

CONSIDERACIONES CLÍNICAS DE LA EXPRESIÓN DE P504S Y METALOPROTEINASA DE MATRIZ 2 EN CÉLULAS PROSTÁTICAS CIRCULANTES EN SANGRE DISEMINADAS COMO RESULTADO DE UNA BIOPSIA PROSTÁTICA TRANS-RECTAL GUIADA POR ECOGRAFÍA

Nigel P. Murray^{1,2,3}, Eduardo Reyes^{4,5}, Nelson Orellana⁵, Cynthia Fuentealba⁵, Ricardo Dueñas⁵ y Omar Jacob⁵.

¹Jefe de Hematología. División de Medicina. Hospital de Carabineros de Chile. Simón Bolívar 2200. Ñuñoa. Santiago. Chile.

²Director. Instituto de BioOncología. Providencia. Santiago. Chile.

³Head of Circulating Tumor Cell Unit. Faculty of Medicine University Finis Terrae. Santiago. Chile.

⁴Profesor Facultad de Medicina. Universidad Diego Portales. Santiago. Chile.

⁵Servicio de Urología. Hospital de Carabineros de Chile. Ñuñoa. Santiago. Chile.

Resumen.- OBJETIVO: la manipulación quirúrgica del cáncer tiene la potencialidad de aumentar la diseminación de células cancerosas al torrente sanguíneo y con esto el riesgo de metástasis. Presentamos el efecto de la biopsia prostática en la diseminación de estas células así como sus características fenotípicas.

MÉTODOS: Se incluyeron cincuenta hombres que fueron sometidos a una biopsia prostática trans rectal como sospecha de cáncer de próstata en nuestro estudio. Se recolectaron muestras sanguíneas inmediatamente antes

de la biopsia, una hora y 24 horas posterior a la misma, para detección de células prostáticas en sangre (CPC) así como para determinar sus características fenotípicas utilizando inmunocitoquímica estándar con anti PSA y luego caracterizarlas utilizando anti P504S y anti matriz de metaloproteinas 2 (MMP-2).

RESULTADOS: Catorce hombres (28%) tuvieron cáncer de próstata en la biopsia, 13 de estos fueron P504S + y MMP-2 + previo a la biopsia. Una hora posterior a la biopsia existió una mezcla de P504S + y P504S - así como de MMP2 + y MMP2 - en pacientes con biopsia positiva para cáncer, niveles que se igualaron a los pre biopsia luego de 24 horas. En pacientes negativos para cáncer, se detectaron células circulantes P504S - y MMP-2 -, algunas de ellas se mantuvieron por más de 24 horas.

CONCLUSIONES: La biopsia prostática puede causar diseminación de células prostáticas malignas y benignas a la circulación y la mayoría son eliminadas dentro de las primeras 24 horas. No existió conversión de pacientes con cáncer de CPCs negativos a positivos lo que sugiere que la capacidad inherente de las células prostáticas de diseminarse es más importante que el efecto de la biopsia prostática

CORRESPONDENCIA



Nigel P Murray
Head of Circulating Tumor Cell Unit
Faculty of Medicine University Finis Terrae
Avenida Pedro de Valdivia
Providencia, 7501015 Santiago (Chile)

nigelpetermurray@gmail.com

Aceptado para publicar:

Palabras clave: Biopsia prostática. Cáncer de próstata. Diseminación de células tumorales. Células prostáticas circulantes.

Summary.- OBJECTIVES: *Surgical manipulation of cancer has been shown to increase blood borne cancer cell dissemination and increase the risk of metastasis, we present the effect of prostate biopsy on prostate cell dissemination and the phenotypic characteristics of these cells.*

METHODS: *50 men undergoing initial prostate biopsy for suspicion of prostate cancer were studied. Blood samples were taken immediately before and 1 and 24 hours after biopsy for circulating prostate cell (CPC) determination and phenotypic characterization. CPCs were detected and enumerated using standard immunocytochemistry using anti-PSA and then characterized using anti-P504S and anti-matrix metalloproteinase-2 (MMP-2).*

RESULTS: *14 (28%) men had cancer detected on biopsy, 13/14 had P504S (+) and MMP-2 (+) cells detected prior to biopsy, after one hour there were a mixture of P504S (+) and P504S (-) cells detected, as well as MMP-2 (+) and MMP-2 (-) cells detected, after 24 hours the same 13/14 men remained positive, although the number of CPCs increased 1 hour after biopsy the numbers decreased to pre-biopsy levels after 24 hours. In cancer negative men, P504S (-) and MMP-2 (-) cells were detected, some of these cells persisted 24 hours after biopsy.*

CONCLUSIONS: *Prostate biopsy causes dissemination of prostate cells, malignant and benign into the circulation, the majority are cleared within 24 hours. There was no conversion of a negative to a positive result in men with cancer, this suggests that the inherent capacity of malignant CPCs to disseminate is more important than the effect of dissemination caused by prostate biopsy.*

Keywords: *Prostate biopsy. Prostate cancer. Tumor cell dissemination. Circulating prostate cells.*

INTRODUCCIÓN

La biopsia prostática es el estándar de oro para el diagnóstico definitivo de cáncer de próstata en pacientes con un PSA anormal o un tacto rectal alterado. Sin embargo, la potencial significancia clínica de la introducción iatrogénica de células prostáticas dentro del torrente sanguíneo como resultado del procedimiento es desconocida. Si bien el aumento del PSA posterior al procedimiento se encuentra documentado, el paso de células prostáticas al torrente sanguíneo no se encuentra bien definido. El PSA puede aumentar en hasta 50 veces posterior a la biopsia prostática y su disminución no sigue su vida media de

2 a 3 días (1). La detección citológica de las células prostáticas posterior a un masaje prostático vigoroso o una resección trans uretral de próstata (RTU-P) ha sido reportada utilizando reacción de polimerasa en cadena reversa (RT-PCR) (2, 3).

Estas células podrían tener el poder potencial de causar futuras metástasis, sin embargo el proceso de metástasis es bastante ineficiente. Experimentos en tumores sólidos en animales sugieren que sólo el 0,01% de las células tumorales circulantes eventualmente pueden crear una metástasis (4, 5). Sólo una pequeña porción de estas células pueden tener la capacidad de sobrevivir en la circulación y eventualmente adherirse al endotelio de la médula ósea, el principal sitio de metástasis del cáncer de próstata.

El objetivo de este estudio es determinar utilizando inmunocitoquímica estándar la potencialidad la biopsia trans-rectal de próstata de diseminar células prostáticas a la sangre y determinar sus características fenotípicas utilizando dos biomarcadores. Primero el P504S que si bien no es próstata específico (6), ha facilitado la diferenciación entre tejido normal, displásico y maligno en tejido prostático. Las células normales o benignas no expresan P504S al contrario de las células con algún tipo de displasia o cancerosas (7). Aunque aún no se encuentra científicamente probado, se podría asumir que las células con PIN no tienen la capacidad de migrar al torrente sanguíneo, lo que implicaría que células prostáticas circulantes que expresen P504S son malignas. Por lo anterior deberíamos ser capaces por este medio de determinar si las células diseminadas por una biopsia prostática al torrente sanguíneo son malignas o no.

Como segundo marcador utilizamos la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP-2), una endopeptidasa capaz de degradar la matriz extracelular. Se postula que tiene un importante rol en el desarrollo de metástasis y la liberación de factores de crecimiento (8, 9). La MMP-2 es una gelatinasa y su expresión aumenta en el cáncer de próstata (10-12). Existe una asociación entre la expresión de MMP-2 en el tumor primario y el puntaje de Gleason pudiendo actuar como un factor pronóstico por sí solo (12, 13). Se ha demostrado que las MMP-2 tienen un rol en la liberación de factores de crecimiento que aumentan el crecimiento tumoral y su agresividad (14-16). Las células prostáticas circulantes expresan MMP-2, sin embargo, al detectar células prostáticas circulantes posteriores a una biopsia prostática podríamos detectar células MMP-2 negativas que bajo condiciones normales no podríamos detectar, lo que sugiere que las células que no tienen MMP-2 no tendrían las enzimas necesarias para pasar a través del endotelio capilar hacia la circulación.

PACIENTES Y MÉTODO

El estudio fue realizado entre octubre del 2011 y junio del 2012 en el Hospital de Carabineros de Chile (HOSCAR) y el Hospital de la Dirección de Previsión de Carabineros de Chile (DIPRECA). La inmunocitoquímica fue realizada en el instituto de Bio-Oncología, Santiago, Chile. El protocolo de estudio así como el consentimiento informado fueron aprobados por el comité de ética de los tres centros.

Cincuenta pacientes consecutivos de edades entre 45 y 80 años sin historia previa de cáncer de próstata o biopsia prostática (BP) que cumplían con los criterios para la realización de una biopsia prostática trans rectal eco guiada de 12 muestras fueron invitados a participar en el estudio. Los criterios de la biopsia fueron un PSA ≥ 4.0 ng/ml, aumento de PSA anual $\geq 0,75$ ng/ml y/o un tacto rectal alterado sospechoso de cáncer de próstata, definido como la presencia de nódulos, induraciones o asimetría en el tamaño de los lóbulos prostáticos (17). Se realizó una BP guiada por ultrasonido de 12 muestras de acuerdo a las recomendaciones estándar (18).

Inmediatamente antes de la BP se tomó una muestra de 8ml de sangre venosa en un tubo que contiene EDTA como anticoagulante (Beckinson-Vacutainer), dos muestras más fueron tomadas una hora posterior y 24 horas posterior al procedimiento. Las muestras fueron mantenidas a 4°C y procesadas dentro de 48 horas. La biopsia prostática y la detección de las CPCs fueron analizadas de manera independiente, siendo los evaluadores ciegos al resultado del otro test.

Detección de CPCs

Se obtuvieron células mono-nucleares mediante centrifugación diferencial utilizando Histopaque

1,077 (Sigma Aldrich), lavadas y re-suspendidas en 100ul de plasma autólogo. Alicuotas de 25ul fueron utilizadas para realizar los preparados (sialinizados DAKO; USA), secados en aire por 24 horas y fijados en una solución de 70% de etanol, 5% formaldehído y 25% de fosfato en buffer salino pH 7,4.

Las CPCs fueron detectadas utilizando anticuerpos monoclonales anti PSA, clon 28^a4 (Novocastro Laboratory, UK) e identificadas utilizando la reacción basada en fosfatasa anti alcalina (LSAB2, DAKO, USA) con nueva fucsina como cromogen. Las muestras positivas fueron sometidas a un segundo proceso con anti-P504S clon 13H4 (DAKO, USA) e identificadas con un sistema basado en peroxidasa (LSAB2, DAKO, USA) con DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorido) como cromogen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego con anti MMP-2 1B4 (Novocastro, UK) e identificadas utilizando el sistema anti-peroxidasa descrito previamente.

Se definió una CPC de acuerdo a los criterios de ISHAGE (International Society of Hematology And Genetic Engineering) (19) y la expresión de P504S de acuerdo al consenso de la Asociación Americana de Patólogos (20). Una CPC maligna se definió como aquella que expresaba PSA y P504S, una célula benigna puede expresar PSA pero no P504S y un leucocito puede expresar P504S pero no PSA (Figura 1 A-C). Los pacientes fueron agrupados como 0%, 10-50%, 51-99% y 100% de co-expresión de P504S. El criterio para definir una célula que expresa MMP-2 fue el de Trudel et al (13) con un porcentaje de positividad para la co-expresión de PSA y MMP-2 agrupados de 0%, 1-9%, 10-50%, 51-99%, 100% (Figuras 1 D-E).

Un test fue considerado positivo cuando al menos una célula teñida por PSA era detectada en la muestra.



Figura 1A. CPC PSA (+) (rojo) P504S (+) Distribución circunferencial (café).



Figura 1B. CPC PSA (+) (Rojo) P504S (+) Distribución apical (café).

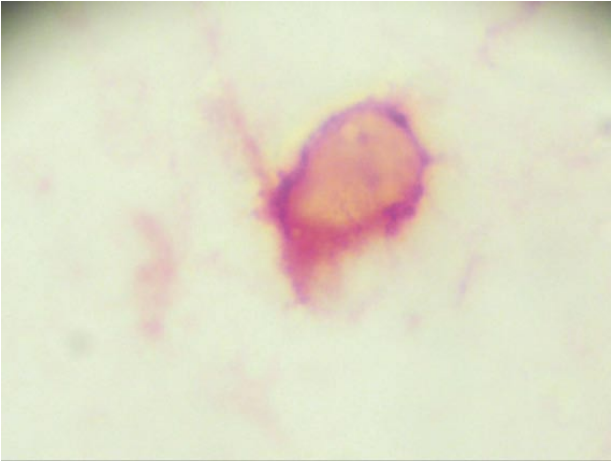


Figura 1C. CPC PSA (+) (rojo) P504S (-).

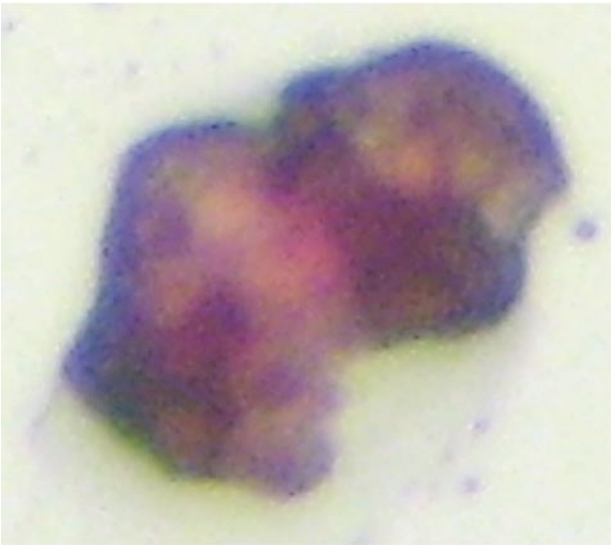


Figura 1D. CPC PSA (+) (rojo) MMP-2 (+) (cafe).

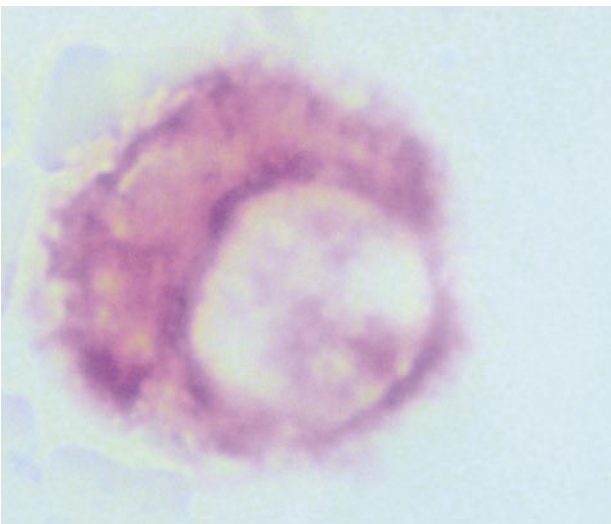


Figura 1E. CPC PSA (+) (rojo) MMP-2 (-).

Los resultados fueron analizados en base al resultado de la biopsia prostática dividiendo a los pacientes en aquellos con y aquellos sin cáncer de próstata.

Consideraciones Éticas

El estudio fue realizado en completo acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki y aprobados por los comité de ética locales.

RESULTADOS

Cincuenta hombres participaron en el estudio, con un promedio de edad de $65 \pm 8,9$ años, una media de PSA en suero de $5,17 \text{ ng/ml}$ (IQR $4,31-7,36 \text{ ng/ml}$). Catorce hombres (28%) tuvieron una biopsia prostática positiva.

a) Hombres con una biopsia positiva para cáncer

La Tabla I muestra el resultado de la determinación de CPCs en hombres con cáncer de próstata y sus características fenotípicas. 13/14 tuvieron CPC primarias detectadas inmediatamente antes de la realización de la biopsia. El único paciente negativo tuvo un puntaje de Gleason 4 que comprometía menos del 5% de una de las 12 muestras. Todas las CPCs detectadas expresaban P504S y MMP-2. Una hora posterior a la biopsia, existió una mezcla de CPCs, algunas expresaban P504S y otras no, lo mismo ocurrió con la expresión de MMP-2. Veinticuatro horas posterior a la biopsia, el paciente con cáncer de próstata Gleason 4 fue negativo para CPCs, sin embargo existió un paciente que tuvo células P504S negativas persistentes y dos MMP-2 negativas persistentes.

b) Hombres con una biopsia negativa para cáncer

La Tabla II muestra los resultados de la determinación de CPCs en hombres sin cáncer de próstata y sus características fenotípicas.

Dos hombres tuvieron CPCs detectadas previo a la realización de la biopsia, estos fueron P504S negativos y con baja expresión de MMP-2. Una hora post biopsia, 3 hombres se convirtieron de negativos a positivos para CPCs pero todos fueron P504S negativos y MMP-2 expresada de forma baja. A las 24 horas posteriores a la biopsia, el número de hombres CPCs positivos disminuyó, y todos fueron P504S negativos y baja expresión de MMP-2.

La Tabla III muestra el número de CPCs detectadas por cada 8 ml de sangre en pacientes positivos

Tabla 1. Expresión de P504S y MMP-2 en CPC en hombres con cancer de próstata.

N=14	Pre-biopsia	1 hora post biopsia	24 horas post biopsia
% CPC (+)	13/14	14/14	13/14
% P504S (+)			
100%	13	0	12
51-99%	0	14	1
10-50%	0	0	0
1-9%	0	0	0
0%	0	0	0
% MMP-2 (+)			
100%	13	1	11
51-99%	0	13	2
10-50%	0	0	0
1-9%	0	0	0
0%	0	0	0

para CPCs. Una hora posterior a la biopsia, existió un aumento significativo en el número de CPCs en pacientes con cáncer. 24 horas posterior a la biopsia, este número tuvo una disminución significativa hasta llegar a los niveles pre biopsia. No existieron suficientes CPC positivos sin biopsia positiva para cáncer de próstata para sacar conclusiones, pero comparando solo la cantidad de CPCs detectadas una hora posterior a la biopsia, los hombres con cáncer tuvieron significativamente mayor número de CPCs detectadas que aquellos sin cáncer.

DISCUSIÓN

Moreno et al. publicaron en 1992 que en hombres con cáncer de próstata existía una diseminación temprana de las células prostáticas cancerígenas primero a las bandeletas neuro-vasculares y luego al torrente sanguíneo, y que estas células podían ser detectadas utilizando RT-PCR (21). Este mismo grupo publicó en 1997 que una hora posterior a la biopsia prostática células positivas para PSA mRNA podían ser detectadas en pacientes con o sin cáncer de próstata hasta en un 10% de los individuos(3). Ellos concluyeron que la manipulación quirúrgica de la próstata en la biopsia prostática trans rectal puede causar liberación de células prostáticas a la circu-

lación. El uso de RT-PCR era incapaz de distinguir entre células malignas y benignas, sin embargo, el hecho de que en hombres sin evidencia de cáncer de próstata podían tener células detectadas en sangre sugiere estas células eran benignas.

En estudios similares utilizando RT-PCR, se ha reportado la presencia de células epiteliales circulantes en sangre positivas para citoqueratina en el 39% de las pacientes operadas de patología mamaria benigna tras el procedimiento (22), lo que implica que la manipulación quirúrgica causa diseminación de células a la circulación sanguínea.

Nuestros resultados sugieren que hombres con biopsia prostática con resultado negativo para cáncer también pueden tener células prostáticas circulantes antes de la manipulación quirúrgica, estas células fueron P504S negativas y por lo tanto benignas. Es aceptado que solo las células malignas tienen la habilidad de diseminar y migrar a la circulación (23), sin embargo nuestros resultados y aquellos publicados por Pantel et al. (24) sugieren que en enfermedades benignas inflamatorias, células pueden escapar a la circulación sanguínea. Estos hallazgos son consistentes con el hecho que citoquinas inflamatorias pueden estimular la migración epitelial (25).

Tabla II. Expresión de P504S y MMP-2 en CPCs de hombres sin cáncer de próstata.

N=36	Pre-biopsia	1 hora post biopsia	24 horas post biopsia
% CPC	2/36	5/36	3/36
P504S (+)			
100%	0	0	0
51-99%	0	0	0
10-50%	0	0	0
1-9%	0	1	0
0%	2	4	3
MMP-2 (+)			
100%	0	0	0
51-99%	0	0	0
10-50%	0	0	0
1-9%	2	2	2
0%	0	3	1

Una hora posterior a la biopsia, 5 de 16 (14%) de los hombres con una biopsia negativa para cáncer tenían células PSA positivas en el torrente sanguíneo detectadas por inmunocitoquímica, estas células fueron P504S negativas, por lo tanto benignas con una baja expresión de MMP-2 y a las 24 horas se habían eliminado en 2 de 5 pacientes. Esto sugiere que células prostáticas benignas pueden ser movilizadas por la manipulación quirúrgica y es consistente con otros reportes de liberación de células intra operatorias (26, 27). Estas células pueden ser encontradas en la circulación en intervalos de hasta 18 días en los pacientes operados de cáncer de mama (27).

En pacientes con una biopsia positiva para cáncer, la frecuencia de pacientes positivos para CPCs malignas (PSA + P504S+) antes de la biopsia es alta tal como ha sido reportado previamente (28). Sin embargo, como resultado de la biopsia el número de células circulantes por ml aumenta y existe una mezcla fenotípica de células, tanto P504S positivo como negativos, lo que confirma que la biopsia traslada células a la circulación, tanto benignas como malignas. Luego de 24 horas en la mayoría de los pacientes las células benignas han sido eliminadas dejando solo las malignas, acercándose a los resultados pre biopsia.

Tabla III. Numero de CPCs detectadas por ml de sangre en pacientes positivos para CPCs.

	Pre-biopsia	1 hora post biopsia	24hr post biopsy	
Benign N=	2	5	3	
Median N° cells/8ml blood (IQR)	2 (2-2)	4 (2-4) ^d	2 (1-2)	^{dd} p<0,002
Cancer N=	13	14	13	
Median N° cells/8ml blood (IQR)	4 (2-6) ^{a, b}	8 (8-16) ^{a, c, d}	6 (4-8) ^{b, c}	^{aa} p=0.035
				^{b-b} p=0.72
				^{cc} p=0.015

Las células malignas expresan MMP-2 en alta cantidad lo que les permite entrar y dejar la circulación sanguínea ya sea desde el tumor primario o desde un posible sitio de metástasis. Este es un proceso dinámico determinado por la cantidad de células que entran a la circulación y aquellas destruidas o que logran invadir sitios a distancia. En contraste con lo anterior, las CPC benignas tuvieron negativa o muy poca expresión de MMP-2, esto es consistente con el hecho que las células prostáticas benignas no tienen capacidad normal de diseminación, y solo se pueden encontrar en la circulación posterior a una manipulación quirúrgica o en caso de patologías inflamatorias estimuladas por la producción de citoquinas.

Se ha sugerido que la manipulación quirúrgica puede ser un agravante para la diseminación tumoral; en animales, células cancerosas sueltas en la circulación como resultado de una manipulación quirúrgica se asocian con metástasis hematogénicas (30). De manera similar, la diseminación intra operatoria de células cancerosas libres durante la resección de metástasis hepáticas de cáncer de colon es un factor predictivo significativo de recurrencia tumoral intra hepática o extra hepática (31). Sin embargo, en el caso de la biopsia prostática, el alto grado de detección de CPCs primarias antes de la biopsia y el hecho que ningún paciente se convirtió desde negativo a positivo 24 horas posterior a la biopsia sugiere que la capacidad inherente de las células cancerosas de diseminar es más importante que la diseminación causada por la biopsia prostática. Esto implica que el procedimiento de la biopsia no aumentaría de forma significativa el riesgo de metástasis.

Debemos recalcar que nuestro estudio tiene algunos fallos, el principal es que el número de pacientes positivos para cáncer pero negativos para CPCs fue solo de 1, esto puede ser importante para determinar si en los tumores de bajo grado y bajo volumen (los que son CPC negativos), la sola biopsia puede ser suficiente o no para seroconvertir a esto pacientes de negativos a positivos 24 o más horas posterior a la biopsia. Otros marcadores importantes tal como el HER-2 que esta asociado a resistencia al bloqueo androgénico no fueron estudiados, lo que puede resultar en diferentes subpoblaciones de células cancerosas, que normalmente no son liberadas a la circulación puedan ser encontradas posterior a la realización de la biopsia prostática y alterar el pronóstico del paciente. Por lo que sería interesante en un futuro también estudiar esta posibilidad.

CONCLUSIONES

Concluimos que la manipulación de la próstata al realizar una biopsia prostática trans rectal

puede causar liberación y diseminación de células benignas y malignas a la circulación sanguínea, lo que puede ser detectado utilizando inmunocitoquímica estándar. La mayoría de estas células son eliminadas rápidamente de la circulación durante la primera hora post procedimiento, sin embargo, algunas células benignas pueden circular por periodos más largos.

La eliminación de estas células se debería al trauma microvascular que sufren principalmente en la microvasculatura pulmonar, sin embargo, las células malignas portadoras de MMP-2 son resistentes a este trauma y por lo tanto tienen el potencial de producir micro focos de células malignas en otros tejidos del cuerpo.

En nuestra serie, ningún paciente se convirtió de positivo a negativo para CPCs posterior a la biopsia, pero si existió un paciente con un cáncer de próstata de bajo grado que se convirtió de negativo a positivo una hora post biopsia. Esta conversión post manipulación quirúrgica puede ser un punto importante a considerar en futuros estudios.

CONFLICTO DE INTERÉS

No hubo conflictos de interés.

AGRADECIMIENTOS

A Sra. Ana María Palazuelos por su ayuda en la preparación del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA y LECTURAS RECOMENDADAS (*lectura de interés y **lectura fundamental)

1. Yuan J, Coplen DE, Petros JA, Fignshau RS, Rattliff TL, Smith DS, Catalona W. Effects of rectal examination, prostate massage, ultrasonography and needle biopsy on serum PSA levels. *J Urol* 1992; 147: 810-814.
2. Jonasson O, Long L, Roberts S, McGrew E, McDonald JH. Cancer cells in the circulating blood during operative management of genitourinary tumors. *J Urol* 1961; 85: 1-12
3. Moreno JG, O'Hara M, Long JP, Veltri RW, Ning X, Alexander AA, Gomella LG. Tranrectal ultrasound guided biopsy causes hematogenous dissemination of prostate cells as determined by RT-PCR. *Urol* 1997; 49: 515-520

4. Fidler IJ, Hart IR. Biologic diversity in metastatic neoplasms—origins and implications. *Science* 1982; 217: 998–1001
5. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastasis following tumor implantation. *Cancer Res.* 1974; 34: 997–1003.
6. Zhou M, Chinnaiyan AM, Llerer CG et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a novel tumor marker over-expressed in several human cancers and their precursor lesions. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 926–31.
7. Beach R, Gown AM, Peralta-Venturina MN et al. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1588–96.
8. A. F. Chambers and L. M. Matrisian, “Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 89, no. 17, pp. 1260–1270, 1997.
9. M. Stearns and M. E. Stearns, “Immunohistochemical studies of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2a) expression in human prostate cancer,” *Oncology Research*, vol. 8, no. 2, pp. 63–67, 1996.
10. D. P. Wood and M. Banerjee, “Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease-free survival,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 15, no. 12, pp. 3451–3457, 1997.
11. H. Kuniyasu, P. Troncoso, D. Johnston et al., “Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers,” *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no. 6, pp. 2295–2308, 2000.
12. J. S. Ross, P. Kaur, C. E. Sheehan, H. A. G. Fisher, R. A. Kaufman Jr., and B. V. S. Kallakury, “Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer,” *Modern Pathology*, vol. 16, no. 3, pp. 198–205, 2003.
13. D. Trudel, Y. Fradet, F. Meyer, F. Harel, and B. Têtu, “Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study,” *Cancer Research*, vol. 63, no. 23, pp. 8511–8515, 2003.
14. A. R. Nelson, B. Fingleton, M. L. Rothenberg, and L. M. Matrisian, “Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 18, no. 5, pp. 1135–1149, 2000.
15. Y.A.DeClerck, S. Imren, A. M. P. Montgomery, B.M.Mueller, R. A. Reissfeld, and W. E. Laug, Proteases and protease inhibitors in tumor progression, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 425, pp. 89–97, 1997.
16. Noel, V. Albert, K. Bajou et al., New functions of stromal proteases and their inhibitors in tumor progression. *Surgical Oncology Clinics of North America*, vol. 10, no. 2, pp. 417–432, 2001.
17. Campbell I, Meredith F. (Meredith Fairfax). II. Wein, Alan J. III. Kavoussi, Louis R. IV. Campbell’s urology. V. Section II, chapter 3.
18. Ouzzane A, Coloby P, Mignard JP, Allegre JP, Soulie M, Rebillard X, Salomon L, Villers A; Recommendations for best practice for prostate biopsy *Prog Urol.* 2011 Jan;21(1):18–28.
19. Borgen E, Naume B, Nesland JM, Kvalheim E, Beiske K, Fodsted O et al. Standardization of the immunohistochemical detection of cancer cells in bone marrow and blood: Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *ISHAGE Cytotherapy* 1999; 5: 377–88.
20. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM. Alpha-methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002; 287: 1662–70.
21. Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mulholland SG and Gomella LG: Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 52: 6110–6112, 1992.
22. Crisan D, Ruark DS, Decker DA, Drevon AM, Dicarlo RG. Detection of circulating epithelial cells after surgery for benign breast disease. *Mol Diag.* 2000; 5: 33–38
23. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with non-malignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6897–6904
24. Pantel K, Denève E, Nocca D, Coffy A, Vandrell JP, Maudelonde T et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem* 2012; 58: 936–40
25. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860–867
26. Brown DC, Purushotham AD, Birnie GD, George WD. Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer by use of RT-PCR. *Surgery* 1995; 117: 96–101.
27. Choy A, McCulloch P. Induction of tumor cell shedding into effluent venous blood by breast cancer surgery. *Br J Cancer* 1996; 73: 79–82.
28. Murray NP, Reyes E, Tapia P, Orellana N, Dueñas R, Fuentealba C, et al. Diagnostic performance of malignant prostate cells detected in blood for early detection of prostate cancer: comparison to prostatic biopsy. *Arch Esp Urol* 2011; 64: 961–971.

29. Weiss L, Orr FW, Honn KV. Interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *FASEB J* 1988; 2: 12-21.
30. Arguello F, Baggs RB, Frantz CN. A murine model of experimental metastasis to bone marrow. *Cancer Res* 1988; 48: 6876-6881
31. Haq M, Goltzman D, Tremblay G, Brodt P. Rat prostate adenocarcinoma cells disseminate to bone and adhere preferentially to bone marrow derived endothelial cells. *Cancer Res.* 1992; 52: 4613-4619.
32. Nishizaki T, Matsumata T, Kanematsu T, Yasunaga C, Sugimachi K. Surgical manipulation of VX2 carcinoma in the rabbit liver evokes enhancement of metastasis. *J Surg Res.* 1990; 49: 92-97.
33. Koch M, Kienie P, Hinz U, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C et al. Detection of hemtaogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastasis. *Ann Surg* 2005; 241: 199-205.