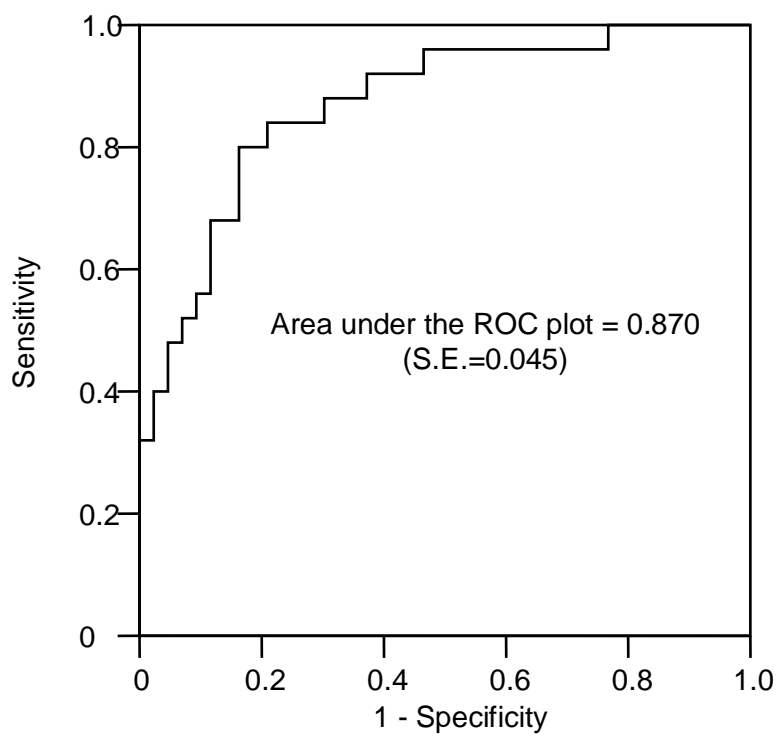


Figure 7.2- ROC curve CA-125 increase rate to predict patient relapse.

Table 7.1- Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and accuracy for several CA-125 increase rate cut-offs to predict ovarian cancer patient relapse.

	CA-125 Increase Rate \geq Cut-Off													
Cut-Off [IU/mL/day]	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
Sensitivity (%)	96.0	92.0	84.0	80.0	76.0	76.0	72.0	68.0	56.0	52.0	44.0	32.0	28.0	20.0
Specificity (%)	32.6	60.5	76.7	81.4	83.7	83.7	83.7	86.0	88.4	90.7	95.3	100.0	100.0	100.0
PPV (%)	45.3	57.5	67.7	71.4	73.1	73.1	72.0	73.9	73.7	76.5	84.6	100.0	100.0	100.0
Accuracy (%)	55.9	72.1	79.4	80.9	80.9	80.9	79.4	79.4	76.5	76.5	76.5	75.0	73.5	70.6

7.4. DISCUSSION

Many ovarian cancer patients, even with successful first line treatment, will eventually suffer relapse. The CA-125 level in the majority of the patients will exhibit a rapid increase.

The aim of the present study was not to calculate the exact value of the rate of CA-125 increase, because for that purpose a more thorough regression analysis should be performed using rich data. However, this study suggests that, monitoring CA-125 can be used to rapidly predict patient relapse with a high level of certainty, corroborated by the high area under the ROC plot (0.87) and using only the first CA-125 increase, as well as a simple definition of that increase. The rate of increase was chosen with the assumption that at the beginning, the increase of CA-125 is linear, but if larger differences between C_{i+1} and C_i are observed, then the CA-125 increase is exponential and a kinetic parameter such as doubling time (DT) is a more suitable parameter to characterize the CA-125 increase. Out of all the patients in this study, only one had a relapse without an increase in CA-125. This might be explained by the existence of ovarian tumours that do not secrete CA-125.

Using the third CA-125 concentration and with an increase rate superior or equal to 0.06 IU/mL/day, the mean lead time to relapse was 204.2 days. However, in four patients the third level was taken after clinical detection of relapse, giving a negative lead time to relapse. This inability to detect CA-125 increase may be due to an unsuitable interval between CA-125 analyses and a rapid tumour burst. This explanation is given further credence by the wide range (21 to 312 days) between CA-125 samples. Thus, a long time interval between samples is unsuitable for the use of CA-125 to monitor ovarian cancer after treatment. On the other hand, small sample-time

intervals may be too expensive and because many patients report anxiety before the next CA-125 level, physicians report this as the CA-125 psychosis. Although a standard interval has not been established, the optimal time between sample determination should take these two aspects into consideration.

Other methods for detecting an increase in the level of CA-125 are possible, such as the Rustin *et al.* criteria, doubling time or other kinetic parameters. Although CA-125 increase detection has an immediate impact in patient follow-up, in particular on the frequency of CA-125 determination, and the request for other examination methods, it might not have the necessary impact on patient overall survival, thus this will depend more on the success of the second line treatment. Although currently there is no evidence to suggest that earlier treatment is superior to administering chemotherapy at clinical detection of recurrence, this situation is under study in a prospective randomized trial [10]. However, the use of capable tools to detect relapse earlier and constant treatment evolution could increase survival or improve the patient's quality of life in the future.

The suggested rate of CA-125 increase is easy to calculate and model-independent. However, caution should be exercised before extrapolation of the present results to other datasets. Furthermore, several well known ovarian cancer prognostic factors such as FIGO stage, patient performance status, tumor grade, DNA ploidy, over expression of the HER-2/neu oncogene, residual disease after initial cytoreductive surgery and response to primary treatment, should be taken into account, together with the CA-125 increase rate. Multivariant analysis will be necessary to combine all available covariates with the objective of increasing the accuracy of relapse prediction. However, in clinical practice early relapse detection based on CA-125 increase is only helpful if further studies clearly

demonstrate that the treatment for the asymptomatic patient is shown to be beneficial for her quality of life or overall survival.

7.5. REFERENCES

1. Jean-Michel B, François T, Christine A, Jacqueline C, Alain D, Nelly J, Françoise L, Hélène V. Kinetic of serum marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem.* 1999; 45(10):1695-1707.
2. Bast RC, Jr., Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest.* 1981; 68:1331-1337.
3. Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA 125: The past and the future. *Int J Biol Markers.* 1998; 13(4):179-87.
4. Van Der Burg MEL, Lammes FB, Van Putten WLJ, Stoter G. Ovarian Cancer: The Prognostic Value of the Serum Half-Life of CA 125 during Induction Chemotherapy. *Gynecol Oncol.* 1988; 30:307-312.
5. Hawkins RE, Roberts K, Wiltshaw E, Mundy J, Fryatt IJ, McCready VR. The prognostic significance of the half-life of serum CA 125 in patients responding to chemotherapy for epithelial ovarian carcinoma. *BJOG.* 1989; 96:1395-1399.
6. Čolaković S, Lukić V, Mitrović L, Jelić S, Šušnjar S, Marinković J. Prognostic Value of CA 125 kinetics and half-life in advanced ovarian cancer. *Int J Biol Markers.* 2000; 15(2):147-152.
7. Rustin GJS, Nelstrop AE, McClean P, Brady MF, McGuire WP, Hoskins WJ, Mitchell H, Lambert HE. Defining Response of Ovarian Carcinoma to Initial Chemotherapy According to Serum CA 125. *J Clin Oncol.* 1996; 14(5):1545-1551.
8. Rustin GJS, Nelstrop AE, Tuxen MK, Lambert HE. Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA 125: A North Thames Ovary Group Study. *Ann Oncol.* 1996; 7:361-364.

9. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem.* 1993; 30(4):561-577.
10. Ozols RF: Treatment goals in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2005; 15 (suppl 1):3-11.

8. CA-125 AUC AS A PREDICTOR FOR EPITHELIAL OVARIAN CANCER RELAPSE*

**Cancer Biomarkers (2008).*

Abstract

Purpose: The aim of the present work was to evaluate the usefulness of CA-125 normalized in time area under the curve (CA-125 AUC) to signalise epithelial ovarian cancer relapse.

Patients and Methods: Data from a hundred and eleven patients were submitted to two different approaches based on CA-125 AUC increase values to predict patient relapse. In *Criterion A* total CA-125 AUC normalized in time value (AUC_i) was compared with the immediately previous one (AUC_{i-1}) using the formulae $AUC_i \geq F * AUC_{i-1}$ (several F values were tested) to find the appropriate close related increment associated to patient relapse. In *Criterion B* total CA-125 AUC normalised in time was calculated and several cut-off values were correlated with patient relapse prediction capacity.

Results: In *Criterion A* the best accuracy was achieved with a factor (F) of 1.25 (increment of 25% from the previous status), while in *Criterion B* the best accuracies were achieved with cut-offs of 25, 50, 75 and 100 IU/mL. The mean lead time to relapse achieved with *Criterion A* was 181 days, while with *Criterion B* they were, respectively, 131, 111, 63 and 11 days.

Conclusion: Based on our results we believe that conjugation and sequential application of both criteria in patient relapse detection should be highly advisable. CA-125 AUC rapid burst in asymptomatic patients should be firstly evaluated using *Criterion A* with a high accuracy (0.85) and with a substantial mean lead time to relapse (181 days). If a negative answer was obtained then *Criterion B* should be performed to confirm the absence of relapse.

Key Words: Ovarian cancer; CA-125; CA-125 kinetics; follow-up; relapse; recurrence.

8.1. INTRODUCTION

Ovarian cancer has the highest mortality among all invasive cancers of the female gynaecological system in the western world. In addition, without a routine generalized screening test, the majority of patients with ovarian cancer present an advanced stage of disease at the time of diagnosis [1-3].

Despite the developments in first line cytoreductive surgery [4] and chemotherapy [5, 6], most women with the disease at an advanced stage suffer recurrence, making ovarian cancer a disease with a poor prognosis. Approximately 10%-50% of patients who receive surgery for treatment of early stage ovarian cancer also have a recurrence [7]. Since curative therapy for a recurrence of the disease may not be possible, attempts to prolong progression-free (PFS) and overall survival, relieve symptoms, and extend quality of life become the alternative goals [8, 9]. The treatment options for patients with recurrent ovarian cancer include additional chemotherapy and, in some particular cases, surgery and radiation therapy [10, 11].

Several drugs and regimens can be used in relapsed ovarian cancer [12]: for instance, carboplatin alone [13] or together with paclitaxel [14, 15] in sensitive patients, topotecan [16-18], doxorubicin, and gemcitabine, among others for resistant patients.

Past available data do not supply a conclusive role for surgery in the treatment of relapsed ovarian cancer [20]. More recent studies suggest that secondary cytoreduction may improve patient survival [21-22], especially in patients that recur at least six months after first-line treatment [23].

In practice, radiation therapy is rarely used due to the amount of radiation that abdomen organs can safely receive. Nevertheless, radiation therapy for advanced ovarian cancer was reported to be more positive than second- and third-line chemotherapy in terms of response, survival and tolerance [24] and therapy with involved field radiation is effective in controlling localized recurrences, particularly after optimal debulking [25].

Although in many cases the treatment objective is to prolong survival, the majority of women with ovarian cancer prefer continuing to treat their cancer aggressively, regardless of poor outcomes and the quality of life becomes secondary [26]. Approximately half of patients without any symptoms of relapse (and the corresponding physicians) want early chemotherapy for a rising CA-125, even with the increase of toxicity [27].

There are several surveillance options to manage ovarian cancer patients. These include second-look laparotomy, regular physical examination, regular imaging, and CA-125 measurement [7].

Described by Bast *et al.* (1983) [28], CA-125 has an important role in analyzing ovarian cancer follow-up. Numerous studies indicate that a continuous rise in serum CA-125 precedes the clinical detection of recurrence [29, 30] and CA-125 may have an important role to play in the design of clinical trials, from prognosis to follow-up [31, 32].

Several authors tested alternative CA-125 progression criteria to predict ovarian cancer recurrence. Rustin *et al.* state that a confirmed rise in CA-125 serum concentration to more than twice the normal upper limit during follow-up after first-line chemotherapy accurately predicts relapse [33]. Tuxen *et al.* reported that analytical imprecision and intra-individual biological fluctuation considerably influence the

variation in CA-125 results [34], and developed several progression criteria that could provide early information about ovarian cancer recurrence [35].

Instead of using the absolute tumour marker concentration itself, the use of tumour marker kinetic parameters seems to be a more rational approach. Indeed, the serum CA-125 kinetic behaviour has an important role in describing the course of the disease. Parameters such as the CA-125 half-life can be used to evaluate the clinical response to the first-line treatment of patients [36], while doubling time (DT) can be used as a predictive factor for ovarian cancer recurrence [37]. Moreover, the intrinsic value of the recently, so called 'normalized in time area under the curve (CA-125 AUC) kinetic parameter' as a prognostic factor and as a primary treatment efficacy outcome, has already been described [38].

The objective of the present work was to evaluate the potential usefulness of CA-125 AUC kinetic parameter to signal ovarian cancer relapse before (and anticipating) any clinical detection.

8.2. PATIENTS AND METHODS

Retrospective clinical information was gathered on patients diagnosed in the late 80s and 90s with epithelial ovarian cancer from the Gynaecology Service of Coimbra University Hospital (HUC) main database. CA-125 serum levels of these patients were obtained from the Pathology Service (HUC - Hormonology & Drug Monitoring Laboratory) database. Patients with a minimum of three CA-125 serum concentrations between the end of primary treatment and the evaluation date were included in the study. The end of treatment was determined as the date of curative surgery if the patient did not receive any chemotherapy, or the date of conclusion of primary

(adjuvant) chemotherapy, or the end of consolidation chemotherapy if the patient received it after the primary chemotherapy. In patients with an early stage (I-IIa) the surgery includes a total abdominal hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, infra-colic omentectomy, multiple biopsys of the abdominal cavity and peritoneal lavage cytology. In rare cases pelvic lymphadenectomy was performed. For advanced stages (IIb-IV) cytoreduction surgery was performed with the attempt of resection of lesions smaller than 2 cm.

During the follow up period, beginning at the end of primary treatment, data was appropriately recorded in the patient clinical file database. Relapse was first determined by physical examination in most cases, by imaging and, in few cases, by biopsy. It should be emphasised that no patients were treated for relapse based on CA-125 information alone. Due to the fact that CA-125 analysis only became standard practice at the beginning of the 90s, not all patients presented CA-125 levels immediately after the end of primary treatment. Therefore, for data analysis purpose and to ensure the same starting conditions for all of them, the first available CA-125 level (C_0) after the end of primary treatment had to be under 35 IU/mL (baseline). Four patients that only had CA-125 levels after relapse detection and one patient with only one CA-125 level between primary treatment conclusion and relapse were withdrawn from the study. Thus, a hundred and eleven patients were included in the present study where two different methodological approaches were tested in order to get the best value from the CA-125 tumour marker to predicted epithelial ovarian cancer relapse.

Criterion A

The aim of this approach was to find in what way a rapid increase in CA-125 AUC could signal patient relapse. For this purpose the overall

CA-125 AUC for two consecutive CA-125 sampling times were calculated and the increment between them evaluated.

Mathematically, in this criterion the overall CA-125 AUC normalized in time to C_i/t_i (AUC_i) was compared to the previous one, i.e. the total CA-125 AUC normalized in time to C_{i-1}/t_{i-1} (AUC_{i-1}). AUC_i and AUC_{i-1} were determined using the following formulae:

$$AUC_i = \frac{A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_i}{t_i - t_0} \quad (\text{formula 8.1})$$

$$AUC_{i-1} = \frac{A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_{i-1}}{t_{i-1} - t_0} \quad (\text{formula 8.2})$$

where in both cases A_j is the area of trapezoid j , calculated by:

$$A_j = \frac{C_{j-1} + C_j}{2} (t_j - t_{j-1}) \begin{cases} j \in \{1,2,3,\dots,i\} \text{ in } AUC_i \\ j \in \{1,2,3,\dots,i-1\} \text{ in } AUC_{i-1} \end{cases} \quad (\text{formula 8.3})$$

Therefore, the calculated AUCs were compared accordingly the following rational: $AUC_i \geq F * AUC_{i-1}$ with F equal to 1.10 ($AUC_i \geq AUC_{i-1}$ in more than 10% of AUC_{i-1}), 1.25 ($AUC_i \geq AUC_{i-1}$ in more than 25% of AUC_{i-1}), 1.50 ($AUC_i \geq AUC_{i-1}$ in more than 50% of AUC_{i-1}), 1.75 ($AUC_i \geq AUC_{i-1}$ in more than 75% of AUC_{i-1}), 2.00 ($AUC_i \geq AUC_{i-1}$ in more than 100% of AUC_{i-1}), 2.50 ($AUC_i \geq AUC_{i-1}$ in more than 150% of AUC_{i-1}) or 3.00 ($AUC_i \geq AUC_{i-1}$ in more than 200% of AUC_{i-1}) (Table 1). If the condition $AUC_i \geq F * AUC_{i-1}$ was true the test was considered positive. Otherwise the test was considered negative.

In order to build our model and due to the fact that this was a retrospective study, a forward stepwise approach was implemented using the following strategy for each patient dataset. Exemplifying with a patient having ten CA-125 levels obtained after the end of

primary treatment (all patients should have a minimum of three CA-125 levels), the CA-125 AUC was calculated from C_0 to C_3 (AUC_i) and compared to CA-125 AUC from C_0 to C_2 (AUC_{i-1}); subsequently CA-125 AUC was calculated from C_0 to C_4 (AUC_i) and compared to CA-125 AUC from C_0 to C_3 (AUC_{i-1}), and so on, until CA-125 AUC from C_0 to C_{10} (AUC_i) was calculated and compared to CA-125 AUC from C_0 to C_9 (AUC_{i-1}). The stepwise procedure stopped when the CA-125 AUC to a certain concentration/time fulfilled the started condition ($AUC_i \geq F * AUC_{i-1}$) (positive test) or when the started condition was not reached at all for the complete dataset (negative test).

Criterion B

While with the *Criterion A* we were looking for rapid increases in CA-125 AUC, the *Criterion B* aimed to look for sustained increases that could potentially be associated to a relapse. Therefore, in this approach the idea was to find a fixed CA-125 AUC cut-off value that, once exceeded, could signal patient relapse.

As defined before, the total normalised in time CA-125 AUC from the first concentration (C_0 / t_0) to a certain concentration (C_i / t_i) was determined using the formula:

$$CA - 125 AUC_i = \frac{A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_{i-1} + A_i}{t_i - t_0} \quad (\text{formula 8.4})$$

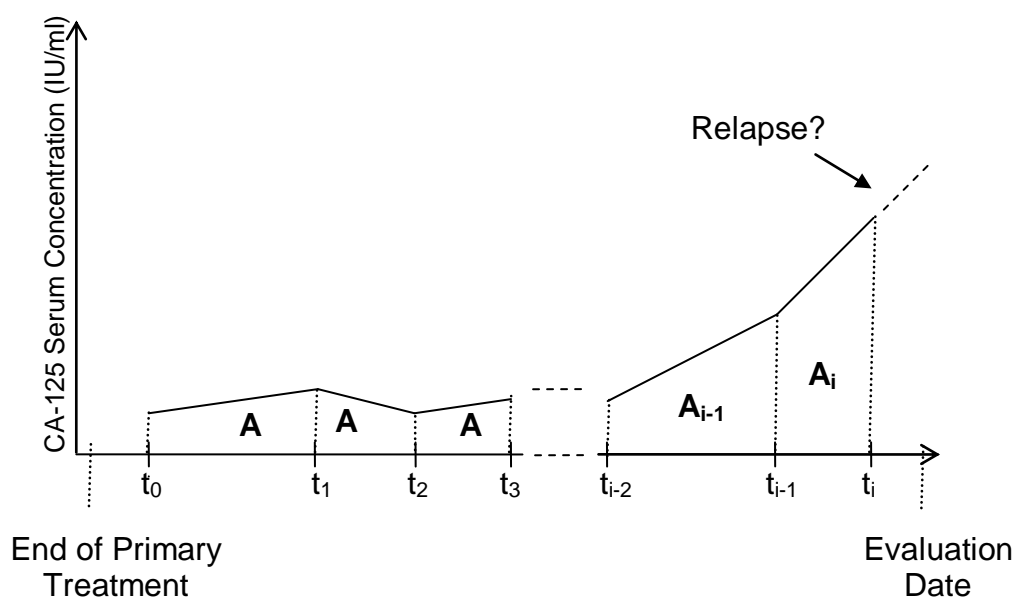
where A_j is the area of trapezoid j , calculated by:

$$A_j = \frac{C_{j-1} + C_j}{2} (t_j - t_{j-1}), j \in \{1, 2, 3, \dots, i\} \quad (\text{formula 8.5})$$

In order to find the best cut-off and due to the fact that this was a retrospective study, a forward stepwise approach was carried out for each patient dataset. In fact, for each patient the corresponding CA-125 AUC were calculated and compared with several cut-off values: 15; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 400; 600 and 1000 IU/mL. If the CA-125 AUC values were equal or superior to a considered cut-off value the test was considered positive. Otherwise the test was considered negative.

Using the example with a patient having ten CA-125 levels obtained after the end of primary treatment, the CA-125 AUC was calculated from C_0 to C_3 (all patients should have a minimum of three CA-125 levels), then from C_0 to C_4 and so on, until reaching CA-125 AUC from C_0 to C_{10} . The test stopped when the CA-125 AUC to a certain concentration (for instance C_6) exceeded the considered cut-off value (positive test) or when the overall CA-125 AUC (i.e. C_0 to C_{10} in the present example) did not exceed the selected cut-off value (negative test).

For both criteria (*A* and *B*) sensitivity, specificity, the positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and best accuracy for predicting relapse was calculated. In all true-positive tests, the lead time to relapse was measure from t_i to the relapse date (t_r) recorded in the patient clinical file (Figure 8.1). A positive lead time indicates that the increase criteria occur before the relapse while a negative time indicates that the increase criteria occur after the relapse.



Criterion A

Search a concentration/time (C_i / t_i) where:
 CA 125 AUC to $t_i \geq \text{Factor} * \text{CA 125 AUC to } t_{i-1}$

Criterion B

Search a concentration/time (C_i / t_i) where

$$CA\ 125\ AUC = \frac{A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_{i-1} + A_i}{t_i - t_0} \geq \text{Cut - Off (IU/ml)}$$

Figure 8.1- Hypothetical CA-125 evolution after primary treatment of patient with ovarian cancer.

8.3. RESULTS

The mean age at diagnostic time was found to be 54.2 (17.2-83.8; S.E.=1.4) years. At evaluation date the mean overall survival was 6.4 (0.6-19.4; S.E.=0.4) years with thirty (27.0%) patients deceased. Fifty (45.1%) patients had FIGO stage I, twelve (10.8%) had stage II, forty-two (37.8%) had stage III, three (2.7%) had stage IV and in four (3.6%) patients this information was missing. Twenty-seven (24.3%) patients had a tumour grade 1, twenty (18.0%) a tumour grade 2, eight (7.2%) had a tumour grade 3 and fifty-six (50.5%) patients had no tumour grade information. Twenty-four (21.6%) patients had a residual tumour greater than 2 cm after surgery. In thirty-four (30.6%) patients the primary treatment consisted of surgery only, in forty-seven (42.4%) cases the patients were also given adjuvant chemotherapy and in thirty (27.0%) the primary treatment included consolidation chemotherapy. The mean duration of treatment for patients that only received adjuvant chemotherapy was 4.1 (1.4-11.5; S.E.=0.2) months while for patients that received both types of chemotherapy was 7.7 (2.6-39.1; S.E.=1.3) months. The mean follow-up time between the first and the last CA-125 level was 54.3 (1.4-110.0; S.E.=3.1) months, in which a mean of 12.9 (3-40; S.E.=0.7) CA-125 serum levels were obtained per patient with a mean of 141.9 (10.5-521.2; S.E.=8.7) days between samples. The mean follow-up time between the end of primary treatment and the evaluation date was 69.6 months (5.1-229.8; S.E.=4.4). In that time twenty-six (23.4%) patients had a recorded relapse, seventy-seven (69.4%) had no recorded relapse and in eight (7.2%) this information was unavailable. Relapse was recorded in eight (20.7%) patients with FIGO stage I/II against seventeen (65.3%) patients with FIGO stage III/IV (the FIGO stage was missing in one patient with relapse). The mean time from the conclusion of treatment to relapse detection was 27.0 (5.1-89.4; S.E.=3.9) months (Table 8.2).

In *Criterion A* the best accuracy (0.85) was achieved for both *F* values of 1.25 (25%) and 1.50 (50%), and start decreasing with *F* value equal or greater than 1.75 (75%). For *Criterion B* the accuracy start to increase above 80% with a cut-off of 25 IU/mL (0.82) achieving a maximum with a cut-off of 100 IU/mL (0.86) (Table 3).

The mean time difference between t_i and t_{i-1} obtained with *Criterion A* ($F = 1.25$) was 5.6 (1.1-16.0; S.E.=0.7) months and the mean lead time to relapse achieved was 181.0 (-37 to 843; S.E.=56.3) days. The mean lead time to relapse achieved with *Criterion B* was 131 (-270 to 644; S.E.=55.9) days with a cut-off of 25 IU/mL, 111 (-103 to 530; S.E.=51.1) days with a cut-off of 50 IU/mL, 63 (-292 to 507; S.E.=54.9) days with a cut-off of 75 IU/mL, and 11 (-377 to 264; S.E.=44.8) days with a cut-off of 100 IU/mL cut-off (Table 8.4).

Table 8.1- Increase factors (*F*) used in *Criterion A*.

Factor	
1.10	AUC _{<i>i</i>} greater or equal that AUC _{<i>i-1</i>} in more than 10%
1.25	AUC _{<i>i</i>} greater or equal that AUC _{<i>i-1</i>} in more than 25%
1.50	AUC _{<i>i</i>} greater or equal that AUC _{<i>i-1</i>} in more than 50%
1.75	AUC _{<i>i</i>} greater or equal that AUC _{<i>i-1</i>} in more than 75%
2.00	AUC _{<i>i</i>} greater or equal that AUC _{<i>i-1</i>} in more than 100%
2.50	AUC _{<i>i</i>} greater or equal that AUC _{<i>i-1</i>} in more than 150%
3.00	AUC _{<i>i</i>} greater or equal that AUC _{<i>i-1</i>} in more than 200%

Table 8.2 - Summary of patient characteristics.

FIGO Stage	Patient Count (%)
I	50 (45.1%)
II	12 (10.8%)
III	42 (37.8%)
IV	3 (2.7%)
Missing	4 (3.6%)
Tumor Grade	
1	27 (24.3%)
2	20 (18.0%)
3	8 (7.2%)
Missing	56 (50.5%)
Residual Disease (>2 cm)	
Yes	24 (21.6%)
No	85 (76.6%)
Missing	2 (1.8%)
Primary Treatment	
Surgery	34 (30.6%)
Surgery + Adjuvant Chemotherapy	47 (42.4%)
Surgery + Adjuvant Chemotherapy + Consolidation	30 (27.0%)
Chemotherapy	
Relapse	
Yes	26 (23.4%)
No	77 (69.4%)
Missing	8 (7.2%)
Patient Final State	
Deceased	30 (27.0%)
Alive	81 (73.0%)

Table 8.3 - Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), false positives (FP %), false negatives (FN %) and accuracy achieved for each criterion (N=103 due to missing values).

Criterion A										
Test		Relapse		Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy	FP (%)	FN (%)
CA-125 AUC to t_i	\geq F *AUC to t_{i-1}	Yes	No							
$F = 1.10$ (10%)	Positive	22	26	0.85	0.66	0.46	0.93	0.71	25.2	3.9
	Negative	4	51							
$F = 1.25$ (25%)	Positive	19	8	0.73	0.90	0.70	0.91	0.85	7.8	6.8
	Negative	7	69							
$F = 1.50$ (50%)	Positive	15	4	0.58	0.95	0.79	0.87	0.85	3.9	10.7
	Negative	11	73							
$F = 1.75$ (75%)	Positive	12	2	0.46	0.97	0.86	0.84	0.84	1.9	13.6
	Negative	14	75							
$F = 2.00$ (100%)	Positive	10	1	0.38	0.99	0.91	0.83	0.83	1.0	15.5
	Negative	16	76							
$F = 2.50$ (150%)	Positive	6	0	0.23	1.00	1.00	0.79	0.81	0.0	19.4
	Negative	20	77							
$F = 3.00$ (200%)	Positive	6	0	0.23	1.00	1.00	0.79	0.81	0.0	19.4
	Negative	20	77							

Table 8.3 -Continuation.

Criterion B										
Test		Relapse		Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy	FP (%)	FN (%)
		Yes	No							
CA-125 AUC \geq C [IU/mL]										
C = 15 IU/mL	Positive	25	25	0.92	0.68	0.49	0.96	0.74	24.3	1.9
	Negative	2	52							
C = 25 IU/mL	Positive	19	12	0.73	0.84	0.61	0.90	0.82	11.7	6.8
	Negative	7	65							
C = 50 IU/mL	Positive	13	4	0.50	0.95	0.76	0.85	0.83	3.9	12.6
	Negative	13	73							
C = 75 IU/mL	Positive	13	2	0.50	0.97	0.87	0.85	0.85	1.9	12.6
	Negative	13	75							
C = 100 IU/mL	Positive	13	1	0.50	0.99	0.93	0.85	0.86	1.0	12.6
	Negative	13	76							
C = 150 IU/mL	Positive	10	1	0.38	0.99	0.91	0.83	0.83	1.0	15.5
	Negative	16	76							
C = 200 IU/mL	Positive	8	1	0.31	0.99	0.89	0.81	0.82	1.0	17.5
	Negative	18	76							
C = 400 IU/mL	Positive	5	1	0.19	0.99	0.83	0.78	0.79	1.0	20.4
	Negative	21	76							
C = 600 IU/mL	Positive	5	1	0.19	0.99	0.83	0.78	0.79	1.0	20.4
	Negative	21	76							
C = 1000 IU/mL	Positive	2	1	0.08	0.99	0.67	0.76	0.76	1.0	23.3
	Negative	24	76							

Table 8.4 - Lead time to recurrence using the best accuracies for each criterion.

Criterion A				
Test	Mean lead time to relapse (t_i to relapse) [days]	Range [days]	Standard Error [days]	Standard Deviation [days]
CA-125 AUC to t_i \geq 1.25 *AUC to t_{i-1}	181	-37 to 843	56.3	245.6
Criterion B				
CA-125 AUC to $t_i \geq 25$ IU/mL	131	-270 to 644	55.9	243.7
CA-125 AUC to $t_i \geq 50$ IU/mL	111	-103 to 530	51.1	184.1
CA-125 AUC to $t_i \geq 75$ IU/mL	63	-292 to 507	54.9	197.9
CA-125 AUC to $t_i \geq 100$ IU/mL	11	-377 to 264	44.8	161.6

8.4. DISCUSSION

From a clinical point of view, earlier relapse detection might have no impact on overall survival since it will depend on the success of second line treatments. Nevertheless, it may have an immediate impact on patient follow-up scheme (number and frequency of the physician's visits, and the request for additional diagnostic tools including CA-125 serum levels). However, it should be recognized that powerful relapse detection tools associated with other advances in therapeutic options could increase survival and/or improve the patient's quality of life in the short term.

Although currently there is no evidence that earlier chemotherapy is superior to administering chemotherapy at clinical detection of recurrence, it should be stressed that a prospective, randomised trial on this issue is currently being carried out by the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) [8]. If incoming studies demonstrate an increased overall survival for asymptomatic patients receiving chemotherapy based on a CA-125 tumour marker information, the sooner the relapse is detected the greater the chances of being able to catch the tumour at an earlier stage of evolution. Working with this scenario, earlier relapse detection will play a fundamental role in ovarian cancer patient follow-up. In addition, earlier relapse detection could also be relevant in the design of clinical trials for new anti-cancer agents.

If any test wants to be classified as suitable for predicting ovarian cancer relapse, the minimal requirement is to accurately signal the relapse in asymptomatic patients. As it can be seen from the results obtained in our population, both approaches (*A* and *B*) allow it with interesting accuracy values (above 80%). If *Criterion A* is adopted, an increase of 25% between two consecutive CA-125 AUCs suggests, with a substantial mean lead time to the event (181 days), that a relapse is ongoing (accuracy of 85%). Otherwise, if *Criterion B* is adopted, cumulative CA-125 AUCs values between 25 IU/mL and 100 IU/mL indicates the presence of relapse (accuracy above 80%). Obviously, increasing the cut-off from 25 IU/mL to 100 IU/mL imply a small rise of accuracy (from 82% to 86%), but an important decrease regarding the mean lead time to relapse from 131 days (with 25 IU/mL) to 11 days (with 100 IU/mL).

Technically speaking, *Criterion A* (in comparison with *Criterion B*) presents the advantage of not considering the upper normal limit or even nadir values, while in both approaches (in comparison with other

methods) the use of all available CA-125 serum levels during the follow-up period decrease the residual error (analytical imprecision and intra-individual biological fluctuation of CA-125). In fact, for each CA-125 AUC normalized in time value, a carry-over effect can be observed (cumulative effect), which promote the dilution of marginal errors. An important issue concerning the present methodological approach is that the mean lead time might be influenced by the CA-125 sampling scheme (more precisely by the interval between any two consecutive samples). Therefore the interval between any two consecutive CA-125 samples might influence the way a particular CA-125 criterion signals the relapse. To be explicit, the negative lead times to relapse must be considered false negatives, corrupting the accuracy. This is more notorious in the case of *Criterion B*, since the number of patients with a negative lead time to relapse would make the accuracy fall when compared with *Criteria A*. Due to the study design constrains (retrospective study without any pattern), the interval between CA-125 samples was not standardised (between and within-patients). Therefore, in some cases the rapid tumour burst occurred between CA-125 samples if the interval between samples was too extended. Nevertheless, the false negatives and false positives in *Criterion A* were below 10% while in *Criterion B*, as the cut-off value increase from 25 to 100 IU/mL, the false positive rate decreased from 11.7% to 1.0% while the false negative rate changed from 6.8% to a stable 12.6%, which are encouraging results for clinical practice. Anyway, as a general rule, the interval between samples must be balanced not only for technical, but also for economic and psychological reasons (many patients reported CA-125 anxiety) [12].

In accordance with the results obtained with our population, the major advantage of *Criterion A* is that it can predict patient relapse far sooner than *Criterion B* (and even sooner than other known criteria

using the CA-125 levels). However the *Criterion A* is especially useful if patient experience a rapid increase in CA-125 AUC. Otherwise *Criterion B* should be implemented because under some circumstances (i.e. when patients experienced a long term sustained increase of CA-125 tumour marker) relapses can occur even when differences between consecutive CA-125 AUC are less than 25%. For this reason, we strongly recommend the use of both criteria in conjugation. Firstly, *Criterion A* should be applied to evaluate the situation. If a negative answer occurs *Criterion B* should be attempted to confirm the absence of relapse. The algorithm of implementation of both criteria in clinical practice is appropriately illustrated in Figure 8.2.

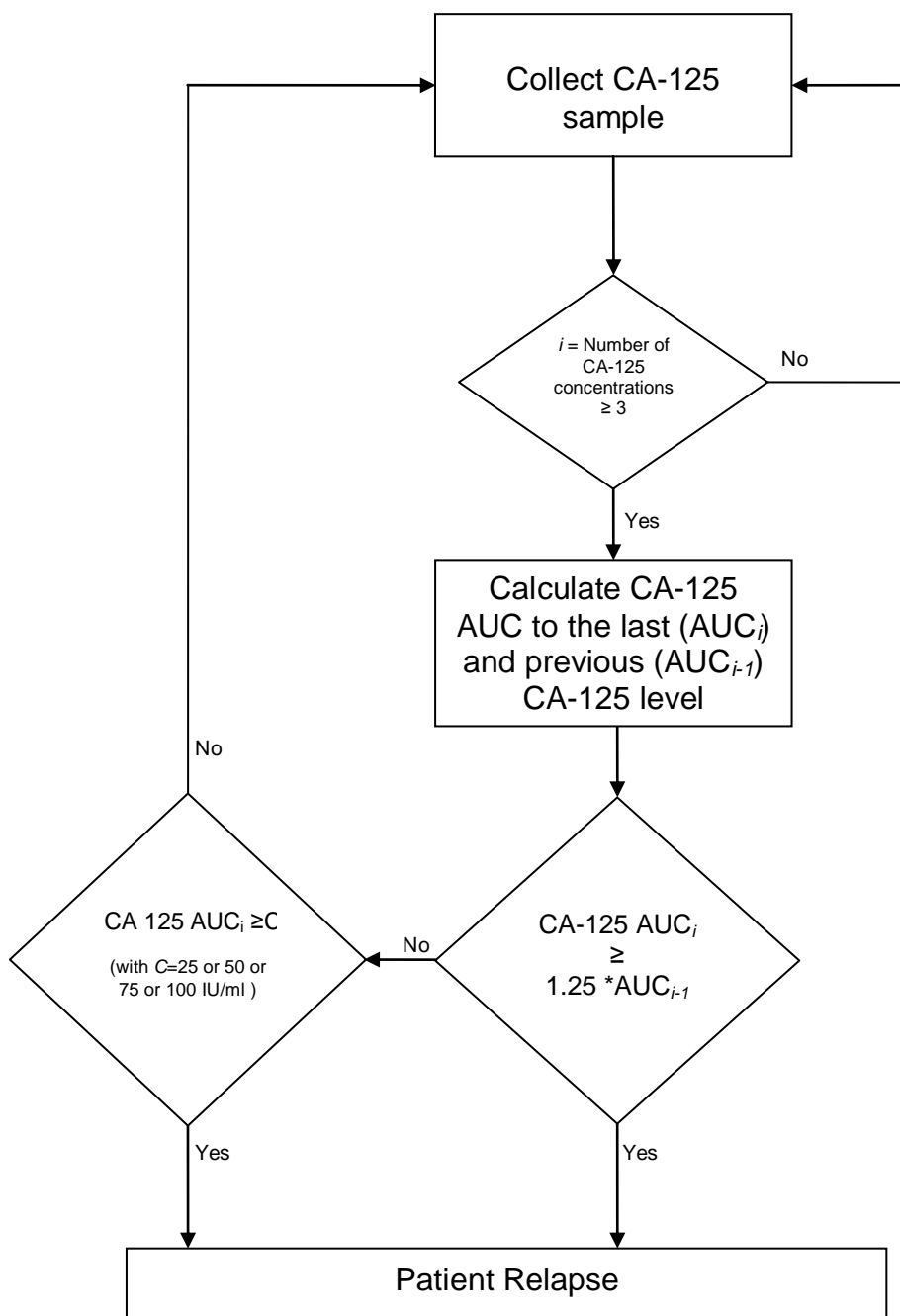


Figure 8.2- Algorithm for implementation of both criteria (A and B) in clinical practice.

8.5. REFERENCES

1. Lewis S, Menon U: Screening for ovarian cancer. *Rev Gynaecol Prac* 4:156-161, 2004.
2. Einhorn N, Bast R, Knapp R, Nilsoon B, Zurawski V, Sjövall K. Long-term follow-up of the Stockholm screening study on ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 79:466-470.
3. Bell R, Petticrew M, Sheldon T. The performance of screening test for ovarian cancer: results of a systematic review. *BJOG* 1998; 105:1136-1147.
4. Kecmanovic DM, Pavlov MJ, Kovacevic PA, Ceranic MS, Stamenkovic AB. Cytoreductive surgery for ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29:315-320.
5. Harries M, Gore M: Part I. Chemotherapy for epithelial ovarian cancer- treatment at first diagnosis. *Lancet Oncol* 2002; 3:529-536.
6. Thigpen JT. Chemotherapy for advanced ovarian cancer: overview of randomized trials. *Semin Oncol* 2000; 27(3, suppl 7):11-16.
7. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, Giurgea L, Timmers P, Coens C, Pecorelli S. Impact of Adjuvant Chemotherapy and Surgical Staging in Early-Stage Ovarian Carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer–Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm Trial. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(2); 113-124.
8. Spriggs D. Optimal sequencing in the treatment of recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 90:S39-S44.
9. Ozols RF. Treatment goals in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15(suppl 1):3-11.
10. Markman M, Bookman MA. Second-Line Treatment of Ovarian Cancer. *Oncologist* 2000; 5:26-35.

11. Baker VV. Treatment Options for Ovarian Cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44(3):522-530.
12. Harries M, Gore M: Part II. Chemotherapy for epithelial ovarian cancer-treatment of recurrent disease. *Lancet Oncol* 2002; 3:537-545.
13. Dizon DS, Dupont J, Anderson S, Sabbatini P, Hummer A, Aghajanian C, Spriggs D. Treatment of recurrent ovarian cancer: a retrospective analysis of women treated with single-agent carboplatin originally treated with carboplatin and paclitaxel. The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Gynecol Oncol* 2003; 91:584-590.
14. Watanabe Y, Nakai H, Ueda H, Hoshiai H. Evaluation of weekly low-dose paclitaxel and carboplatin treatment for patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 96:323-329.
15. Havrilesky LJ, Alvarez AA, Sayer RA, Lancaster JM, Soper JT, Berchuck A, Clarke-Pearson DL, Rodriguez GC, Carney ME. Weekly Low-Dose Carboplatin and Paclitaxel in the Treatment of Recurrent Ovarian and Peritoneal Cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 88:51-57.
16. Beshara N, Fung Kee Fung M, Faught W. The role of topotecan as second-line therapy in patients with recurrent ovarian cancer. *Eur J Gynaec Oncol* 2002; 23(4):287-290.
17. Herzog TJ. Clinical experience with topotecan in relapsed ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 90:S3-S7.
18. Bhoola SM, Coleman RL, Herzog T, Morris R, Bryant C, Estes JM, Alvarez RD. Retrospective analysis of weekly topotecan as salvage therapy in relapsed ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 95:564-569.
19. Parazzini F, Raspagliesi F, Guarnerio P, Bolis G. Role of secondary surgery in relapsed ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 37:121-125.

20. Günhör M, Ortaç F, Arvas M, Kösebay D, Sönmezer M, Köse K. The role of secondary cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 97:74-79.
21. Gronlund B, Lundvall L, Christensen IJ, Knudsen JB, Høgdall C. Surgical cytoreduction in recurrent ovarian carcinoma in patients with complete response to paclitaxel-platinum. *EJSO* 2005; 31:67-73.
22. Munkarah AR, Coleman RL. Critical evaluation of secondary cytoreduction in recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 95:273-280.
23. Gadducci A, Iacconi P, Cosio S, Fanucchi A, Cristofani R, Genazzani AR. Complete Salvage Surgical Cytoreduction Improves Further Survival of Patients with Late Recurrent Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 79:344-349.
24. Tinger A, Waldron T, Peluso N, Katin MJ, Dosoretz DE, Blitzer PH, Rubenstein JH, Garton GR, Nakfoor BA, Patrice SJ, Chuang L, Orr JW, Jr. Effective palliative radiation therapy in advanced and recurrent ovarian carcinoma. *Int J Radiation Biol Phys* 2001; 51(5):1256-1263.
25. Albuquerque KV, Singla R, Potkul RK, Smith DM, Creech S, Lo S, Emami B. Impact of tumor volume-directed involved field radiation therapy integrated in the management of recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 96:701-704.
26. Donovan KA, Greene PG, Shuster JL Jr, Partridge EE, Tucker DC. Treatment Preferences in Recurrent Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 86:200-211.
27. Penson RT, Digman F, Seiden MV, Lee H, Gallagher CJ, Matulonis UA, Olson K, Gibbens I, Gore ME. Attitudes to chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 94:427-435.
28. Bast RC Jr, Klug TL, St. John E., Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to

- monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983; 309(15):883-887.
29. Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA 125: The past and the future. *Int J Biol Markers* 1998; 13(4):179-187.
 30. Tuxen MK, Sölétormost G, Dombernowsky P. Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 1995; 21:215-245.
 31. Rustin GJ, Bast RC Jr, Kelloff GJ, Barrett JC, Carter SK, Nisen PD, Sigman CC, Parkinson DR, Ruddon RW. Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3919-3926.
 32. Guppy AE, Rustin GJ. CA125 Response: Can it Replace the Traditional Response Criteria in Ovarian Cancer? *Oncologist* 2002; 7:437-443.
 33. Rustin GJ, Nelstrop AE, Tuxen MK, Lambert HE. Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA 125: A North Thames Ovary Group Study. *Ann Oncol* 1996; 7: 361-364.
 34. Tuxen MK, Solétormos G, Rustin GJ, Nelstrop AE, Dombernowsky P. Biological variation and analytical imprecision of CA 125 in patients with ovarian cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60:713-722.
 35. Tuxen MK, Solétormos G, Dombernowsky P. Serum tumor marker CA 125 for monitoring ovarian cancer during follow-up. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62:177-188.
 36. Bidart JM, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N, Labrousse F, Voitot H. Kinetic of Serum Marker Concentrations and Usefulness in Clinical Monitoring. *Clin Chem* 1999; 45(10):1695-1707.
 37. Riedinger JM, Coudert B, Barillot I, Buffenoir G, Mayer F, Fargeot P, Cuienier J, Guerrin J: Intérêt clinique de l'estimation

de la vitesse de croissance des récidives ovariennes premières par le temps de doublment du CA 125. Bull Cancer 1997; 84(9):855-860.

38. Mano A, Falcão A, Godinho I, Santos J, Leitão F, de Oliveira C, Caramona M. CA-125 AUC as a new prognostic factor for patients with ovarian cancer. Gynecol Oncol 2005; 97:529-534.

9. CONCLUSÕES FINAIS

Apesar de cada artigo apresentado possuir já as suas próprias conclusões (Capítulos 4-8), nesta secção pretende-se proceder a uma integração capaz de levar à obtenção de conclusões mais abrangentes sobre o presente trabalho.

Neste estudo retrospectivo, o registo informático da informação médica mostrou-se fundamental pois permitiu uma agregação da informação de um modo célere.

Apesar das bases de dados estarem em plataformas diferentes a codificação usada pelos HUC foi fundamental para a interligação das mesmas. Este facto associado ao desenvolvimento do programa “Filtra Dados” acabou por permitir fazer uma análise multivariante e, inclusivamente, calcular diversos parâmetros cinéticos para o CA-125 em diferentes fases de seguimento das doentes.

Assim, o estudo foi dividido em dois componentes principais:

- a) Estudar a cinética do CA-125 durante a fase de tratamento primário com o objectivo de inferir sobre o prognóstico da doença;
- b) Estudar o comportamento do CA-125 após o tratamento primário com o objectivo da detecção da recidiva da doença.

Durante a fase de tratamento primário, o tempo de semi-vida do CA-125 é um dos parâmetros cinéticos mais estudados sendo um factor de prognóstico para o cancro do ovário. Por esse motivo, no primeiro trabalho (Capítulo 4), com a nossa população concluímos que com a determinação do tempo de semi-vida do CA-125 é possível classificar o prognóstico da doença. No entanto a determinação numérica do tempo de semi-vida nem sempre era possível principalmente quando o CA-125 não estabilizava abaixo do “cut-off”

de 35UI/mL. Atendendo a esta limitação foi experimentado um novo parâmetro cinético (Capítulo 5): a área sob a curva do CA-125 normalizada pelo tempo (ASC).

A ASC do CA-125 apresenta vantagens sobre outros parâmetros cinéticos pois não assume qualquer condição sobre o valor sérico individual do CA-125 para o seu cálculo, como por exemplo a estabilização do CA-125 abaixo do valor normal de 35UI/mL, permitindo assim a sua determinação numérica sem quaisquer constrangimentos.

A ASC do CA-125 durante o tratamento primário, por estar estreitamente relacionada com uma resposta completa à quimioterapia adjuvante, pode permitir classificar numericamente o resultado do tratamento, ou seja, poderá ser um “end point” especialmente útil na comparação de diferentes tipos de tratamento, nomeadamente em estudos prospectivos.

A aplicação de redes neuronais artificiais requer cuidados adicionais. Alguns erros da aplicação de redes neuronais em oncologia são referidos no artigo de revisão de Schwarzer e colaboradores [1]. Um dos erros mais comuns são as estimativas ineficientes, com muitos trabalhos a apresentar um tamanho do conjunto de teste muito pequeno. No entanto, muitos dos trabalhos publicados poderiam ter sido melhorados através da divisão da amostra com a utilização de técnicas de validação cruzada.

Segundo Lisboa [2] uma das questões metodológicas na elaboração de aplicações clínicas usando redes neuronais é a robustez da avaliação do desempenho. São diversas as fontes de incerteza capazes de reduzir a capacidade de manter o desempenho de um grupo de doentes para outro. Podemos incluir variabilidade intra e

inter-individual, variabilidade entre os diferentes grupos de doentes e diferenças entre centros clínicos.

Assim na criação de uma ferramenta informática baseada em redes neuronais com utilização na prática clínica devemos ter em conta:

- a) Uma validação interna, na qual, um conjunto de treino com a dimensão adequada é usado para modelar o problema em causa. Novos dados podem servir como conjunto de validação do treino e para medir a performance da aplicação;
- b) Uma validação temporal com a entrada de dados recentes do mesmo centro clínico;
- c) Uma validação externa na qual dados obtidos noutros centros clínicos e que sejam independentes dos dados de treino e validação interna.

Com um número de doentes reduzido que possuíamos, mesmo com validação cruzada, a criação de uma ferramenta informática utilizando redes neuronais para utilização clínica plena, estava assim comprometida. No entanto no trabalho apresentado (Capítulo 6), as redes neuronais apesar de não mostrarem vantagem sobre os métodos estatísticos convencionais, confirmaram o resultado obtido da relevância e aplicabilidade da ASC CA-125 como factor de prognóstico para o cancro do ovário.

Na segunda fase do trabalho foi estudado o comportamento do CA-125 e qual a sua relação com a recidiva. Foram estudados a velocidade de aumento do CA-125 e a aplicação da ASC do CA-125 na detecção da recidiva (Capítulos 7 e 8, respectivamente).

Mais uma vez a aplicação da ASC do CA-125 apresenta vantagem sobre a velocidade de aumento (melhor exactidão e tempo médio até à recidiva mais consistente) e sem depender de nenhuma

concentração individual do CA-125, havendo um efeito atenuante devidos à variabilidade das concentrações do CA-125.

Sabe-se então que o aumento do CA-125 caracterizado (ou não) por parâmetros cinéticos está relacionado com a recidiva e, durante o acompanhamento das doentes, uma das questões centrais será a antecipação (ou não) da quimioterapia apenas com a elevação do CA-125 sem manifestações clínicas da doença.

Um estudo randomizado recente (*MRC OV05/EORTC 55955*) mostrou não haver evidências de benefícios na sobrevivência com a aplicação do tratamento da recidiva baseada apenas no aumento isolado do CA-125, não estando provada a utilidade da medição do CA-125 em doentes que obtiveram uma resposta completa no tratamento primário. Contudo a determinação do CA-125 pode ser um “output” muito relevante no caso dos ensaios clínicos [3].

Um aspecto da maior relevância é que a nossa abordagem original através do uso da ASC permitiu apresentar um tempo mediano até à recidiva de 111 dias [-37; 843] muito superior (quase o dobro) ao sugerido por Rustin e colaboradores de 63 dias [-361; 77], com valores de exactidão semelhantes (85% vs 88%) [4], o que pode ter implicações clínicas de grande alcance.

Na realidade, os parâmetros cinéticos derivados do CA-125 podem ser utilizados em estudos clínicos prospectivos na comparação de novos tratamentos com os utilizados na actualidade, ou então para ajustar o modo como determinada doente deve ser acompanhada (ex. frequência das consultas ou pedido de exames complementares de diagnóstico).

Com base no acumular de conhecimento, foi então elaborado um programa informático o “CA-125 Analyser” (Figura 9.1) capaz de sinalizar recidivas usando transversalmente os resultados obtidos na presente dissertação.

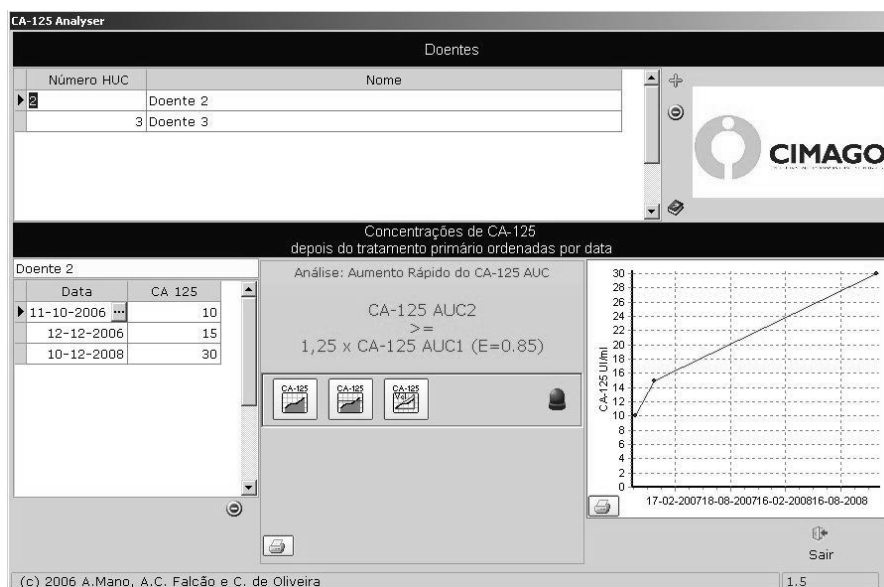


Figura 9.1- Ecrã principal do “CA-125 Analyser”.

O “CA-125 Analyser” tem por objectivo ajudar a interpretar os aumentos do CA-125 em doentes consideradas como curadas após tratamento primário do cancro do ovário. A interpretação do CA-125 é feita usando parâmetros cinéticos como a área sobre a curva do CA-125 normalizada pelo tempo e a velocidade de aumento do CA-125. A análise dos valores do CA-125 é feita à medida que as doentes são acompanhadas após o tratamento primário e origina alertas de recidivas baseando-se em três cálculos independentes:

- a) Detecção do aumento brusco da ASC do CA-125: calcula-se a ASC até à última e penúltima concentração do CA-125 e verifica se existe um aumento superior em 25%;
- b) Detecção da ultrapassagem de um “cut-off” da ASC do CA-125: calcula-se a ASC total e verifica se ocorreu um ultrapassar dos “cut-off’s” 25, 50, 75 ou 100 UI/ml;

- c) Cálculo da velocidade de aumento do CA-125: calcula-se a velocidade de aumento do CA-125 entre a antepenúltima e última concentração do CA-125 com a condição de que $C_{i+2} > C_{i+1}$ e $C_{i+1} > C_i$.

9.1. REFERÊNCIAS

1. Schwarzer, G., W. Vach, and M. Schumacher, *On the misuses of artificial neural networks for prognostic and diagnostic classification in oncology*. Stat Med, 2000. **19**(4): p. 541-61.
2. Lisboa, P.J., *A review of evidence of health benefit from artificial neural networks in medical intervention*. Neural Netw, 2002. **15**(1): p. 11-39.
3. Rustin, G.J., et al., *Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial*. Lancet, 2010. **376**(9747): p. 1155-63.
4. Rustin, G.J., et al., *Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA 125: a North Thames Ovary Group Study*. Ann Oncol, 1996. **7**(4): p. 361-4.