

Rastreamento e diagnóstico das neoplasias de ovário – papel dos marcadores tumorais

Francisco José Candido dos Reis

RESUMO

O câncer de ovário é a neoplasia ginecológica mais letal e a sobrevida global é inferior a 40% em cinco anos. Isto ocorre principalmente porque a maioria das pacientes apresenta estádios avançados no momento do diagnóstico. Nestes casos as opções terapêuticas - citorredução e quimioterapia - são apenas parcialmente efetivas. Quando diagnosticado precocemente, por outro lado, a sobrevida em cinco anos é superior a 90% e a cirurgia geralmente é o único tratamento necessário. No entanto, em função da baixa prevalência do câncer de ovário na população, mesmo testes muito específicos produzem altas taxas de resultados falso-positivos e aumento de intervenções cirúrgicas para abordar massas anexiais assintomáticas. Com base nestes fatos, é essencial a busca de métodos e estratégias para se detectar estes tumores em estádios iniciais e ao mesmo tempo evitar intervenções desnecessárias. Neste artigo são revisadas as bases e as possíveis conseqüências de estratégias para a detecção precoce dos tumores ovarianos. São discutidos os principais métodos disponíveis e os resultados de alguns estudos com este objetivo.

PALAVRAS-CHAVE: Neoplasias ovarianas/diagnóstico; Marcadores biológicos de tumor; Antígeno Ca-125

ABSTRACT

Ovarian cancer is the most lethal gynecologic tumor, the 5-year survival is less than 40%. The main reason is the advanced stage at the moment of the diagnosis. In these cases the therapeutic options, cytoreductive surgery and chemotherapy, are not completely effective. On the other hand, 5-year survival for early stage ovarian cancer is higher than 90%, and most of the times the surgery is the only treatment needed. However, because of the low prevalence of ovarian cancer in the general population, even tests with high specificity present many false positive results and eventually an increase in surgical procedures to investigate asymptomatic adnexal masses. Based on these facts the search for methods and strategies to diagnose early stage ovarian cancer and at the same time to avoid unnecessary surgical interventions are essential. In this article, the bases and possible consequences of strategies for ovarian cancer screening were reviewed. The most important methods available and the results of some trials are evaluated.

KEYWORDS: Ovarian neoplasms/diagnosis; Tumor makers, biological; CA-125 antigen

Introdução

O câncer de ovário é a sexta neoplasia maligna mais freqüente e a quarta causa de morte por câncer em mulheres nos Estados Unidos. Para 2004 eram esperados 25580 novos casos, com 16090 óbitos¹. Os dados de prevalência acumulada ao longo da vida, desde o nascimento até 85 anos de idade, mostram que a probabilidade de ocorrência do câncer de ovário é de 1,5%². A sobrevida global é apenas 30–40% em cinco anos. Isto ocorre em parte porque a maioria das pacientes tem a doença diagnosticada em estádios avançados, situação em que as opções de tratamento são restritas a cirurgia citorrredutora e a quimioterapia baseada nos derivados da platina. Estas modalidades terapêuticas são apenas parcialmente efetivas e, conseqüentemente, a maioria das pacientes apresentará recorrência e óbito em função da doença.

Os fatores de prognóstico, definidos pela correlação com a sobrevida, em geral refletem a extensão da doença (estádio), a biologia intrínseca do tumor (tipo e grau histológico) e a capacidade da paciente tolerar o tratamento para a doença (*performance status*). Assim como estes fatores pré-tratamento, outros que podem ter

Professor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto (SP).
Correspondência: Francisco José Candido dos Reis
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Av. Bandeirantes 3900, 8º andar – 14049-900 – Ribeirão Preto – SP – e-mail: fcreis@fmrp.usp.br

impacto na sobrevida incluem o tipo de tratamento recebido (citorredução ótima, quimioterapia baseada em derivados da platina) e o efeito da terapêutica sobre o tumor (ex. resposta completa) ou sobre a paciente (ex. mielossupressão)³. Entre estes fatores de prognóstico, o estadiamento da FIGO é considerado o mais importante. A sobrevida em cinco anos é de 95% para os casos de tumor localizado no ovário, 72% para os casos com implantação regional e 31% para os casos com tumor disseminado. No entanto, no momento do diagnóstico, 29% dos casos apresentam-se com tumor restrito aos ovários, 6% com tumores disseminados regionalmente e 59% com disseminação à distância^{1,4,5}.

A elevada mortalidade e a pequena proporção de casos de câncer de ovário diagnosticados em estádios iniciais tornam a busca por meios de identificação precoce desta doença essencial. Os critérios básicos para o rastreamento de uma doença são: elevada morbidade e mortalidade, o entendimento da história natural da doença, a elevada prevalência de doença pré-clínica na população, a existência de teste confortável e conveniente, com custo acessível, fácil de realizar, sem efeitos colaterais, e com elevada sensibilidade e especificidade. A etiologia do câncer de ovário parece ser multifatorial, incluindo fatores reprodutivos, familiares e pessoais. Existem evidências consistentes a respeito do efeito protetor da multiparidade⁶ e do uso de contraceptivos orais, independente do subtipo histológico⁷. A história de câncer de ovário ou câncer de mama em parente de primeiro grau é considerada o principal fator de risco, embora apenas 5% das mulheres com a doença apresentem fatores genéticos identificáveis⁸. Considerando-se os aspectos epidemiológicos do câncer de ovário e o estágio atual do conhecimento sobre esta doença, apenas o primeiro critério essencial para a proposição de rastreamento populacional pode ser considerado completamente satisfeito.

Marcadores tumorais

Marcadores tumorais são substâncias que podem ser detectadas e quantificadas no sangue ou em outros fluidos orgânicos de pacientes portadores de neoplasias. Diversas categorias de marcadores têm sido investigadas para o diagnóstico precoce dos tumores ovarianos, entre as quais merecem destaque: as sialomucinas epiteliais; proteases com seus inibidores complementares e produtos de clivagem; citocinas, receptores e reagentes de fase aguda; hormônios, fatores promotores e inibidores de crescimento; citoqueratinas; lípidos e lipoproteínas; proteínas oncofetais; auto-anticorpos; e mais recentemente os perfis proteômicos⁹. Estas substâncias podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação.

O marcador ideal deve ser produzido por todos os tumores da mesma linhagem e seus níveis devem ser mensuráveis mesmo na presença de pequena quantidade de células. Os níveis séricos devem refletir com precisão a evolução clínica e a regressão da doença, sendo a sua normalização associada à cura. Deve ser sensível e específico, apresentar níveis proporcionais ao tamanho tumoral, ter utilidade no estabelecimento do prognóstico, antecipar a ocorrência de recorrências e permitir a seleção de tratamento. Nenhum dos marcadores estudados até o momento apresenta todas estas características.

O CA 125 é marcador mais conhecido e utilizado na condução clínica de pacientes com tumores epiteliais de ovário. É uma sialomucina de elevado peso molecular, também conhecido como MUC 16, que foi inicialmente identificada por meio de anticorpos produzidos por animais imunizados com células de cistadenocarcinoma seroso papilífero do ovário humano¹⁰. Este marcador tem sido estudado para o rastreamento de mulheres assintomáticas, no diagnóstico diferencial de mulheres com massas pélvicas, no monitoramento de resposta ao tratamento adjuvante e na detecção precoce de recorrência do tumor após tratamento.

Os parâmetros de sensibilidade e especificidade do CA 125 na detecção do câncer de ovário variam na dependência de diversos fatores. A sensibilidade varia entre 24 e 97% e depende principalmente do estágio e do tipo histológico do tumor. Para o estágio I a sensibilidade está entre 27 e 66%, para o estágio II entre 65 e 100%, para o estágio III entre 87 e 90% e para o estágio IV em torno de 94%. Entre os tipos histológicos o desempenho é melhor para os tumores serosos e endometrióides quando se compara com tumores mucinosos e de células claras. Para os tumores serosos a sensibilidade está entre 68 e 94%, para os tumores mucinosos entre 52 e 68%, para os tumores endometrióides em torno de 92% e, para os tumores de células claras em torno de 61%. A especificidade varia entre 71 e 100%, podendo ser comprometida por uma série de eventos fisiológicos (ex. menstruação), por diversas condições benignas (ex. endometriose), e por outras neoplasias. Em estudos utilizando pessoas saudáveis como controle, a especificidade é de cerca de 96%, quando são incluídas pessoas com doença benigna a especificidade cai para 71 a 86% e quando entre os controles existem portadores de outras neoplasias cai para cerca de 62%⁹.

Os níveis séricos de CA 125 podem ser interpretados com base em um ponto de corte fixo ou na dosagem seriada e avaliação do comportamento da curva pelo cálculo de risco de câncer de ovário (RCO). Há uma preocupação importante com relação ao uso de valores de corte fixos para o CA 125 (30 ou 35 U/mL) como método de detecção do câncer de ovário inicial e assintomático, pois a sensibilidade tende a ser limitada¹¹. Por outro lado, quando se avaliam do-

sagens seriadas de CA 125 verifica-se que os níveis deste marcador elevam-se rapidamente nos casos de tumores ovarianos pré-clínicos e permanecem relativamente estáveis nas pessoas normais, independentemente se nível inicial é elevado¹². Levando-se em conta estes aspectos, o cálculo do RCO, baseado na comparação de curvas de dosagem seriada de CA 125 com curvas conhecidas de pacientes com câncer e controles, é considerado melhor que pontos de corte fixos para a detecção precoce do câncer de ovário. Esta nova forma de analisar eleva a sensibilidade do método de 62% para 84%, mantendo a especificidade fixa em 98%¹³.

Mais recentemente, a extração do RNA mensageiro e a síntese do DNA complementar a partir de tumores e de tecido normal têm sido utilizadas para localizar genes superexpressos e identificar uma variedade de marcadores, incluindo prostatina¹⁴ e a osteopontina¹⁵. A principal limitação do uso do método baseado nos *microarrays* de DNA complementar é que as seqüências gênicas identificadas, DNA ou RNA, não necessariamente refletem a funcionalidade das proteínas codificadas, em virtude da atividade transcricional tumoral, das diversas interações proteína-proteína e modificações conformacionais, que podem alterar o padrão de proteínas encontrado na circulação.

Por outro lado, proteínas produzidas por tecidos tumorais podem ser consideradas uma forma de “assinatura molecular” da lesão primária. O desenvolvimento tumoral é um processo complexo que requer a interação coordenada de numerosas proteínas, e tipos celulares. Como resultado de extensos estudos sobre patogênese molecular dos tumores malignos, diversas novas vias e redes regulatórias têm sido identificadas. O delineamento destas vias tem revelado diversos eventos únicos marcados por mudanças morfológicas e histológicas na célula, e a expressão de genes e proteínas que acompanham a transformação oncogênica. Portanto a assinatura celular muda durante o desenvolvimento do câncer. Pela leitura destas modificações podemos melhorar a detecção precoce e o diagnóstico de indivíduos com câncer.

Novas tecnologias para estudo de proteínas têm sido utilizadas para a identificação de novos marcadores para o câncer de ovário. Uma interessante abordagem é a utilização de padrões de perfis gerados pela análise do soro de pacientes com câncer de ovário por meio da espectrometria de massa, sem a identificação de proteínas específicas. Estes perfis são gerados por espectrômetro de massa SELDI-TOF (*Surface-Enhanced Laser Desorption and Ionisation Time-of-Flight*) e analisados por complexas ferramentas de bioinformática¹⁶.

Embora esta idéia tenha ganhado muita atenção, está ainda em avaliação para a detecção precoce do câncer de ovário. Por este método não

é necessária a identificação dos componentes individuais do soro, são enfatizadas basicamente as diferenças relativas no perfil protéico do soro de pacientes com câncer quando comparadas com controles sem a doença. Cada proteína recebe um número que é a razão entre sua massa e carga. Imprecisões no uso da espectrometria de massa com possíveis artefatos em função de diferentes condições de geração de perfis entre os casos e os controles e uso de peptídeos de baixo peso molecular foram levantadas. Tais fatos dificultam tanto a reprodutibilidade dos resultados¹⁷, quanto problemas de interpretação dos dados. Utilizando os mesmos conjuntos de dados da publicação original, outros autores não conseguem reproduzir os resultados de sensibilidade e especificidade.

Grande número de marcadores têm sido propostos como úteis para rastreamento e diagnóstico do câncer de ovário. Para organizar estes conhecimentos o EDRN (*National Cancer Institute's Early Detection Research Network*) estabeleceu as seguintes cinco fases para o desenvolvimento e avaliação de novos biomarcadores antes de sua utilização clínica rotineira: 1) fase pré-clínica exploratória para a identificação de direções promissoras, 2) ensaios clínicos e fase de validação para avaliar a habilidade do teste para detectar uma dada doença, 3) fase retrospectiva/longitudinal para determinar a habilidade de um específico marcador para o diagnóstico precoce de uma dada doença e definir o critério de positividade, 4) fase de rastreamento prospectiva para identificar as características da doença detectada pelo teste, assim como a taxa de resultados falso-positivos, e 5) estudo definitivo (prospectivo e randomizado) para determinar o impacto do rastreamento na redução da mortalidade e morbidade da doença na população geral¹⁸. Apenas o CA 125 passou pelas quatro primeiras fases, a quinta fase está sendo conduzida atualmente.

Ultra-sonografia

A ultra-sonografia é método naturalmente associado aos marcadores tumorais, tanto nas tentativas de rastreamento como para o diagnóstico diferencial dos tumores ovarianos. Na presença de aumento do volume ovariano, as características ultra-sonográficas podem ser associadas ao risco de malignidade. Em série de 1017 tumores, 0,3% dos cistos uniloculares, 8% dos cistos multiloculares e 39% dos tumores predominantemente sólidos eram malignos¹⁹.

A experiência com a ultra-sonografia transvaginal como método inicial para o rastreamento do câncer de ovário é, no entanto, limitada. Utilizando-se 8 cm³ como valor máximo do volume ovariano

foram identificados 33 (2,5%) exames anormais em 1300 mulheres na pós-menopausa, destas 27 foram submetidas à laparotomia com a identificação de apenas dois tumores malignos primários do ovário e 14 cistadenomas²⁰. Em outro estudo com 3220 mulheres assintomáticas também na pós-menopausa, houve indicação de 44 laparotomias exploradoras com a identificação de três casos de tumores primários do ovário dos quais dois no estadió IA²¹.

Existem ainda alguns estudos em pacientes com risco elevado para câncer de ovário. Em estudo observacional de 10 anos no qual se avaliaram mulheres com risco para câncer de ovário familiar, foram identificados 104 exames positivos em 4231 realizados (2,5%). Dentre estes, 11 casos de tumor maligno do ovário sendo sete iniciais, incluindo quatro de malignidade limítrofe²². Na universidade do Kentucky um estudo incluiu 14469 mulheres entre 1987 e 1999. Todas eram consideradas de risco para câncer de ovário, com idade acima dos 50 anos ou acima dos 25 anos e pelo menos uma familiar de primeiro ou segundo grau com câncer de ovário documentado. Estas mulheres foram submetidas à avaliação ultra-sonográfica anual. Como resultado, 180 mulheres (1,2%) foram submetidas à cirurgia por anormalidade persistente à ultra-sonografia. Dentre estas 17 apresentaram tumor maligno primário do ovário e as demais apresentaram massas ovarianas benignas. Nove tumores foram classificados no estadió IA, dois IC, um IIA, dois IIC e três no estadió III²³.

Rastreamento do câncer de ovário

Além da falta de bons métodos de rastreamento, grande problema das propostas de rastreamento para o câncer de ovário é o impacto causado pelos resultados falso-positivos. O valor preditivo de um teste de rastreamento é determinado pela especificidade do mesmo e pela prevalência da doença na população estudada. No caso de doenças de baixa prevalência como o câncer de ovário, exames com especificidade extremamente elevada podem produzir valores preditivos positivos inaceitáveis. Na verdade o maior obstáculo para um programa de rastreamento do câncer de ovário é sua baixa prevalência.

O impacto “social” do valor preditivo positivo depende da necessidade de utilização de procedimentos invasivos no caso de resultados positivos do rastreamento. Considerando-se a prevalência média de 50 por 100000 mulheres após a menopausa e um exame com especificidade de 95%, o valor preditivo positivo é de apenas 1%, ou seja, seriam necessários 100 procedimentos invasivos (laparoscopia ou laparotomia) para se detectar um caso de tumor de ovário²⁴.

A mortalidade e morbidade decorrentes do câncer de ovário atualmente e a expectativa de mudança de panorama caso a proporção de diagnósticos precoces aumente têm motivado esforços na busca e aprimoramento de métodos de rastreamento. Mesmo considerando as limitações epidemiológicas esperadas, grandes ensaios estão em andamento atualmente²⁵.

Nos EUA está sendo conduzido ensaio envolvendo 10 grandes instituições com o objetivo de verificar se o rastreamento populacional reduz a mortalidade pelo câncer de ovário. Este estudo é conhecido como PLCO (*Prostate, Lung, Colorectal & Ovarian Cancer Screening Trial*) e patrocinado pelo Instituto Nacional do Câncer. O recrutamento na fase de estudo-piloto começou em 16 de novembro de 1993 e a inclusão no estudo definitivo em 30 de setembro de 2004. Para o câncer de ovário, os métodos utilizados são a dosagem do CA 125 sérico e a ultra-sonografia transvaginal. Foram incluídas 74000 mulheres randomizadas em 2 grupos, 37000 seguidas com ultra-sonografia transvaginal e CA 125 anualmente por cinco anos e 37000 para receberem cuidados de saúde habituais²⁶. Para o ano de 2010 é esperada a ocorrência de cerca de 500 casos de câncer de ovário entre as pacientes estudadas e para este ano são previstos os primeiros resultados sobre o impacto do rastreamento sobre a história natural desta doença²⁷.

Outro importante ensaio populacional está sendo conduzido no Reino Unido, recebeu a denominação de UKTOCS (*UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening*). Foram recrutadas 200000 mulheres menopausadas, entre 50 e 74 anos. Do total de mulheres, 100000 estão participando do rastreamento e as demais são controles. O grupo sob rastreamento está dividido em duas modalidades, metade com ultra-sonografia transvaginal anualmente e a outra metade, com dosagem seriada de CA 125 e cálculo de risco de câncer de ovário.

Estes dois estudos devem trazer uma resposta quanto ao verdadeiro impacto do rastreamento populacional sobre a morbidade e mortalidade decorrentes do câncer de ovário. Os dois grupos planejam resultados para o ano 2010, mas os pesquisadores envolvidos no segundo ensaio publicaram um estudo-piloto em 1999. Este estudo envolveu 21935 mulheres (10958 para rastreamento com CA 125 e ultra-sonografia transvaginal quando CA 125 apresentasse níveis superiores a 30 U/mL), e 10977 como controles. Durante sete anos do seguimento do estudo foram diagnosticados 16 casos de câncer de ovário no grupo de rastreamento e 20 casos no grupo controle. A proporção de estádios iniciais foi de 31,3% entre as pacientes rastreadas e 10% entre as controles. A sobrevida mediana foi de 72,9 meses no grupo rastreado e 41,8 meses no grupo controle²⁸. Estes resultados são preliminares, mas diversos ginecologistas americanos os utilizam para oferecer rastreamento para mulheres com mais de 50 anos.

Massas anexiais assintomáticas

A utilização liberal da ultra-sonografia é responsável pelo aumento no número de casos de massas anexiais em mulheres assintomáticas após a menopausa. A prevalência destas lesões após os 55 anos é cerca de 21,2%, sendo 15,7% cistos simples e 5,5% cistos complexos²⁹. A remoção cirúrgica de cistos ovarianos benignos parece ter pouco impacto na incidência futura de câncer de ovário³⁰. Uma minoria destas massas é maligna. No entanto sua presença é sempre motivo para preocupação. Nestes casos devem-se procurar metodologias que permitam reduzir ao máximo as intervenções desnecessárias sem deixar de realizar o diagnóstico precoce dos tumores malignos. A combinação de características clínicas, ultra-sonográficas e a dosagem de CA 125 são os métodos recomendados para tal finalidade. A intervenção cirúrgica é recomendada nos casos de pacientes com história de câncer de ovário, mama ou cólon em parentes de primeiro grau, avaliação ultra-sonográfica no qual se encontrou "massa complexa" ou que apresentem CA 125 com níveis superiores a 35 U/mL. Uma massa anexial é considerada complexa quando apresenta cápsula espessa, septos espessos, vegetações ou componentes sólidos.

Quando há indicação cirúrgica e não há evidências claras de malignidade, a via considerada como preferencial é a laparoscópica. A anexectomia e exame anatomopatológico intra-operatório são formalmente indicados. Apesar do aprimoramento dos métodos de diagnóstico pré-operatório e intra-operatório, continuam sendo relatados casos de massas anexiais abordadas por laparoscopia e que subsequentemente se revelaram malignas. Entre quatro e seis massas anexiais em cada 1000 casos com aparência intra-operatória totalmente benigna, são na verdade tumores malignos³¹⁻³³. Devem ser ressaltados ainda dois pontos: o primeiro é que o atraso em realizar o tratamento definitivo em caso de tumores malignos pode piorar o prognóstico³⁴ e, segundo que, embora não sendo consenso, a ruptura intra-operatória de tumores malignos tem efeito negativo sobre o seu prognóstico³⁵. A ruptura implica em tratamento mais agressivo com indicação obrigatória de quimioterapia adjuvante. Estes aspectos considerados em conjunto nos levam a preconizar anexectomia total em pacientes submetidas à laparoscopia por massas ovarianas após a menopausa, independentemente da característica macroscópica. Pelos mesmos motivos a avaliação histopatológica intra-operatória é obrigatória em pacientes submetidas à anexectomia laparoscópica por massas ovarianas. O exame de congelação é o método mais adequado para a avaliação intra-operatória na maioria dos casos, apresentando concordância com o exame em parafina em 92% dos casos³⁶.

Conclusões

As publicações atuais não dão apoio à recomendação rotineira de rastreamento em nível populacional para o câncer de ovário até o momento. No entanto, em que pesem as características epidemiológicas desfavoráveis, a elevada mortalidade e morbidade que acompanha esta doença é motivo suficiente para insistir na busca de métodos mais sensíveis e específicos para tal finalidade.

Quando se considera pessoas de alto risco, como aquelas têm parente de primeiro grau com câncer de ovário, há indícios fortes que a utilização anual de ultra-sonografia transvaginal e dosagem seriada de CA 125 com cálculo de risco para o câncer de ovários pode levar à identificação de casos mais precocemente havendo, portanto, mais benefícios que risco em aplicar o rastreamento.

Referências

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004;54(1):8-29.
2. Whittemore AS. Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. *Gynecol Oncol.* 1994;55(3 Pt 2):S15-9.
3. Agarwal R, Kaye SB. Prognostic factors in ovarian cancer: how close are we to a complete picture? *Ann Oncol.* 2005;16(1):4-6.
4. Hornung R, Urs E, Serenella E, Edward W, Ursula S, Urs H, Daniel F. Analysis of potential prognostic factors in 111 patients with ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2004;206(1):97-106.
5. Linasmita V, Pattaraarchachai J, Daengdeelert P. Prognostic factors for survival of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004;85(1):66-9.
6. Titus-Ernstoff L, Perez K, Cramer DW, Harlow BL, Baron JA, Greenberg ER. Menstrual and reproductive factors in relation to ovarian cancer risk. *Br J Cancer.* 2001;84(5):714-21.
7. Kurian AW, Balise RR, McGuire V, Whittemore AS. Histologic types of epithelial ovarian cancer: have they different risk factors? *Gynecol Oncol.* 2005;96(2):520-30.
8. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med.* 2004;351(24):2519-29.
9. Terry KL, Sluss PM, Skates SJ, Mok SC, Ye B, Vitonis AF, Cramer DW. Blood and urine markers for ovarian cancer: a comprehensive review. *Dis Markers.* 2004;20(2):53-70.
10. Bast RC Jr., Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest.* 1981;68(5):1331-7.

11. Jacobs I, Davies AP, Bridges J, Stabile I, Fay T, Lower A, Grudzinskas JG, Oram D. Prevalence screening for ovarian cancer in postmenopausal women by CA 125 measurement and ultrasonography. *BMJ*. 1993;306(6884):1030-4.
12. Jacobs IJ, Skates S, Davies AP, Woolas RP, Jeyarajah A, Weidemann P, Sibley K, Oram DH. Risk of diagnosis of ovarian cancer after raised serum CA 125 concentration: a prospective cohort study. *BMJ*. 1996;313(7069):1355-8.
13. Skates SJ, Menon U, MacDonald N, Rosenthal AN, Oram DH, Knapp RC, Jacobs IJ. Calculation of the Risk of Ovarian Cancer From Serial CA-125 Values for Preclinical Detection in Postmenopausal Women. *J Clin Oncol*. 2003;21(10 Suppl):206-10.
14. Mok SC, Chao J, Skates S, Wong K, Yiu GK, Muto MG, Berkowitz RS, Cramer DW. Prostatein, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(19):1458-64.
15. Kim JH, Skates SJ, Uede T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, Berkowitz RS, Cramer DW, Mok SC. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA*. 2002;287(13):1671-9.
16. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002;359(9306):572-7.
17. Sorace JM, Zhan M. A data review and re-assessment of ovarian cancer serum proteomic profiling. *BMC Bioinformatics*. 2003;4(1):24.
18. Sullivan Pepe M, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(14):1054-61.
19. Granberg S, Wikland M, Jansson I. Macroscopic characterization of ovarian tumors and the relation to the histological diagnosis: criteria to be used for ultrasound evaluation. *Gynecol Oncol*. 1989;35(2):139-44.
20. Van Nagell JR Jr., DePriest PD, Puls LE, Donaldson ES, Gallion HH, Pavlik EJ, Powell DE, Kryscio RJ. Ovarian cancer screening in asymptomatic postmenopausal women by transvaginal sonography. *Cancer*. 1991;68(3):458-62.
21. DePriest PD, van Nagell JR, Jr., Gallion HH, Shenson D, Hunter JE, Andrews SJ, Powell DE, Pavlik EJ. Ovarian cancer screening in asymptomatic postmenopausal women. *Gynecol Oncol*. 1993;51(2):205-9.
22. Taylor A, Bourne TH, Campbell S, Okokon E, Dew T, Collins WP. Results from an ultrasound-based familial ovarian cancer screening clinic: a 10-year observational study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003;21(4):378-85.
23. Van Nagell JR Jr., DePriest PD, Reedy MB, Gallion HH, Ueland FR, Pavlik EJ, Kryscio RJ. The efficacy of transvaginal sonographic screening in asymptomatic women at risk for ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2000;77(3):350-6.
24. Skates SJ, Xu FJ, Yu YH, Sjøvall K, Einhorn N, Chang Y, Bast RC Jr., Knapp RC. Toward an optimal algorithm for ovarian cancer screening with longitudinal tumor markers. *Cancer*. 1995;76(10 Suppl):2004-10.
25. Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(4):355-66.
26. Prorok PC, Andriole GL, Bresalier RS, Buys SS, Chia D, Crawford ED, Fogel R, Gelmann EP, Gilbert F, Hasson MA, Hayes RB, Johnson CC, Mandel JS, Oberman A, O'Brien B, Oken MM, Rafla S, Reding D, Rutt W, Weissfeld JL, Yokochi L, Gohagan JK. Design of the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Control Clin Trials*. 2000;21(6 Suppl):273S-309S.
27. Hayes RB, Reding D, Kopp W, Subar AF, Bhat N, Rothman N, Caporaso N, Ziegler RG, Johnson CC, Weissfeld JL, Hoover RN, Hartge P, Palace C, Gohagan JK. Etiologic and early marker studies in the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening trial. *Control Clin Trials*. 2000;21(6 Suppl):349S-355S.
28. Jacobs IJ, Skates SJ, MacDonald N, Menon U, Rosenthal AN, Davies AP, Woolas R, Jeyarajah AR, Sibley K, Lowe DG, Oram DH. Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet*. 1999;353(9160):1207-10.
29. Hartge P, Hayes R, Reding D, Sherman ME, Prorok P, Schiffman M, Buys S. Complex ovarian cysts in postmenopausal women are not associated with ovarian cancer risk factors: preliminary data from the prostate, lung, colon, and ovarian cancer screening trial. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(5):1232-7.
30. Crayford TJ, Campbell S, Bourne TH, Rawson HJ, Collins WP. Benign ovarian cysts and ovarian cancer: a cohort study with implications for screening. *Lancet*. 2000;355(9209):1060-3.
31. Canis M, Mage G, Pouly JL, Wattiez A, Manhes H, Bruhat MA. Laparoscopic diagnosis of adnexal cystic masses: a 12-year experience with long-term follow-up. *Obstet Gynecol*. 1994;83(5 Pt 1):707-12.
32. Nezhat F, Nezhat C, Welander CE, Benigno B. Four ovarian cancers diagnosed during laparoscopic management of 1011 women with adnexal masses. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167(3):790-6.
33. Maiman M, Seltzer V, Boyce J. Laparoscopic excision of ovarian neoplasms subsequently found to be malignant. *Obstet Gynecol*. 1991;77(4):563-5.
34. Lehner R, Wenzl R, Heinzl H, Husslein P, Sevelde P. Influence of delayed staging laparotomy after laparoscopic removal of ovarian masses later found malignant. *Obstet Gynecol*. 1998;92(6):967-71.
35. Mizuno M, Kikkawa F, Shibata K, Kajiyama H, Suzuki T, Ino K, Kawai M, Mizutani S. Long-term prognosis of stage I ovarian carcinoma. Prognostic importance of intraoperative rupture. *Oncology*. 2003;65(1):29-36.
36. Gol M, Baloglu A, Yigit S, Dogan M, Aydin C, Yensel U. Accuracy of frozen section diagnosis in ovarian tumors: Is there a change in the course of time? *Int J Gynecol Cancer*. 2003;13(5):593-7.