

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA

**Caracterización de subpoblaciones de
micropartículas en pacientes con enfermedad
tromboembólica venosa**

VERÓNICA SÁNCHEZ LÓPEZ
SEVILLA, 2017

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA

Caracterización de subpoblaciones de micropartículas en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa

Memoria que presenta para optar al título de Doctor la licenciada en Bioquímica

Verónica Sánchez López

Directoras de tesis:



Dra. Remedios Otero Candelera



Dra. Lin Gao Chen

La presente tesis ha sido realizada fundamentalmente en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y financiada por los fondos FEDER del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica [Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (PI11/02308)], Red RIC (RD12/0042/0029), Junta de Andalucía (CVI-6654) y por la Fundación de Investigación del Hospital La Fe de Valencia.



Tabla de contenido

TABLA DE CONTENIDO	IV
RESUMEN.....	X
LISTADO DE FIGURAS	XIV
LISTADO DE TABLAS	XVII
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XIX
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedad tromboembólica venosa	2
1.1. Definición.....	2
1.2. Epidemiología.....	2
1.2.1. Incidencia	2
1.2.2. Mortalidad	3
1.3. Diagnóstico y tratamiento.....	4
1.3.1. Síntomas y signos	4
1.3.2. Diagnóstico	4
1.3.3. Tratamiento.....	6
1.4. Factores de riesgo.....	7
1.4.1. Factores de riesgo heredados	7
1.4.2. Factores de riesgo provocados.....	7
1.5. El cáncer como factor de riesgo de la ETV	8
2. Cáncer.....	10
2.1. Epidemiología	10
2.1.1. Incidencia	10
2.1.2. Mortalidad	10
2.2. Factores de riesgo de ETV en los pacientes con cáncer.....	10
2.2.1. Factores individuales o intrínsecos	11
2.2.2. Factores asociados al tipo de cáncer	11
2.2.3. Factores relacionados con el tratamiento	12

2.3.	La ETV en el cáncer	12
3.	El equilibrio hemostático: coagulación y fibrinólisis	13
3.1.	Fases de la hemostasia	14
3.1.1.	Hemostasia primaria	14
3.1.2.	Hemostasia secundaria	14
3.2.	Modelos de coagulación	15
3.2.1.	Modelo clásico de coagulación.....	15
3.2.1.1.	Vía extrínseca	15
3.2.1.2.	Vía intrínseca	16
3.2.2.	Modelo celular de la coagulación.....	16
3.2.2.1.	Fase de iniciación.....	17
3.2.2.2.	Fase de amplificación.....	17
3.2.2.3.	Fase de propagación.....	17
3.3.	Fibrinólisis	18
4.	Micropartículas	19
4.1.	Definición y significado clínico.....	19
4.2.	Otras vesículas extracelulares: exosomas y cuerpos apoptóticos.....	20
4.3.	Formación de las vesículas extracelulares.....	20
4.3.1.	Formación de los exosomas.....	20
4.3.2.	Formación de los cuerpos apoptóticos.....	21
4.3.3.	Formación de las MPs.....	22
4.4.	Modulación de los niveles de MPs	23
4.4.1.	Liberación de las MPs	23
4.4.2.	Aclaramiento de las MPs	23
4.5.	Estructura y composición de las MPs.....	26
4.6.	Funciones de las MPs	26
4.6.1.	MPs y comunicación celular.....	27

4.6.2.	MPs e inflamación.....	27
4.6.3.	MPs e inflamación.....	28
4.6.4.	MPs y apoptosis	28
4.6.5.	MPs y hemostasia.....	29
4.6.5.1.	MPs procoagulantes.....	29
4.6.5.2.	MPs anticoagulantes y fibrinolíticas	30
4.6.6.	MPs y trombosis.....	30
4.6.7.	MPs y cáncer.....	31
4.6.8.	Las MPs como biomarcadores de ETV en el cáncer y de neoplasia subyacente en la trombosis	
	32
4.7.	Métodos para el análisis de MPs	32
4.7.1.	Condiciones preanalíticas para el aislamiento de MPs.....	33
4.7.1.1.	Tipo de muestra	33
4.7.1.2.	Elección del anticoagulante para la extracción sanguínea.....	33
4.7.1.3.	Método de venopunción.....	33
4.7.1.4.	Transporte.....	34
4.7.1.5.	Retraso en el procesamiento	34
4.7.1.6.	Centrifugación	34
4.7.1.7.	Almacenamiento	35
4.7.2.	Métodos para la detección y caracterización de MPs	35
4.7.2.1.	Citometría de flujo	35
4.7.2.2.	Ensayo por inmunoadsorción asociado a enzimas	37
4.7.2.3.	Ensayos funcionales	37
4.7.2.4.	Microscopía.....	38
4.7.2.5.	Dispersión dinámica de luz	38
5.	Planteamiento del problema y justificación de nuestro estudio.....	38
II.	HIPÓTESIS	40
III.	OBJETIVOS.....	42
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	44
1.	Diseño experimental	45
1.1.	Objetivo 1: Evaluación de la influencia de las condiciones de centrifugación y conservación de las muestras sobre los niveles de MPs totales y su actividad procoagulante	

1.2. Objetivo 2: Comparación de los niveles de MPs cuantificados en dos plataformas citométricas diferentes siguiendo una nueva estrategia de calibración	45
1.3. Objetivo 3: Caracterización fenotípica diferencial de MPs en dos grupos de pacientes, diagnosticados de ETV y diagnosticados de cáncer.....	46
2. Consideraciones éticas.....	48
3. Extracción de sangre venosa	48
4. Preparación de PPP	48
5. Citometría de flujo	49
6. Actividad procoagulante mediada por MPs	52
7. Actividad procoagulante mediada por MPs	53
8. Determinación de sP-selectina	56
9. Determinación de FT antigénico	56
10. Determinación de dímero D	57
11. Análisis estadístico.....	58
V. RESULTADOS	59
1. Objetivo 1: Influencia del procesamiento de las muestras sobre las propiedades de las MPs: efecto de la congelación y de la centrifugación.....	60
1.1. Efecto de la temperatura de centrifugación	60
1.2. Efecto de la velocidad de centrifugación.....	63
1.3. Conservación del PPP	67

2. Objetivo 2: Cuantificación de MPs en dos plataformas citométricas diferentes siguiendo una nueva estrategia de calibración	68
2.1. Calibración del citómetro Navíos para la detección de MPs	68
2.2. Calibración del citómetro LSR Fortessa para la detección de MPs	71
2.3. Cuantificación de niveles de MPs totales y PMPs	72
3. Objetivo 3: Caracterización fenotípica diferencial de MPs en dos grupos de pacientes, diagnosticado de ETV y diagnosticados de cáncer.....	75
3.1. Caracterización y comparación de los niveles de MPs en pacientes con ETV y pacientes con cáncer.....	78
3.2. Caracterización y comparación de los niveles de MPs en pacientes con ETV versus pacientes con diferentes subtipos de cáncer	81
3.3. Niveles de dímero D, sP-selectina y F ₁ T antigénico en pacientes con ETV versus pacientes con cáncer.....	86
VI. DISCUSIÓN	87
VII. CONCLUSIONES.....	101
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	103
ANEXO I: CONSENTIMIENTO INFORMADO	127
ANEXO II: PUBLICACIONES	131

Resumen

La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) en su expresión trombosis venosa profunda y/o embolia pulmonar es una enfermedad multifactorial compleja de considerables dimensiones. Su relación con el cáncer está bien establecida, un porcentaje no despreciable de pacientes con ETV son posteriormente diagnosticados de cáncer y a su vez una de las complicaciones más frecuentes en los pacientes con cáncer es la enfermedad tromboembólica. En todas las neoplasias se genera un estado de hipercoagulabilidad, pero determinados tipos como el cáncer de pulmón, el de páncreas, o los cánceres gástricos tienen una mayor incidencia de ETV y se encuentran más asociados a la trombosis. La aparición de ETV en pacientes con cáncer se asocia con un peor pronóstico y un difícil manejo desde el punto de vista clínico. La comunidad científica se centra en el hallazgo de biomarcadores que permitan un diagnóstico precoz de la neoplasia subyacente en los pacientes con ETV y una mejor estratificación del riesgo de ETV en los pacientes con cáncer. En este sentido, uno de los biomarcadores estudiados más prometedores son las micropartículas (MPs). Las MPs son unas microvesículas de entre 0,1- y 1- μm de diámetro liberadas al torrente circulatorio por diferentes tipos celulares en situaciones de activación, daño celular o apoptosis. Inicialmente se consideraban polvo celular desprovisto de cualquier función biológica pero hoy en día se consideran un fiel reflejo de la activación y/o regeneración tisular *in vivo*. Sus propiedades y características dependen de la célula y el estímulo que las origina y aunque se han detectado MPs en sujetos sanos, niveles elevados se han encontrado en pacientes con diversas patologías entre las que se incluyen la ETV y el cáncer. Hasta ahora la mayoría de estudios diseñados son estudios de cohortes longitudinales centrados en las MPs como posibles biomarcadores del evento trombótico en el paciente con cáncer y aún no resultados concluyentes al respecto. La facilidad con la que los niveles y propiedades de las MPs circulantes se alteran *ex vivo* y la variabilidad de protocolos utilizados en los laboratorios porque no existe un protocolo estandarizado de aislamiento y detección de MPs podrían explicar los resultados inconsistentes entre los diferentes trabajos.

Esta tesis se centra en el estudio, caracterización y cuantificación de diferentes tipos de MPs circulantes en pacientes con ETV idiopática y pacientes con cáncer que no han desarrollado ETV. Nuestro objetivo fue identificar alguna población o poblaciones de MPs características de la ETV o del cáncer que nos permitieran discriminar entre ambas enfermedades y que pudieran servir para el diseño de futuros estudios. Debido a la necesidad de conseguir un protocolo consensuado que facilite una medición precisa, objetiva y reproducible de las MPs, como paso previo a la caracterización de MPs en los pacientes con ETV y pacientes con cáncer, se llevaron a cabo dos estudios metodológicos que también se han recogido en

esta tesis. El primero de ellos evaluaba el impacto de la centrifugación y congelación del plasma sobre los niveles de MPs y su capacidad procoagulante. Se preparó plasma de 21 sujetos sanos siguiendo 4 protocolos de centrifugación: 1500 g 30 min 4 °C; 1500 g 30 min 20 °C; 2x2500 g 10 min 4 °C y 2x2500 g 10 min 20 °C. Se determinaron los niveles de MPs totales y su actividad procoagulante mediante citometría y ensayos funcionales respectivamente. Las determinaciones se realizaron sobre el plasma fresco y sobre el plasma tras un ciclo de congelación-descongelación. En nuestros resultados observamos que el aumento de la velocidad de centrifugación disminuía significativamente los niveles y la actividad de las MPs detectados en el plasma, mientras que la temperatura de centrifugación no afectaba a ninguna de las propiedades de las MPs. La congelación-descongelación del plasma también afectaba, aumentando significativamente los niveles de MPs totales y su actividad procoagulante. Estas observaciones indicaban que la comparación de resultados entre laboratorios estaba muy limitada si la velocidad de centrifugación y condiciones de conservación de la muestra no habían sido las mismas. Sin embargo, habría puertas hacia la comparación de resultados entre muestras procesadas con protocolos idénticos de velocidad y tiempo de centrifugación pero con diferentes condiciones de temperatura.

El segundo estudio metodológico se centraba en la evaluación de una nueva estrategia de calibración de los citómetros de flujo como herramienta para la optimización en la detección de MPs y la comparación de resultados entre diferentes plataformas citométricas. La citometría de flujo, es el método más empleado para la medición de MPs, la mayoría de trabajos utilizan bolas fluorescentes de diferentes tamaños para la calibración de los citómetros pero la falta de un protocolo de calibración consensuado junto con la variabilidad que existen en los citómetros en cuanto a su capacidad de resolución se refiere hace que la comparación fiable de resultados sobre MPs entre citómetros con diferentes características técnicas esté muy limitado. Nuestro objetivo era evaluar una nueva estrategia de calibración basada en dos combinaciones diferentes de bolas fluorescentes especialmente diseñadas para establecer una región de MPs que sea comparable entre citómetros que tengan una mayor capacidad de resolución en el parámetro citométrico “ forward scattered light” (FS, da información sobre el tamaño de las MPs) y citómetros que tengan una mayor capacidad de resolución en el parámetro “side scattered light” (SS, da información sobre la complejidad de las MPs). Para llevarla a cabo se cuantificaron en muestras de plasma de 65 pacientes los niveles de MPs totales y MPs de procedencia plaquetar (PMPs) en dos tipos de citómetros, uno optimizado para el parámetro FS (citómetro Navios) y otro optimizado para SS (citómetro LSR Fortessa). En nuestros resultados observamos que los niveles tanto de MPs

totales como de PMPs detectados en el citómetro Navios se encontraban significativamente más elevados que en el citómetro LSR Fortessa. Sin embargo, se encontró una alta y significativa correlación positiva entre los resultados de ambos citómetros tanto para los niveles de MPs totales como para los niveles de PMPs. Basándonos en nuestros hallazgos podemos decir que la determinación de MPs en citómetros calibrados siguiendo esta estrategia es un método fiable. La comparación de resultados en valor absoluto entre citómetros con diferentes características técnicas para FS y SS no es posible, en su lugar debe realizarse una comparación relativa o porcentual de los resultados la cual sí es fiable y precisa.

Por último, escogiendo como protocolo preanalítico la centrifugación de 1500 g 30 min a 4 °C y como método analítico el citómetro LSR Fortessa calibrado con las Megamix-Plus, se llevó a cabo la caracterización de MPs circulantes en pacientes con ETV idiopática y pacientes con cáncer que no desarrollaron ETV. En concreto se cuantificaron niveles de MPs totales, procedencia celular de las MPs (endotelial, plaquetar o leucocitaria) y niveles de MPs que expresaran en superficie factor tisular (MPs+FT) o glicoproteína ligando 1 de la P-selectina (MPs+PSGL1), proteínas conocidas por su implicación en el proceso de formación del trombo. Para ello se utilizó plasma de 138 pacientes con ETV de naturaleza idiopática, 96 pacientes con cáncer (47 pulmón, 21 gástrico o pancreático y 28 colon) que no desarrollaron trombosis y 14 sujetos sanos utilizados a modo de referencia. De forma adicional en todos los pacientes se determinaron concentraciones plasmáticas de dímero D, P-selectina soluble y FT antigénico, marcadores también implicados en el proceso de coagulación. En nuestros resultados encontramos que además de los niveles dímero D y de sP-selectina, los niveles de MPs+FT se encontraban significativamente más elevados en los pacientes con ETV idiopática que en los pacientes con cáncer que no desarrollaron ETV. Además en los pacientes con cáncer gástrico o pancreático se detectaron niveles de MPs+PSGL1 significativamente más elevadas que en el grupo de ETV idiopática. Estos resultados ayudan a pensar que determinados tipos de MPs circulantes podrían tener capacidad discriminante entre el cáncer y la trombosis y sustentarían el diseño de futuros estudios de cohortes con pacientes con cáncer y ETV que permitieran validar nuestra hipótesis.

Listado de figuras

Figura 1. Vías de la cascada de coagulación.	16
Figura 2. Modelo celular de la coagulación.	18
Figura 3. Esquema proceso fibrinolítico por la acción del activador tisular de plasmina (tPA).	19
Figura 4. Tamaño de las vesículas extracelulares.	20
Figura 5. Formación y liberación de vesículas extracelulares.	22
Figura 6. Proceso de formación de las MPs.	25
Figura 7. Estructura y composición de las MPs.	27
Figura 8. Vías de comunicación intercelular utilizadas por las MPs.	28
Figura 9. Ensamblaje de los complejos de coagulación en la membrana lipídica.	29
Figura 10. Esquema del fundamento de la citometría de flujo.	36
Figura 11. Calibración del citómetro basándose en una combinación de bolas de calibración fluorescentes (Megamix).	50
Figura 12. Caracterización de MPs circulantes por citometría de flujo.	52
Figura 13. Medición de la actividad procoagulante dependiente de fosfolípidos asociados a las MPs.	55
Figura 14. Medición de actividad procoagulantes de fosfolípidos asociados a MPs.	56
Figura 15. Esquema del fundamento del ELISA tipo sándwich.	57
Figura 16. Efecto de la temperatura de centrifugación en los niveles de MPs circulantes y su actividad procoagulante asociada.	62
Figura 17. Influencia de la velocidad de centrifugación en los niveles de MPs circulantes y su actividad procoagulante asociada plasma fresco.	64
Figura 18. Correlaciones entre las determinaciones realizadas sobre plasma pobre en plaquetas (PPP) tras un ciclo de congelación-descongelación.	65
Figura 19. Niveles de MPs circulantes en plasma pobre en plaquetas (PPP) y plasma libre de micropartículas (PLMPs) determinados mediante citometría de flujo.	66
Figura 20. Influencia de la congelación del plasma pobre en plaquetas (PPP) sobre los niveles de MPs circulantes y su actividad procoagulante asociada.	68
Figura 21. Calibración del citómetro Navios con una nueva estrategia para la optimización en la detección de MPs.	70
Figura 22. Calibración del citómetro LSR Fortessa utilizando una nueva estrategia para optimizar la detección de MPs.	72
Figura 23. Cuantificación de las MPs de procedencia plaquetar (PMPs) en dos tipos diferentes de citómetro.	73
Figura 24. Correlación de los niveles de MPs circulantes entre ambas plataformas citométricas.	74
Figura 25. Diagrama de flujo con la inclusión de los pacientes en el estudio.	75
Figura 26. Perfil de MPs totales y su procedencia celular en los diferentes grupos de estudio.	79
Figura 27. Perfil de MPs con factor tisular (MPs+FT) en el grupo de ETV versus el grupo de cáncer.	80
Figura 28. Perfil de MPs totales y su procedencia celular en los subgrupos de cáncer y en el grupo de ETV.	82

Figura 29. Perfil de las MPs plaquetares con factor tisular (PMPs+FT) en los subgrupos de cáncer y en la ETV.83

Figura 30. Perfil de MPs circulantes con glicoproteína ligando 1 de la P-selectina (MPs+PSGL1) en los subtipos de cáncer y en la ETV.....84

Figura 31. Comparación de los niveles de dímer D (A) y P-selectina soluble (B) entre pacientes con cáncer y pacientes con ETV.....86

Listado de tablas

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de vesículas extracelulares.....	21
Tabla 2. Principales estímulos para la liberación de MPs en función del tipo celular	24
Tabla 3. Criterios utilizados para la identificación de MPs mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos.....	53
Tabla 4. Efecto de la centrifugación y conservación de la muestra sobre el número absoluto de MPs circulantes y su actividad procoagulante asociada	61
Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los tres grupos de estudio.	76
Tabla 6. MPs con factor tisular (MPs+FT) y su procedencia celular.....	80
Tabla 7. Perfil de MPs con glicoproteína ligando 1 de P-selectina (MPs+PSGL1) y su procedencia celular	81
Tabla 8. Perfil de MPs circulantes con factor tisular (MPs+FT) y su procedencia celular en los subtipos de cáncer y en la ETV	85

Abreviaturas y acrónimos

ADP: adenosín difosfato
 Angio TC: angiografía por tomografía computerizada helicoidal
 AnV: anexina V
 ARN: ácido ribonucleico
 ATP: adenosín trifosfato
 AVC: accidente vasculocerebral
 BD: Becton Dickinson Biosciences
 CAT: trombograma automatizado calibrado
 CATS: “cáncer and thrombosis study”
 CI: consentimiento informado
 ELISA: ensayo por inmunoadsorción asociado a enzimas
 EMPs: micropartículas de procedencia endotelial
 EMPs+FT: micropartículas de procedencia endotelial con factor tisular en la superficie celular
 EP: embolismo pulmonar
 EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
 Eq PS: equivalente de fosfatidilserina
 ER: retículo endoplásmico
 ETV: enfermedad tromboembólica venosa
 FDPs: producto de degradación de la fibrina
 FI/FIa: factor I/factor I activado
 FII/FIIa: factor II/factor II activado
 FITC: isotiocianato de fluoresceína
 FIX/FIXa: factor IX/factor IX activado
 FL1: canal de fluorescencia
 FS/FSC: “forward scattered light”/canal de “forward scattered light”
 FT: factor tisular
 FV/FVa: factor V/factor V activado
 FVII/FVIIa: factor VII/factor VII activado
 FVIII/FVIII: factor VIII/factor VIII activado
 FX/FXa: factor X/factor X activado
 FX/FXa: factor X/factor X activado
 FXI/FXIa: factor XI/factor XI activado
 FXII/FXIIa: factor XII/factor XII activado
 GPI: fosfatidilinositol
 H₂O₂: agua oxigenada

HBPM: heparina de bajo peso molecular
 IC: intervalo de confianza
 IL-1 α : interleuquina 1 alfa
 IMC: índice de masa corporal
 LMPs: micropartículas de procedencia leucocitaria
 LMPs+PSGL1: micropartículas de procedencia leucocitaria con glicoproteína ligando 1 de la P-selectina en la superficie celular
 LPS: lipopolisacárido
 MBV: cuerpos multivesiculares maduros
 MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
 MPs: micropartículas
 MPs+FT: micropartículas con factor tisular en la superficie de la membrana celular
 MPs+PSGL1: micropartículas con glicoproteína ligando 1 de la P-selectina en la superficie de la membrana celular
 NC: núcleo celular
 PAI-I: inhibidor de los activadores del plasminógeno
 PAR: receptor de proteasa
 PCR: proteína C reactiva
 PE: ficoeritrina
 PECy7: ficoeritrina cianina 7
 PLMPs: plasma libre de micropartículas
 PMPs: micropartículas de procedencia plaquetar
 PMPs+FT: micropartículas de procedencia plaquetar con factor tisular en la membrana celular
 PPL: fosfolípidos
 PPL-P: procoagulantes
 PPP: plasma pobre en plaquetas
 Procoag-PPL: fosfolípidos procoagulantes
 PS: fosfatidilserina
 PSGL1: glicoproteína ligando 1 de la P-selectina
 PT: protrombina
 PTP: escalas de probabilidad clínica
 PTP: pretest de probabilidad clínica
 RI: rango intercuartílico
 RIETE: registro informatizado de la enfermedad tromboembólica venosa
 ROS: especies reactivas de oxígeno

SAOS: síndrome de apnea obstructiva del sueño
SERPIN: inhibidores serin proteasas
sP-selectina: P-selectina soluble
SS/SSC: “side scattered light”/canal de “side scattered light”
TAFI: inhibidor fibrinolítico activado por trombina
TC: tomografía computerizada
TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular
TNF- α : factor de necrosis tumoral tipo alfa
t-PA: activador del plasminógeno tisular
TVP: trombosis venosa profunda
u-PA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa
Gast-panc: cáncer gástrico o pancreático

I. Introducción

1. Enfermedad tromboembólica venosa

1.1. Definición

La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) es una entidad clínica que comprende la trombosis venosa profunda (TVP) de miembros inferiores o superiores y su complicación más temida, el embolismo pulmonar (EP). La ETV es ocasionada por la obstrucción total o parcial del flujo sanguíneo provocada por la formación de una trombosis en el sistema venoso profundo, generalmente de las extremidades inferiores, aunque también en menor frecuencia pueden afectarse las extremidades superiores. El trombo en un proceso que forma parte de su evolución natural, puede desprenderse de la pared vascular y sus fragmentos migrar a través del sistema circulatorio impactando en las arterias pulmonares, dando lugar a la embolia o EP. Hay una estrecha relación entre la aparición de TVP y EP, en el 85 - 90 % de los casos de EP sintomáticos hay una TVP asociada [1] y en el 50 % de los pacientes con TVP sintomática existe una EP, en su mayoría silente [2]. Las causas de la ETV son multifactoriales en ellas intervienen antecedentes del paciente, factores clínicos e interacciones genético-ambientales [3-7].

1.2. Epidemiología

1.2.1. Incidencia

Aunque es difícil calcular la incidencia real de esta enfermedad, de forma global el trabajo de White de 2016 [8] estima una tasa en Europa entre 104 y 183 casos por cada 100000 personas-año [9-18]. Esta cifra va aumentando de forma progresiva con la edad para las TVP y EP tanto en hombres como en mujeres[11, 17, 18], llegando hasta una tasa de incidencia de 1 caso por cada 100 personas-año a la edad de 85 años [19]. Rara es su aparición durante o antes de la adolescencia [9, 11-14, 17, 18] a no ser que el paciente presente algún factor de riesgo ya sea congénito como ciertas mutaciones específicas o adquirido como infección, cáncer o presencia de un catéter venoso central [20, 21]. Ajustada por edad la incidencia es ligeramente mayor en hombres, 130 casos por cada 100000 personas-año, que en mujeres, 110 casos por cada 100000 personas-año mostrando una relación hombre:mujer de 1,2:1 [11, 13, 18]. Sin embargo es algo más alta en mujeres durante la edad fértil mientras que a partir de los 45 años es mayor en hombres [13]. En cuanto a la etnia, la incidencia de ETV parece ser superior entre afroamericanos e inferior entre los asiáticos y los americanos nativos [22-25]. El diagnóstico de la ETV ha permanecido relativamente constante durante el periodo

comprendido entre 1981-2000, pero sufrió un aumento entre los años 2001-2009 [8, 11, 16, 17, 26]. Este aumento de la incidencia pudiera haber sido debido a un mejor diagnóstico por el uso más extendido de equipos con mayor resolución de tomografía axial computerizada (TC) [16].

Según los datos del Ministerio de Salud y Consumo, en España desde 1999 hasta 2002, ha habido un aumento paulatino y constante del número de casos diagnosticados de ETV [27] y un incremento de la incidencia de EP entre los pacientes hospitalizados desde 20,44 por 100000 habitantes en el 2002 a 32,69 en el 2011 ($p < 0,05$) [28]. Según el grupo RIETE (registro informatizado de pacientes con enfermedad tromboembólica), la tasa de incidencia de ETV en nuestro país durante el año 2003 giraba en torno a 116 casos por cada 100000 habitantes, estimándose que durante ese año el 1% del total de ingresos hospitalarios fueron por episodios de ETV [29]. Se estima que en 2002 el coste anual en España por ingresos hospitalarios relacionados con esta enfermedad fue de 50484193 euros [27, 30].

1.2.2. Mortalidad

Los trabajos que analizan la mortalidad y la supervivencia varían ampliamente en sus diseños (retrospectivo o prospectivo), en los criterios de inclusión o en el seguimiento de los pacientes. Existe cierta controversia sobre si la mortalidad por ETV se está estabilizando [31-33] o está descendiendo [34-37]. Durante el primer mes se estima que la tasa de mortalidad oscila entre el 3 % y el 5 % para la TVP [18, 38] y el 10 % - 31 % para EP [18, 38]. Dentro de la EP el 37 % de las muertes tienen lugar justo después de la aparición del evento [39] y el 40% tras los 7 días [39]. El número de estudios de supervivencia a largo plazo es limitado [40, 41] y la información disponible en dichos trabajos es variable [9, 42]. Algunos autores sitúan la tasa de mortalidad a largo plazo en el 14 %, otros en el 40 %. En un reciente estudio se observó que el riesgo de muerte en estos pacientes es mayor que en una población sana incluso pasados los 30 años desde la aparición del evento [38]. La tasa de supervivencia para esta patología es peor de la esperada sobre todo cuando se trata de una EP [8, 39, 43, 44]. En las últimas décadas el aumento de la profilaxis [45, 46] y la mejora en la detección y tratamiento de la enfermedad han contribuido a mejorar la supervivencia. No obstante el índice de sospecha clínica sigue siendo bajo y los síntomas son atribuidos con frecuencia a otras patologías, retrasando con ello el diagnóstico [47]. En EEUU, aproximadamente el 10 % de los pacientes con EP fallecen antes de ser diagnosticados [47] y está descrito que la muerte por esta patología podría ser prevenible hasta en el 50 % de los casos considerándose la causa de muerte más prevenible dentro de los ingresos hospitalarios [48-51]. Un estudio

realizado en Francia revela que la mayoría de los facultativos no estaban al corriente del algoritmo diagnóstico del EP y que el conocimiento sobre los factores de riesgo no eran los suficientes [52]. Durante una campaña de concienciación realizada sobre 100000 personas en Polonia, la tasa de diagnóstico de TVP aumentó, volviendo a los niveles iniciales tras la finalización de la misma [53].

En relación a otras patologías vasculares altamente prevalentes y según datos del Ministerio de Sanidad de España, los pacientes hospitalizados con EP fueron de 3 a 4 veces menos frecuentes que los que ingresan por otras enfermedades vasculares, como la cardiopatía isquémica o el accidente vasculocerebral (AVC). No obstante uno de cada 3 pacientes con EP frente a solo uno de cada 10 con cardiopatía isquémica o AVC, tuvieron un diagnóstico secundario asociado y estos pacientes fueron más complejos con mayor mortalidad [54].

1.3. Diagnóstico y tratamiento

1.3.1. Síntomas y signos

Las manifestaciones clínicas de la ETV son muy inespecíficas y variadas. Entre las más frecuentes para TVP se encuentra el dolor, edema blando con fóvea, calor, cianosis, eritema y circulación colateral. En el caso de EP, los síntomas más frecuentes son la disnea, el dolor torácico y la taquipnea las cuales aparecen entre el 70 % y el 90 % de los casos. De forma menos frecuente pueden aparecer síncope, hemoptisis, fiebre o palpitaciones [55].

1.3.2. Diagnóstico

Diagnóstico de TVP

La inespecificidad de los síntomas asociados a la TVP hace que el diagnóstico se base en la valoración clínica y en exploraciones complementarias. Actualmente la combinación de la estratificación de la sospecha clínica de TVP mediante escalas de probabilidad (PTP) [56], los niveles de dímero D y las pruebas de imagen permiten un diagnóstico en la mayoría de los casos sin necesidad de recurrir a métodos invasivos. El dímero D es el producto de degradación de la fibrina que forma el coágulo, puede encontrarse elevado en los pacientes con ETV pero también en otros contextos como en procesos inflamatorios. Debido a su escasa especificidad y a su alta sensibilidad es utilizado en los algoritmos diagnósticos de ETV por su alto valor predictivo negativo. La determinación del dímero D < 500 ng/ml junto con una sospecha clínica moderada o baja, es una buena herramienta para descartar la

TVP. Cuando se requieren pruebas complementarias no invasivas las técnicas ecográficas más empleadas para el diagnóstico de ETV son la ecografía venosa compresiva, la ecografía dúplex y la eco-Doppler color. Dentro de las pruebas invasivas la flebografía de TVP está considerada como prueba de referencia ya que permite la visualización directa del trombo. Sin embargo, su carácter invasivo, la necesidad del uso de contrastes yodados y el desarrollo de otras técnicas han provocado que su empleo haya disminuido a favor de la TC, que permite tanto la visualización del sector infrapoplíteo, como territorios más proximales, venas cavas y pélvicas. Otras pruebas de imagen como la resonancia magnética nuclear son poco frecuentes para el diagnóstico de TVP aunque potencialmente útiles [55].

Diagnóstico de EP

La variabilidad de la EP es tan inespecífica, que se requieren técnicas de valoración clínica para acercarnos al problema de la forma más objetiva posible. La estratificación de la sospecha mediante reglas de predicción vuelve a ser un aliado que facilita la interpretación de las demás pruebas diagnósticas. Las escalas de predicción de Wells y de Ginebra han sido las más utilizadas y validadas [57, 58]. Generalmente las exploraciones complementarias de fácil acceso como la gasometría arterial, el electrocardiograma y la radiología de tórax tienen un valor para establecer o descartar diagnósticos alternativos. En la gasometría arterial la existencia de hipoxemia es una alteración frecuente en la EP aunque una presión de oxígeno normal no descarta el diagnóstico. Las alteraciones en el electrocardiograma son frecuentes en los pacientes con EP y con una sospecha clínica apropiada sustentan firmemente el diagnóstico de EP. En cuanto a la radiografía de tórax, su utilidad más que en su capacidad diagnóstica, radica en la posibilidad de descartar otras enfermedades capaces de simular una EP.

Una mención especial es la determinación del dímero D cuyo papel en el diagnóstico de EP es similar al de la TVP. Un dímero D de alta sensibilidad con resultado negativo (< 500 ng/mL) excluye EP en pacientes con probabilidad clínica baja o intermedia. Sin embargo, la determinación del dímero D no es rentable en pacientes con alta probabilidad clínica, en los cuales el porcentaje de pacientes con cifras < 500 ng/mL es bastante menor que en otras categorías. Además, en el hipotético caso de un dímero D negativo en una alta sospecha clínica, no eximiría de continuar el algoritmo diagnóstico y solicitar otras pruebas. Finalmente el diagnóstico es descartado o confirmado mediante pruebas de imagen la gammagrafía pulmonar, la angiografía por tomografía computerizada helicoidal (angio TC) y

la resonancia magnética nuclear. La gammagrafía pulmonar ha sido la técnica de elección como procedimiento de cribado durante más de 20 años, tiene la ventaja de ser un método seguro y poco invasivo. Hoy en día su uso ha sido desplazado por la angio TC que desde su desarrollo en el inicio de la década de los 90 para el diagnóstico de EP se ha establecido como técnica de elección [55]. La resonancia magnética nuclear tiene un papel más teórico que real, sin embargo no ha obtenido buenos resultados en términos de sensibilidad [59].

1.3.3. Tratamiento

Los episodios de ETV requieren tratamiento con anticoagulación. En una ETV aguda la duración estándar del tratamiento debe ser 3 meses, aunque en algunos casos puede ser necesario un periodo extendido más allá de los 3 meses o incluso de forma indefinida para la prevención secundaria de futuros eventos tromboembólicos sopesando en cada paciente el riesgo de recurrencia frente al riesgo de sangrado.

Anticoagulantes parenterales

La heparina de bajo peso molecular (HBPM)/fondaparinux debe ser el tratamiento de elección en los pacientes hemodinámicamente estables. El tratamiento, sobretodo en pacientes con probabilidad clínica alta o intermedia, se debe iniciar a la espera de los resultados de las pruebas complementarias que descarten o no la enfermedad.

Antagonistas de la vitamina K

La anticoagulación oral debe iniciarse tan pronto como sea posible. Las Guías de Práctica Clínica señalan iniciarla en el mismo día que el anticoagulante parenteral. La warfarina, acenocumarol, fenprocumona, fenindiona y flunidiona son los principales anticoagulantes orales antagonistas de la vitamina K utilizados hoy día [60].

Nuevos anticoagulantes orales

El uso y la experiencia con anticoagulantes orales directos es bastante menor. Actualmente el rivaroxabán, dabigatrán y apixabán están aprobados en la Unión Europea para el tratamiento de la ETV.

1.4. Factores de riesgo

Son aquellas condiciones inherentes al paciente o aquellas situaciones clínicas que aumenten la incidencia de episodios de ETV. Pueden ser factores heredados o provocados. Con frecuencia se pueden encontrar la combinación entre dos o más factores de riesgo que aumentan de forma exponencial la probabilidad de desarrollar ETV [61].

1.4.1. Factores de riesgo heredados

Estudios familiares indican que la ETV tiene un alto componente genético y sigue un modo complejo de interacción ambiental [3, 5, 6]. Como factores de riesgo heredados se incluye: el descenso congénito de anticoagulantes naturales del plasma (antitrombina, proteína C, proteína S) [62, 63], las alteraciones en la regulación del sistema procoagulante como la resistencia a la proteína C activada o el factor V (FV) Leiden [26, 64, 65] y la elevación de la actividad de los factores procoagulantes en plasma como el fibrinógeno, la protrombina, el factor VIII (FVIII), el factor IX (FIX) o el factor XI (FXI) [66-69].

El FV Leiden (resistencia a la proteína C activada) y la mutación del gen de la protrombina se consideran las alteraciones más comunes de trombofilias. La prevalencia en la población del FV Leiden oscila entre el 4 % - 5% [61, 70] aumentando hasta el 13 % en pacientes con ETV [71]. El riesgo de ETV en estos sujetos es de 2 a 7 veces mayor en los individuos heterocigotos y hasta 40 veces en los homocigóticos [61, 72]. La mutación del gen de la protrombina (G20210A), tiene una prevalencia poblacional de entre el 2 % - 4 % [26, 73] y una frecuencia en pacientes con ETV que oscila entre el 6 % y el 17 % [73]. Otro factor a tener en cuenta en las trombofilias es el aumento de la concentración del factor FVIII presente en el 25 % de los pacientes con ETV frente al 10 % en la población sana [74]. Las trombofilias congénitas interactúan con los factores de riesgo adquiridos o provocados, potenciando aún más el riesgo de ETV. De igual forma, la combinación de varias alteraciones genéticas incrementa aún más el riesgo de ETV [75].

1.4.2. Factores de riesgo provocados

Los factores de riesgo provocados hacen referencia a aquellos que el individuo va adquiriendo a lo largo de su patobiografía o historia clínica. La edad sería el primer factor dentro de este capítulo a analizar, de hecho es uno de los factores adquiridos más importantes en la ETV. El riesgo de ETV está directamente asociado al incremento de la edad independientemente del resto de factores de puesto que con el aumento de la edad los

anticoagulantes naturales del plasma (proteína C y proteína S) disminuyen en mayor proporción que los factores procoagulantes favoreciéndose así un estado protrombótico. La inmovilización junto con la cirugía son otros factores de riesgo importantes en la ETV sobre todo la inmovilización de más de una semana y la inmovilización prolongada pre y postoperatoria [76]. La ingesta de anticonceptivos orales también se encuentra asociada con la aparición de ETV [77, 78] debido en gran medida a su alto contenido de estrógenos. Se ha observado que otros tratamientos hormonales como el tratamiento hormonal sustitutivo aumentan entre 2 y 4 veces el riesgo de trombosis [79] y aunque parecen existir evidencias de peso que avalen esta asociación [77, 80], no hay un consenso entre autores sobre la asociación entre el tratamiento hormonal sustitutivo y el riesgo de ETV. El embarazo, la obesidad, la insuficiencia cardíaca, la exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la sepsis, los accidentes cerebrovasculares agudos o el cáncer son también considerados otros factores de riesgo adquiridos de la ETV.

1.5. El cáncer como factor de riesgo de la ETV

Desde que Trousseau observó en 1865 casos de tromboflebitis migratoria en pacientes con cáncer y apuntó que en el cáncer se generaba un estado espontáneo de hipercoagulabilidad son muchos los trabajos que han estudiado la asociación entre cáncer y trombosis estando hoy en día firmemente establecida. El cáncer es el factor de riesgo adquirido de mayor relevancia tanto en episodios primarios de ETV como en recidivas. El 10 - 20 % de todos los casos de ETV se producen en pacientes con cáncer, con una presencia de hasta el 50 % en las autopsias de enfermos con neoplasias [81] y se estima que entre el 5 % y el 15 % de todas las neoplasias desarrollan eventos trombóticos [82] con una incidencia de TVP y EP en pacientes con cáncer del doble que en pacientes sin cáncer [61]. Esta incidencia está en aumento debido en gran medida al mejor diagnóstico y a la incorporación de nuevos tratamientos [81]. Esta relación entre cáncer y ETV es bidireccional, puesto que también existen casos en los que la trombosis es la primera manifestación del cáncer [83, 84]. Un estudio realizado con más de 15000 pacientes diagnosticados de TVP recoge que el 11,3 % de estos pacientes son posteriormente diagnosticados de neoplasia [85]. En 1992, Prandoni y colaboradores publicaron los resultados de un estudio de 145 pacientes con ETV idiopática los cuales fueron seguidos durante al menos un año después del diagnóstico. Once de los 145 pacientes desarrollaron cáncer en 12 meses (7,6 %) [86, 87]. Varios estudios prospectivos y retrospectivos sustentan que el riesgo para un diagnóstico de cáncer en pacientes con ETV era de 4 a 7 veces mayor que en una población sana [86].

Debido a la considerable incidencia de cáncer en pacientes con ETV, se han propuesto métodos de cribado para la detección del cáncer oculto en pacientes con una trombosis “aparentemente” idiopática, aunque no existe un consenso sobre qué tipo de pruebas diagnósticas han de ser incluidas para ello. Inicialmente se propuso el denominado cribado “limitado” el cual incluye pruebas diagnósticas básicas como examen físico, historia del paciente, analítica sanguínea básica y radiografía de tórax. Estudios retrospectivos observaron que con el cribado “limitado” podían detectar hasta el 80 - 90 % de las neoplasias ocultas [88-90] mientras que otros estudios de similares características sugerían que este tipo de cribado era insuficiente [91-93]. Algunos autores propusieron un cribado “extenso” que añadía a las anteriores, pruebas de TC, endoscopia, mamografía y marcadores tumorales. En un estudio de cohortes prospectivo con 864 pacientes diagnosticados de ETV en el que realizaron un seguimiento de un año a todos los pacientes, encontraron que la versión de cribado “extendida” identificó un 24 % más de pacientes trombóticos que posteriormente fueron diagnosticados de cáncer que el cribado “limitado” [92]. Sin embargo, recientes trabajos abogan por un cribado más limitado. Un estudio longitudinal prospectivo con 107 pacientes diagnosticados de EP detectó que con un cribado simple no invasivo que incluyera radiografía de tórax, examen físico, historia del paciente bioquímica sanguínea de rutina y marcadores tumorales se obtenía una sensibilidad aceptable (55 %) y concluyeron que el uso de cribados más extendidos e invasivos en este perfil de pacientes no tenía suficiente beneficio clínico [94]. En otro estudio prospectivo longitudinal randomizado tampoco encontraron un beneficio clínico en el cribado “extendido” que incluyera TC de pelvis y abdomen cuando se comparó con el cribado “limitado” en pacientes diagnosticados de ETV idiopática [95]. En otro estudio también prospectivo randomizado con pacientes diagnosticados de ETV a los que se les realizó un seguimiento de 2 años llegaron a la conclusión de que el cribado extendido podría identificar el cáncer de forma más precoz aunque no estaba claro que mejorara el pronóstico del paciente [96]. Como se puede observar hasta ahora no se ha encontrado un método de cribado con una sensibilidad/especificidad que permita identificar un alto porcentaje de las neoplasias subyacentes u ocultas con un valor predictivo positivo adecuado.

2. Cáncer

2.1. Epidemiología

2.1.1. Incidencia

El cáncer es un problema sanitario de considerables dimensiones. Según la Organización Mundial de la Salud, en 2012 se registraron cerca de 14 millones de nuevos casos en todo el mundo. Las estimaciones poblacionales prevén un aumento hasta los 22 millones/año en los próximos dos decenios [97]. La Sociedad Española de Oncología Médica recoge que la incidencia de cáncer en nuestro país ha ido aumentando en los últimos 20 años debido en gran medida al aumento y envejecimiento poblacional y a la mejora en cuanto a la detección de la enfermedad. En un estudio realizado por la red española de registros de cáncer se estimó que en el año 2015 fueron diagnosticados en España alrededor de 248000 nuevos casos de cáncer de los cuales 149000 eran hombres y 99000 eran mujeres. Entre los 5 tipos de cáncer más comunes encontraron el cáncer colorrectal (41441 nuevos casos), el de próstata (33370 nuevos casos), el de pulmón (28347 nuevos casos), el de mama (27747 nuevos casos) y el de vejiga (21093 nuevos casos) [98].

2.1.2. Mortalidad

El cáncer está considerado como la primera causa de muerte a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud en el año 2015 se estimó que 8,8 millones de defunciones fueron causadas por esta enfermedad y se prevé que esta cifra aumentará hasta los 13 millones en el año 2032.

En cuanto a la mortalidad en España por cáncer, el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III recoge que es la primera causa de muerte en varones y la segunda en mujeres, tras las enfermedades cardiovasculares. Se estima que en el año 2015 en nuestro país 1 de cada 3 muertes en varones y 1 de cada 5 muertes en mujeres fueron causadas por algún tipo de cáncer [98] suponiendo el 24 % de las muertes intrahospitalarias.

2.2. Factores de riesgo de ETV en los pacientes con cáncer

El riesgo de aparición de ETV no es el mismo en todos los pacientes con cáncer, varía según el tipo de cáncer o incluso en cada paciente a lo largo del tiempo. Existen diferentes factores que pueden interactuar simultáneamente y afectar al riesgo de trombosis en un paciente

oncológico. Estos factores de riesgo dependen fundamentalmente del paciente, de la enfermedad neoplásica y de los tratamientos recibidos [99, 100].

2.2.1. Factores individuales o intrínsecos

Entre los factores de riesgo dependientes del paciente se encuentra la edad y las comorbilidades como enfermedades respiratorias, cardíacas, infecciones, obesidad, la inmovilización prolongada y los antecedentes de trombosis. Se ha observado que el riesgo de desarrollar trombosis en pacientes con cáncer que ya han sufrido un episodio trombótico con anterioridad es entre 6 y 7 veces mayor que en aquellos que nunca la han desarrollado [99, 100]. Las anomalías trombofílicas hereditarias que aumentan ya de por sí el riesgo de trombosis son un factor de riesgo exponencial en los pacientes con cáncer [84, 101].

2.2.2. Factores asociados al tipo de cáncer

Aunque cualquier neoplasia genera un estado de hipercoagulabilidad, la incidencia de ETV en los pacientes con cáncer varía dependiendo del tipo de tumor y del estadio de la enfermedad [99]. Los cánceres gástrico y pancreático son uno de los más asociados a episodios de ETV [102-105]. Estudios de cohortes sitúan el cáncer pancreático como el subtipo de cáncer con mayor incidencia de ETV (40,9) frente al 17,7 del tumor cerebral. [102]. Otro tipo de tumores sólidos asociados son el cerebral, ginecológico, pulmonar y renal, [102-104, 106-108]. En un estudio con diferentes tipos de cáncer comunes se observa que la mayor incidencia de ETV ocurre durante el primer año de seguimiento en pacientes metastásicos de cáncer pancreático (20,0), estómago (10,7), vejiga (7,9) o pulmón (5,0) [103]. Entre los cánceres hematológicos asociados a trombosis destacan el mieloma, el linfoma y la leucemia aguda [81, 99].

En cuanto al grado de progresión de la enfermedad se considera que los pacientes con cáncer metastásico o localmente avanzado tienen un mayor riesgo de desarrollar ETV que aquellos con un cáncer localizado [99, 101, 103, 109, 110]. En el estudio CATS (“Cancer And Thrombosis Study”) evaluaron la asociación entre el cáncer local (N0) regional (N1-3) o distal (M1) y la aparición de eventos trombóticos en 832 pacientes oncológicos. Estos investigadores observaron que pacientes con un grado de desarrollo del cáncer distal o regional presentaban a los 6 meses mayor probabilidad acumulativa de presentar ETV (en torno al 6 %) que aquellos pacientes con cáncer local (alrededor del 2 %) [111].

En cuanto al periodo de mayor riesgo para el paciente con cáncer de sufrir una ETV, se observa una mayor incidencia en los primeros 3-6 meses desde el diagnóstico de cáncer, hecho que puede estar relacionado con una mayor agresividad biológica del tumor y con las intervenciones médicas como la realización de cirugía mayor o el inicio de la quimioterapia [101].

2.2.3. Factores relacionados con el tratamiento

La administración de agentes quimioterápicos es un importante factor asociado al desarrollo de ETV. Estudios muestran que la quimioterapia incrementa hasta 6,5 veces el riesgo de trombosis [112]. Los agentes citotóxicos pueden actuar bien alterando niveles de proteínas específicas que actúan en la coagulación o bien dañando directamente el endotelio, uno de los más asociados a la trombosis es el cisplatino [113]. También se ha observado que los tratamientos hormonales como el tratamiento con tamoxifeno aumentan la incidencia de ETV en algunos tipos de cáncer [99], probablemente este tipo de fármacos actúen reduciendo los niveles plasmáticos de anticoagulantes naturales. La cirugía y el cateterismo son ya de por sí factores de riesgo de ETV. En pacientes con cáncer, el riesgo de trombosis en esta situación se duplica [81] y puede persistir durante periodos de tiempo prolongados [114].

2.3. La ETV en el cáncer

Los episodios tromboticos son una de las complicaciones más frecuentes en los enfermos con cáncer y afecta de manera importante a su calidad de vida. Estos pacientes son a menudo de difícil manejo clínico, precisan tratamiento anticoagulante durante periodos de tiempo prolongados, y el riesgo tanto de complicaciones hemorrágicas como de recurrencias es mayor [115, 116]. Se estima que de cada 7 fallecimientos de pacientes oncológicos con ingreso hospitalario, uno muere a causa de una EP [114, 117]. De estos pacientes fallecidos por la EP, el 60 % tenían cáncer localizado o enfermedad localmente extendida y habrían vivido más tiempo en ausencia del episodio trombotico. En otro estudio holandés observaron que los pacientes con cáncer y ETV tenían un riesgo de mortalidad 2,2 veces mayor que pacientes equivalentes diagnosticados de cáncer pero sin ETV [118] y un trabajo con 4466 pacientes diagnosticados de cáncer y en tratamiento con quimioterapia ambulatoria encontró que el tromboembolismo era la segunda causa de muerte en estos pacientes sólo por debajo de la propia progresión del tumor [119]. La identificación de aquellos pacientes oncológicos con mayor riesgo de padecer episodios tromboticos podría ayudar a realizar una

estratificación del riesgo y adoptar medidas profilácticas efectivas en función de cada caso. En este sentido Khorana y colaboradores [120] publicaron una escala basada en 5 parámetros clínicos que identificaba los pacientes oncológicos con un alto riesgo de padecer una ETV. La escala de Khorana se ha validado en amplias series de pacientes, aunque con resultados dispares y poco satisfactorios siendo su poder de predicción de pacientes con alto riesgo insuficiente [121]. El grupo de Viena la modificó añadiendo dos biomarcadores, en concreto el dímero D y la P-selectina soluble (sP-selectina) [122, 123]. Con esta modificación la escala mejoró en la estimación del riesgo de ETV en los pacientes, pero sin alcanzar resultados óptimos para su generalización en la práctica clínica. Esta versión de la escala de Khorana en un modelo expandido tiene limitaciones ya que no se encuentra suficientemente validado y su utilización está limitada debido en parte al bajo número de pacientes detectados en el grupo de alto riesgo. En la última edición de la guía sobre el manejo de la ETV en pacientes con cáncer realizada por “The National Comprehensive Cancer Center Network” [124] se manifestó la necesidad de mejorar los modelos de riesgo de ETV en pacientes bajo tratamiento con quimioterapia extrahospitalaria. Existe un reciente algoritmo de predicción del riesgo de trombosis que combina factores de riesgo genéticos y clínicos y que parece mejorar significativamente la capacidad de predicción del riesgo tromboembólico en la población [125]. El algoritmo incluye causas genéticas subyacentes al riesgo trombotico tales como mutaciones que dan lugar a un fenotipo protrombotico como factor V Leiden en el gen *F5* o G20210A en el gen *F2* de la protrombina [126], variantes genéticas de baja penetrancia asociadas a la ETV [127] y variantes genéticas que actúan modificando la vía de coagulación [128, 129]. Basándose en este modelo, estudios como el “Oncothromb” [130] están intentando desarrollar un nuevo modelo de predicción del riesgo individual de ETV en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia ambulatoria en el que se incluyan datos clínicos y genéticos de cada paciente. Hasta ahora no se ha encontrado un modelo predictivo que permita estratificar con suficiente sensibilidad/especificidad el riesgo de ETV en el paciente con cáncer.

3. El equilibrio hemostático: coagulación y fibrinólisis

La hemostasia es la capacidad que tiene el organismo para preservar la integridad del sistema circulatorio. La hemostasia permite la circulación de la sangre dentro de los vasos sanguíneos en estado líquido y, tras una lesión vascular, regula la formación de un coágulo sanguíneo que detiene la hemorragia. Una vez reparado el daño, se encarga de disolver el coágulo. En una hemostasia adecuada existe un equilibrio dinámico entre reacciones procoagulantes

(favorecen la formación del coágulo), anticoagulantes (evitan la formación del coágulo) y fibrinolíticas (disuelven el coágulo) [131]. La pérdida de este equilibrio en favor de un aumento de la actividad procoagulante provoca la aparición trombos obstructivos que pueden desencadenar en trombosis venosas. La fisiopatología del cáncer también se asocia a una pérdida de este equilibrio en favor de un estado de hipercoagulabilidad.

3.1. Fases de la hemostasia

3.1.1. Hemostasia primaria

En la primera etapa tiene lugar la interacción endotelio-plaqueta y la formación del tapón plaquetario. La hemostasia primaria comienza con la contracción o espasmo vascular del vaso inmediatamente después de ser dañado, su finalidad es reducir instantáneamente el flujo de sangre en el área afectada. A continuación tiene lugar la formación del tapón plaquetario. En este proceso, las sustancias anticoagulantes (óxido nítrico, prostaciclina, ectonucleotidasa CD39) liberadas normalmente por el endotelio no dañado dejan de liberarse. La capa subendotelial, que en situación sana está protegida por la capa endotelial, entra en contacto con el torrente circulatorio. Esta capa presenta en su superficie factor tisular (FT) activado y colágeno. Las plaquetas al entrar en contacto con el colágeno se activan, adoptan formas irregulares con numerosos pseudópodos y se vuelven tan pegajosas que quedan adheridas al colágeno. Las plaquetas activadas se contraen fuertemente favoreciendo la liberación de factores activos presentes en sus gránulos como el adenosín difosfato (ADP) y el tromboxano A₂ que actúan sucesivamente sobre plaquetas cercanas para activarlas y favorecer su adhesión a la superficie dañada formando así el denominado tapón plaquetario o trombo blanco.

3.1.2. Hemostasia secundaria

En esta fase tiene lugar la activación de una serie de proteínas denominadas factores de coagulación. Los factores de coagulación son proteínas presentes en su mayoría de forma circulante por el torrente sanguíneo que participan en la formación del coágulo sanguíneo. Uno de los principales factores de coagulación es el FT que puede encontrarse no sólo de forma circulante sino también en la superficie celular de las células endoteliales activadas, plaquetas activadas y monocitos [132, 133]. Habitualmente los factores de coagulación se encuentran en forma no activa y para su activación interactúan entre sí dando lugar a un conjunto de reacciones enzimáticas en cadena denominada cascada de coagulación, cuyo

producto final es la formación de un coágulo estable de fibrina que refuerce el tapón plaquetar formado durante la hemostasia primaria. Para mantener un equilibrio y evitar una coagulación generalizada el torrente sanguíneo también presenta sustancias con acción anticoagulante cuya función es regular la activación de la cascada. Uno de los principales inhibidores fisiológicos de la coagulación es la antitrombina III que actúa sobre la trombina y el factor X (FX) [134-136]. Este anticoagulante es por sí mismo un inhibidor relativamente ineficaz, siendo la tasa de inactivación de la trombina demasiado lenta como para prevenir la coagulación. Por el contrario, la heparina es otro anticoagulante muy eficaz que actúa como puente entre la trombina y la antitrombina y acelera alrededor de 1000 veces la velocidad de reacción, sin embargo su concentración fisiológica en la sangre suele ser insuficiente para evitar el proceso de coagulación. Por ello la administración de heparina se ha convertido en uno de los tratamientos de elección en los pacientes con ETV [136].

3.2. Modelos de coagulación

3.2.1. Modelo clásico de coagulación

Según este modelo, existen dos vías que dan lugar a la formación del coágulo de fibrina, la vía intrínseca y la vía extrínseca. Aunque las dos vías son iniciadas por mecanismos diferentes ambas se relacionan entre sí y convergen en una vía común que finaliza con la formación del coágulo [137].

3.2.1.1. Vía extrínseca

Esta vía se activa cuando tiene lugar una lesión del tejido vascular. Tras producirse el daño el FT expuesto en el endotelio vascular dañado se une al factor VII (FVII) activado (FVIIa) formando el complejo FT-FVIIa el cual constituye en condiciones fisiológicas el inicio de la coagulación. Este complejo puede bien activar al factor FIX para que éste active al FX, o bien activar directamente al factor FX. El FX activado (FXa) por un lado actúa sobre el FIX y lo activa (FIXa) amplificando la señal y por otro forma un complejo con el FV activado (FVa) y la protrombina (FII) denominado complejo protrombinasa. Este complejo se ensambla en la superficie de plaquetas activadas y se encarga de transformar la protrombina, también llamada factor II (FII) en trombina o FII activado (FIIa). Esta enzima es la encargada de la conversión del fibrinógeno en fibrina. Los polímeros de fibrina formados se van uniendo para dar lugar al coágulo (Figura 1).

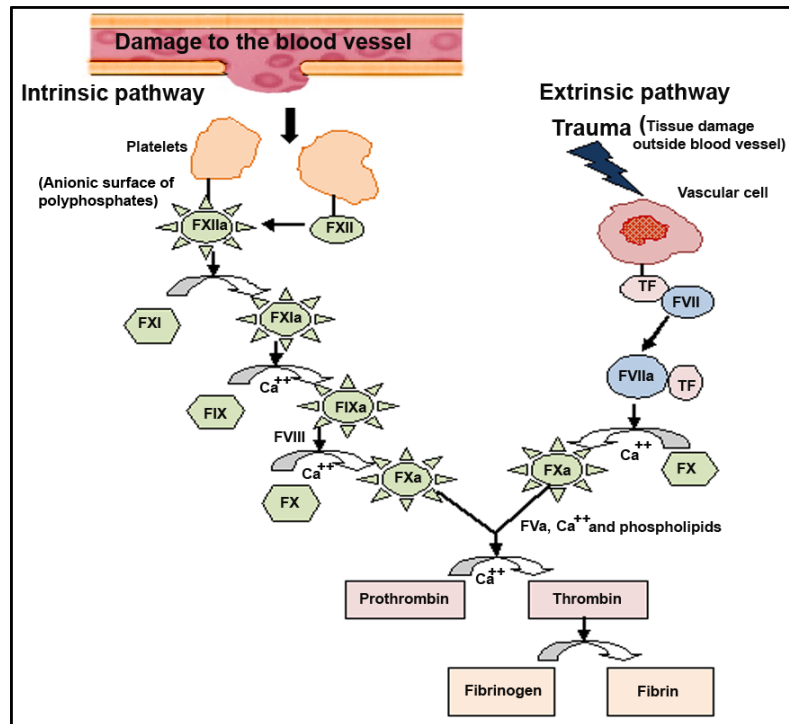


Figura 1. Vías de la cascada de coagulación.

FXII: factor XII; FXI: factor XI; FIX: factor IX; FX: factor X; FVIII: factor VIII TF: factor tisular; VII: factor VII. La letra "a" junto al número de cada factor indica su activación. Adaptación de Bhattacharjee y col. [142].

3.2.1.2. Vía intrínseca

Esta vía se activa en respuesta a una anomalía en un vaso pero en ausencia de daño tisular. Su papel bajo condiciones fisiológicas es poco significativo, actualmente se considera una vía de amplificación de la vía extrínseca (Figura 1). Comienza con la activación del factor XII (FXII) y con la liberación de fosfolípidos plaquetarios que contienen la lipoproteína plaquetaria llamada factor plaquetario-3. El FXII activado (FXIIa) actúa activando al FXI que a su vez activa al FIX. El FIXa junto con el FVIIIa, los fosfolípidos plaquetarios y el factor 3 plaquetario activan al factor X. Éste se ensambla en la superficie de la membrana plaquetaria con el FVa para formar el complejo protrombinasa. Este complejo el cual rompe la protrombina en fragmentos de trombina, la trombina a su vez fragmenta el fibrinógeno produciéndose filamentos de fibrina [138].

3.2.2. Modelo celular de la coagulación

Este modelo fue desarrollado por Maureane Hoffman en el 2003 [139] y posteriormente revisado por Furie en el 2008 [140] y es el que hasta ahora mejor explica el funcionamiento de la cascada de coagulación *in vivo*. Su principal diferencia con el anterior es que considera a

las células como elementos esenciales en la activación y regulación de la formación del coágulo. Considera que las células tienen capacidad de dirigir el proceso hemostático y no que no sólo participan como superficies de ensamblaje de los complejos de coagulación [139]. Los modelos celulares dividen la coagulación en tres fases.

3.2.2.1. Fase de iniciación

Considera el FT el principal iniciador de la coagulación. El FT presente en la superficie de plaquetas o monocitos activados o en el endotelio dañado reconoce al FVII circulante activado y se une a él. El complejo FT-FVIIa activa a los factores IX y X y al propio FVII [141]. El FXa es capaz de generar pequeñas cantidades de trombina de manera local que juegan un importante papel en la activación del FVIII y de las plaquetas en la siguiente fase (Figura 2).

3.2.2.2. Fase de amplificación

Las plaquetas se adhieren a la matriz subendotelial y se activan por la exposición de FT. Estas plaquetas activadas se contraen, vierten los factores activos contenidos en sus gránulos que favorecen la activación y adhesión de nuevas plaquetas al igual que durante el proceso de formación del tapón plaquetario. La superficie con carga negativa de las plaquetas activadas, la pequeña cantidad de trombina generada y la presencia de calcio sanguíneo, amplifican la señal procoagulante inicial y activan a los factores FV, FVIII y FXI los cuales forman complejos estables en la superficie de las plaquetas activadas (Figura 2).

3.2.2.3. Fase de propagación

La superficie plaquetar sirve de ensamblaje para la formación de los complejos denominados tenasa (FVIIIa, FIXa, calcio y fosfolípidos aniónicos) y protrombinasa (FVa, FXa, calcio y fosfolípidos aniónicos) ambos considerados complejos iniciadores de la fase de propagación. El complejo tenasa cataliza la activación del FX y el complejo protrombinasa cataliza la conversión de protrombina en trombina. El complejo protrombinasa permite la generación de grandes cantidades de trombina encargada de catalizar la reacción que convierte el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble. La trombina se encarga también de la activación del factor XIII (FXIII) encargado de estabilizar la fibrina y del inhibidor fibrinolítico (TAFI) favoreciendo así la formación de un coágulo estable y resistente a la lisis. La trombina

participa a su vez en la activación de plaquetas y de FV, FVIII, FXI y FXIII aumentando así la señal de coagulación (Figura 2).

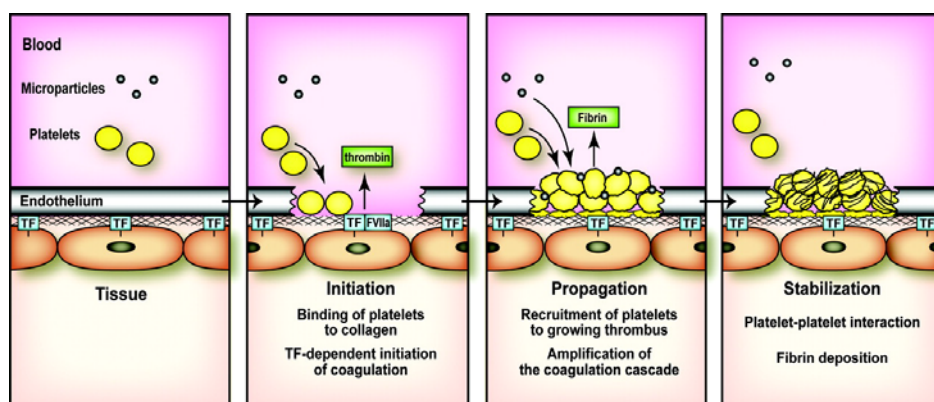


Figura 2. Modelo celular de la coagulación.

TF: factor tisular; FVIIa: factor VII activado. Mackman y col. [133].

3.3. Fibrinólisis

La formación del coágulo interrumpe la pérdida de sangre tras una lesión. Cuando la lesión se ha reparado el coágulo se elimina para restablecer el flujo sanguíneo. Al proceso de disolución del coágulo se le denomina fibrinólisis [143], en él intervienen una serie de activadores e inhibidores los cuales regulan la conversión del proenzima circulante, plasminógeno, en el enzima activo plasmina encargado de romper la fibras de fibrina [144] y de otros procoagulantes proteicos como el fibrinógeno, el FV, el FVIII, la protrombina y el FXII [145, 146].

Cuando se forma un coágulo, un gran número de moléculas de plasminógeno y de proteínas plasmáticas quedan atrapadas en él, al mismo tiempo, los tejidos lesionados y el endotelio vascular liberan muy lentamente potentes activadores del plasminógeno [144, 147] como el tipo uroquinasa (u-PA) y el tipo tisular (t-PA)(Figura 3), ambos se unen a sus respectivos receptores en la superficie celular. Del mismo modo, el plasminógeno circulante se une a sus receptores de la superficie endotelial y se activa por la acción del t-PA y u-PA que catalizan la conversión del plasminógeno a la plasmina encargada de la degradación del coágulo de fibrina. Uno de los productos de la degradación de la fibrina es el dímero D, utilizado en los algoritmos diagnósticos de la ETV. La duración y la magnitud de la fibrinólisis está regulada por el inhibidor circulante de la plasmina, el alfa-2 antiplasmina y por el inhibidor de los activadores del plasminógeno (PAI-1, Figura 3) [148, 149]. Las plaquetas también

contribuyen a mantener la integridad del tapón hemostático, liberando PAI-1 en los lugares de lesión vascular, una vez que se ha producido la agregación plaquetaria [149].

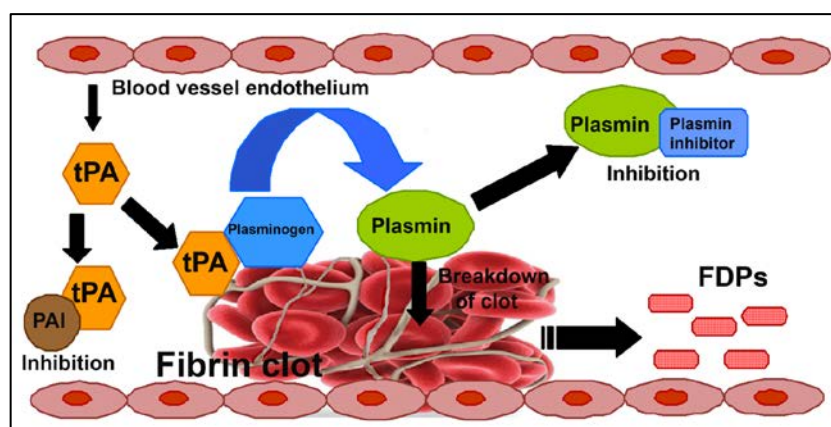


Figura 3. Esquema proceso fibrinolítico por la acción del activador tisular de plasmina (tPA).
PAI: inhibidor del activador de plasmina; FDPs: productos de degradación de fibrina. Bhattacharjee y col. [142].

4. Micropartículas

4.1. Definición y significado clínico

Las micropartículas (MPs) son microvesículas fosfolipídicas de entre 0,1 μm - 1 μm de diámetro liberadas por diferentes tipos celulares en respuesta a procesos de activación, daño o apoptosis. Sus propiedades y características van a depender de su procedencia celular [150, 151] y aunque inicialmente se trataron como polvo celular desprovisto de cualquier función biológica, hoy en día se consideran un fiel reflejo de la activación y/o degeneración tisular *in vivo* [152, 153] con una aplicación potencial como biomarcadores diagnósticos y/o pronósticos de procesos fisiopatológicos [154, 155]. Las MPs están presentes en sujetos sanos aunque niveles elevados se han detectado en pacientes con enfermedades relacionadas con el daño vascular, la inflamación, los procesos de coagulación sanguínea o la angiogénesis [154, 155]. Se encuentran en varios fluidos corporales como, líquido sinovial, semen u orina [151] aunque son las MPs circulantes por el torrente sanguíneo las más estudiadas. Poblaciones específicas de MPs se han encontrado elevadas en diferentes patologías como las MPs de procedencia endotelial (EMPs) en la cardiopatía isquémica [152], el síndrome coronario agudo [156] o la diabetes mellitus [157], MPs de procedencia plaquetar (PMPs) en la hipertensión severa o en pacientes con sepsis [158, 159], o MPs de origen leucocitario (LMPs) en la psoriasis [160]. Pacientes con cáncer y pacientes con ETV también presentan

niveles elevados de MPs circulantes [161-163] de las cuales hablaremos en próximas secciones con más detalle.

4.2. Otras vesículas extracelulares: exosomas y cuerpos apoptóticos

Las MPs, los exosomas y los cuerpos apoptóticos se engloban dentro de las denominadas vesículas extracelulares. Tienen en común que están formadas por una bicapa lipídica con proteínas de membrana y que contienen en su interior componentes citosólicos característicos de su procedencia celular. Entre sus diferencias se encuentra su tamaño y su proceso de formación [164, 165] (Figura 4, Tabla 1).

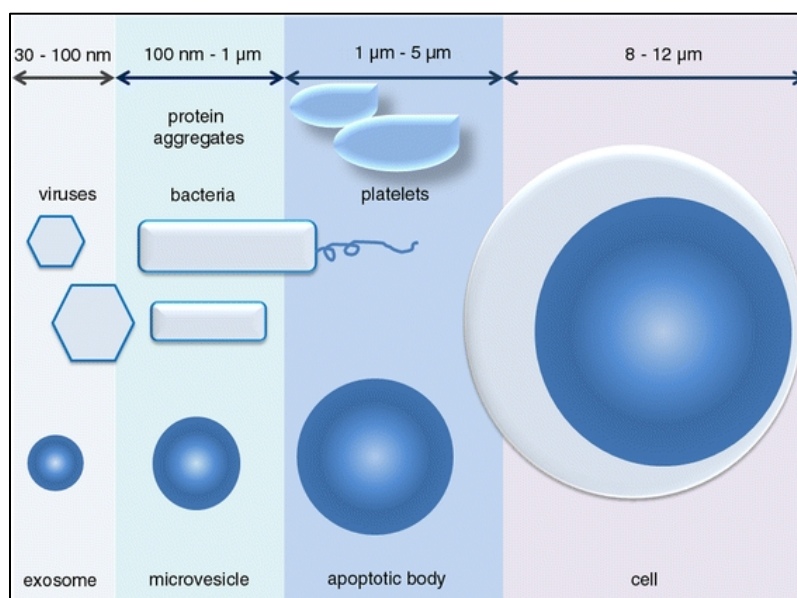


Figura 4. Tamaño de las vesículas extracelulares.

El término “microvesicle” hace referencia a las micropartículas. György y col. [166].

4.3. Formación de las vesículas extracelulares

4.3.1. Formación de los exosomas

Su formación está relacionada con el proceso de reciclaje de la membrana. Inicia con la endocitosis de la membrana plasmática formando una vesícula intracelular que se fusiona con una vesícula de mayor tamaño denominada endosoma temprano [167, 168]. El endosoma presenta en su interior vesículas internas generadas a partir de invaginaciones de su propia membrana. Mediante un proceso de maduración el endosoma temprano se transforma en una estructura más compleja denominada cuerpo multivesicular. Los cuerpos

multivesiculares pueden tener 3 destinos: i) reciclado de la membrana plasmática, ii) degradación en los lisosomas iii) secreción [167, 168]. En este último caso los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática celular liberando su contenido al exterior incluyendo a los exosomas (Figura 5).

Tabla 1. Características de los diferentes tipos de vesículas extracelulares

Característica	Exosomas	Micropartículas	Cuerpos apoptóticos
Tamaño	50 100 nm	100 -1000 nm	Hasta 4000 nm
Origen	Multivesicular Compartimentos internos	Vesiculación membrana plasmática	Fragmentos celulares
Liberación	Constitutiva y/o activación	Activación y/o inicio apoptosis	Final apoptosis
Capacidad de unión a AnV	Nula o baja	Alta	Alta
Marcadores proteicos	CD63 tetraspano	Antígenos de su célula parental	Histonas
Referencias	[167, 169]	[170, 171]	[172, 173]

AnV: anexina V. Adaptación de Mause y col. [174].

4.3.2. Formación de los cuerpos apoptóticos

Los cuerpos apoptóticos como su nombre indica se forman durante la etapa tardía del proceso de apoptosis celular. Estos cuerpos son fagocitados por los macrófagos circundantes en la fase final de la apoptosis (Figura 5).

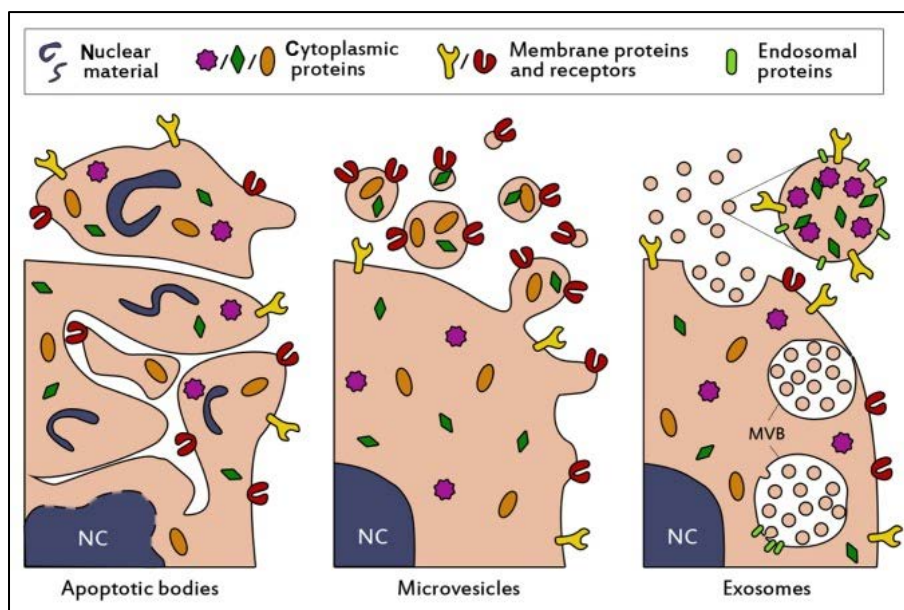


Figura 5. Formación y liberación de vesículas extracelulares.

A. Cuerpos apoptóticos. **B.** Micropartículas (“micovesículas”) **C.** Exosomas. NC: núcleo celular; MVB: cuerpos multivesiculares maduros. Adaptación de Kooijmans y col. [175].

4.3.3. Formación de las MPs

Sabemos que de manera previa a la liberación de las MPs o proceso de microvesiculación tienen lugar tres fenómenos: i) aumento de la concentración de calcio intracelular, ii) pérdida de la asimetría de la membrana lipídica con la consecuente exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana iii) reorganización del citoesqueleto. Cada una de las caras que forman la bicapa lipídica de la membrana plasmática tiene una composición lipídica específica. La cara externa está formada por los fosfolípidos fosfatidilcolina y esfingomiélin y la cara interna por los fosfolípidos fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Esta asimetría en la bicapa es mantenida gracias a la acción de un conjunto de enzimas de membrana que se encargan del movimiento de fosfolípidos entre las dos capas: la flipasa, transporta la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina de la cara externa a la interna, la flopasa transporta fosfolípidos de forma no específica desde la cara interna a la externa y la escramblasa que transporta los fosfolípidos hacia la cara interna o externa de forma aleatoria [176, 177]. Durante procesos de activación, apoptosis o situaciones de estrés celular los canales de calcio situados en la membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplásmico se abren aumentando la concentración de calcio en el citosol. El aumento de calcio intracelular inactiva a la flipasa y activa a la flopasa y a la escramblasa. Como consecuencia, los fosfolípidos fosfatidilserina, y fosfatidiletanolamina se externalizan y se pierde la asimetría de la membrana. Este proceso también implica la disrupción entre los fosfolípidos de la cara

interna y el citoesqueleto [178] (Figura 6). El citoesqueleto es un entramado de proteínas (actina, miosina, filamentos intermedios) situado bajo la cara interna de la membrana. Actúa como soporte interno para la célula confiriéndole estabilidad. El aumento de calcio intracelular activa a enzimas como la calpaína o la gelsolina encargadas de la disrupción de las proteínas ancladas al citoesqueleto [176, 177]. También activa a la rho quinasa que altera el citoesqueleto y favorece la contracción celular [179]. El citoesqueleto se desprende de la membrana plasmática, la célula pierde su estabilidad y empiezan a formarse protuberancias citoplasmáticas que se separan de la célula por fisión dando lugar a pequeñas vesículas lipídicas ricas en fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina en su superficie [180] (Figura 6).

4.4. Modulación de los niveles de MPs

4.4.1. Liberación de las MPs

Los niveles de MPs están determinados por la tasa de liberación y el aclaramiento. Otros factores como el sexo, el ritmo circadiano, la edad o el ciclo menstrual está descrito que podrían afectar a sus niveles en plasma [177, 181, 182]. Se considera que las MPs puede generarlas cualquier tipo de célula eucariota incluyendo las células vasculares. La liberación de las mismas es un proceso biológico controlado que se produce en respuesta a diferentes procesos como la activación celular [183], exposición a estrés biológico (radicales de oxígeno, ultravioleta), inflamación, isquemia, hipoxia [184], exposición a adenosín trifosfato (ATP) [185], la diferenciación celular, senescencia o transformación a célula maligna [186-188]. Asociadas a estos procesos hay muchas sustancias reconocidas como estímulos fisiológicos que se han descrito que promueven la formación de MPs. La Tabla 2 resume algunos de ellos.

4.4.2. Aclaramiento de las MPs

Se estima que las MPs tienen un corto periodo de vida en el torrente sanguíneo comparado con el de su célula progenitora. Estudios *in vivo* en modelos animales sitúan el tiempo de vida de las PMPs en aproximadamente 30 min en ratones [189] y menos de 10 minutos en conejos [177] mientras que la vida de una plaqueta puede alcanzar los 10 días. El proceso de aclaramiento no se conoce con exactitud. Como posibles mecanismos implicados en este proceso se incluye: la degradación de los fosfolípidos de membrana mediante las fosfolipasas [190], la fagocitosis directa vía interacción del fosfolípido fosfatidilserina presente en la superficie de las MPs con la lactaderina presente en la superficie de los macrófagos [191, 192]

y la fagocitosis indirecta a través de opsoninas como la anexina V o la proteína S que reconocen a la fosfatidilserina uniéndose a ella y facilitando su fagocitosis [191]. En un modelo animal experimental se ha observado una menor capacidad de aclaramiento de MPs en ratones a los que se les extirpó el bazo por lo que se le considera a este órgano el principal responsable de su aclaramiento [163].

Tabla 2. Principales estímulos para la liberación de MPs en función del tipo celular

Tipo celular	Estímulo	Referencia
Plaquetas	Proinflamatorio	LPS citoquinas [193] [194]
	Procoagulante	ADP Trombina Colágeno Agonistas PAR [195] [196] [197] [198]
	Otros	Estrés mecánico Epinefrina/noradrenalina Ionóforo de calcio Almacenamiento [199] [200] [194] [201]
Células endoteliales	Proinflamatorio	TNF- α LPS IL-1 α PCR [202] [203] [204] [205]
	Procoagulante	Trombina Proteína C activada [206] [207]
	Otros	Glucosa elevada Angiotensina II Ionóforo de calcio Estrés mecánico ROS [196] [208] [209] [210] [211]
Leucocitos	Proinflamatorio	TNF- α LPS [212] [213]
	Otros	Ligando Fas Actinomicina D Ionóforo de calcio Endotoxinas [214] [215] [216] [217]

LPS: lipopolisacárido; ADP: adenosín difosfato; PAR: receptor de proteasa activado; TNF- α : factor de necrosis tumoral; IL-1 α : interleuquina 1 alfa; ROS: especies reactivas de oxígeno.

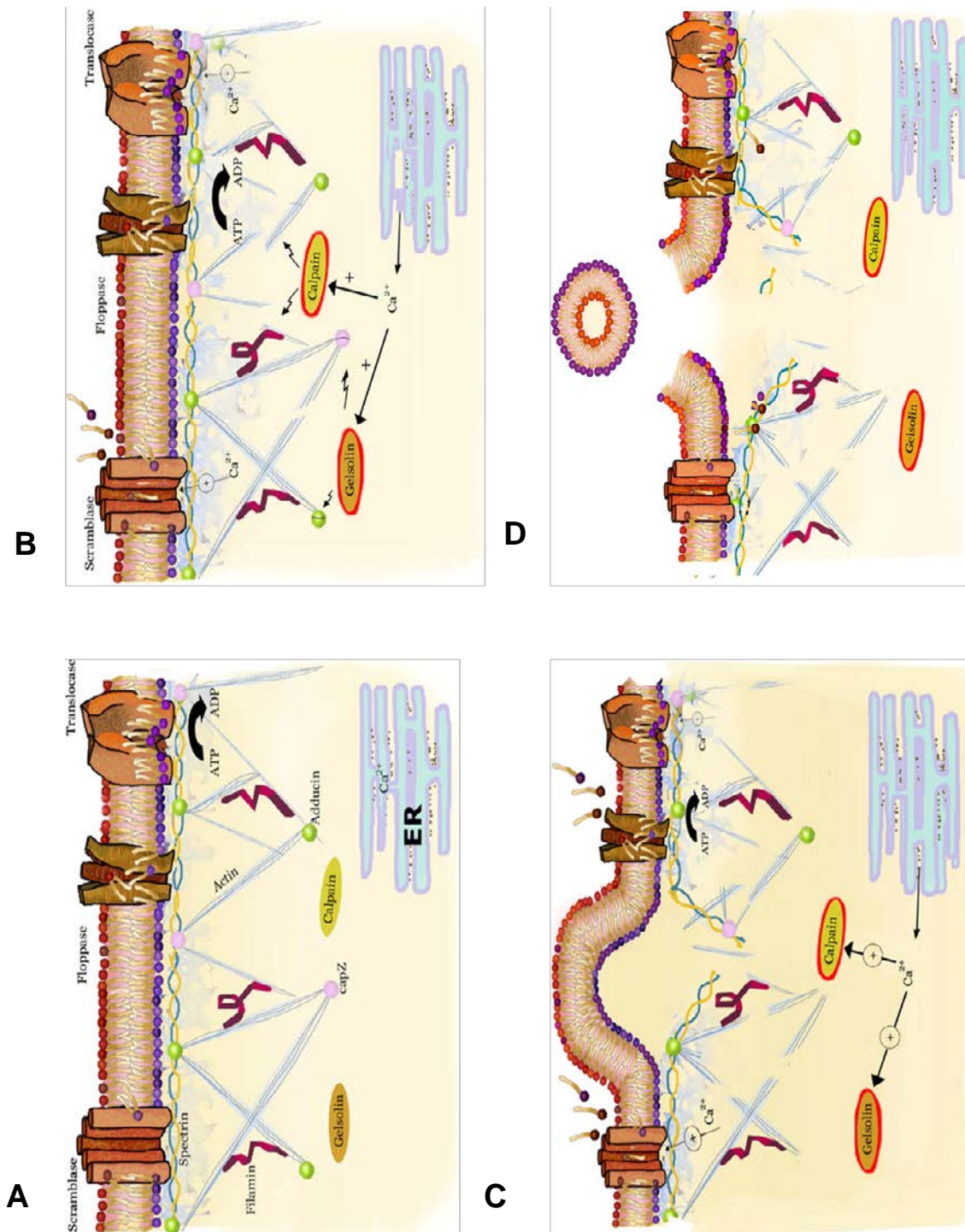


Figura 6. Proceso de formación de las MPs.

A. Célula en reposo. B. Activación celular. C. Escisión del citoesqueleto y dependimiento de la membrana plasmática. D. Emisión de la micropartícula. ER: retículo endoplásmico; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato. Piccin y col. [218].

4.5. Estructura y composición de las MPs

La composición y propiedades de las MPs vienen determinadas por su célula de origen, el microentorno en el que se encuentre esa célula y la naturaleza del estímulo que las origine. Las MPs representan más que una versión en miniatura de su célula parental ya que además de tener sus mismas propiedades, ciertos componentes en las MPs se encuentran enriquecidos si los comparamos con su célula de procedencia. Un ejemplo de ello es la considerable concentración local de fosfatidilserina que presentan las MPs en superficie [174]. A nivel de membrana las MPs están formadas por fosfolípidos, receptores transmembrana, canales, proteínas de unión a glicosilfosfatidilinositol (GPI) o proteínas de adhesión celular [174]. Si se estudian las proteínas de membrana que presentan las MPs podremos identificar su origen celular (plaquetario, endotelial, leucocitario, eritrocitario, tumoral, etc.). Por ejemplo las PMPs pueden expresar la glicoproteína IIb-IIIa (CD41), la molécula de adhesión plaqueta-endotelial (PECAM-1; CD31) y la P-selectina (CD62P). Las EMPs pueden expresar en su superficie CD31, E-selectin (CD62E), endogлина (CD105) o S-endo1 (CD146). También se puede obtener información sobre la naturaleza del estímulo que las originó. Así como MPs procedentes de plaquetas activadas por trombina expresan el complejo glicoproteico IIb-IIa en su superficie, MPs derivadas de plaquetas activadas por el complemento no lo hacen [219]. También se han encontrado diferencias en cuanto a expresión de antígenos como CD31, CD62E, CD105 entre MPs derivadas de células endoteliales activadas o apoptóticas [220, 221]. A nivel intravesicular las MPs están formadas por parte del citoplasma de la célula parental que se evaginó durante la microvesiculación. Por ello pueden contener un amplio espectro de sustancias bioactivas, citoquinas, quimioquinas, enzimas, factores de crecimiento, proteínas de señalización, o incluso ARNm y micro ARN [174] (Figura 7).

4.6. Funciones de las MPs

Dada su composición heterogénea, las MPs juegan un papel crucial en muchos procesos fisiopatológicos como la hemostasia, la trombosis, la inflamación, el sistema inmune o la angiogénesis. Debido a su pequeño tamaño las MPs circulan por todo el árbol vascular permitiéndoles participar en procesos tanto locales como remotos [222, 223].

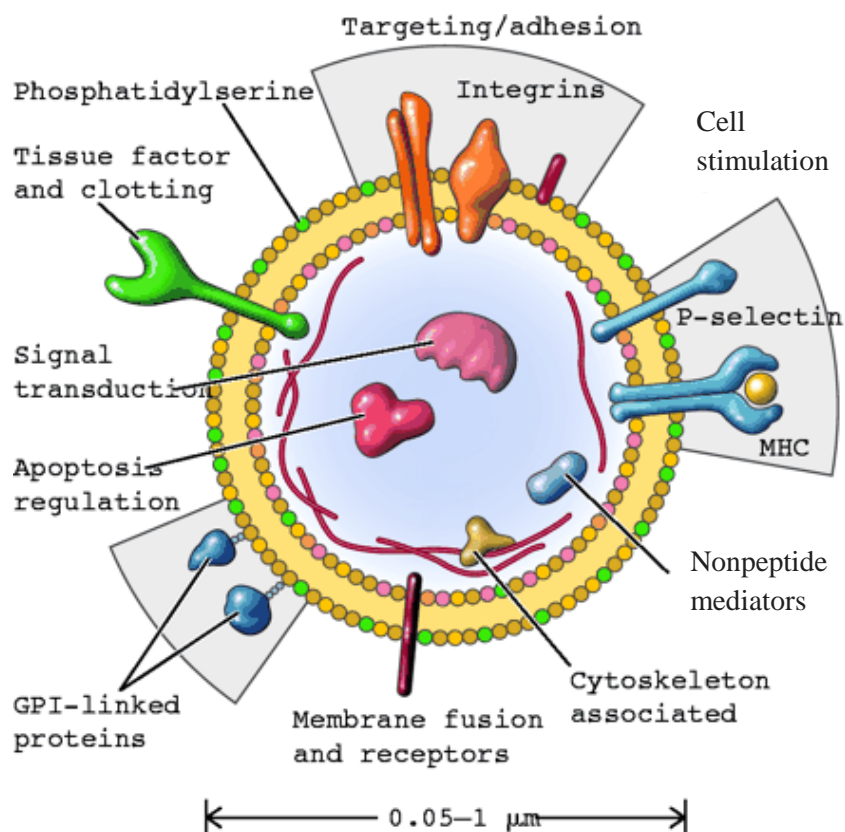


Figura 7. Estructura y composición de las MPs.

Representación esquemática del repertorio de componentes de las MPs. MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; GPI: glicosilfosfatidilinositol. Adaptación de Hugel y col. [224].

4.6.1. MPs y comunicación celular

Las MPs son consideradas auténticos mediadores y efectores de la comunicación intercelular mediante la interacción con receptores celulares, transferencia de moléculas de superficie o del contenido citoplasmático proteico o genético remotos [222, 223]. Hoy en día se conoce que las MPs juegan un papel crucial en muchos procesos fisiopatológicos como la hemostasia, la trombosis, la inflamación la regulación del tono vascular, la respuesta inmunitaria, o la angiogénesis. La figura 8 resume las posibles vías de comunicación entre célula y MPs.

4.6.2. MPs e inflamación

Las MPs podrían contribuir a las respuestas inflamatorias de diferentes formas. Las EMPs generadas durante el estrés oxidativo dan lugar a fosfolípidos oxidados biológicamente activos, que promueven la activación de neutrófilos y la adherencia de monocitos a las células endoteliales. Las EMPs podrían tener la capacidad de activar a los leucocitos [225] y mejorar la adhesión de macrófagos [208]. También se ha observado que las PMPs facilitan la

adhesión de monocitos al endotelio vascular [223] y que podrían favorecer la interacción interleucocitaria vía P-selectina [226].

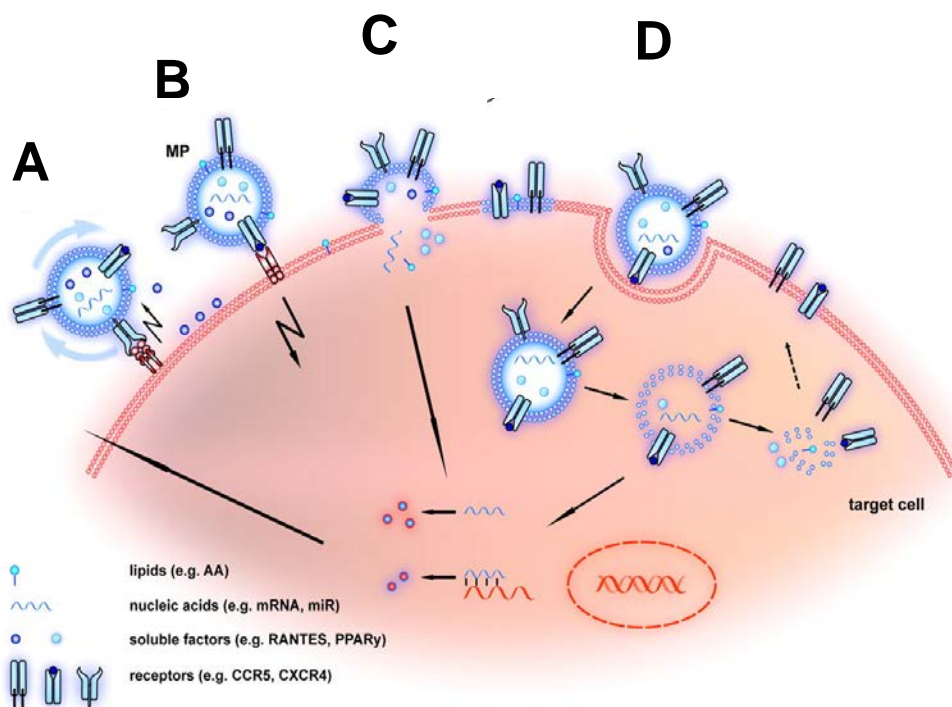


Figura 8. Vías de comunicación intercelular utilizadas por las MPs.

A. Transferencia de proteínas. **B.** Señalización. **C.** Transferencia de ARN y/o lípidos. **D.** Transferencia de receptores y/o proteínas. MP: micropartículas. Adaptación de Mause y col. [174].

4.6.3. MPs e inflamación

Las MPs podrían contribuir a las respuestas inflamatorias de diferentes formas. Las EMPs generadas durante el estrés oxidativo dan lugar a fosfolípidos oxidados biológicamente activos, que promueven la activación de neutrófilos y la adherencia de monocitos a las células endoteliales. Las EMPs podrían tener la capacidad de activar a los leucocitos [225] y mejorar la adhesión de macrófagos [208]. También se ha observado que las PMPs facilitan la adhesión de monocitos al endotelio vascular [223] y que podrían favorecer la interacción interleucocitaria vía P-selectina [226].

4.6.4. MPs y apoptosis

Se ha observado que MPs procedentes de monocitos y de linfocitos T pueden inducir apoptosis en macrófagos [227, 228]. Algunos estudios han encontrado caspasas dentro de las EMPs y PMPs [229, 230]. También se ha observado que MPs procedentes de pacientes hipertensos inducen la producción de H_2O_2 , la senescencia celular y la apoptosis [231].

4.6.5. MPs y hemostasia

4.6.5.1. MPs procoagulantes

Fosfatidilserina

La mayoría de las MPs se caracterizan por presentar en su cara externa una alta concentración de fosfatidilserina. La fosfatidilserina es un fosfolípido aniónico cuya carga negativa facilita el ensamblaje de los factores de coagulación y sus cofactores favoreciendo la formación de los complejos protrombinasa, tenasa e iniciador de la cascada de coagulación todos ellos implicados en el proceso de formación del coágulo. Se produce una interacción electrostática entre la carga positiva del ácido gamma-carboxiglutámico presente en los factores coagulación y la carga negativa de la fosfatidilserina (Figura 9). Entre las proteínas de la cascada de coagulación que contienen ácido gamma carboxiglutámico se incluyen los factores VII, IX, X, y la protrombina. Diferentes estudios sugieren que la actividad procoagulante asociada a la MPs juega un papel en la hemostasia. Utilizando un test de generación de trombina, Pereira y colaboradores encontraron que el plasma libre de plaquetas en pacientes diagnosticados de síndrome de antifosfolípidos tenían una capacidad de generación de trombina aumentada comparada con el de sujetos sanos y que esta diferencia dependía de la presencia de PMPs [232].

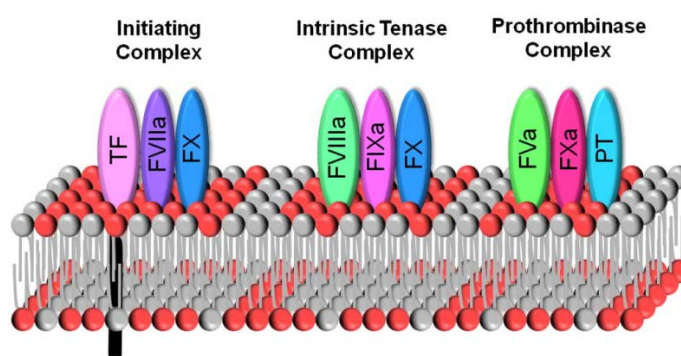


Figura 9. Ensamblaje de los complejos de coagulación en la membrana lipídica.

TF: factor tisular; FVII: factor VII, FX: factor X; FVIII: factor VIII; FIX: factor IX; FX: factor X; PT: protrombina. La letra a junto al número romano de cada factor de coagulación indica que se encuentra activado. Los fosfolípidos de membrana con carga negativa se representan en rojo. Owens y col. [163].

Factor tisular

Diferentes tipos celulares como el endotelio, plaquetas, fibroblastos o monocitos pueden dar lugar a MPs circulantes que en su superficie exhiban F Γ (MPs+F Γ) las cuales podrían tener un papel en la hemostasia. En estudios *in vivo* se ha observado como las MPs+F Γ se acumulan en el coágulo [233, 234] y potencian su actividad procoagulante. Un modelo animal en el cual se ligó la arteria carótida, demostró que la acumulación de fibrina en el lugar del daño aumentaba cuando se le inyectaba al animal MPs+F Γ de procedencia humana [235]. Otros modelos experimentales han demostrado que tras la generación de un daño de la pared vascular la acumulación rápida de F Γ (tras los 60 segundos) depende de las MPs portadoras en su superficie de F Γ y no del F Γ procedente de leucocitos cuya acumulación en el lugar del daño no se empezó a observar hasta pasados los 2-3 min [234, 236] y como el aumento en los niveles de MPs procoagulantes podría restablecer la hemostasia en un modelo animal de hemofilia A [237]. Esta acumulación de MPs+F Γ parecer ser dependiente de la interacción entre la P-selectina expresada en la superficie de plaquetas activadas ya reclutadas en el coágulo con su ligando denominado glicoproteína ligando 1 de la P-selectina (PSGL1) expresado en MPs derivadas de monocitos. Se ha observado que en ratones deficientes para ambas proteínas el reclutamiento de MPs en el lugar del trombo es menor. Por otro lado, estudios muestran que la presencia de P-selectina en el coágulo favorece el reclutamiento de MPs+F Γ derivadas de monocitos [234, 236] y que el reclutamiento de estas MPs favorece la formación de fibrina [238].

4.6.5.2. MPs anticoagulantes y fibrinolíticas

Además de las MPs con una actividad procoagulante, existen MPs con actividad anticoagulante o fibrinolítica que contribuyen a mantener el equilibrio hemostático. Se ha observado que las MPs pueden ser portadoras de sustancias anticoagulantes como el inhibidor de la vía del F Γ , la trombomodulina (inactiva a la trombina uniéndose a ella) o la proteína C activada (regula la activación de los factores V y VIII) [239, 240] o incluso pueden ser portadoras de compuestos fibrinolíticos como el t-PA o el u-PA [241, 242].

4.6.6. MPs y trombosis

El modelo celular de coagulación de Furie, contempla el papel de las MPs+F Γ monocitarias en la actividad trombótica [140] (Figura 9). Diferencia entre dos tipos de MPs+F Γ , las hemostáticas y las patológicas. Las hemostáticas estarían presentes en el torrente sanguíneo

de forma constitutiva a bajas concentraciones y expresarían en su superficie FT inactivado. Tras el daño vascular, estas MPs se reclutarían vía P-selectina-PSGL1 lo que conllevaría la activación de su FT [238, 243]. Por el contrario, las MPs patológicas, estarían presentes a altas concentraciones en el torrente circulatorio y expresarían FT activado en su superficie. Estas MPs se reclutarían a través del endotelio o de las plaquetas y al presentar ya el FT activado no necesitarían el paso de activación que regula la formación de trombina por parte de las MPs hemostáticas. De forma adicional, las MPs con FT y/o con PSGL1 también podrían fusionarse con otros tipos celulares favoreciendo el reclutamiento de células al trombo [244]. Diferentes estudios han observado un aumento de los niveles o de la actividad procoagulante de las MPs+FT en pacientes con cáncer que han desarrollado trombosis con respecto a aquellos que no la han desarrollado [245-247].

4.6.7. MPs y cáncer

La relación entre la generación de MPs y el cáncer está bien establecida [183, 248-251]. Entre los procesos que inducen microvesiculación se incluye el cáncer. La acción de mutantes oncogénicos como el *K-ras* [252], el receptor del factor de crecimiento epidermal [253], o su mutante el denominado factor de crecimiento epidermal variante III estimulan la liberación de MPs [252, 253]. De forma similar, la activación [185] o la supresión [252] de ciertos supresores de tumores alteran la vesiculación celular. Evidencias de peso sugieren que las MPs contribuyen a la supervivencia del cáncer, a la invasión del tumor y a la metástasis [254]. Las células tumorales podrían estar esquivando la apoptosis mediante liberación de MPs con alto contenido en caspasa 3 (enzima apoptótica) [204, 254, 255] o podrían actuar contribuyendo a la resistencia de tratamientos antitumorales. Se ha observado que líneas celulares quimio-resistentes liberan más MPs con el agente químico terapéutico que aquellas líneas no resistentes [254, 256, 257].

Las MPs también podrían ejercer un papel en el sistema inmune suprimiendo la respuesta antitumoral y favoreciendo la proliferación del tumor. MPs procedentes de células tumorales podrían fusionarse con monocitos y mermar su capacidad como célula presentadora de antígenos [254] o contribuir con el crecimiento del tumor transfiriendo oncogenes a células no tumorales transformándolas en malignas [178]. En modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* diversos estudios han demostrado la implicación de las LMPs en la angiogénesis [258, 259] y el papel de las PMPs en la angiogénesis, la regeneración tisular [258, 260] y la metástasis [261]. Algunos estudios han observado en pacientes oncológicos una correlación entre los niveles de MPs procoagulantes y la aparición de trombosis [243, 245, 262, 263] y

varios trabajos asocian el estado protrombótico del cáncer con la presencia de MPs, en especial con las PMPs [254].

4.6.8. Las MPs como biomarcadores de ETV en el cáncer y de neoplasia subyacente en la trombosis

Los biomarcadores podrían ser una herramienta complementaria para mejorar la especificidad/sensibilidad de los modelos actuales de predicción del riesgo de ETV en pacientes oncológicos. Su estudio es difícil dada la heterogeneidad de los pacientes con cáncer y los múltiples factores de riesgo que en el curso clínico de la evolución del paciente oncológico pueden estar o no presentes.

Por otro lado, la posibilidad de que las MPs sirvieran de ayuda en el diseño de estrategias personalizadas de búsqueda de neoplasias subyacentes en pacientes con trombosis, es una atractiva idea. La capacidad procoagulante de las MPs, su potencial papel en el mecanismo de la trombosis, en el mecanismo de crecimiento y supervivencia tumoral y la elevación de poblaciones específicas de MPs tanto en el cáncer [161] como en la trombosis [162, 163] comentado en párrafos anteriores, alientan a pensar en el potencial de las MPs como uno de los biomarcadores más prometedores en la relación bidireccional cáncer-trombosis, que los estudios y epidemiología clínica nos han demostrado desde hace muchos años. Por ahora, la mayoría de estudios de MPs se centran en ellas como marcadores predictores del desarrollo de ETV en cohortes de cáncer aunque aún no se han obtenido evidencias [264, 265].

4.7. Métodos para el análisis de MPs

La facilidad con la que los niveles y propiedades de las MPs circulantes se alteran *ex vivo* junto con la falta de estandarización en el procedimiento de aislamiento y detección de MPs suponen una importante limitación para el uso de las MPs como biomarcadores. Los métodos utilizados por los diferentes autores varían entre sí y hacen difícil la comparación de resultados entre laboratorios. Sociedades científicas como la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia y la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares están impulsando trabajos colaborativos con la finalidad de estandarizar un protocolo consensuado para el análisis de MPs [266]. Resultado de esta iniciativa, se ha alcanzado conocimientos acerca de diversos aspectos o condiciones preanalíticas que afectan la cuantificación de las MPs.

4.7.1. Condiciones preanalíticas para el aislamiento de MPs

Debido a la facilidad con la que se pueden alterar los niveles de MPs *ex vivo*, son numerosas las circunstancias preanalíticas que pueden afectar tanto a los niveles como a su actividad. Aquí se recogen las principales condiciones preanalíticas descritas como variables que influyen en el estudio de MPs circulantes a partir de muestras sanguíneas.

4.7.1.1. Tipo de muestra

El plasma es el tipo de muestra más recomendado y utilizado para el estudio de MPs. Otras opciones como el empleo de suero quedan descartadas ya que su preparación requiere la coagulación de la sangre *in vitro*, proceso en el que se liberan MPs. El análisis de MPs sobre sangre total en fresco es una alternativa elegida por algunos autores [177, 267, 268], tiene la ventaja de que se miden las MPs en su entorno fisiológico y se evita además la alteración causada por la congelación y/o centrifugación de la muestra, sin embargo es poco práctico ya que para minimizar la generación *ex vivo* de MPs la muestra debe analizarse en ese mismo momento.

4.7.1.2. Elección del anticoagulante para la extracción sanguínea

El citrato de sodio es el anticoagulante más empleado y considerado como más apropiado para el estudio de MPs ya que previene la degranulación tanto plaquetar como leucocitaria y actúa como agente quelante de los iones de calcio evitando así en gran medida el proceso de vesiculación. El comité científico de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia recomienda el uso de citrato trisódico en concentraciones de 0,105 ó 0,129 ml/L (3,2 % ó 3,8 %) [269]. Otros anticoagulantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o anticoagulantes del tipo inhibidor de proteasas como la heparina siguen utilizándose para el análisis de MPs [270]. Hay autores que consideran que la heparina preserva mejor las MPs de procedencia endotelial cuyos niveles podrían verse afectados por la acción quelante de los anticoagulantes como el citrato sódico [271].

4.7.1.3. Método de venopunción

Durante el proceso de la extracción las plaquetas son susceptibles de activarse y consecuentemente liberar PMPs. El uso de agujas de diámetro muy pequeño así como una fuerte y prolongada compresión durante la extracción aumentan la presión en la vena pudiendo causar hemolisis *in vitro* y la posible formación de MPs eritrocitarias. Recientes

estudios muestran que el uso de agujas de mayor calibre (calibre 21) disminuye la hemólisis *in vitro*, la generación de MPs y la activación plaquetar [269]. Es recomendable descartar los primeros 2 - 3 mL de sangre extraídos para limitar el efecto artefactual del daño vascular causado por la propia venopunción.

4.7.1.4. Transporte

Cuando se requiera transportar los tubos de sangre desde el lugar de la extracción hasta el lugar de procesamiento, el control de la agitación de los tubos de extracción durante este tiempo es fundamental. Se ha observado que la agitación de los tubos, aunque fuese de forma involuntaria y accidental, aumenta sustancialmente los niveles de MPs. Si se requiere transportar los tubos de sangre, se recomienda hacerlo en posición vertical y sin ninguna agitación para evitar la generación de MPs artefactuales [269].

4.7.1.5. Retraso en el procesamiento

Un tiempo de demora desde la extracción hasta el inicio del procesamiento (inicio de la centrifugación) inferior a dos horas se considera adecuado ya que ese tiempo de demora no causa una alteración sustancial de los niveles de MPs y a la vez es un tiempo compatible con la práctica diaria del laboratorio. Un tiempo de procesamiento superior a 2 h puede dar lugar a MPs artefactuales [269, 272]. La mayoría de los trabajos publicados no especifican la demora en el tiempo de procesamiento en su metodología.

4.7.1.6. Centrifugación

Aunque la mayoría de autores optan por centrifugar las muestras de sangre como paso previo al análisis de MPs no existe un consenso sobre qué condiciones de centrifugación son las más adecuadas. La variedad de protocolos de centrifugación empleados en los distintos laboratorios [159, 273-275] hace que a nivel preanalítico, la centrifugación sea la principal causa de variabilidad en la determinación de MPs. Dependiendo del protocolo de centrifugación que se haya empleado la determinación de MPs se lleva a cabo sobre el plasma o sobre el pellet de MPs. Para obtener el pellet o sedimento de MPs se realizan centrifugaciones seriadas a distintas velocidades la última de ellas suele ser una ultracentrifugación o una centrifugación a alta velocidad durante un tiempo prolongado en las que se obtiene un pellet rico en MPs. Tiene como ventaja evitar la contaminación plaquetar pero en contraposición se pierden MPs debido a que algunas de ellas no son más

densas que el plasma y por tanto no sedimentan [276]. La medición de MPs directamente sobre plasma es la opción más utilizada por los distintos autores [159, 165, 269, 277]. El número de centrifugaciones empleadas oscila entre 1 y 2 centrifugaciones y los tiempos y velocidad empleados muy variables.

4.7.1.7. Almacenamiento

Lo ideal sería realizar la determinación de MPs en fresco sin que sea necesario su almacenamiento. En la práctica diaria de muchos laboratorios es difícil realizar un análisis en fresco. La mayoría de trabajos conservan el pellet de MPs o el plasma a -80 °C antes del análisis de MPs. Se ha observado que la congelación afecta de forma variable los niveles de MPs. Se hipotetiza que los restos celulares y/o plaquetas residuales presentes en la muestra congelada se activan en la congelación/descongelación y dan lugar a MPs artefactuales. Algunos autores prefieren congelar la muestra de forma rápida en nitrógeno líquido antes de almacenarla a -80 °C para preservar la morfología de las MPs y disminuir la formación de cristales [278], otros consideran que la congelación rápida no tiene ningún efecto en la conservación las MPs [269]. La temperatura de descongelación de la muestra también es objeto de debate, diversos autores recomiendan una descongelación lenta para preservar la estructura y función de las MPs [278] mientras que otros abogan por una descongelación rápida a 37 °C para evitar la formación de cristales y defienden que la descongelación lenta favorece la formación de MPs artefactuales [269].

4.7.2. Métodos para la detección y caracterización de MPs

4.7.2.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrica cuyo fundamento radica en hacer pasar una suspensión de partículas alineadas en una corriente de fluido por un haz de luz, generalmente, uno o varios láseres monocromáticos. Gracias a las propiedades físicas de dispersión de la luz y a la emisión de fluorescencia, es posible determinar simultáneamente multitud de parámetros de cada partícula, que es analizada individualmente [279]. Las células o partículas, en nuestro caso MPs, se añaden a un medio líquido y se pasan a través de una cámara de flujo sobre la que inciden diferentes láseres monocromáticos. Fruto del impacto del láser en la MPs se produce una dispersión de luz (“scattered light”) que es captada por diversos detectores. El “forward scattered light” (FS) es el parámetro del citómetro que recoge el haz de luz dispersado hacia delante y que da información sobre el

tamaño de la MPs. El “side scattered light” (SS) es el parámetro que recoge el haz de luz dispersado ortogonalmente y que da información sobre la complejidad de la MPs. Además, si la muestra se incubaba previamente con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos, es posible inmunofenotipar las diferentes poblaciones de MPs. En la figura 10 se refleja el fundamento de la citometría de flujo.

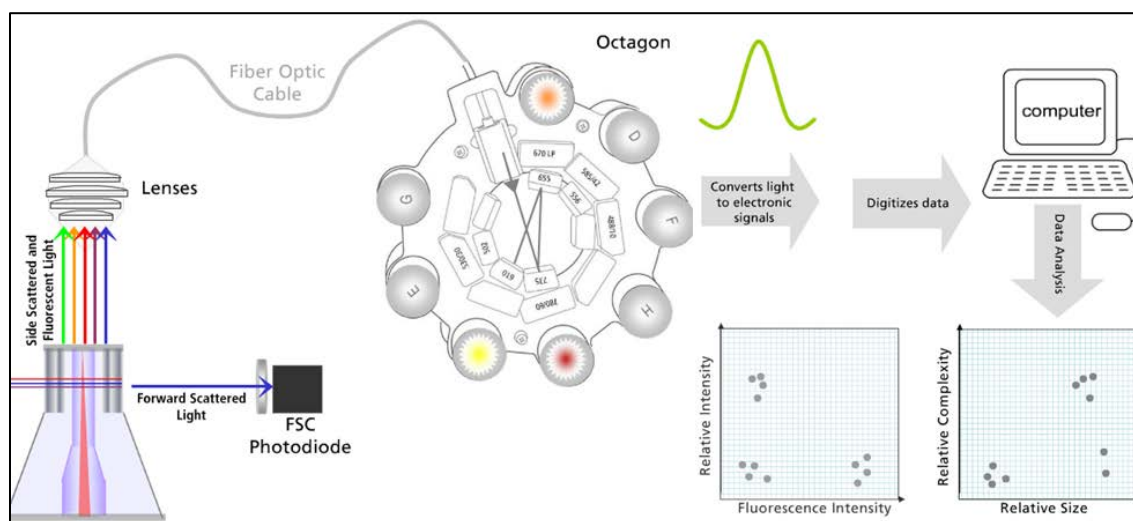


Figura 10. Esquema del fundamento de la citometría de flujo.

FSC: canal de detección de “forward scattered light”. Adaptación de BD Biosciences

La citometría de flujo es la técnica más empleada para la determinación de MPs. Tiene como ventaja que permite de forma simultánea determinar el número de MPs e identificar su origen celular o la composición de proteínas a nivel de superficie [274, 280, 281]. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones causadas por el pequeño tamaño de las MPs ($0,1 \mu\text{m} - 1 \mu\text{m}$) que hace que su detección en los citómetros requiera condiciones de trabajo muy próximas a los límites de sensibilidad de estos equipos [282-284]. La falta de un protocolo estandarizado para la detección de MPs por citometría es otra importante limitación que dificulta la comparación de resultados entre las diferentes plataformas citométricas.

La mayoría de trabajos utilizan esferas fluorescentes con tamaño conocido para ajustar los parámetros del citómetro y establecer una región donde se estima que se van a recoger los eventos de tamaño entre $0,1-1 \mu\text{m}$, compatibles con el tamaño de las MPs [285, 286]. El FS es el parámetro más utilizado como criterio para establecer la región de MPs en el citómetro [285, 286]. Recientemente, algunos autores basándose en los resultados obtenidos en estudios multicéntricos dirigidos a la estandarización del análisis de MPs por citometría concluyeron que existen citómetros con una mayor capacidad de resolución en el parámetro

FS y citómetros con una mayor resolución en el parámetro de SS y que en estos últimos, hasta ahora, la estrategia utilizada para la detección de MPs basada en el FS no era la adecuada [282]. Esto se traducía en variabilidad de resultados entre citómetros optimizados en FS versus citómetros optimizados en SS [287]. Consecuentemente se propuso una nueva estrategia de calibración basada en un set de microesferas fluorescentes adaptado a citómetros optimizados en FS y otro set de microesferas fluorescentes adaptado para citómetros optimizados en SS de forma que aunque aparentemente se utilice para cada tipo de citómetro un protocolo diferente con un tamaño de microesferas diferentes, el resultado final sea establecer en los equipos una región de MPs equivalente que permita la comparación de resultados [288]. Esta nueva estrategia de calibración podría suponer una interesante alternativa y un gran avance en el proceso de estandarización en la detección de MPs, sin embargo se necesitan estudios futuros que la validen.

4.7.2.2. Ensayo por inmunoadsorción asociado a enzimas

Las MPs pueden ser analizadas mediante ensayos de inmunoadsorción asociado a enzimas (ELISA). Esta técnica emplea anticuerpos monoclonales específicos de moléculas de superficie de las MPs para aislarlas y cuantificar su concentración, normalmente mediante colorimetría o fluorimetría. El tipo de MPs aislada va a depender del tipo de anticuerpo utilizado. Tiene como ventajas la cuantificación de forma sencilla y automatizada pero no da información a nivel funcional [178].

4.7.2.3. Ensayos funcionales

Son kits comerciales que miden la actividad funcional de las MPs normalmente mediante ensayos protrombinasa colorimétricos, fluorométricos o basados en pruebas que miden tiempo de coagulación. Se distinguen dos grupos. Los tests que miden la actividad procoagulante de MPs dependiente de fosfolípidos como son el “Zymuphen MPs Activity assay” (Hypen Biomed) o el test de fosfolípidos procoagulantes (Procoag PPL, Stago), y los tests que miden la actividad procoagulante dependiente de FT como el “Zymuphen MP TF Assay” (Hypen Biomed). Este tipo de determinaciones tienen la ventaja de que dan información sobre la actividad de las MPs pero no información detallada sobre los valores absolutos ni sobre la procedencia celular [165, 177].

4.7.2.4. Microscopía

Diferentes técnicas de microscopía pueden ser utilizadas para la detección de MPs cada una con sus ventajas e inconvenientes. La microscopía electrónica da información fiable sobre el tamaño y la morfología. Si se utiliza la inmuno-microscopía electrónica se pueden identificar diferentes poblaciones. Sin embargo, tiene limitaciones en cuanto a la cuantificación y es una técnica costosa que requiere un procesamiento de muestra que puede alterar el tamaño y la morfología de las MPs [289]. La microscopía confocal láser permite la identificación de diferentes poblaciones de MPs mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales marcados fluorescentemente y con la microscopía confocal de barrido por fluorescencia se puede obtener información sobre las características morfológicas aunque requiere varias horas de preparación [274]. Otro tipo de microscopía utilizada es la microscopía de fuerza atómica. Ésta es una técnica óptima para la evaluación de la morfología de la MPs aunque tiene algunas limitaciones a la hora de analizar su tamaño [290].

4.7.2.5. Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz, también conocida como espectroscopia de correlación de fotones es útil para determinar el tamaño de partículas en suspensión de entre 1 nm y 6 μm . Es útil para el análisis de MPs homogéneas pero su uso en el análisis de poblaciones heterogéneas está limitado [291].

5. Planteamiento del problema y justificación de nuestro estudio

Aunque los estudios acerca de MPs en diferentes patologías se han visto incrementados considerablemente en los últimos años [292-297], su traslación a la aplicación clínica aún no se ha conseguido. Esto es debido en gran parte a la ausencia de un protocolo preanalítico y analítico estandarizado que permita una medición precisa, objetiva y reproducible entre diferentes laboratorios. El estudio de las condiciones preanalíticas de procesamiento así como el estudio del método analítico comúnmente empleado para la detección y cuantificación de MPs son indispensables para el establecimiento del valor de las MPs como biomarcadores. En este sentido, y como paso previo a la caracterización de MPs en la ETV y en el cáncer, para este trabajo hemos estudiado de qué forma afectan a las MPs la congelación de la muestra y las condiciones de centrifugación, dos de las condiciones preanalíticas con mayor influencia en el procesamiento y que además generan controversia entre autores. Como paso previo también se ha estudiado una nueva estrategia de calibración

de citómetros basada en una combinación de bolas fluorescentes adaptadas para cada tipo de instrumento cuyo objetivo final es optimizar la detección de MPs en los citómetros y establecer una región de MPs que permita la comparación de resultados entre plataformas citométricas de diferentes laboratorios lo que facilitaría los estudios multicéntricos con MPs.

El último aspecto abordado en esta tesis se centra en el cáncer y la trombosis, dos patologías diferentes pero estrechamente relacionadas en las que la elaboración del perfil de pacientes oncológicos con mayor susceptibilidad para desarrollar trombosis y el diagnóstico precoz de la neoplasia subyacente en los pacientes con ETV es de gran relevancia clínica. En ambas patologías por separado se han encontrado niveles de MPs circulantes elevados y se contempla el uso de las MPs como posibles marcadores diagnósticos/pronósticos del evento trombótico en el paciente oncológico y de la neoplasia oculta en el paciente con cáncer. Desarrollando esta línea argumental, el papel biomarcador de las MPs sería más fácilmente abordable si logramos previamente caracterizar las MPs circulantes más típicas o genuinas de cada enfermedad o situación patológica en concreto y elaborar un perfil de MPs elevadas asociadas a la trombosis y un perfil de MPs elevadas asociadas al cáncer. Por esta razón, centramos este trabajo en la caracterización de las MPs circulantes en pacientes con cáncer y en pacientes con ETV en el que estudiamos el origen celular de las MPs y las MPs que presentan a nivel de membrana celular FT o PSGL1 cuya implicación en el cáncer y la trombosis ya fueron descritas en modelos animales [298].

II. Hipótesis

Las MPs circulantes podrían actuar como biomarcadores diagnósticos/pronósticos de diversas patologías como el cáncer o la trombosis y podrían ser de utilidad en el estudio de mecanismos moleculares subyacentes en estas patologías. La falta de un diseño adecuado y de un protocolo estandarizado para la medición de las MPs limita sustancialmente su potencial papel como biomarcador.

1. Las MPs son susceptibles de sufrir alteraciones *ex vivo* en función de las condiciones preanalíticas elegidas para el procesamiento de la muestra especialmente cuando se trata de las condiciones de centrifugación y almacenamiento. El estudio de estas variables ayudaría a conocer mejor de qué forma afectan y a seleccionar las condiciones preanalíticas más óptimas que tuvieran un impacto mínimo sobre las propiedades de las MPs.
2. Las nuevas estrategias de calibración centradas en establecer regiones de MPs comparables entre los diferentes tipos de citómetros podrían ser una opción para mejorar la reproducibilidad y la comparación de resultados entre las diferentes plataformas citométricas facilitando los estudios multicéntricos con MPs.
3. Niveles elevados de MPs específicas se han encontrado en pacientes oncológicos y pacientes con trombosis. Podría existir un perfil de MPs específico para cada una de las enfermedades que fuera de utilidad para diferenciarlas y que nos permitiera el diseño de posteriores estudios basados en la determinación de estas MPs específicas.

III. Objetivos

El objetivo global fue investigar el papel de las MPs como biomarcadores en pacientes con ETV y cáncer. De forma previa al análisis de estos grupos de pacientes estudiamos dos aspectos de importancia capital para avanzar en nuestra línea argumental, la posibilidad de incorporar ciertas MPs a algoritmos clínicos de decisión. Un primer aspecto fue la influencia de dos importantes factores preanalíticos en la determinación de MPs y el segundo, la utilización de una nueva estrategia de calibración de citómetros que optimizara la detección de MPs y facilitara la comparación de resultados entre plataformas citométricas. Como objetivos específicos de este trabajo se propusieron:

1. Evaluación de la influencia de las condiciones de centrifugación y conservación de las muestras sobre los niveles de MPs totales y su actividad procoagulante.
2. Comparación de los niveles de MPs cuantificados en dos plataformas citométricas diferentes siguiendo una nueva estrategia de calibración.
3. Caracterización fenotípica diferencial de MPs en dos grupos de pacientes. Un grupo diagnosticado de ETV idiopática y otro diagnosticado de cáncer que no desarrollan ETV.

IV. Materiales y métodos

6. Diseño experimental

6.1. **Objetivo 1: Evaluación de la influencia de las condiciones de centrifugación y conservación de las muestras sobre los niveles de MPs totales y su actividad procoagulante**

Diseño del estudio

Estudio comparativo observacional para la evaluación del impacto de la centrifugación y almacenamiento de las muestras sobre los niveles de MPs totales y su actividad procoagulante.

Población de estudio

Se incluyeron 21 sujetos sanos del personal del Hospital La Fe de Valencia.

Variable de estudio

Como variable demográfica se recogió el sexo. Como variables analíticas, para cada condición preanalítica estudiada se determinaron los niveles de MPs totales, la generación de trombina, el tiempo de coagulación asociado a fosfolípidos y la cuantificación de fosfolípidos procoagulantes asociados a MPs.

6.2. **Objetivo 2: Comparación de los niveles de MPs cuantificados en dos plataformas citométricas diferentes siguiendo una nueva estrategia de calibración**

Diseño del estudio

Estudio observacional analítico que evalúa las diferencias entre los niveles de MPs totales y de procedencia de plaquetar medidos en dos tipos de citómetros previamente calibrados con una nueva estrategia de calibración.

Población del estudio

Los pacientes candidatos se seleccionaron en consultas externas monográficas de ETV. Se incluyeron pacientes diagnosticados de forma objetiva de un episodio de TVP ya sea idiopática, secundaria a cirugía, por inmovilización o tratamiento hormonal y que llevaban tratados con anticoagulantes durante 3 meses.

Variables de estudio

Como variables analíticas se determinaron niveles de MPs totales y niveles de PMPs.

6.3. Objetivo 3: Caracterización fenotípica diferencial de MPs en dos grupos de pacientes, diagnosticados de ETV y diagnosticados de cáncer*Diseño del estudio*

Estudio observacional descriptivo en el que se estudiaron niveles de diferentes subpoblaciones de MPs y otros parámetros relacionados con la coagulación en pacientes diagnosticados de ETV idiopática, pacientes diagnosticados de cáncer no asociado a ETV y sujetos sanos. La cuantificación, la caracterización fenotípica y la determinación de la procedencia celular de las MPs se realizó mediante citometría de flujo sobre muestras de plasma pobre en plaquetas (PPP). La actividad procoagulante asociada a las MPs se determinó mediante estudios de generación de trombina, tiempo de formación del coágulo y cuantificación de fosfolípidos asociados a MPs. Como otros parámetros asociados a la coagulación se determinaron también sobre PPP, niveles de dímero D, sP-selectina y FT antigénico.

Población de estudio

Los pacientes candidatos se seleccionaron en consultas externas monográficas de ETV y de oncología del Hospital Universitario Virgen del Rocío entre marzo de 2011 y noviembre de 2013. El grupo sano se seleccionó a partir de acompañantes de pacientes y personal trabajador del hospital. En el grupo de pacientes con ETV no asociada a cáncer se incluyeron pacientes diagnosticados de forma objetiva de un primer episodio de ETV idiopática en cualquiera de sus manifestaciones (TVP o EP) que no desarrollaron cáncer en los 12 meses posteriores al episodio de ETV. Se excluyeron de este grupo todos aquellos pacientes diagnosticados de ETV con antecedente de neoplasia, factor de riesgo transitorio de trombosis (cirugía, trauma, inmovilización prolongada por prescripción médica, tratamiento hormonal) o tratamiento anticoagulante de más de 72 h. También se excluyeron aquellos pacientes que dentro de los 12 meses posteriores al diagnóstico de ETV fueron diagnosticados de cáncer o existía sospecha clínica de que podían padecerlo. Dentro del grupo de pacientes con cáncer no asociado a ETV se incluyeron pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón o de tracto digestivo en estadio IIIB o IV que no tuvieran signos de ETV

incidental y que no desarrollaron trombosis en los 12 meses posteriores al diagnóstico de cáncer. Se excluyeron de este grupo todos los pacientes diagnosticados de cáncer con antecedentes de trombosis o terapia anticoagulante ya sea a modo de prevención o como tratamiento. También se excluyeron aquellos pacientes que dentro de los 12 meses posteriores al diagnóstico de cáncer fueron diagnosticados de ETV o existía sospecha clínica de que lo padecieran (episodios de disnea sin causa aparente, taquiarritmias, hipotensión, muerte súbita o muerte sin causa conocida) y pacientes diagnosticados de cáncer pero sin un diagnóstico histológico confirmado. En el grupo de sujetos sanos se incluyeron voluntarios sanos sin antecedentes ni de ETV ni de cáncer que no estuvieran en situación de riesgo para desarrollar trombosis (inmovilización por periodos prolongados, tratamientos anticonceptivos orales, cirugía reciente...) y que no estuvieran bajo tratamiento anticoagulante.

Variables de estudio

De todos los sujetos incluidos en el estudio se recogieron variables clínicas y demográficas: sexo, edad, peso, talla, hábito tabáquico, hábito enólico, hipertensión, dislipemia, enfermedad arterial periférica, síndrome dispéptico, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad hepática, enfermedad respiratoria (asma, EPOC, tuberculosis, bronquiectasias u obstrucción crónica del flujo aéreo), cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca crónica, artritis, artrosis, enfermedad renal crónica, trastornos neurológicos. En el caso del grupo de pacientes diagnosticados de cáncer se recogió la fecha en la que fueron diagnosticados de forma objetiva mediante histología, el tipo de neoplasia (pulmonar, gástrica o pancreática y de colon), el estadio de la neoplasia (estadio III o IV) y si el paciente se encontraba bajo tratamiento con agente quimioterápico y/o radioterápico en el momento de la extracción sanguínea. Para el grupo de diagnosticados de ETV se recogió el tipo de ETV (TVP con/sin EP asociada o EP con/sin TVP asociada), si estaban bajo tratamiento con HBPM y en caso afirmativo el tipo de tratamiento (enoxaparina, tinzaparina, bemiparina, fraxiparina, dalteparina, rivaroxaban, dabigatrán). Además en todos los sujetos se recogió la fecha de extracción sanguínea, fecha del último seguimiento clínico, el periodo de seguimiento (diferencia entre la fecha del último seguimiento clínico y la fecha de extracción). Dentro del periodo de seguimiento se identificó a aquellos pacientes oncológicos diagnosticados o con sospecha clínica de padecer ETV y a aquellos pacientes trombóticos diagnosticados o con sospecha clínica de padecer cáncer así como los pacientes que habían fallecido y su causa.

Como variables analíticas se recogieron: niveles plasmáticos de MPs totales, niveles plasmáticos de PMPs, LMPs y EMPs, niveles plasmáticos de MPs+FT o MPs con PSGL1 (MPs+PSGL1) en la superficie celular, niveles plasmáticos de MPs+FT de procedencia endotelial (EMPs+FT) o plaquetar (PMPs+FT), niveles plasmáticos de MPs+PSGL1 de procedencia leucocitaria (LMPs+PSGL1). De forma adicional se determinaron las concentraciones plasmáticas de dímero D, sP-selectina y FT antigénico.

7. Consideraciones éticas

De todos los participantes se obtuvo consentimiento informado por escrito antes de la inclusión en el estudio. Los trabajos realizados en esta tesis se han llevado a cabo de acuerdo con el Código Ético de la asociación mundial de medicina (Declaración de Helsinki) y están englobados dentro de un proyecto multicéntrico sobre MPs circulantes en pacientes con cáncer y ETV el cual fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y por el Comité del Hospital Universitario y Politécnico de La Fe de Valencia.

8. Extracción de sangre venosa

De todos los participantes se recogió sangre venosa con una aguja de calibre 21 (descartando los primeros 3 ml) en tubos de 3,5 ml con citrato de sodio al 3,2 % Vacuette® (Greiner bio-one, North Carolina, EE.UU). Los tubos se colocaron en posición vertical y cuando el procesamiento de las muestras requería su transporte éste se llevó a cabo en frío. El tiempo transcurrido entre la extracción y el procesamiento de la muestra fue inferior a 2 h en todos los casos.

9. Preparación de PPP

Para la evaluación del impacto de la centrifugación y conservación de la muestra, muestras de sangre procedentes del mismo sujeto se centrifugaron siguiendo 4 protocolos de centrifugación diferentes 1) una centrifugación a 1500 g, 30 min a 4 °C; 2) doble centrifugación a 2500 g, 10 min a 4 °C; 3) una centrifugación a 1500 g 30 min a 20 °C; 4) doble centrifugación a 2500g 10 min a 20 °C. En todas las centrifugaciones se quitó el freno de parada de la centrifuga para evitar que las diferentes fases separadas por el gradiente de centrifugación se mezclaran. En las centrifugaciones se obtuvo PPP de cada paciente que se

recogió en un tubo de plástico estéril de 50 mL y tras mezclarlo suavemente, se realizaron alícuotas de 200 μ L y 500 μ L en tubos previamente identificados con el código de cada sujeto. La recogida de PPP se detuvo 1 cm por encima de la capa leucocitaria para evitar la contaminación celular. Las alícuotas se utilizaron en fresco para el conteo de MPs totales y la determinación de actividad procoagulante asociada a MPs, o se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se descongelaron a temperatura ambiente para volver a realizar las determinaciones mencionadas anteriormente (MPs totales y actividad procoagulante asociada). Además una alícuota de 500 μ L de PPP de cada paciente fue sometida a una centrifugación adicional a 25000 g durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener plasma libre de MPs (PLMPs) el cual se utilizó como control negativo tanto en la medida de actividad procoagulante como en la determinación de MPs por citometría. Para los estudios posteriores todas las determinaciones (conteo de MPs totales y PMPs en el estudio 2 y caracterización fenotípica, procedencia celular de MPs, determinación de dímero D, sP-selectina y FT antigénico en el caso del estudio 3) se realizaron a partir de PPP congelado-descongelado preparado siguiendo el protocolo 1 de centrifugación (una centrifugación a 1500 g 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). El tiempo de congelación del PPP fue de un mes o de 12-18 meses en función de si para la inclusión del paciente en el estudio se requería o no un tiempo de seguimiento. Para todas las muestras la demora desde la extracción hasta el procesamiento de las muestras fue inferior a 2 h.

10. Citometría de flujo

Para la evaluación del impacto de la centrifugación y conservación de la muestra se cuantificaron los niveles de MPs totales en el PPP y PLMPs preparado siguiendo alguno de los 4 protocolos de centrifugación y conservación de la muestra en un citómetro de flujo EPICS XL (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU). Para ello 10 μ L de PPP o PLMPs se diluyeron en 500 μ L de solución salina tamponada HEPES (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2,5 mM CaCl_2 , pH7,4) y se incubaron durante 60 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 5 μ L de anexina V fluoresceína isotiocianato (FITC, TACS® Annexin V-FITC, Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) prediluida 1:5 en tampón HEPES. Tras la incubación, las muestras se adquirieron en el citómetro durante 2 min a bajo caudal tiempo en el cual el citómetro analizó aproximadamente 50 μ L de la muestra. Para la calibración del equipo y la delimitación de una región de MPs se utilizó una combinación de bolas fluorescentes de diferentes tamaños (0,5-; 0,9- y 3,0- μm de diámetro, Megamix, BioCytex, Marsella, Francia) especialmente diseñadas para la detección de MPs por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como eventos / 120 s (Figura 11).

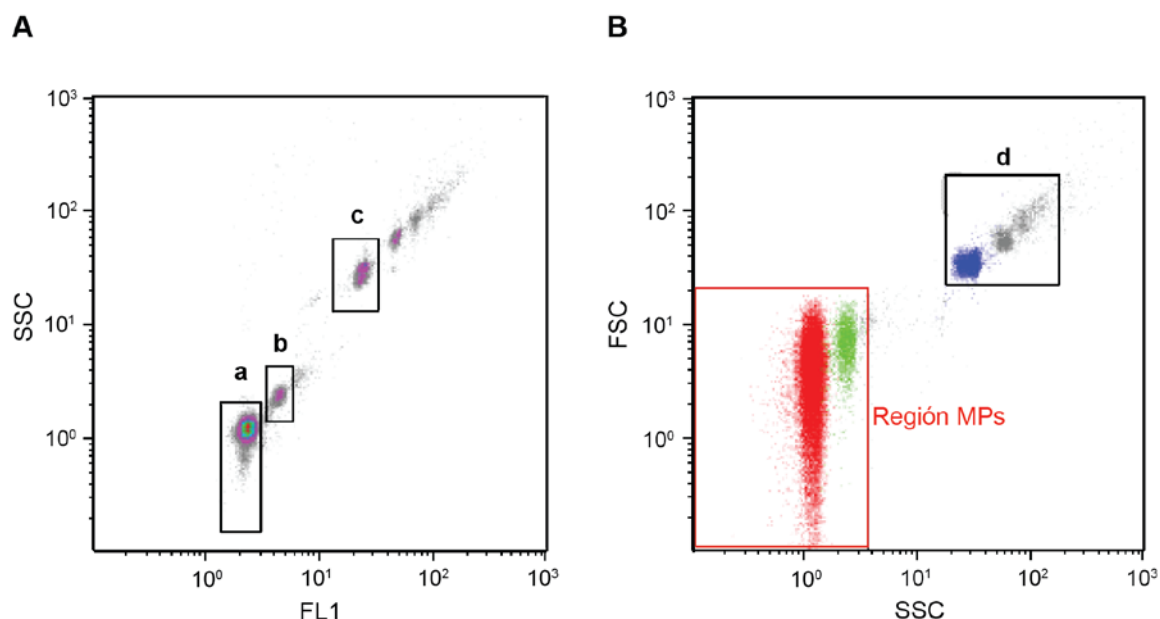


Figura 11. Calibración del citómetro basándose en una combinación de bolas de calibración fluorescentes (Megamix).

A. Citograma del instrumento Epics-XL donde se identifican tres regiones: a (bolas de 0,5 μm), b (bolas de 0,9 μm) y c (bolas de 3 μm). SSC: canal de “side scattered light”; FL1: canal de fluorescencia 1. **B.** Citograma del instrumento Epics-XL donde se identificó la región d, correspondiente a las bolas de 3 μm (nube de puntos azul) y la región de MPs delimitada en el extremo superior derecho por las bolas de 0,9 μm (nube de puntos verde); bolas de 0,5 μm (nube de puntos roja); FSC: canal para “forward scattered light”.

Para la comparación de niveles de MPs determinados en dos tipos de citómetros se cuantificaron los niveles de MPs totales y niveles de PMPs en el citómetro LSR Fortessa (Becton Dickinson Biosciences, BD, San José, CA, EE.UU) situado en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla y en el citómetro Navios (Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) situado en el Hospital La Fe de Valencia. La cuantificación de poblaciones específicas de MPs circulantes (MPs totales, EMPs, PMPs, LMPs, MPs+F T , EMPs+F T , PMPs+F T , MPs+PSGL1 y LMPs+PSGL1) en pacientes con cáncer y trombosis se realizó en el mismo LSR Fortessa citado con anterioridad. Para la cuantificación, 30 μL de PPP descongelado se incubaron en 500 mL de solución tampón HEPES (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 ; pH, 7,4) con la selección de anticuerpos monoclonales conjugados según correspondiera para cada estudio: 2 μL de CD45 FITC, 3 μL de CD31 PE, μL de CD41-ficoeritrina-cianina 7 (PECy7, Beckman Coulter, Marsella, Francia), 2 μL de CD142-FITC (American Diagnostica, Stamford, CT, EE. UU), 3 μL de CD162-PE (Biolegend, San Diego, CA, USA) y 5 μL de anexina V-FITC prediluida 1:5 en solución tampón HEPES (utilizada para estudio comparativo entre dos plataformas citométricas) ó 2 μl de anexina V-CF[™] Azul (Immunostep, Salamanca, España, utilizada para la caracterización de MPs en pacientes con

cáncer y pacientes con ETV. Cuando se empleó la anexina V-FITC la anexina junto con todos los anticuerpos y el PPP se incubaron 60 min en frío y oscuridad. Cuando se utilizó la anexina V-CF blue, antes de añadir la anexina los anticuerpos se incubaron junto con el PPP 30 min a temperatura ambiente, a continuación se añadió la anexina V-CF Blue y 20 μ l de solución tampón de unión a anexina V (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4) y se incubó de nuevo 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Como control negativo las muestras fueron también incubadas con los controles de isotipo correspondientes siguiendo las mismas condiciones que las utilizadas para cada anticuerpo.

Previamente a la detección de las MPs, cada citómetro se calibró siguiendo las recomendaciones del fabricante utilizando una combinación de bolas fluorescentes específicas y diferentes según las características del propio instrumento. En el citómetro de la casa comercial Beckman Coulter (Navios; Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU) se utilizó la Megamix-Plus FSC, una combinación de bolas fluorescentes de poliestireno con diferentes diámetros (0,1-; 0,3-; 0,5- y 0,9- μ m, Biocytex, Marsella, Francia). En el citómetro de la casa comercial BD (LSR Fortessa, Becton Dickinson Biosciences, Erembodegen, Bélgica) se utilizó la Megamix-Plus SSC, una combinación de bolas fluorescentes de poliestireno con diferentes diámetros (0,16-; 0,20-; 0,24-; y 0,5- μ m, Biocytex, Marsella, Francia). Aunque los rangos de tamaño entre el conjunto de bolas de la Megamix-Plus FSC y la Megamix-Plus SSC no sean los mismos, el protocolo a seguir estaba diseñado para establecer una región de identificación de MPs comparable ente ambos citómetros, por lo que las mismas MPs deben detectarse en uno y otro citómetros una vez calibrados. Para la cuantificación del número absoluto de MPs se añadieron a cada muestra, 30 μ L de esferas de conteo de 6 μ m de diámetro con una concentración conocida (alrededor de 1000 esferas/ μ L, Perfect-Count Microspheres, Cytognos, Salamanca, España) y los resultados se expresaron como eventos/ μ L o eventos/mL. Las muestras se adquirieron en el citómetro durante 2 minutos a bajo caudal de flujo.

En todos los casos, para limitar el ruido de fondo las soluciones tamponadas empleadas fueron doblemente filtradas utilizando filtros con un tamaño de poro de 0,22 μ m. Se consideraron MPs totales a aquellos eventos incluidos dentro de la región de MPs que fueran positivos para anexina V e inmuno-reactivos a los anticuerpos monoclonales específicos añadidos (Tabla 3) según correspondiera en cada caso. A modo de control negativo el PPP se incubó con anexina V-FITC/CF Blue según correspondiera en solución HEPES libre de calcio el cual es requerido para la unión de la anexina V a la fosfatidilserina.

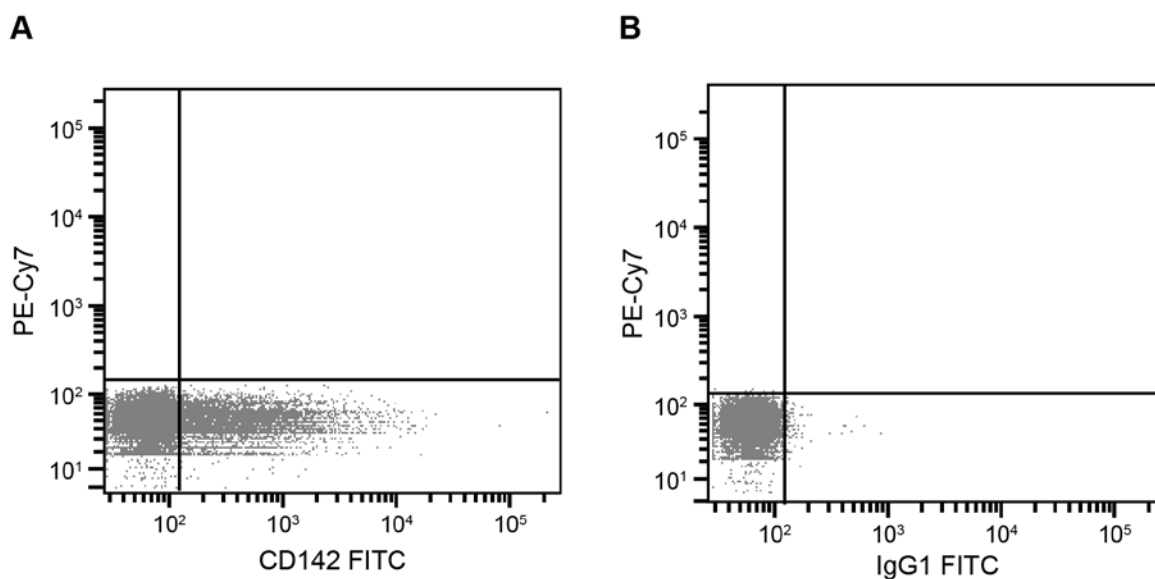


Figura 12. Caracterización de MPs circulantes por citometría de flujo.

A modo de ejemplo se exponen dos dot plot representativos que ilustran la identificación de las MPs con factor tisular (MP+FT) en un paciente diagnosticado de ETV. **A.** Las MPs+FT se identifican en la región inferior derecho utilizando un marcador específico para FT (CD142). **B.** Correspondiente control de isotipo negativo. IgG1: inmunoglobulina G1; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PECy7: ficoeritrina-cianina 7.

11. Actividad procoagulante mediada por MPs

Generación de trombina

La generación de trombina se determinó en el sistema de trombograma automatizado calibrado (CAT, Thrombinoscope BV, Maastricht, NL y Diagnostica Stago, Asnières, Francia) según el método de Hemker y colaboradores [269, 299] en muestras de PPP y PLMPs. La generación de trombina se inició mediante la adición de 20 μ l de reactivo denominado PRP (contiene gran cantidad de FT y una cantidad escasa de fosfolípidos) y 20 μ l de reactivo FluCa (sustrato fluorogénico de trombina y calcio) a 80 μ l de muestra. Para corregir los artefactos debidos al diferente color del plasma entre las muestras, el consumo del sustrato y el filtrado de la señal se utilizó calibrador de trombina para cada muestra. Los pocillos calibradores de trombina contenían 20 μ l de calibrador de trombina y reactivos FluCa y 80 μ l de plasma. La actividad de trombina se midió en forma de fluorescencia en un fluorímetro Fluoroskan FL (Thermo Labsystem, Helsinki, Finlandia) equipado con filtros de 390/460 nm cada 20 segundos durante 90 minutos bajo el control del software Thrombinoscope (Thrombinoscope BV). A partir de la medición calibrada de la actividad de trombina, se pudo calcular la concentración. La trombina generada bajo estas condiciones era

críticamente dependiente de la presencia de MPs en el plasma. Los datos se expresaron en forma de concentración de trombina generada (nM).

Tabla 3. Criterios utilizados para la identificación de MPs mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos

	AnV- CF Blue o AnV- FITC	CD162 PE	CD142 FITC	CD31 PE	CD41 PECy7	CD45 FITC
MPs totales	P	-	-	-	-	-
MPs+PSGL1	P	P	-	-	-	-
MPs+FT	P	-	P	-	-	-
EMPs	P	-	-	P	N	-
EMPs+FT	P	-	P	P	N	-
PMPs	P	-	-	P	P	-
PMPs+FT	P	-	P	P	P	-
LMPs	P	-	-	-	-	P
LMPs+PSGL1	P	P	-	-	-	P

AnV: anexina V;PMPs: MPs de procedencia plaquetar; EMPs: MPs de procedencia endotelial; LMPs: MPs de procedencia leucocitaria; FT: factor tisular; PSGL1: glicoproteína ligando 1 de la P-selectina; PE: ficoeritrina; FITC: fluoresceín isotiocianato; PECy7: ficoeritrina-cianina 7; P: positividad; N: negatividad.

12. Actividad procoagulante mediada por MPs

Generación de trombina

La generación de trombina se determinó en el sistema de trombograma automatizado calibrado (CAT, Thrombinoscope BV, Maastricht, NL y Diagnostica Stago, Asnières, Francia) según el método de Hemker y colaboradores [269, 299] en muestras de PPP y PLMPs. La generación de trombina se inició mediante la adición de 20 µl de reactivo

denominado PRP (contiene gran cantidad de F Γ y una cantidad escasa de fosfolípidos) y 20 μ l de reactivo FluCa (sustrato fluorogénico de trombina y calcio) a 80 μ l de muestra. Para corregir los artefactos debidos al diferente color del plasma entre las muestras, el consumo del sustrato y el filtrado de la señal se utilizó calibrador de trombina para cada muestra. Los pocillos calibradores de trombina contenían 20 μ l de calibrador de trombina y reactivos FluCa y 80 μ l de plasma. La actividad de trombina se midió en forma de fluorescencia en un fluorímetro Fluoroskan FL (Thermo Labsystem, Helsinki, Finlandia) equipado con filtros de 390/460 nm cada 20 segundos durante 90 minutos bajo el control del software Thrombinoscope (Thrombinoscope BV). A partir de la medición calibrada de la actividad de trombina, se pudo calcular la concentración. La trombina generada bajo estas condiciones era críticamente dependiente de la presencia de MPs en el plasma. Los datos se expresaron en forma de concentración de trombina generada (nM).

Actividad procoagulante dependiente de fosfolípidos

La actividad procoagulante asociada a las MPs depende de la presencia de fosfolípidos aniónicos en superficie los cuales favorecen la formación y estabilización de los complejos de coagulación tenasa y protrombinasa. Se realizaron dos ensayos para valorar esta actividad procoagulante de las MPs: el primero evaluaba el tiempo de formación del coágulo dependiente de fosfolípidos y el segundo cuantificaba los fosfolípidos procoagulantes presentes en la superficie de las MPs.

- Tiempo de coagulación dependiente de fosfolípidos procoagulantes: El tiempo de coagulación dependiente de fosfolípidos procoagulantes se midió de utilizando el kit STA®-procoag-PPL [269, 300] en un analizador automatizado STA-® (Diagnostica Stago, París, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, 25 μ L de muestra se diluyeron con 25 μ L de plasma humano desprovisto de fosfolípidos y se incubaron durante 120 s a 37 ° C en un tubo con una bolita esférica. Acto seguido se añadieron 100 μ L de FXa (0,01 U/mL) y se sometió al tubo a una agitación suave de vaivén hasta que se detectó que la bolita esférica dejaba de moverse (Figura 13). Se consideró tiempo de coagulación al tiempo (s) que tardaba la bolita esférica en quedarse parada. Este tiempo era inversamente proporcional a la capacidad procoagulante asociada a fosfolípidos.

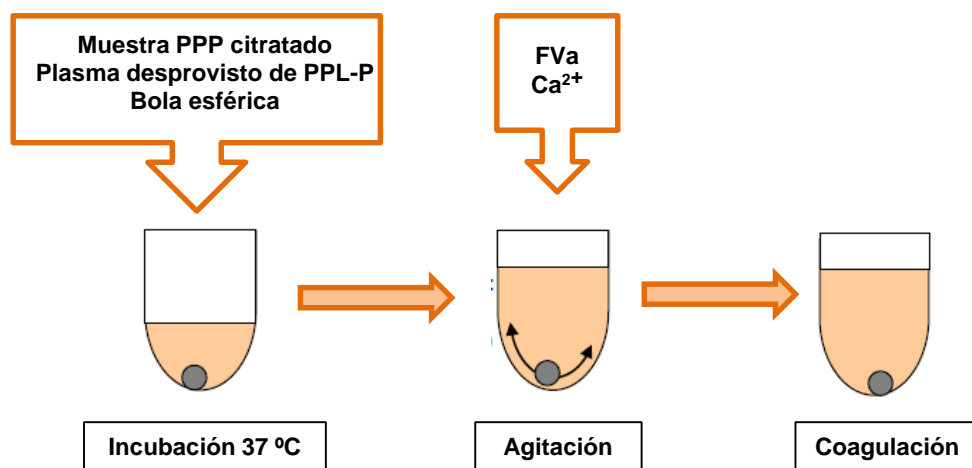


Figura 13. Medición de la actividad procoagulante dependiente de fosfolípidos asociados a las MPs.

PPL-P: fosfolípidos procoagulantes; FVa: factor V activado.

- Cuantificación de fosfolípidos procoagulantes asociados a MPs: La cuantificación de fosfolípidos asociados a MPs se llevó a cabo midiendo la actividad procoagulante de la fosfatidilserina asociada a las MPs mediante el kit “Zymuphen MP-Activity” (Hyphen Biomed, Neuville-Sur-Oise, France), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este ensayo se llevó a cabo sólo en las muestras que previamente habían sido congeladas. Para ello, el PPP fue descongelado a 37 °C y 100 µL de PPP diluido 1:20 ó 100 µL de calibrador (6 calibradores en total) se añadieron en una placa con pocillos tapizados con estreptavidina y anexina V biotinilada (Figura 14). Tras 1 hora de incubación a 37 °C, la placa se lavó con solución tampón de lavado (provisto por el fabricante) para eliminar el exceso de muestra. A continuación se añadieron 100 µL de factor X activado (FXa) y factor V activado (FVa) bovino, calcio y 50 µL de protrombina humana y todo se incubó durante 10 min a 37 °C. Tras la incubación se añadió 50 µL de sustrato cromogénico específico de trombina y pasados 3 min la reacción se paró con 50 µL de ácido cítrico al 2 %. El producto de la reacción da coloración la cual es proporcional a la concentración de fosfatidilserina asociada a la MPs. La intensidad de ese color generado se midió en un espectrofotómetro a 405 nm (TECAN infinite F200 pro, Männedorf, Suiza). A partir de los calibradores se elaboró una curva patrón que se utilizó para el cálculo de concentración de MPs medida en nM equivalente de fosfatidilserina (nM eq PS).

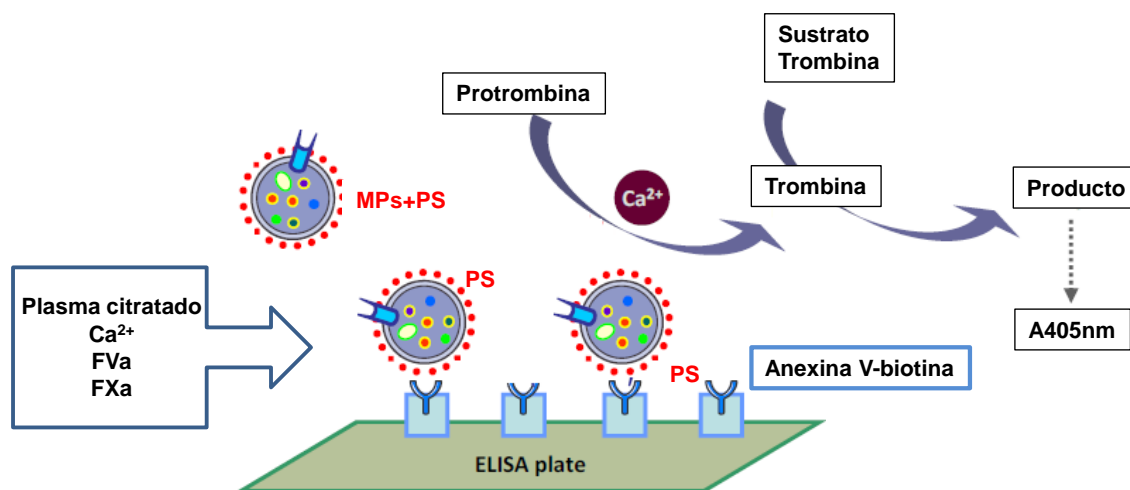


Figura 14. Medición de actividad procoagulantes de fosfolípidos asociados a MPs.
FVa: factor V activado; FXa: factor X activado.

13. Determinación de sP-selectina

Los niveles de sP-selectina se analizaron en muestras de PPP previamente descongeladas mediante ELISA tipo sándwich (Figura 15, Human sP-selectin/CD62P Quantikine R&D Systems Minneapolis, MN, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello 100 μ L de PPP (previamente diluido 1:20) ó 100 μ L de calibrador (8 en total) y 100 μ L de anticuerpo policlonal para sP-selectina conjugado con peroxidasa se añadieron en una placa de pocillos tapizados con anticuerpos monoclonales específicos para sP-selectina. Tras 1 h de incubación la muestra se lavó con una solución tamponada para eliminar el resto de muestra no unida al anticuerpo. A continuación se le añadió tetrametilbenzidina y tras 15 min, la reacción se paró con 100 μ L de ácido hidroclicórico 1 N. La lectura e interpretación de los datos se realizó de igual forma que en la determinación de la actividad procoagulante de MPs con el kit Zymuphen. Los valores se expresaron como concentración de sP-selectina (ng/mL). En la Figura 15 se representa el fundamento.

14. Determinación de FT antigénico

Los niveles de FT antigénico se determinaron en muestras de PPP previamente descongeladas por el método ELISA tipo sándwich (Figura 15, Imubind® tissue factor ELISA, Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, CT EEUU). Brevemente, 100 μ L de PPP previamente diluido 1:4 ó 100 μ L de los estándares (6 en total) se añadieron en las placas de 96 pocillos tapizadas con el anticuerpo monoclonal para FT. Tras 12 h de incubación a 4 °C el resto de muestra no unida se eliminó con lavados de solución salina (PBS, 0.1% Tritón X-

100, pH: 7,4). A continuación se agregó el anticuerpo para FT biotinilado y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Tras eluir el exceso de anticuerpo mediante lavados, se añadió la enzima conjugada estreptavidin peroxidasa se incubó durante una hora y se lavó siguiendo el procedimiento anterior. Acto seguido se añadieron 100 μ L de tetrametilbenzidina y pasados 20 minutos se paró la reacción con 50 μ L de ácido sulfúrico 0,5 M. La lectura e interpretación de los datos se realizó de igual forma que en la determinación de la actividad procoagulante de MPs utilizando el kit de Zymuphen. Los valores se expresaron en pg/mL.

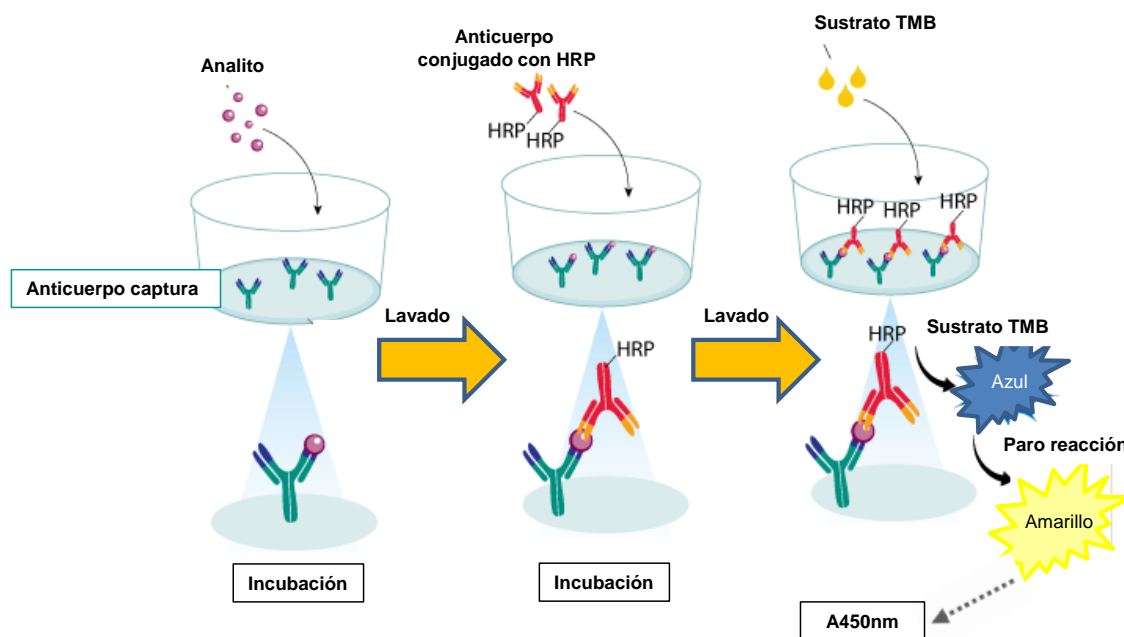


Figura 15. Esquema del fundamento del ELISA tipo sándwich.

HRP: enzima peroxidasa de rábano; TNB: tetrametilbenzidina. Adaptación de R&D Systems.

15. Determinación de dímero D

Los niveles de dímero D se analizaron en el laboratorio del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Virgen del Rocío mediante el método de dímero D Acute Care™ de Stratus® CS (Siemens Healthcare Diagnostics, Newark, DE, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este test es un ensayo tipo “sandwich two-site” doble, basado en la técnica de inmunoensayo de participación radial en fase sólida y cuyo principio es similar al descrito en la Figura 15. Para realizarlo, se añadió un anticuerpo monoclonal específico para la molécula de dímero D a la porción central de un trozo cuadrado de papel de fibra de vidrio junto con la muestra de PPP descongelada. Tras un breve periodo de incubación se agregó el anticuerpo monoclonal esta vez conjugado con una enzima que reconoce un segundo sitio antigénico específico del dímero D. Durante este periodo de

incubación, el anticuerpo conjugado reaccionó con el dímero D unido, formando un sándwich anticuerpo, antígeno, anticuerpo marcado. El anticuerpo marcado no unido se eliminó mediante lavados con una solución de lavado que incluía el sustrato de la enzima del anticuerpo conjugado iniciándose así la reacción enzimática. La tasa enzimática de la fracción unida aumentaba de forma directamente proporcional a la cantidad de dímero D presente en la muestra. La velocidad de reacción se midió mediante un sistema óptico. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g/L}$.

16. Análisis estadístico

Las variables categóricas se expresaron en forma de % y las diferencias entre grupos se compararon utilizando el test de Fisher o la Chi- cuadrado según fuera apropiado. Las variables continuas se expresaron como media \pm error estándar, como mediana e intervalo de confianza o como mediana y rango intercuartílico en función de la distribución de la muestra (normal o no normal). Para la comparación de resultados entre los grupos se utilizó el test-t de pares, el test-t de Student, la prueba U de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis con su correspondiente corrección de Bonferroni (0,0167) dependiendo del número de grupos objeto de análisis y de su distribución. La correlación bivariada de Pearson se realizó para estudiar las relaciones entre las diferentes variables. Previamente a la comparación de resultados entre los citómetros de las dos plataformas citométricas, se le aplicó a los datos una transformación logarítmica que normalizara la distribución. Para evaluar la concordancia entre los resultados se llevó a cabo el test de Bland-Altman. El análisis estadístico se realizó con la versión 22 del programa SPSS para Windows y se consideraron diferencias significativas valores de $p < 0,05$ menos cuando se aplicó la corrección de bonferroni que entonces se consideraron diferencias significativas valores de $p < 0,0167$.

V. Resultados

17. Objetivo 1: Influencia del procesamiento de las muestras sobre las propiedades de las MPs: efecto de la congelación y de la centrifugación

17.1. Efecto de la temperatura de centrifugación

Como primer paso se quiso determinar si la temperatura de centrifugación durante la preparación del PPP influía en las propiedades de MPs. Para ello se preparó PPP centrifugando a 1500 g 30 min a 4 °C ó 20 °C (protocolo 1 versus protocolo 3) y se compararon los niveles de MPs obtenidos a partir de ambos protocolos así como la capacidad procoagulante asociada a las MPs. Observamos resultados similares utilizando ambas temperaturas (protocolo 1 versus protocolo 3, Tabla 4). Lo mismo ocurrió cuando se compararon niveles y actividad funcional de MPs medidos en PPP fresco preparado mediante doble centrifugación a 2500 g 10 min a 4 °C y 20 °C (protocolo 2 versus protocolo 4, Tabla 4) o cuando las MPs se analizaron sobre PPP tras un ciclo de congelación-descongelación (Tabla4). Estos resultados demostraron que la temperatura de centrifugación no afectaba ni al número de MPs (Figura 16A) ni a su capacidad procoagulante (Figura 16B-D) independientemente de la velocidad de centrifugación o condición almacenamiento que se empleara.

Tabla 4. Efecto de la centrifugación y conservación de la muestra sobre el número absoluto de MPs circulantes y su actividad procoagulante asociada

Protocolo centrifugación	Plasma fresco			Plasma congelado			
	<i>MPs (Eventos/120 s)</i>	<i>Trombina (nM)</i>	<i>Tiempo coagulación (s)</i>	<i>MPs (Eventos/120 s)</i>	<i>Trombina</i>	<i>Tiempo coagulación (s)</i>	<i>MPs (nM eq PS)</i>
1: 1500 g, 30 min, 4 °C	3150 ± 612	21,5 ± 2,7	94 ± 2	21577 ± 2587	93,0 ± 14,9	42 ± 1	1,5 ± 0,1
2: 2x2500 g, 10 min, 4 °C	1575 ± 2591	11,4 ± 1,8	105 ± 32	8558 ± 17213	37,1 ± 5,7	61 ± 33	1,4 ± 0,1
3: 1500 g, 30 min, 20 °C	3586 ± 709	23,1 ± 4,3	90 ± 2	21142 ± 2844	80,6 ± 10,4	42 ± 2	1,6 ± 0,1
4: 2x2500 g, 10 min, 20 °C	1641 ± 300 ^a	13,4 ± 3.3 ^b	100 ± 3 ^a	9403 ± 1637 ^b	39,3 ± 7,0 ^b	59 ± 3 ^b	1,2 ± 0,1 ^b

Los datos se expresaron como media ± error estándar, n = 16-21/determinación; a: p < 0,05; b: p < 0,01 y c: p < 0,001 comparado con el protocolo 1. d: p < 0,05 y b: p < 0,001 comparado con el protocolo 3; eq PS: equivalentes de fosfatidilserina.

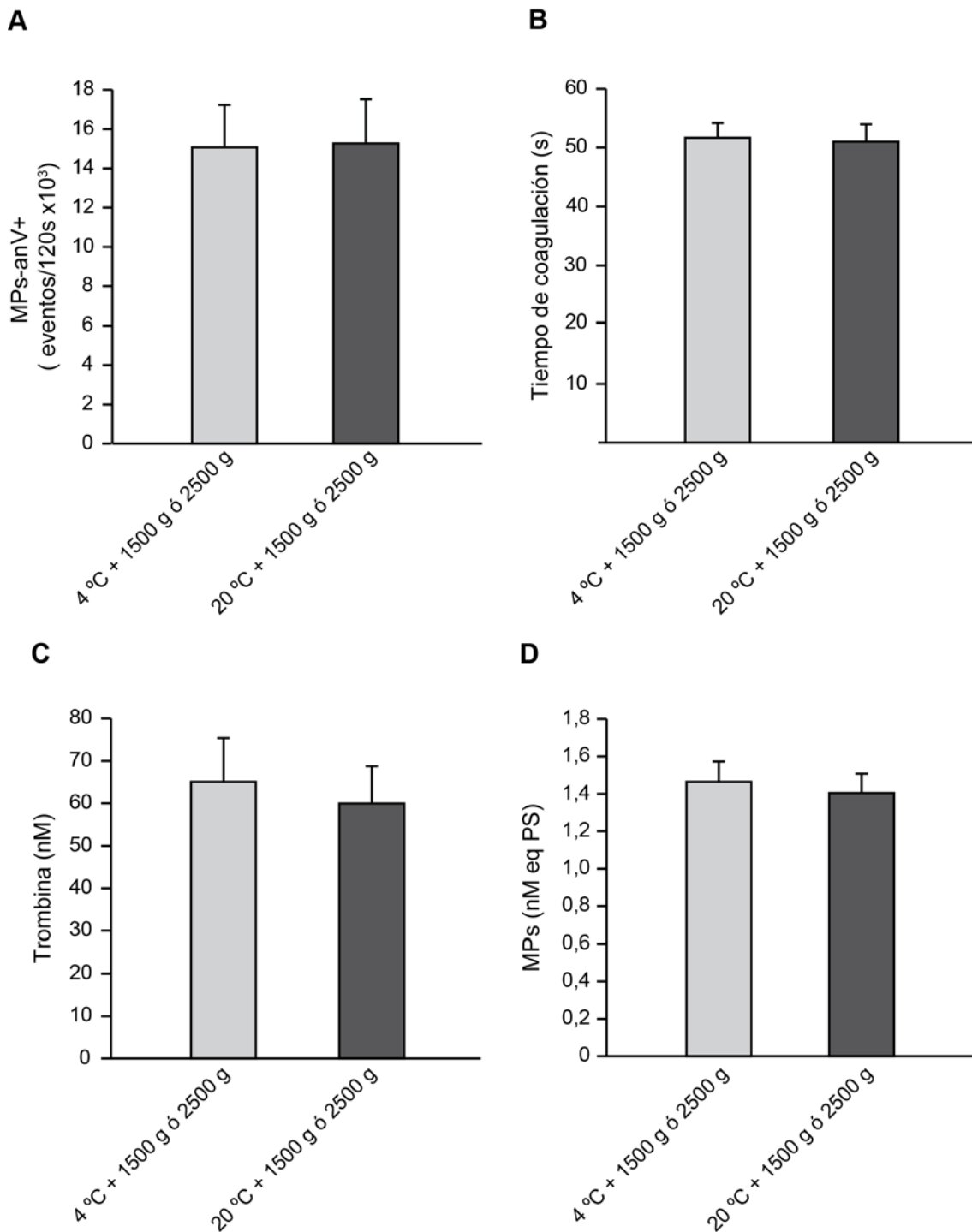


Figura 16. Efecto de la temperatura de centrifugación en los niveles de MPs circulantes y su actividad procoagulante asociada.

Se compararon las dos temperaturas de centrifugación 4 °C versus 20 °C sin tener en cuenta la velocidad de centrifugación empleada 1500 g ó 2500 g; eq PS: equivalentes de fosfatidilserina. Las barras de error indican el error estándar.

17.2. Efecto de la velocidad de centrifugación

El siguiente paso fue estudiar si la velocidad de centrifugación utilizada para la preparación del PPP afectaba al número de MPs y/o a su actividad procoagulante. Como por los resultados anteriores concluimos que la temperatura no afectaba las propiedades de las MPs, las mediciones realizadas sobre PPP fresco preparado bajo la misma velocidad de centrifugación se agruparon para este análisis. Los protocolos 1 (1500 g 30 min 4 °C) y 3 (1500 g 30 min 20 °C) se agruparon en protocolo de baja velocidad de centrifugación, mientras que los protocolos 2 (2x2500 g 10 min 4 °C) y 4 (2x2500 g 10 min 20 °C) se agruparon en protocolo de alta velocidad de centrifugación. Al comparar ambos en muestras frescas encontramos que tanto el número de MPs como la capacidad de generación de trombina eran dos veces mayores cuando se utilizaba el PPP preparado con el protocolo de baja velocidad (Figura 17A-B). El tiempo de coagulación detectado fue más corto en las muestras PPP de baja velocidad (Figura 17C).

Cambios similares se observaron cuando se compararon estos mismos protocolos (baja versus alta velocidad) con muestras de PPP tras un ciclo de congelación-descongelación (Tabla 4). Los niveles de MPs medidos en nM eq PS, otro indicador de la actividad procoagulante asociada a la MPs, se determinaron sobre PPP tras un ciclo de congelación-descongelación y se observó que también fueron mayores cuando el PPP se obtuvo a baja velocidad (Tabla 4). Estos resultados demostraban una clara asociación entre la baja velocidad de centrifugación y el mayor número y actividad procoagulante de MPs.

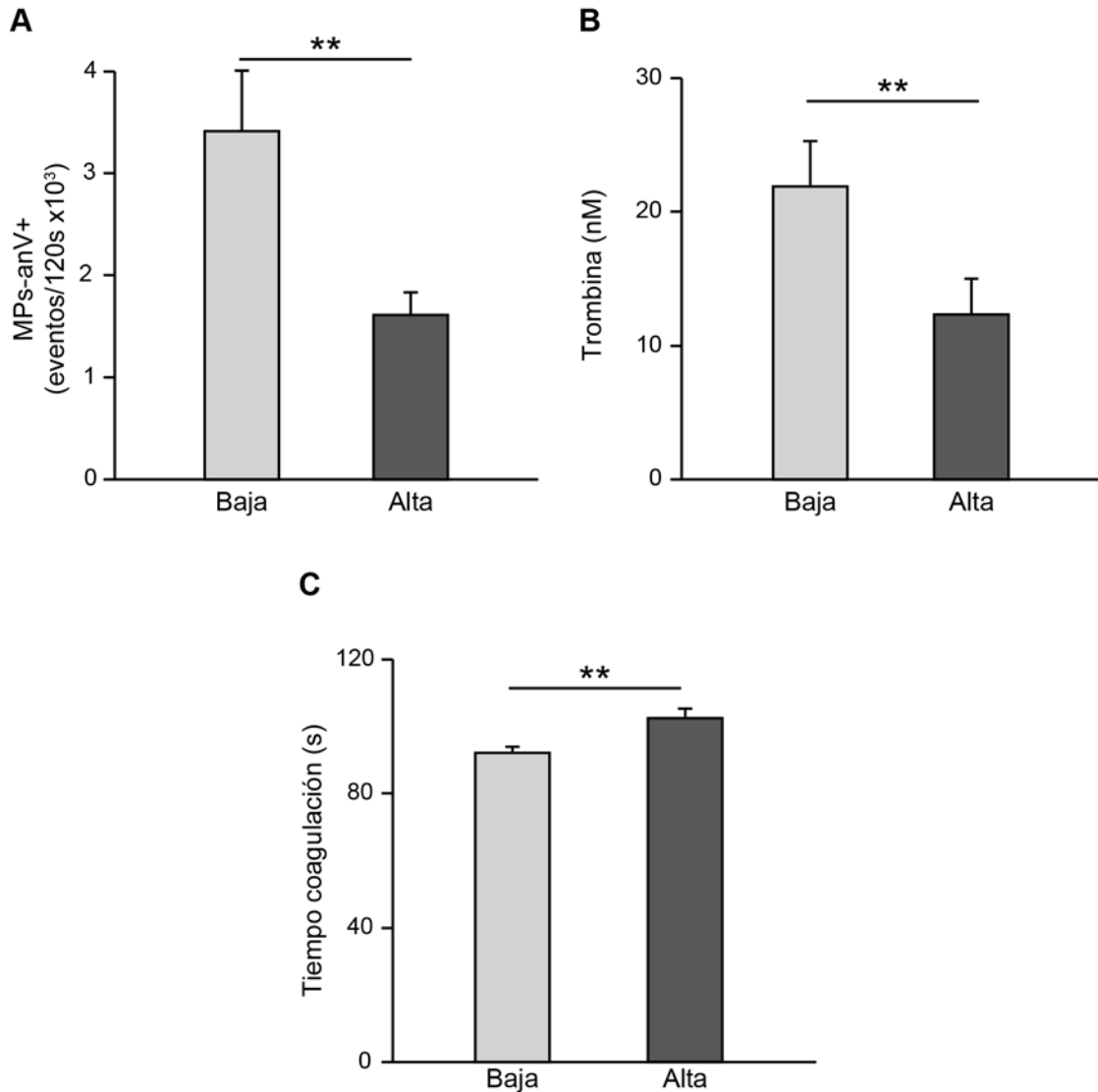


Figura 17. Influencia de la velocidad de centrifugación en los niveles de MPs circulantes y su actividad procoagulante asociada plasma fresco.

A. MPs anexina V positivas. **B.** Generación de trombina. **C.** Tiempo de coagulación. Baja: centrifugación a 1500 g 30 min; alta: doble centrifugación a 2500 g 10 min. n = 20-21 por grupo. ** p < 0,01. Las barras de error indican el error estándar.

De forma complementaria, sobre muestras de PPP congelado se estudiaron las correlaciones entre las diferentes determinaciones realizadas agrupando todos los protocolos estudiados. Se encontraron correlaciones significativas entre todas las comparaciones realizadas (Figura 18). La correlación más fuerte se encontró entre los niveles de MPs circulantes y la generación de trombina ($r = 0,77$; $p < 0,000$; Figura 18A) y entre los niveles de MPs y el tiempo de coagulación ($r = -0,76$; $p < 0,000$; Figura 18B) y la más débil entre los niveles de MPs y la concentración de nM eq PS ($r = 0,43$; $p < 0,000$; Figura 18D).

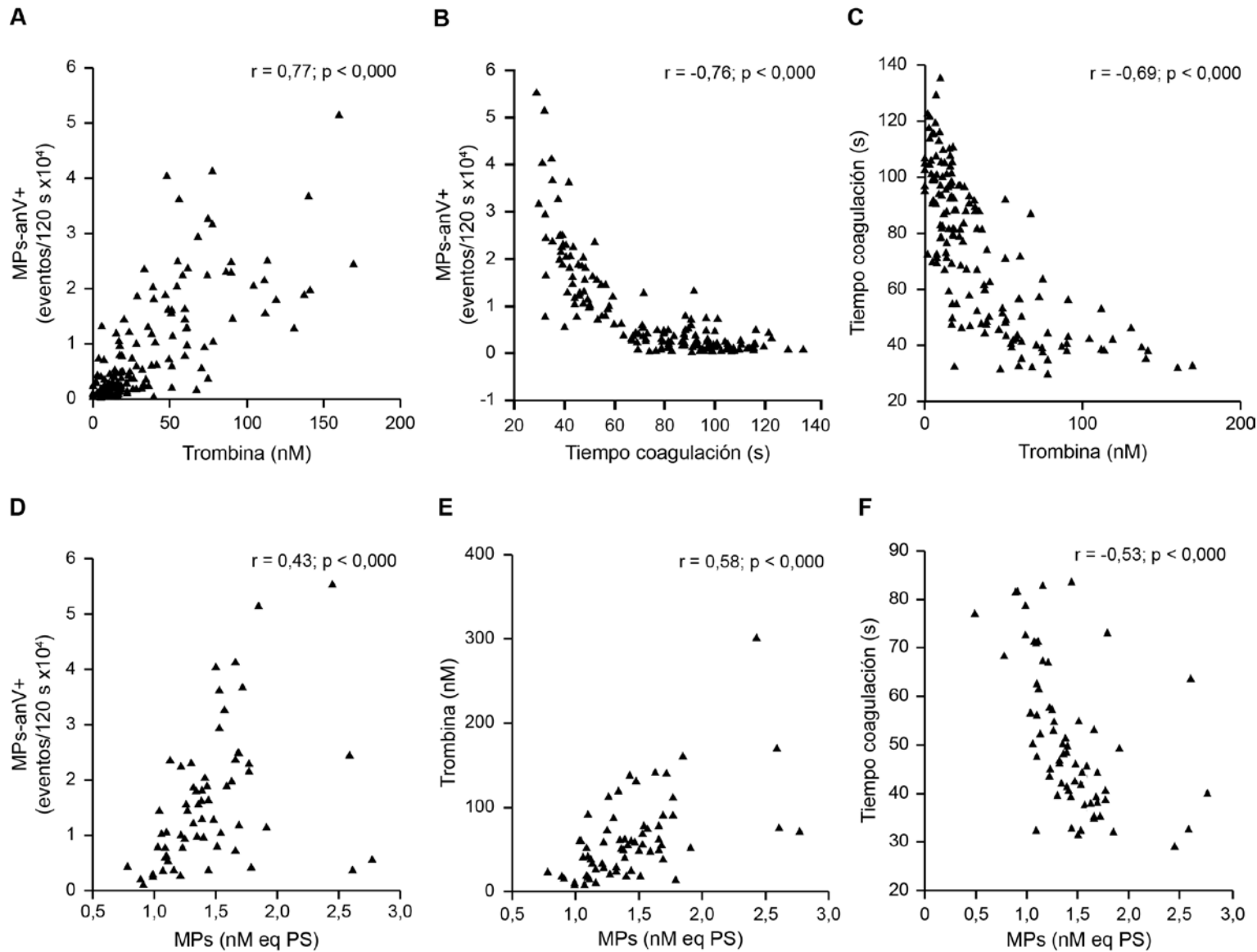


Figura 18. Correlaciones entre las determinaciones realizadas sobre plasma pobre en plaquetas (PPP) tras un ciclo de congelación-descongelación.

A. MPs versus generación trombina. **B.** MPs versus tiempo coagulación. **C.** Tiempo coagulación versus generación trombina. **D.** MPs(eventos/120s) (nM eq PS). **E.** Generación trombina versus MPs (nM eq PS). **F.** Tiempo coagulación versus MPs (nM eq PS). En el análisis se agruparon los 4 protocolos de centrifugación estudiados. eq PS: equivalentes de fosfatidilserina.

Para comprobar que la actividad procoagulante medida dependía de las MPs se determinaron niveles de MPs y generación de trombina en muestras (PLMPs) en donde gran parte de las MPs habían sido eliminadas mediante una centrifugación a 2500 g durante 2 h. Se encontró que el PLMPs presentaba una baja capacidad de generación de trombina equivalente sólo a un 6 % de la generación de trombina detectada en el PPP. También se cuantificaron niveles de MPs totales en el PLMPs y se observó que equivalían a un 5 % de las encontradas en el PPP (Figura 19). Estos resultados indicaban que la actividad procoagulante dependía en gran medida de la presencia de MPs.

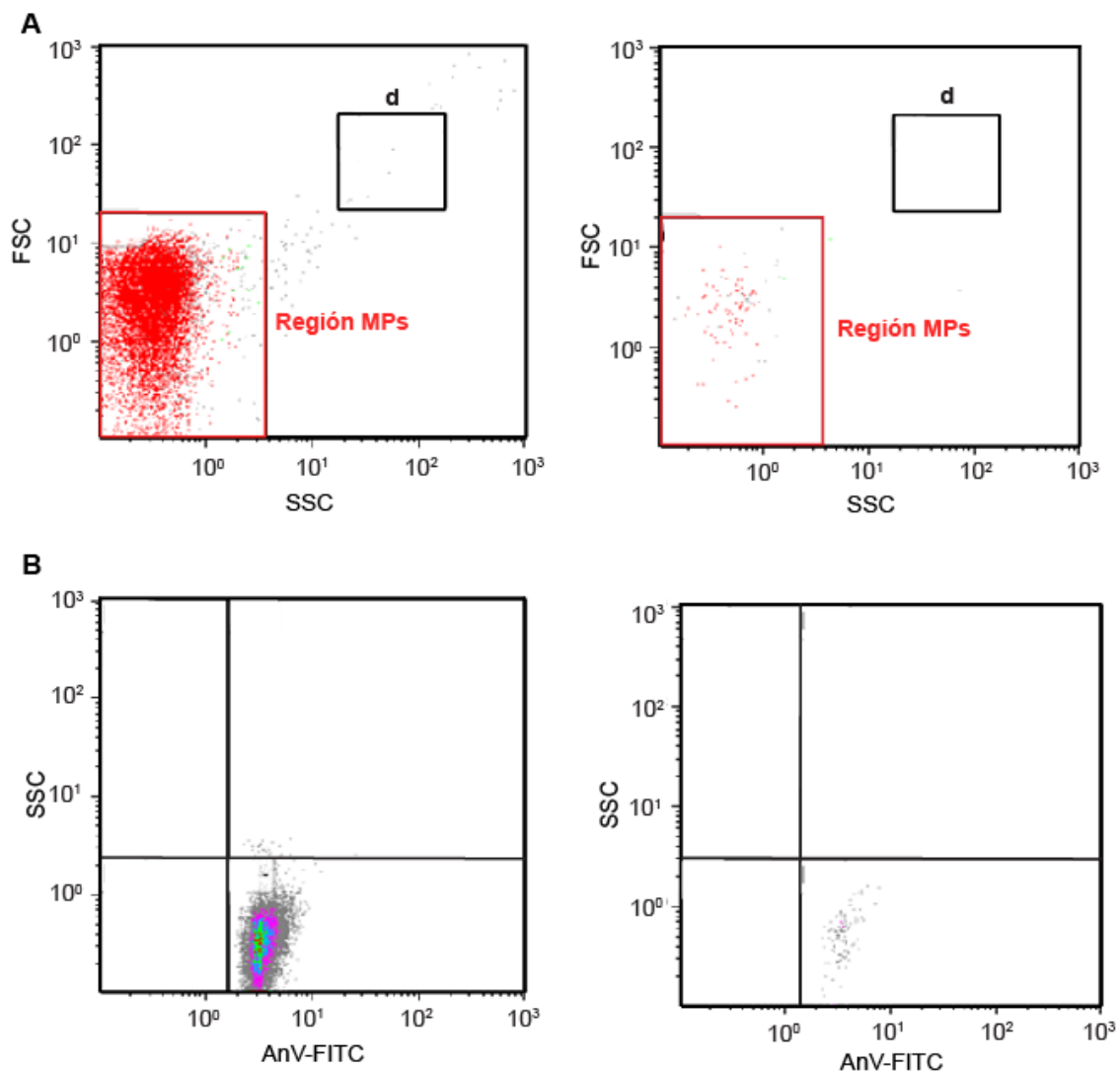


Figura 19. Niveles de MPs circulantes en plasma pobre en plaquetas (PPP) y plasma libre de micropartículas (PLMPs) determinados mediante citometría de flujo.

A. Eventos detectados dentro de la región de MPs en el PPP (panel izquierdo) versus el PLMPs (panel derecho). **B.** Niveles de MPs anexina V (anV) positivas detectados (cuadrante inferior derecho) en el PPP (panel izquierdo) versus PLMPs (panel derecho). SSC: canal para “side scattered light”; FSC: canal para “forward scattered light”; FITC; isotiocianato de fluoresceína; F: región de bolas de 0,9 μ m).

17.3. Conservación del PPP

La determinación de MPs en fresco es poco práctica y supone una limitación para muchos laboratorios clínicos. Por eso, la mayoría de ellos congelan el plasma para conservarlo antes de realizar cualquier tipo de análisis [278, 301-303]. Para evaluar si la congelación del plasma afecta a la cantidad y funcionalidad de las MPs se compararon niveles de MPs circulantes, generación de trombina y tiempo de coagulación entre PPP fresco y PPP tras un ciclo de congelación-descongelación. Como la temperatura de centrifugación no afectaba las propiedades de las MPs se agruparon los protocolos con la misma velocidad de centrifugación tal y como se realizó en el análisis de la velocidad de centrifugación. Cuando se estudió el protocolo de baja velocidad de centrifugación (1500 g 30 min) se encontró que los niveles de MPs en el PPP congelado y descongelado eran 6 veces mayores que los detectados en el PPP fresco. Un cambio similar (5,5 veces) se observó con velocidades de centrifugación más altas (2x2500g 10 min, Figura 20A). La determinación de generación de trombina también aumentó en el PPP congelado-descongelado comparado con el PPP fresco (Figura 20B). Todo ello fue acompañado de un descenso del tiempo de coagulación en determinaciones con PPP congelado-descongelado (Figura 20C).

Cuando los 4 protocolos de centrifugación se analizaron de forma individual, los resultados obtenidas eran similares a los encontrados agrupando los datos (Tabla 4). Estos resultados demostraban que la congelación-descongelación de las muestras daba lugar a un aumento del número de MPs y de su actividad procoagulante.

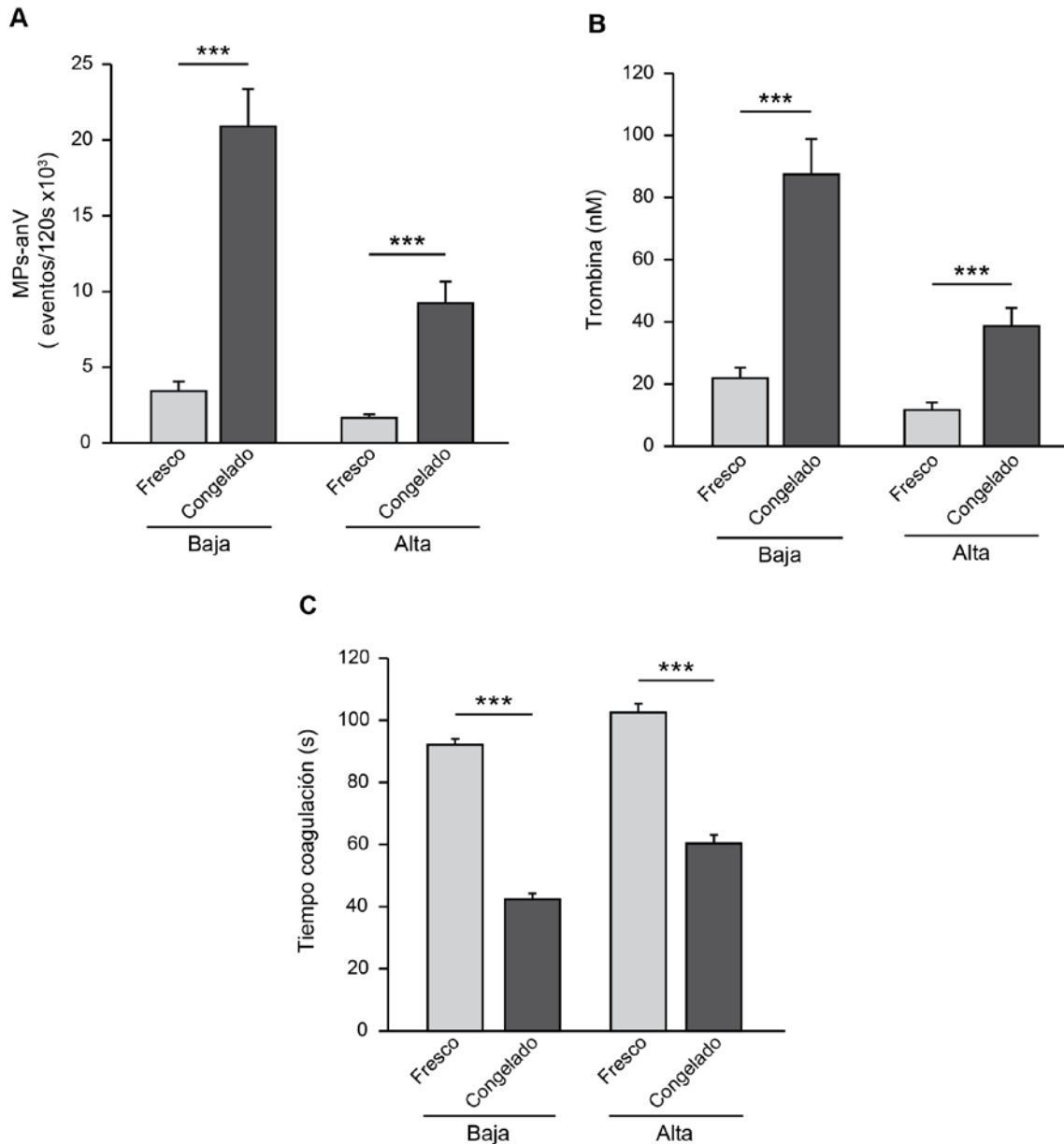


Figura 20. Influencia de la congelación del plasma pobre en plaquetas (PPP) sobre los niveles de MPs circulantes y su actividad procoagulante asociada.

A. MPs anexina V positivas. **B.** Generación de trombina. **C.** Tiempo de coagulación. Baja: centrifugación a 1500 g 30 min. Alta: doble centrifugación a 2500 g 10 min. n = 19-21 por grupo. *** p < 0,001.

18. Objetivo 2: Cuantificación de MPs en dos plataformas citométricas diferentes siguiendo una nueva estrategia de calibración

18.1. Calibración del citómetro Navios para la detección de MPs

Para calibrar el citómetro Navios de Beckman Coulter, citómetro con mayor capacidad de resolución en FS que en SS, se utilizaron las bolas Megamix-Plus FSC siguiendo

rigurosamente las recomendaciones del fabricante. Resumidamente los pasos que se realizaron fueron: i) selección de todos los parámetros citométricos en escala logarítmica y selección de adquisición en caudal de flujo bajo, ii) identificación de las bolas por fluorescencia: se creó un gráfico de puntos donde se visualizó el canal 1 de fluorescencia en el eje de abscisas y el canal de SS (SSC) en el de ordenadas. Se seleccionó el canal 1 de fluorescencia como discriminador. A continuación se adquirieron las bolas de Megamix Plus-FSC durante 1 min y se identificaron las 4 poblaciones de bolas diferenciándolas de los posibles dobletes formados (Figura 21A), iii) comprobación de la resolución del citómetro en canal de FS (FSC): se creó un histograma para FS y se visualizaron las 3 poblaciones de bolas de mayor tamaño (0,3-; 0,5- y 0,9- μm). La resolución sólo era suficiente si la distribución de la población de bolas de 0,3 μm no se solapaba con la de 0,5 μm de diámetro (Figura 21B), iv) comprobación de la proporción de bolas de 0,3-/0,5- μm con el discriminador en fluorescencia. En el histograma para FSC se seleccionaron las poblaciones de 0,3- y 0,5- μm y se comprobó que la proporción de bolas 0,3-/0,5- μm era cercana a 2 (Figura 21C), v) comprobación de la proporción de bolas de 0,3-/0,5- μm con el discriminador en FS. Se adquirieron en el citómetro las Megamix-Plus FSC durante 1 min. Se cambió el discriminador al FSC) y se ajustó el voltaje de forward hasta que la proporción de 0,3-/0,5- μm visualizada en el histograma fuera aproximadamente 1 (Figura 21D), vi) definición de la región de MPs: manteniendo el discriminador en forward en un gráfico donde se representaba el SSC versus el FSC y se definió la región de detección de MPs. El límite superior estaba delimitado por la nube de puntos de 0,9 μm de tamaño y el límite inferior por el valor de FS, seleccionado como discriminador (Figura 21E), vii) comprobación del nivel de ruido de fondo: para comprobar que el ruido de fondo del citómetro con los parámetros seleccionados era lo suficientemente bajo para la determinación de MPs, se adquirió en el citómetro agua purificada doblemente filtrada con filtros de tamaño de poro de 0,1 μm durante 1 min y se comprobó que los eventos /s recogidos por el citómetro no excedían el 50 % de la capacidad electrónica total del equipo (10000 eventos/s). Como se puede apreciar en la Figura 21A-E la calibración se realizó satisfactoriamente.

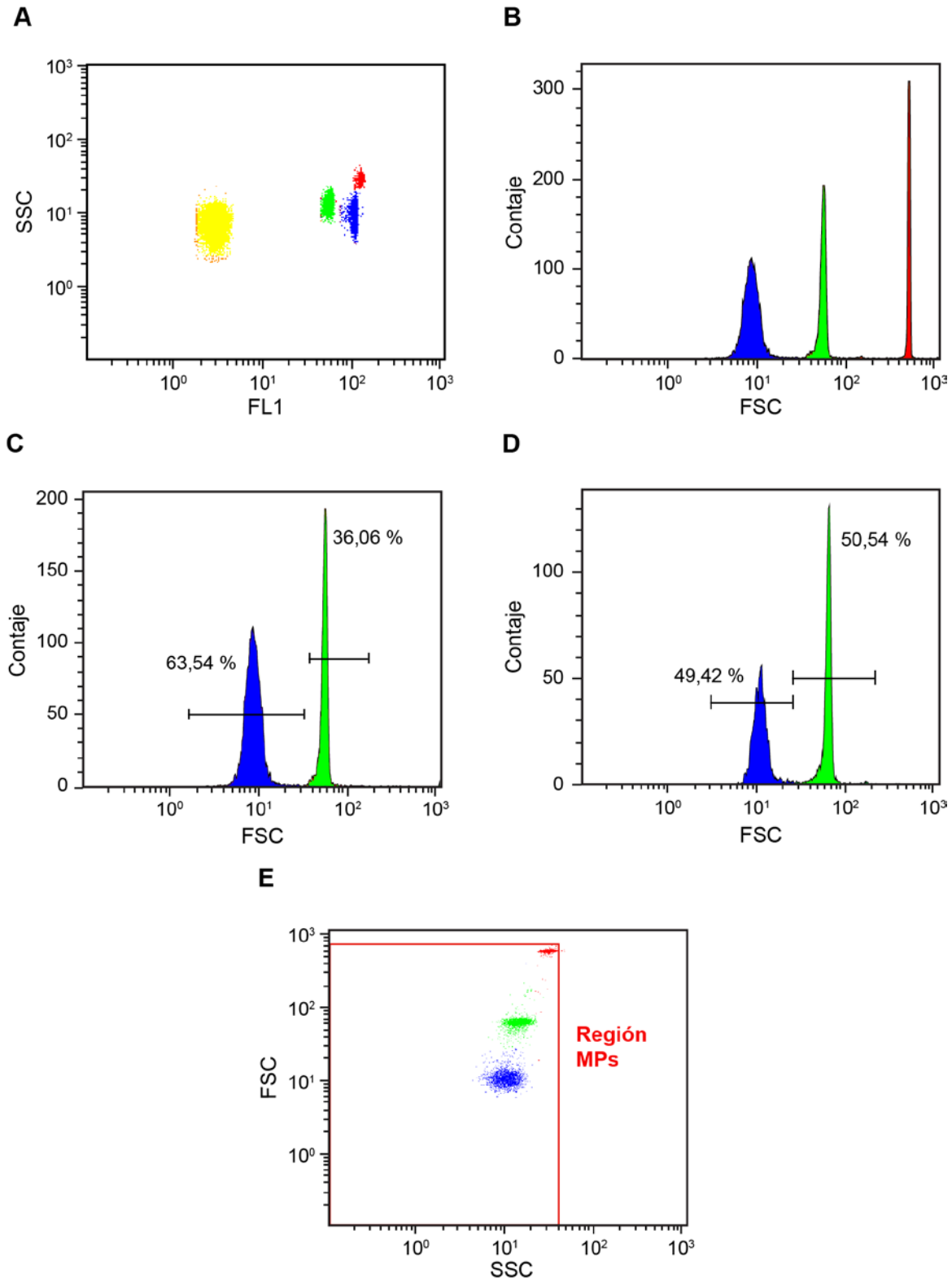


Figura 21. Calibración del citómetro Navios con una nueva estrategia para la optimización en la detección de MPs.

La calibración realizó con la combinación de bolas Megamix-Plus FSC. **A.** Gráfico de densidad con la detección de las bolas fluorescentes de calibración. **B.** Histograma en el canal de “forward scattered light” (FSC) con la distribución de las bolas de 0,3-; 0,5- y 0,9 μm . **C.** Detección de la proporción de 0,3-/0,5- μm con el discriminador en el canal de fluorescencia 1 (FL1). **D.** Detección de la proporción de bolas 0,3-/0,5- μm con el discriminador en FSC. **E.** Gráfico de densidad donde se delimita la región de MPs. 0,9 μm (nube roja); 0,5 μm (nube verde); 0,3 μm (nube azul), 0,1 μm (nube amarilla).

18.2. Calibración del citómetro LSR Fortessa para la detección de MPs

Para la calibración del citómetro LSR Fortessa de BD, citómetro con mayor capacidad de resolución en el parámetro SS que en el FS, se emplearon las bolas Megamix-Plus SSC siguiendo de nuevo rigurosamente las recomendaciones del fabricante. Resumidamente los pasos realizados fueron: i) selección de todos los parámetros en escala logarítmica, selección de la señal de detección en pico y selección de adquisición en caudal de flujo bajo, ii) identificación de las bolas de fluorescencia: se seleccionó el discriminador en el canal de fluorescencia para FITC y se creó un gráfico de puntos donde se visualizara el canal de fluorescencia para FITC en el eje de abscisas y el SSC en ordenadas. Se adquirieron las bolas Megamix-Plus SSC durante 1 min y se identificaron las diferentes subpoblaciones de bolas descartando los dobletes (Figura 22A), iii) comprobación de la resolución de SS: en un histograma para el canal de SS, se visualizaron las 4 subpoblaciones de bolas. La resolución era suficiente sólo si la distribución de las poblaciones no se solapaban entre sí (Figura 22B), iv) comprobación de la resolución de FS y definición de la región de MPs: en un gráfico de puntos representando FS en el eje de abscisa y SS en el de ordenadas, se ajustó el voltaje de forward de forma que la mayor parte de las bolas, fuera cual fuera su tamaño, se encontraran situadas entre la segunda y la cuarta década del eje de abscisas. A continuación se definió la región de detección de MPs, el límite superior se delimitó por el final de la nube de puntos de las bolas de 0,5 μm de tamaño y el límite inferior por el final de la nube de puntos de las bolas de 0,16 μm de tamaño (Figura 22H), v) cambio de discriminador de fluorescencia a SS: se adquirieron las bolas Megamix-Plus SSC durante 1 min. Se cambió el discriminador a SS (este valor del discriminador se calculó en función de la distribución de las bolas de 0,16- y 0,20- μm de diámetro en el histograma de SS comentado anteriormente (en el apartado iii) y aplicando la siguiente fórmula: valor del discriminador del SSC = mediana bolas de 0,16 μm + [0,3 x (mediana bolas 0,20 μm - mediana bolas 0,16 μm)]. Al cambiar el discriminador las bolas de 0,16 μm dejaban de visualizarse aunque se mantuvo el límite inferior en el final de las bolas de 0,5 μm de tamaño, vi) verificación del ruido de fondo del equipo: para comprobar que el ruido de fondo del Fostessa en estas condiciones era lo suficientemente bajo para la adecuada detección de MPs, agua ultrapura doblemente filtrada con filtros de 0,1 μm se adquirió en el citómetro durante 1 min y se comprobó que la tasa de eventos / s detectados no excedía el 50 % de la capacidad electrónica máxima del citómetro (8000 eventos/s). Como se puede apreciar en la figura 22A-C la calibración se realizó satisfactoriamente.

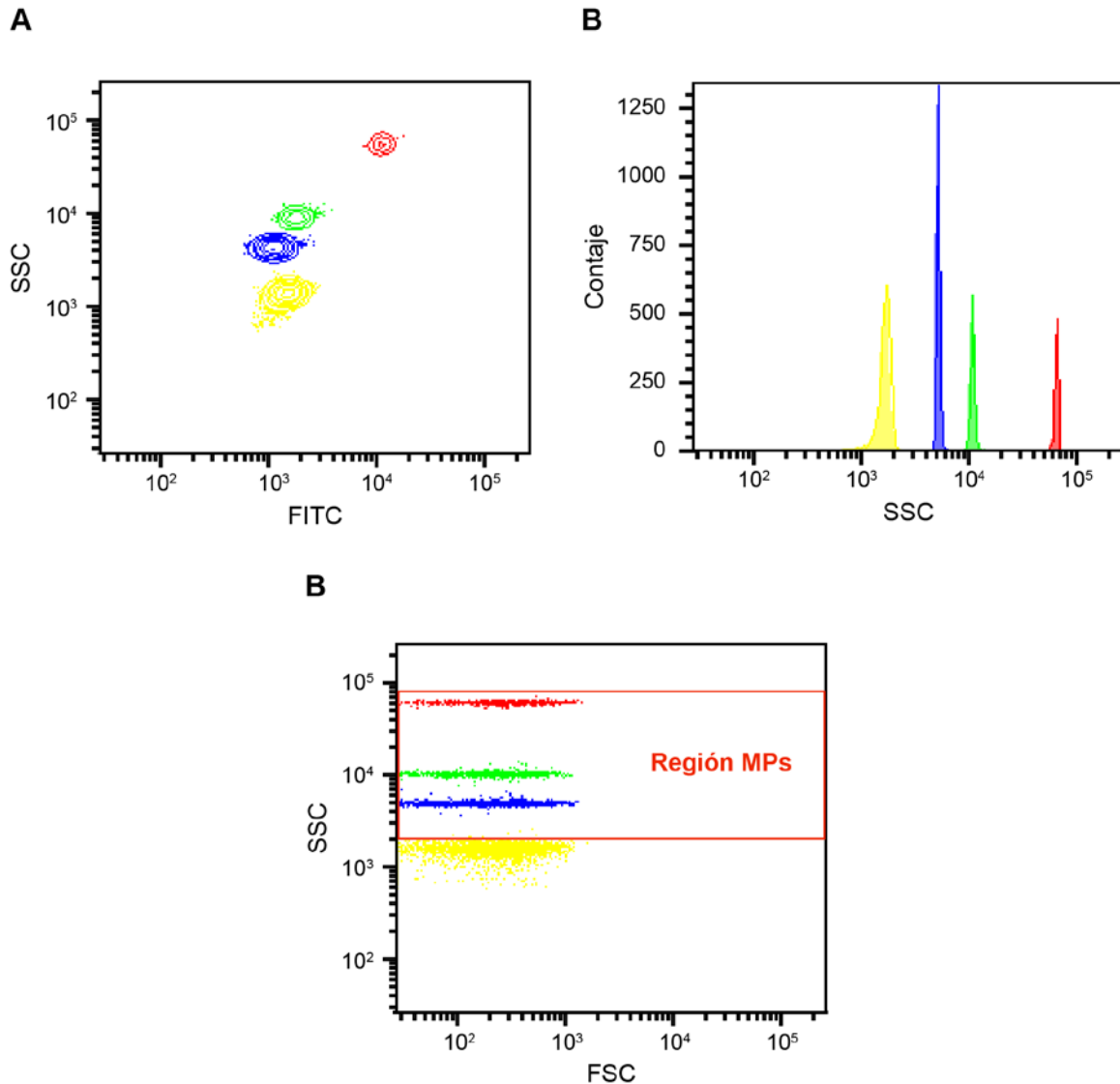


Figura 22. Calibración del citómetro LSR Fortessa utilizando una nueva estrategia para optimizar la detección de MPs.

La calibración del citómetro se llevó a cabo utilizando la combinación de bolas Megamix-Plus SSC. **A.** Gráfico de densidad con la detección de las bolas fluorescentes de calibración. **B.** Histograma en el canal de “side scattered light” (SSC) con la distribución de las bolas de 0,16-; 0,20-; 0,24- y 0,5- μ m. **C.** Gráfico de puntos donde se delimita la región de MPs colocando el discriminador en el canal de fluorescencia para el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Bolas de 0,5 μ m (nube roja); 0,24 μ m (nube verde); 0,20 μ m (nube azul); 0,16 μ m (nube amarilla).

18.3. Cuantificación de niveles de MPs totales y PMPs

Niveles de MPs totales y PMPs de los mismos pacientes se midieron tanto en el citómetro Navios como en el LSR Fortessa. La figura 23A-B muestra cómo se identificaron las PMPs en cada citómetro a modo de ejemplo. Cuando se compararon los niveles de MPs circulantes, se encontraron diferencias significativas en los valores absolutos de MPs totales (26987 ± 2845 versus 15411 ± 1733) y PMPs (21565 ± 2620 versus 13063 ± 1615) entre el Navios y el Fortessa tal y como se muestra en la figura 23C. Estos resultados demostraban que la

comparación absoluta entre citómetros de con diferentes propiedades ópticas (diferente capacidad de resolución en FS y SS) no era posible con la metodología empleada.

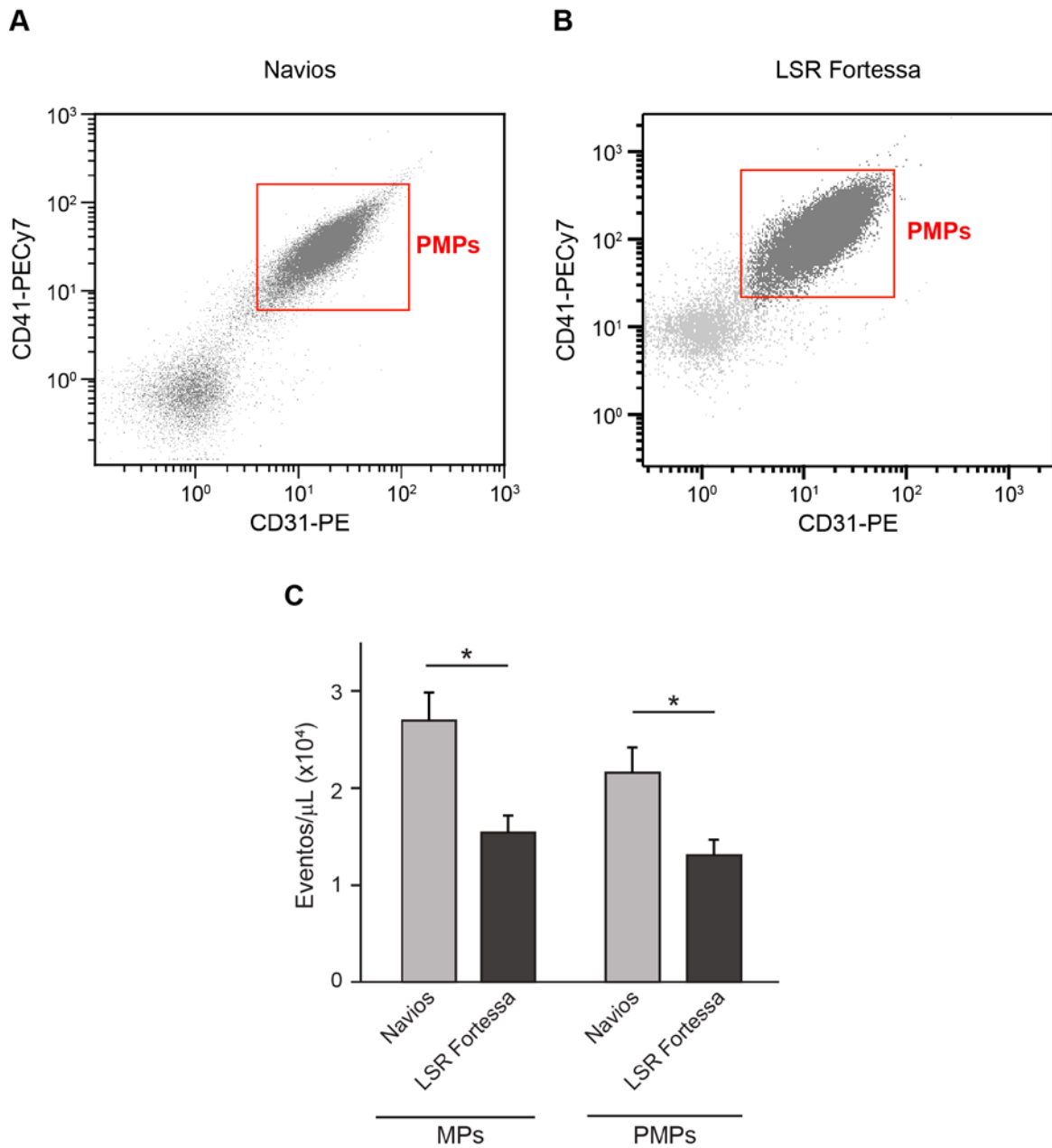


Figura 23. Cuantificación de las MPs de procedencia plaquetar (PMPs) en dos tipos diferentes de citómetro.

(A,B) Gráficos representativos de fluorescencia donde se visualizan las PMPs. **A.** Análisis de las PMPs en el citómetro Navios previamente calibrado. **B.** Análisis de las PMPs en el citómetro LSR Fortessa previamente calibrado. Se consideraron PMPs a las MPs doble positivas para CD31-PE y CD41-PECy7, en ambos paneles sólo se muestran los eventos recogidos dentro de la región de MPs establecida positivos para anexina V-FITC. FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina. **C.** Contaje absoluto de MPs totales y PMPs, los resultados se expresaron como media y error estándar (barra de error). $n = 65$; $* p < 0,05$.

A pesar de la diferencia en el número de MPs circulantes detectados en cada citómetro, cuando se compararon los valores absolutos de ambas poblaciones de MPs, observamos una fuerte correlación entre los valores de MPs totales ($r = 0,908$; $p < 0,01$; Figura 24A) y entre los valores de PMPs obtenidos en ambos citómetros ($r = 0,910$; $p < 0,01$; Figura 24B). Se evaluó la concordancia de los resultados obtenidos en las dos plataformas de citometría por el método de Bland-Altman y se observó que la mayoría de los valores se encontraban dentro del 95 % del límite de concordancia para cada comparación (media de las diferencias $\pm 1,96$ la desviación estándar de la diferencia, Figura 24C).

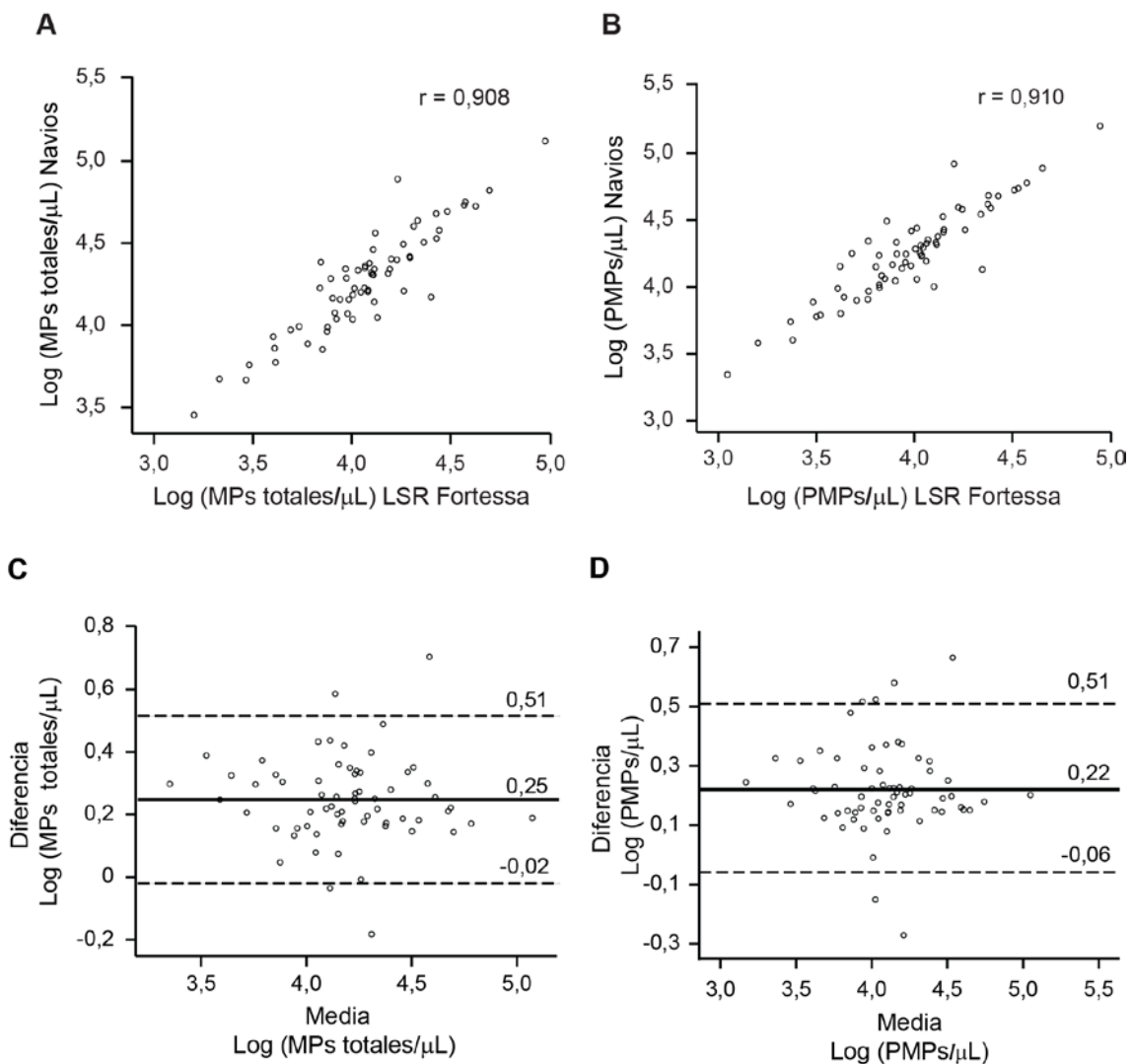


Figura 24. Correlación de los niveles de MPs circulantes entre ambas plataformas citométricas.

(A,B) Comparación de los niveles de MPs totales (A) y de los niveles de MPs de procedencia plaquetar PMPs (B) medidos en muestras del mismo paciente utilizando el citómetro LSR Fortessa o el Navios; r: correlación de Pearson. (C, D) Análisis de la concordancia en el conteo de MPs entre ambos citómetros utilizando el test de Bland-Altman. Línea negra: diferencia de la media; línea punteada: $\pm 1,96$ veces la desviación estándar. $n = 65$.

19. Objetivo 3: Caracterización fenotípica diferencial de MPs en dos grupos de pacientes, diagnosticado de ETV y diagnosticados de cáncer

La figura 25 muestra un diagrama de flujo con la inclusión de los pacientes. La población de estudio estaba formada por dos grupos, uno incluía 96 pacientes con cáncer sin ETV y otro 138 pacientes con ETV sin diagnóstico de cáncer. Estos pacientes fueron seleccionados a partir de dos cohortes de pacientes, una de ETV y otra de cáncer a las cuales se les realizó un seguimiento de 1 año. Aquellos pacientes con ETV que durante el seguimiento desarrollaron cáncer y aquellos pacientes con cáncer que durante el seguimiento fueron diagnosticados de ETV no se incluyeron en nuestra población de estudio, otros criterios de inclusión y exclusión fueron especificados en el apartado de métodos. También se incluyó un grupo de 14 sujetos sanos a modo de referencia. La tabla 5 muestra las características clínicas y demográficas de las 3 poblaciones de estudio.

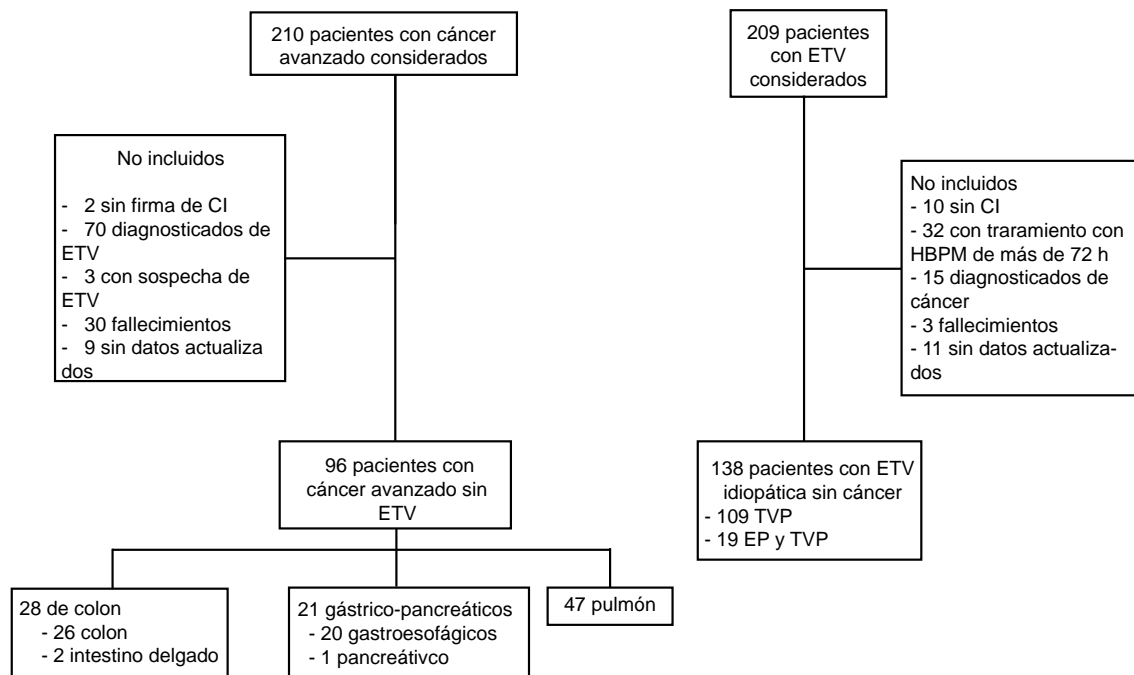


Figura 25. Diagrama de flujo con la inclusión de los pacientes en el estudio.

CI: consentimiento informado; HBPM: heparina de bajo peso molecular; TVP: trombosis venosa profunda; EP: embolia pulmonar.

Tabla 5. Características clínicas y demográficas de los tres grupos de estudio.

Característica	Sanos	ETV	Cáncer	Valor P
Edad (años)	41 (20)	67 (23)	63 (13)	0,54
IMC (kg/m²)	23 (5)	30 (7)	26 (6)	< 0,001*
Hombre	5 (35,7)	77 (55,8)	67 (69,8)	< 0,001*
Fumador	13 (92,9)	48 (34,8 %)	62 (64,6 %)	< 0,001*
Consumidor de alcohol	0 (0)	12 (8,7 %)	25 (26,0 %)	< 0,001*
Hipertensión	0 (0)	72 (52,2 %)	29 (30,2 %)	< 0,001*
Dislipemia	1 (7,1)	39 (28,3 %)	25 (26 %)	0,767
Diabetes	0 (0)	19 (13,8 %)	17 (17,7 %)	0,463
Enfermedad respiratoria	1 (7,1)	31 (22,5 %)	18 (18,8 %)	0,518
EPOC	0 (0)	12 (8,7 %)	13 (13,6 %)	0,038*
Asma	1 (7,1)	8 (5,8 %)	1 (1,0 %)	0,127
Tuberculosis	0 (0)	2 (1,4 %)	2 (2,1 %)	0,618
Bronquiectasias	0 (0)	3 (2,2 %)	0 (0 %)	0,288

En la tabla se reflejan los datos afirmativos correspondientes para cada variable. Las variables cuantitativas están expresadas como media y (rango intercuartílico) y las variables cualitativas como n y (%). Sólo se indica el valor de p para la comparación entre trombosis y cáncer. IMC: índice de masa corporal; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; SAOS: síndrome de apnea obstructiva del sueño; n sanos = 14; n ETV = 138; n cáncer = 96; * indica valor de p con significación.

Característica	Sanos	ETV	Cáncer	Valor P
<i>Enfermedad inflamatoria intestinal</i>	0 (0)	3 (2,2 %)	1(1 %)	0,646
SAOS	0 (0)	4 (2,9 %)	2 (2,1 %)	1
<i>Enfermedad arterial periférica</i>	0 (0)	2 (1,4 %)	4 (4,2 %)	0,231
<i>Dispesia</i>	1 (7,1)	6 (4,3 %)	1 (1 %)	0,245
<i>Insuficiencia cardiaca crónica</i>	0 (0)	1 (0,7 %)	3 (3,1 %)	0,308
<i>Artritis</i>	0 (0)	6 (4,3 %)	1 (1,0 %)	0,245
<i>Artrosis</i>	0 (0)	16 (11,6 %)	1 (1,0 %)	0,002*
<i>Enfermedad renal crónica</i>	0 (0)	10 (7,2 %)	6 (6,3 %)	1
<i>Trastornos neurológicos</i>	0 (0)	21 (15,2 %)	7 (7,3 %)	0,1

Tabla 5. (continuación).

En el grupo de ETV se encontraron pacientes con un mayor índice de masa corporal (IMC) y mayor frecuencia de hipertensión arterial y de artrosis que en el grupo de cáncer (Tabla 5). Entre los pacientes con ETV, 86 de los 138 (62,3 %) habían recibido tratamiento con HBPM dentro de las 72 h previas a la obtención de muestra, 72 de esos 86 (83,7 %) fueron tratados con enoxaparina. Por el contrario, el grupo de cáncer estaba formado en su mayoría por hombres, fumadores activos, consumidores regulares de alcohol y con mayor prevalencia de EPOC que los pacientes del grupo de ETV (Tabla 5). El 86,5 % de los pacientes oncológicos (83/96) presentaron un grado avanzado de progresión de la enfermedad (estadio IV) y se encontraban bajo tratamiento con agentes quimioterápicos. Dentro de éstos, el 3,1 % (3/96) había recibido en el mes previo, a la inclusión del estudio, quimioterapia y radioterapia de forma conjunta.

19.1. Caracterización y comparación de los niveles de MPs en pacientes con ETV y pacientes con cáncer

Estudio de MPs circulantes totales y su procedencia celular

Para caracterizar e identificar un perfil de MPs que permitiera discriminar entre pacientes con ETV y pacientes con cáncer, comparamos la mediana e intervalo de confianza (IC) de los niveles de MPs totales, EMPs, PMPs y LMPs obtenidos en cada grupo (ETV, cáncer y sanos). Ambos grupos de pacientes presentaron niveles de MPs totales claramente más elevados que el grupo de sujetos sanos (Figura 26A) y aunque los valores de mediana se encontraban ligeramente más elevados en el grupo de cáncer que en el de ETV, estadísticamente no se encontró que esta elevación fuera determinante (Figura 26A). Las PMPs presentaban un comportamiento similar a las MPs totales, se detectaron niveles claramente más elevados en los pacientes que en los sanos pero no existían diferencias importantes entre la ETV y el cáncer, únicamente se observó una ligera elevación del valor de mediana del grupo oncológico (Figura 26B). Las EMPs y LMPs también se encontraron marcadamente más elevadas en los pacientes que en los sujetos sanos, sin embargo, ambas subpoblaciones de MPs seguían un patrón similar entre el grupo de cáncer y el grupo de tromboticos, aunque al contrario que en el caso de las PMPs, la ligera elevación del valor de mediana recaía sobre el grupo de ETV tanto para las EMPs como para las LMPs (Figura 26C-D).

Estudio de MPs circulantes con exposición de FT o PSGL1 en su membrana celular

Se estudiaron los niveles de MPs que expresaran FT o PSGL1 a nivel de membrana y se compararon las medianas e IC obtenidos para los 3 grupos (ETV cáncer y sanos). Ambas poblaciones de pacientes presentaron mayores niveles de MPs+FT que el grupo de sujetos sanos. En la estimación por IC no se encontraron diferencias con evidencia estadística entre el grupo de cáncer y el de ETV. Sin embargo, el valor de mediana para las MPs+FT en el grupo de ETV era aproximadamente un 50 % superior al valor obtenido en el grupo de cáncer (Figura 27A). Por ello se realizó un segundo análisis comparando las medianas y rangos intercuartílicos de las MP+FT entre ambos grupos una vez ajustadas por aquellas variables que en el análisis bivariado presentaron diferencias significativas (género, hábito tabáquico, consumo de alcohol, hipertensión, EPOC, artrosis e IMC, Tabla 5). En este análisis se encontraron niveles de MPs+FT significativamente más elevados en los pacientes diagnosticados de ETV que en los diagnosticados de cáncer ($p = 0,027$; Figura 27B). Esta

diferencia significativa no se mantuvo cuando se estudió la procedencia endotelial o plaquetar de las MPs+FT. Ambos grupos de pacientes seguían un patrón casi idéntico en las PMPs+FT tanto en valores de mediana como de rango intercuartílico (Tabla 6). Los niveles de EMPs+FT fueron casi indetectables en los 3 grupos (Tabla 6). En cuanto a las MPs+PSGL1, no se encontraron diferencias ni en los niveles totales ni en los niveles de LMPs+PSGL1 entre el grupo de ETV y el de cáncer. Tampoco se observaron cambios sustanciales de estas poblaciones de MPs entre los grupos de pacientes y el grupo de sujetos sanos (Tabla 7).

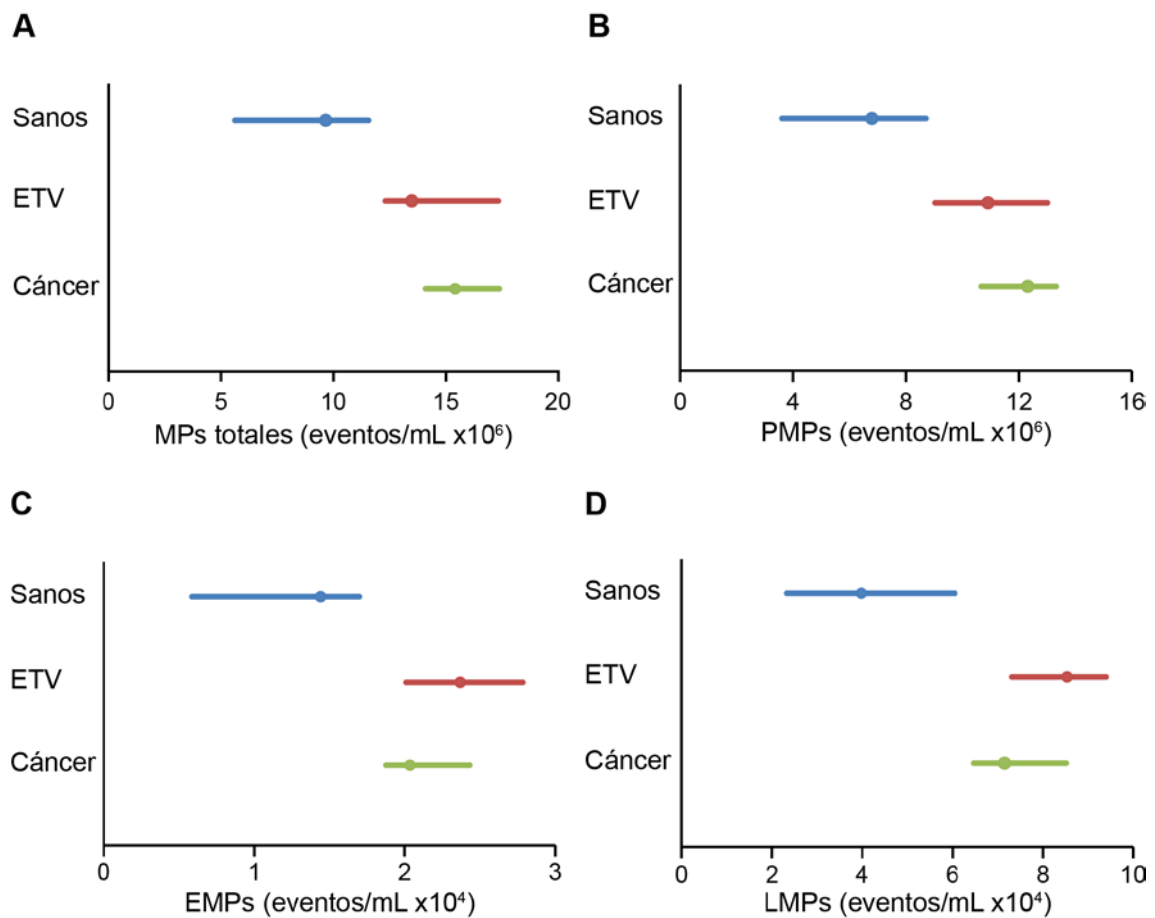


Figura 26. Perfil de MPs totales y su procedencia celular en los diferentes grupos de estudio. A. MPs circulantes totales. **B.** MPs circulantes de procedencia plaquetar (PMPs). **C.** MPs circulantes de procedencia endotelial (EMPs). **D.** MPs de circulantes de procedencia leucocitaria (LMPs). Los resultados se expresaron como mediana (círculo) e intervalo de confianza (barra horizontal).

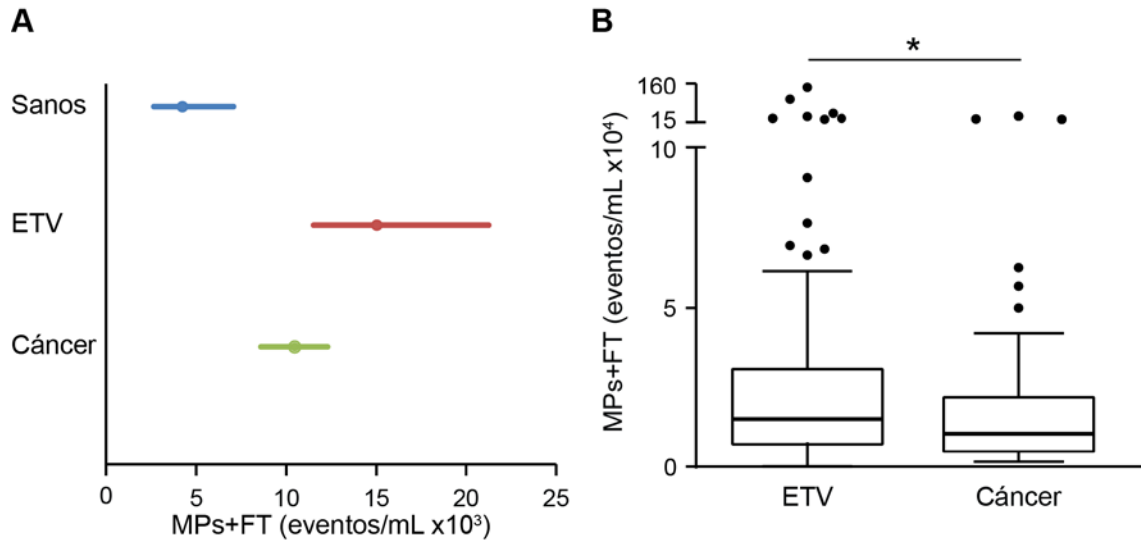


Figura 27. Perfil de MPs con factor tisular (MPs+FT) en el grupo de ETV versus el grupo de cáncer.

A. Representación mediana (círculo) e intervalos de confianza barra horizontal). **B.** Representación de la mediana (línea horizontal dentro de la caja) y 1,5 veces rango intercuartílico (bigotes); percentil 25 y 75 (líneas horizontales extremo inferior y superior de la caja); círculos negros: “outliers”/valores extremos; * $p < 0,05$.

Tabla 6. MPs con factor tisular (MPs+FT) y su procedencia celular

Población MPs	ETV	Cáncer	Valor p
<i>MPs+FT</i>	15021 (23524)	10462 (17043)	0,027
<i>EMPs+FT</i>	0,00 (526)	0,00 (419)	0,160
<i>PMPs+FT</i>	3389 (9465)	3981 (7532)	0,857

Los resultados se expresaron como mediana (rango intercuartílico), n ETV = 138, n cáncer = 96. EMPs+FT: MPs+FT con origen en el endotelio; PMPs+FT: MPs+FT de origen plaquetar.

Tabla 7. Perfil de MPs con glicoproteína ligando 1 de P-selectina (MPs+PSGL1) y su procedencia celular

Población MPs	Sanos	ETV	Cáncer
MPs+PSGL1	3613 (0 ;6506)	4383 (3740; 5093)	5149 (3895; 6851)
LMPs+PSGL1	1143 (0; 1707)	1654 (1237; 2057)	1772 (1470; 1911)

Los resultados se expresaron como mediana, (intervalo de confianza inferior; superior)
 LMPs+PSGL1: MPs+PSGL1 de procedencia leucocitaria; n sanos = 14; n ETV = 138, n
 cáncer = 96.

19.2. Caracterización y comparación de los niveles de MPs en pacientes con ETV versus pacientes con diferentes subtipos de cáncer

Estudio de MPs circulantes totales y su procedencia celular

Para estudiar si existía alguna diferencia entre el perfil de MPs de los pacientes con ETV y algún subtipo concreto de cáncer, los pacientes oncológicos se clasificaron en tres subgrupos de acuerdo con la localización de la neoplasia (pulmón, gástrica o pancreática y de colón). Se compararon los valores de las MPs totales, EMPs, LMPs y PMPs obtenidos en dichos subgrupos con los obtenidos en el grupo de ETV. En los 3 subtipos de cáncer encontramos niveles de MPs totales marcadamente más elevados que en los sujetos sanos (Figura 28A). Entre el grupo de cáncer y el de ETV por estimación de los IC no se encontraron diferencias con suficiente evidencia estadística aunque sí encontramos que los 3 subtipos de cáncer presentaron valores de MPs totales ligeramente más elevados que el grupo de ETV, especialmente aquellos pacientes con cáncer gástrico o pancreático cuyo valor de mediana era aproximadamente un 33 % mayor que la de los pacientes con trombosis (Figura 28A). En cuanto a la procedencia de las MPs, en los orígenes celulares estudiados (endotelial, leucocitario y plaquetar) no se encontró un patrón que permitiera diferenciar entre alguno de los subgrupos de cáncer y el grupo de ETV (Figura 28B-D). Cabe mencionar que en el caso de las EMPs y LMPs los valores de mediana obtenidos para los subgrupos de cáncer de pulmón y cáncer de colon se encontraban ligeramente por debajo del valor obtenido para el grupo de ETV, mientras que en el subgrupo de gástrico-pancreáticos los niveles de estas MPs se encontraban levemente más elevados en estos pacientes que en los trombóticos (Figura 28B-C). En el caso de las PMPs el patrón era diferente, sin llegar a una evidencia estadística los niveles de PMPs se encontraron más elevados en los 3 subgrupos de cáncer

que en los pacientes con ETV especialmente en los gástrico-pancreático cuyos valores de PMPs eran los más elevados de todos los grupos (Figura 28D).

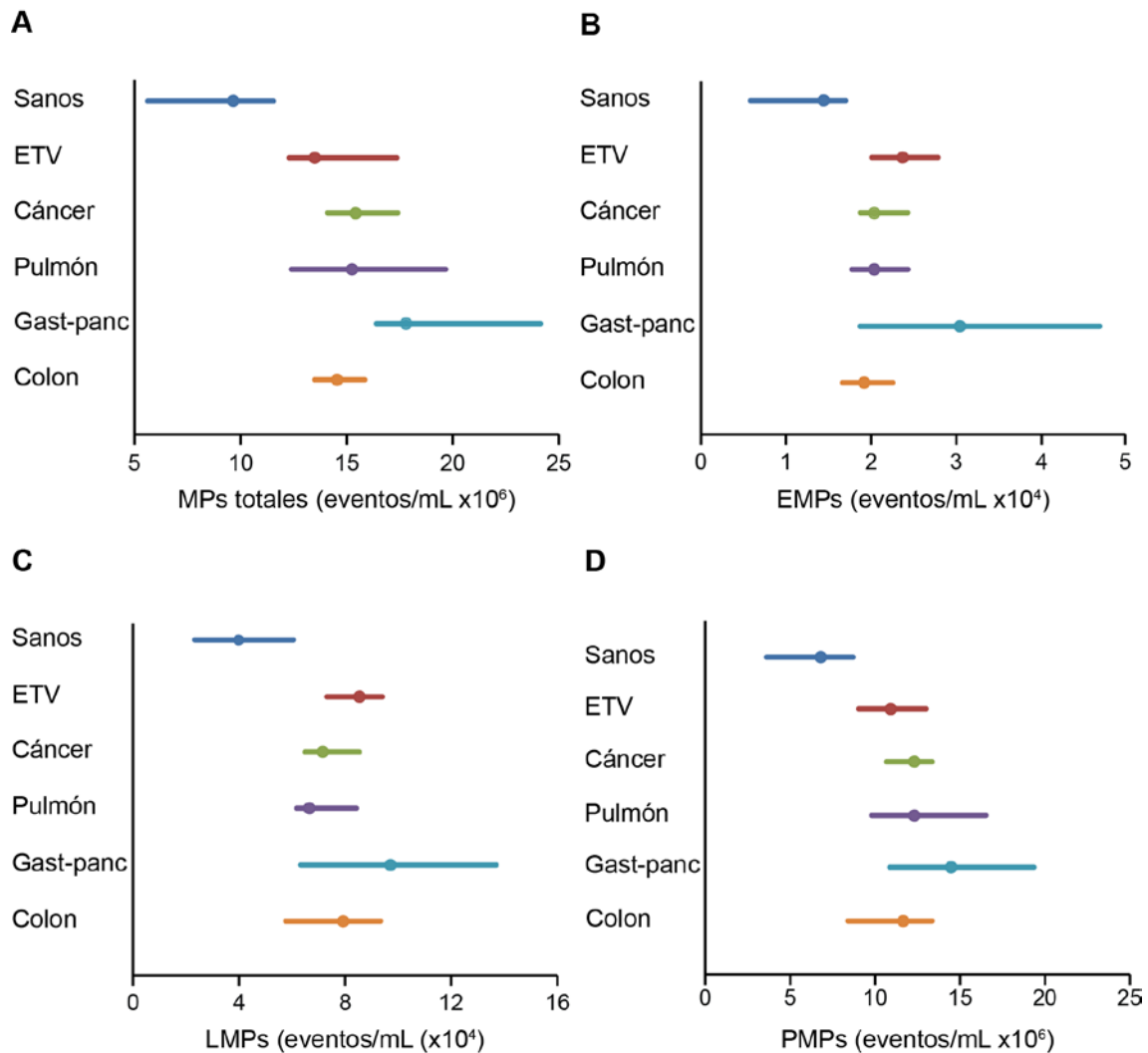


Figura 28. Perfil de MPs totales y su procedencia celular en los subgrupos de cáncer y en el grupo de ETV.

A. MPs circulantes totales. **B.** MPs circulantes de procedencia endotelial (EMPs). **C.** MPs circulantes de procedencia leucocitaria (LMPs). **D.** MPs de circulantes de procedencia plaquetar (PMPs). Los resultados se expresaron como mediana (círculos) e intervalo de confianza (barra horizontal).

Pulmón: cáncer de pulmón; Gast-panc: cáncer gástrico o pancreático; Colon: cáncer de colon.

Estudio de MPs circulantes con exposición de FT o PSGL1 en su membrana celular

Se compararon los valores para MPs+FT y MPs+PSGL1 entre los diferentes subgrupos de cáncer y el grupo de ETV. Se observó en los 3 subgrupos de cáncer niveles de MPs+FT más elevados que en los sujetos sanos aunque fue el subgrupo gástrico-pancreático el que presentó los niveles más altos (Tabla 8). Sin embargo, ninguno de los subtipos de cáncer

superaron los valores observados en el grupo de ETV para estas poblaciones de MPs (Tabla 8).

Cuando se estudió el origen celular de las MPs+FT (endotelial o plaquetar) no se encontraron valores que evidenciaran una marcada diferencia estadística entre el grupo de ETV y cualquier subgrupo de cáncer. Únicamente se apreciaron valores de mediana para las PMPs+FT algo más elevados en los subgrupos de cáncer de colon y gástrico-pancreático que en el grupo de ETV y ligeramente más bajos en el cáncer de pulmón (Figura 29). En cuanto a las EMPs+FT, en la mayoría de las poblaciones de estudio sus niveles fueron casi indetectables con un valor de mediana de 0 (Tabla 8).

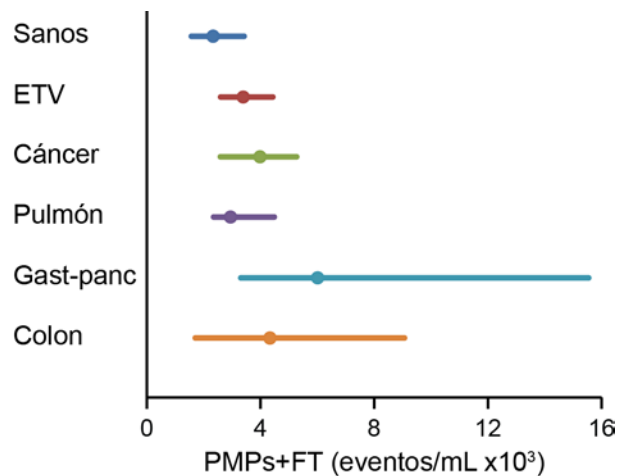


Figura 29. Perfil de las MPs plaquetares con factor tisular (PMPs+FT) en los subgrupos de cáncer y en la ETV.

Pulmón: cáncer de pulmón; Gast-panc: cáncer gástrico o pancreático; Colon: cáncer de colon.

Niveles de MPs+PSGL1 similares se encontraron entre los subgrupos de colon y pulmón y el grupo de ETV. En cambio, el valor de mediana para las MPs+PSGL1 fue un 50 % mayor en los pacientes con cáncer gástrico o pancreático en comparación con aquellos diagnosticados de ETV. Teniendo en cuenta los valores de IC esta diferencia no tenía evidencia estadística debido al solapamiento entre los intervalos de ambos grupos (Figura 30A). Se realizó un segundo análisis donde se compararon las medianas y rangos intercuartílicos de las MPs+PSGL1 entre los tres subgrupos de cáncer y el grupo de ETV una vez ajustadas por las variables que un previo análisis multivariante presentaron diferencias significativas. Se encontraron niveles de MPs+PSGL1 significativamente más elevados en los pacientes con cáncer gástrico-pancreático que en los pacientes con ETV ($p = 0,003$; Figura 30B). Esta diferencia significativa no se mantuvo cuando se estudió la

procedencia leucocitaria de estas MPs, niveles similares de LMPs+PSGL1 se encontraron entre el grupo de ETV y el subgrupo de cáncer gástrico-pancreático [mediana (rango intercuartílico); ETV: 1654 (1915); cáncer gástrico o pancreático: 2785 (4076), $p > 0,05$].

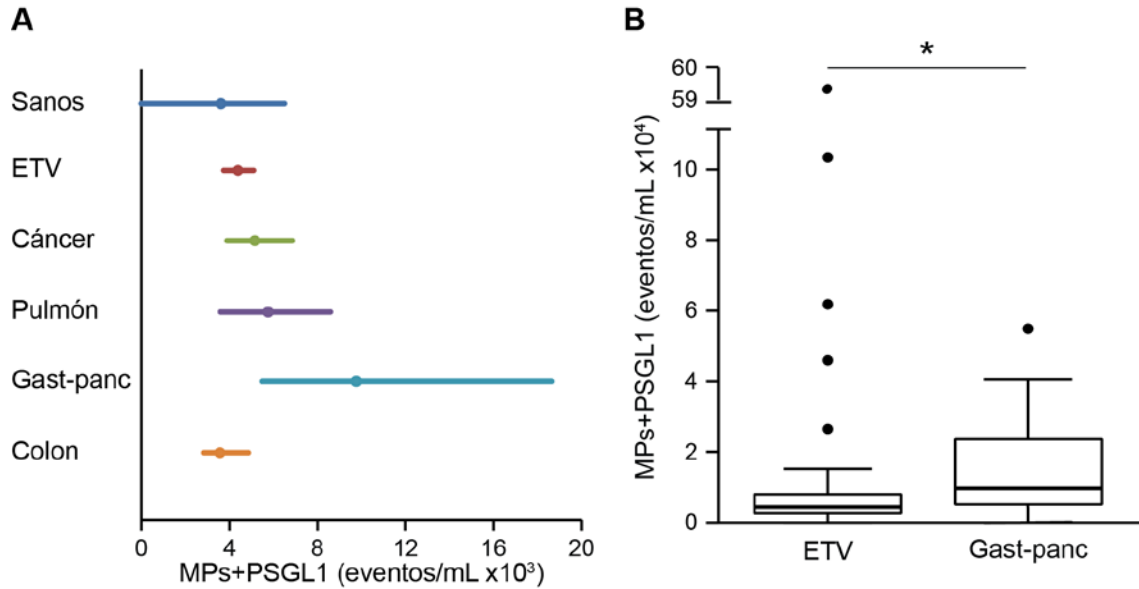


Figura 30. Perfil de MPs circulantes con glicoproteína ligando 1 de la P-selectina (MPs+PSGL1) en los subtipos de cáncer y en la ETV.

A. Representación de mediana (círculo) e intervalo de confianza (barra horizontal). **B.** Representación de mediana (línea horizontal dentro de la caja) y 1,5 veces el rango intercuartílico (bigotes); percentil 25 y 75 (líneas horizontales extremo inferior y superior de la caja respectivamente); círculos negros: outliers/valores extremos * $p < 0,05$; Pulmón: cáncer de pulmón; Gast-panc: cáncer gástrico o pancreático; Colon: cáncer de colon.

Tabla 8. Perfil de MPs circulantes con factor tisular (MPs+FT) y su procedencia celular en los subtipos de cáncer y en la ETV

Población de MPs	Sanos	ETV idiopática	Cáncer pulmón	Cáncer gast-panc	Cáncer colon
<i>MPs+FT</i>	4244 (2638; 7054)	15021 (11502; 21245)	9611 (7822; 14620)	10892 (8704; 32929)	10347 (5756; 15956)
<i>PMPs+FT</i>	2332 (1569; 3420)	3390 (2599; 4429)	2946 (2350; 4483)	6008 (3306; 15541)	4331 (1705; 9061)
<i>EMPs+FT</i>	0 (0; 135)	0 (0; 202)	0 (0; 408)	0 (0; 0)	0 (0; 0)

PMPs+FT: MPs+FT de procedencia plaquetar; EMPs+FT: MPs+FT con origen endotelial; IC: intervalo de confianza; cáncer gast-panc: cáncer gástrico o pancreático.

19.3. Niveles de dímero D, sP-selectina y FT antigénico en pacientes con ETV versus pacientes con cáncer

Además de las MPs también se estudiaron otros parámetros sanguíneos implicados en la coagulación como son el dímero D, la sP-selectina y el FT antigénico. Entre el grupo de ETV y el grupo de cáncer encontramos diferencias acentuadas en los valores de mediana y en los valores del IC para el dímero D y para la sP-selectina. En ambos casos los valores de se encontraron sustancialmente más elevadas en el grupo de pacientes con trombosis que en el grupo de pacientes oncológicos (Figura 31). Para el FT antigénico, no se encontraron diferencias importantes entre ninguna de las poblaciones estudiadas [mediana (IC inferior; IC superior); ETV: 241 (222; 262), cáncer pulmón: 209 (170; 266), cáncer gástrico o pancreático: 209 (177; 233), cáncer colon: 212 (193; 233)].

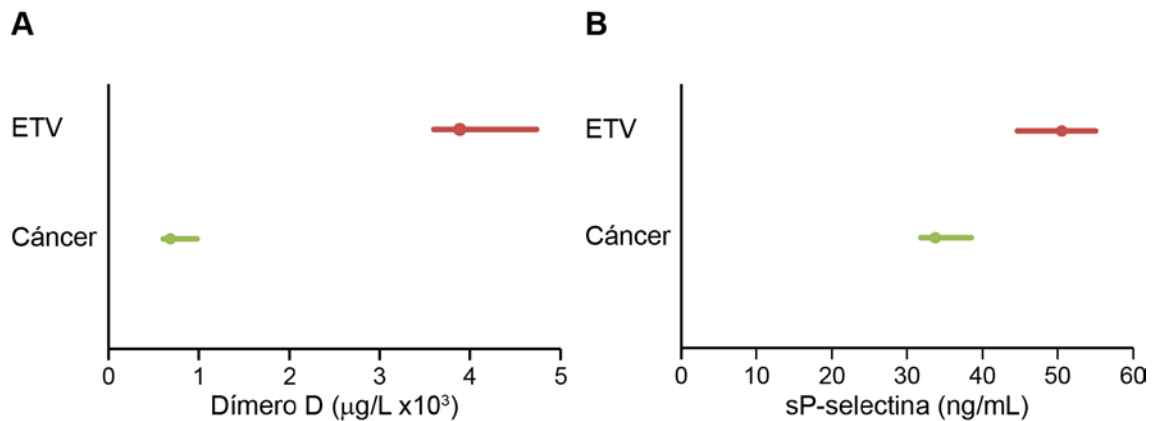


Figura 31. Comparación de los niveles de dímero D (A) y P-selectina soluble (B) entre pacientes con cáncer y pacientes con ETV.

Los resultados se expresaron como mediana (círculo) e intervalo de confianza (barra horizontal).

VI. Discusión

Entre los retos clínicos actuales en la relación entre cáncer y ETV se incluyen tanto la optimización de las herramientas de predicción para el evento trombótico en pacientes con cáncer como el diagnóstico temprano de la neoplasia subyacente en el paciente con ETV. En ambos escenarios clínicos las MPs son uno de los biomarcadores más prometedores. Son varios los estudios centrados en el hallazgo de marcadores del evento trombosis en pacientes con cáncer [161, 245, 246, 262] o de marcadores del evento cáncer subyacente en las trombosis aparentemente idiopáticas [95], sin que existan resultados concluyentes. Los estudios amplios de cohortes longitudinales serían los más apropiados para validar el papel de las MPs como biomarcador. Por ello como paso previo a estos estudios de cohortes nuestro trabajo se ha centrado en la caracterización de MPs circulantes en dos grupos de pacientes, unos diagnosticados de ETV idiopáticas sin diagnóstico de cáncer y otro grupo diagnosticado de cáncer que no han desarrollado ETV. Sin embargo, debido a que las MPs son muy sensibles a sufrir alteraciones *ex vivo* y que no hay un protocolo de procesamiento estandarizado para su aislamiento y análisis, la comparación de resultados entre diferentes laboratorios y la utilización de MPs como biomarcadores aún está muy limitada y su estandarización supone un desafío [266, 269, 282, 304]. Para la obtención de resultados precisos es importante conocer de qué forma afectan las condiciones preanalíticas a las propiedades de las MPs. Por ello antes de elegir las condiciones preanalíticas y analíticas en la caracterización de MPs de ambos grupos de pacientes (cáncer y trombosis), se realizaron dos estudios metodológicos, uno sobre el método preanalítico en el que se puso de manifiesto el impacto que tiene la velocidad de centrifugación y la congelación sobre las propiedades de las MPs y otro sobre el método de análisis por citometría en el que observamos que la detección de MPs en citómetros de flujo calibrados con la Megamix-Plus es un método fiable. En estos resultados metodológicos basamos la elaboración del protocolo de aislamiento y análisis de MPs.

1. Influencia del procesamiento de las muestras sobre las propiedades de las MPs: efecto de la congelación y de la centrifugación

El primer objetivo de esta tesis se centró en evaluar el impacto de la centrifugación y almacenamiento de las muestras como parte del procedimiento de preparación del plasma para la determinación de las MPs. Cuatro protocolos de centrifugación que implicaban diferentes velocidades y temperaturas así como el efecto de la congelación de las muestras han sido estudiados. Cuando se analizaron los niveles de MPs y su capacidad procoagulante

asociada, nuestros resultados demostraron que las propiedades de las MPs (número y capacidad procoagulante) se veían afectadas por la velocidad de centrifugación empleada y por la congelación de la muestra pero no por la temperatura de centrifugación.

Temperatura de centrifugación

Hasta la fecha no tenemos conocimiento de que existan otros estudios que describan la influencia de la temperatura de centrifugación en las propiedades de las MPs. En nuestros resultados observamos que la temperatura de centrifugación (4 °C ó 20 °C) no influía ni en el número de MPs ni en su actividad procoagulante. En la literatura, si el PPP debe ser aislado a temperatura ambiente (20 °C) o a baja temperatura (4 °C) es objeto de debate. Recientemente se ha postulado que la centrifugación de la sangre total a bajas temperaturas puede dar lugar a una activación de las plaquetas con el correspondiente incremento de MPs artefactuales, eso conlleva que muchos autores opten por una centrifugación a temperatura ambiente [269, 272, 305]. Sin embargo, también se ha propuesto que la centrifugación a 4 °C ayuda a preservar la calidad y la actividad de las proteínas y puede ser por tanto una mejor opción si las propiedades de las MPs y la actividad de las proteínas van a ser determinadas [286, 306, 307]. En cualquier caso basándonos en nuestros resultados podemos decir que la temperatura de centrifugación no afecta a las determinaciones de MPs (Tabla 4; Figura 16).

Velocidad de centrifugación

Tanto la velocidad como el número de centrifugaciones pueden afectar a las propiedades de las MPs. En nuestro estudio se observó una clara disminución en el número y en la capacidad procoagulante asociada a las MPs (disminuyeron tanto la concentración de MPs medidas en eq de PS como la capacidad de generación de trombina y aumentó el tiempo de coagulación dependiente de fosfolípidos) cuando se utilizó una doble centrifugación a velocidades más altas (2 x 2500 g, Tabla 4; Figura 17). Esta observación coincide con otros trabajos en los que muestran una asociación entre el bajo conteo de MPs y la alta velocidad de centrifugación [308, 309] o entre una menor actividad procoagulante asociada a MPs y una mayor velocidad de centrifugación [310, 311]. La contaminación celular causada por plaquetas y células rojas [176] y la liberación de MPs artefactuales debido a la activación de plaquetas *ex vivo* podrían ser los causantes del aumento de MPs cuando sólo se lleva a cabo una centrifugación a baja velocidad. Muchos estudios recomiendan una centrifugación adicional para eliminar completamente las plaquetas [269, 272], otros por el contrario consideran suficiente una única centrifugación a baja velocidad incluso puntualizan que una única centrifugación a

1550 g durante 20 min elimina aproximadamente el 99 % del contenido plaquetar [277, 286, 301]. La eliminación total de las plaquetas conlleva una pérdida de MPs ya que existe un solapamiento entre el tamaño de las PMPs más grandes, las MPs procedentes de células rojas y las plaquetas [312]. A la hora de elegir el número y la velocidad de la centrifugación, es importante sopesar entre eliminar el máximo número de plaquetas y células rojas posibles sin llegar a perder las MPs de interés [176]. No se conoce con certeza cómo afecta la velocidad de centrifugación a las MPs de menor tamaño procedentes de otros orígenes celulares diferentes. Se han detectado considerables niveles de EMPs utilizando diferentes protocolos de centrifugación [176] aunque algunos autores apuntan que niveles elevados de PMPs podrían enmascarar la medición de otras MPs más minoritarias es el caso de las EMPs o de las LMPs [309]. Debido al bajo número de EMPs y de LMPs, una baja velocidad de centrifugación podría ser utilizada para analizar MPs procedente de estos orígenes minoritarios a pesar del riesgo de la contaminación causada por la presencia de un remanente de plaquetas y células rojas, razón por la que se escogió el protocolo de centrifugación 1500 g 30 min para el procesamiento de las muestras de los estudios 2 y 3.

Conservación de las muestras antes de su análisis

Con frecuencia los laboratorios tienen limitaciones o falta de recursos para analizar las MPs en el mismo lugar donde se procesa la muestra o que con frecuencia los ensayos que se llevan a cabo para la determinación de MPs se realizan de forma conjunta sobre un número considerable de muestras por lo que se requiere el almacenamiento. En la práctica, es inevitable congelar la muestra para conservarla hasta el posterior análisis. En nuestro trabajo hemos observado un claro aumento del número y de la capacidad procoagulante de las MPs (aumento de generación de trombina y disminución del tiempo de coagulación asociado a fosfolípidos) cuando las muestras eran congeladas antes de su análisis (Tabla 4; Figura 20). Estos resultados están en concordancia con otros estudios [282, 308, 313] en los que también se ha descrito que la congelación-descongelación incrementan los niveles de MPs en plasma. Sin embargo, otros grupos no encontraron un aumento de MPs en el plasma tras haberlo conservado durante 28, 42 ó 56 días a -80 °C [280, 309]. Esta discrepancia puede estar relacionada con el tipo de MPs estudiado. Las condiciones de conservación de la muestra pueden tener diferentes efectos dependiendo de las subpoblaciones de MPs. Varios estudios no han observado un aumento sustancial ni en el número de EMPs ni en el número de LMPs tras un ciclo de congelación-descongelación [282, 314] aunque sí se ha descrito que el número de PMPs positivas para anexina V se ven aumentados [282]. Por otro lado, el tiempo

de congelación también es otro factor a tener en cuenta ya que se ha observado que puede causar un aumento de los niveles de MPs totales a corto plazo, pero una disminución de las mismas si el periodo de congelación es largo [282, 309]. La mayoría de las MPs detectadas con los protocolos actuales de centrifugación son de procedencia plaquetar [178] llegando a ser en algunos casos superior al 90% mientras que las EMPs y LMPs son muy minoritarias. Estudios adicionales que caractericen el origen celular de las MPs podrían ayudar a dilucidar si el número y función de las MPs presentes en el PPP congelado son fundamentalmente de procedencia plaquetar como se ha sugerido en otros trabajos [269, 309].

Una segunda explicación que justifique la variabilidad entre los resultados teniendo en cuenta la conservación de la muestra podría ser el tipo de muestra que se congela y que posteriormente es utilizada para el análisis de MPs. En nuestro estudio, congelamos muestras de PPP y tras su descongelación se realizaron las determinaciones de MPs directamente sobre el plasma con el fin de prevenir la pérdida de MPs [165, 276, 315]. Algunos investigadores tras la descongelación del plasma realizan una centrifugación adicional para aislar las MPs en el pellet lo cual, podría conllevar a una pérdida de MPs ya que las MPs de menor tamaño no son más densas que el plasma y por tanto no sedimentan [276].

Una tercera posible causa del incremento de las MPs tras la congelación-descongelación podría ser la activación *ex vivo* de las plaquetas remanentes en el plasma, lo que daría lugar a un incremento del número de plaquetas y de la actividad procoagulante. Se ha observado que el número de PMPs es entre 3 y 10 veces mayor en el PPP congelado-descongelado que en su PPP equivalente fresco [290, 316]. La fragmentación plaquetar [309, 317] la cual daría lugar a fragmentos de un tamaño equivalente al de las MPs y con los mismos antígenos de superficie que las PMPs ha sido propuesto como otro mecanismo de formación de MPs artefactuales [317]. Esto sustentaría el aumento de MPs totales pero no el aumento de la capacidad procoagulante encontrado en nuestro estudio por lo que no lo contemplamos como una posible explicación. Nuestros resultados no sólo mostraron un incremento en el número de MPs totales, también mostraron un claro aumento de la capacidad procoagulante asociada a las MPs, esto no sustentaría la fragmentación como una posible explicación del mecanismo causante de la formación de MPs artefactuales.

Otros factores a tener en cuenta en el análisis de MPs circulantes

En el presente estudio, nos hemos centrado en la velocidad y temperatura de centrifugación y en el almacenamiento de la muestra antes de su análisis. Otros parámetros preanalíticos

como el tipo de anticoagulante empleado en la extracción sanguínea, el transporte de los tubos de sangre, el tiempo de demora entre la extracción y el procesamiento de la sangre, la temperatura de descongelación del plasma pueden afectar en mayor o menor medida las propiedades de las MPs [269]. Diversas recomendaciones sobre cómo procesar la muestra para la detección de MPs se han llevado a cabo por diferentes grupos de investigación. Algunas de ellas son i) elección de citrato como anticoagulante en la extracción, ii) extracción sanguínea con mínima compresión y con una aguja de calibre 19-21, iii) procesamiento de la muestra en un periodo inferior a 2 h desde la extracción de sanguínea, iv) procesamiento de la muestra con dos centrifugaciones seriadas v) conservación del plasma a -80 °C si no se va a analizar en el momento vi) conservación de las muestras congeladas durante periodos de tiempo similares para facilitar su comparación [272, 282, 318]. Más estudios que profundicen sobre estos puntos son de vital interés. Otro punto que también es causante de variaciones en la detección de MPs es la falta de un criterio a la hora de considerar un evento detectado en el citómetro como positivo para MPs. Algunos investigadores consideran MPs a todos aquellos eventos que una vez calibrado el citómetro se encuentre dentro de la región de MPs establecida [282]. Sin embargo, la mayoría de grupos entre los que nos incluimos nosotros definen las MPs como eventos incluidos en la región de MPs y positivos para la anexina V [152, 269, 286, 319]. La anexina V es considerado un marcador general de MPs ya que reconoce la fosfatidilserina presente en su superficie. Esta unión es dependiente de calcio y requiere por tanto la adición de calcio a la muestra lo cual podría facilitar la formación de coágulos *ex vivo*. En consecuencia, se han propuesto marcadores alternativos. Uno de ellos es la lactaderina la cual reconoce la fosfatidilserina sin que sea necesaria la presencia de calcio [192]. En un estudio reciente han observado contajes de MPs similares marcando las MPs con anexina V y con lactaderina, [320] lo que sugeriría que el calcio requerido por la anexina no afecta sustancialmente a la detección de MPs. En cualquier caso, sería interesante investigar más a fondo si la lactaderina es un buen marcador de MPs, especialmente comparado con la anexina V.

En nuestros resultados hemos encontrado que la congelación-descongelación y la velocidad de centrifugación pero no la temperatura, son variables preanalíticas que, afectan críticamente a las MPs. Tanto la preparación de las muestras como los protocolos de detección de MPs deben ser estandarizados sobre todo de cara a estudios multicéntricos y cuando las muestras necesiten congelarse previamente a su análisis.

2. Cuantificación de MPs en dos plataformas citométricas diferentes siguiendo una nueva estrategia de calibración

Encontrar una estrategia que optimice la detección y permita la comparación de los niveles de MPs obtenidos en citómetros de diversa índole es de gran utilidad para la elaboración de estudios multicéntricos y el avance en el estudio de MPs como biomarcadores. En este sentido, hemos evaluado la detección y comparación de MPs en dos citómetros diferentes siguiendo una nueva estrategia de calibración basada en el empleo de dos combinaciones de bolas diferentes especialmente diseñadas para la calibración de citómetros con mayor capacidad de resolución en FS o en SS según corresponda. En nuestros resultados hemos obtenido una alta correlación en los niveles de MPs totales y PMPs medidos entre dos tipos de citómetros (Figura 24). Sin embargo, el número absoluto era significativamente mayor en el Navios que en el Fortessa (Figura 23). Las combinaciones de bolas fluorescentes de diferentes tamaños se emplean frecuentemente para la detección de MPs por citometría de flujo [278, 286, 312, 321] aunque es materia de debate si las bolas compuestas por poliestireno son las más adecuadas para la calibración de los citómetros debido al diferente índice de refracción entre las bolas de poliestireno y las MPs de procedencia celular [322-324]. Las esferas Megamix simples, son una combinación de bolas fluorescentes de entre 0,5- y 3- μm de diámetro, las cuales se ha comprobado que son una buena herramienta de calibración para medir PMPs utilizando citómetros de Beckman Coulter [325]. Sin embargo, su uso para la detección de MPs en los citómetros de BD estaba limitado [287]. Una posible causa que justificara esta limitación radicaba en que las Megamix simples basaban su estrategia de calibración para detectar MPs en el tamaño relativo medido mediante FS. Esta estrategia era óptima para los citómetros de Beckman Coulter pero no para los de BD. Las estrategias de calibración basadas en la granularidad relativa medida mediante el SS son las más adecuadas para la detección de MPs en los equipos de BD. Para abordar este problema, recientemente se han diseñado las bolas Megamix-Plus, y de ser validadas, podrían facilitar la comparación de los resultados de MPs entre los diferentes tipos y marcas de citómetros (Beckman Coulter y BD) y podría por tanto convertirse en una útil herramienta dentro de los estudios multicéntricos que contemplen la detección de MPs.

La buena correlación observada en nuestros resultados entre los dos citómetros está en concordancia con otro trabajo reciente en el que compararon los niveles de MPs plaquetares utilizando las bolas Megamix-Plus (Megamix –Plus FSC en un citómetro de Beckman Coulter y Megamix-Plus SSC en un citómetro de BD) [326]. Sin embargo, nuestro trabajo

añade el aspecto original de haber sido realizado en muestras de pacientes con ETV utilizando las Megamix-Plus como herramienta de calibración y dos citómetros localizados en distintos hospitales [327], una situación comparable con la de los estudios multicéntricos. El objetivo de este trabajo era la realización de un estudio piloto, que sirviera de base para estudios y estrategias futuras en las que se contemplaran otras subpoblaciones de MPs, otros perfiles de pacientes, o un mayor número de citómetros.

El recuento tanto de MPs totales como de PMPs observado en nuestro estudio, era mayor en el citómetro de Beckman Coulter que en el de BD (Figura 23). Para el cálculo de los niveles de MPs se utilizaron unas esferas de contaje de 6 μm de diámetro. La mayoría de las esferas de contaje que se comercializan oscilan entre 6 y 10 μm de tamaño y están diseñadas para el recuento absoluto de células, pero pueden ser demasiado grandes para ser utilizadas en el recuento de MPs las cuales tienen un tamaño entre 8 y 120 veces menor que una célula. La detección de MPs por citometría requiere el empleo de unos valores de voltaje para FS y SS (miden tamaño y granularidad relativa respectivamente). Aplicando estos valores de voltaje, las esferas de contaje convencionales (con un tamaño entre 6 y 60 veces mayor que las MPs) son detectadas en el límite superior de detección de FS y SS, lo que puede conllevar que no se detecte la población completa de esferas de contaje. Dependiendo de la marca y tipo de citómetros la proporción de esferas de contaje no detectadas puede variar, pudiendo afectar a la comparación de los contajes absolutos entre citómetros. Un estudio monocéntrico comparó los niveles de PMPs entre un citómetro de Beckman Coulter y uno de BD y encontraron también una limitación en el uso de esferas de contaje a la hora de realizar una comparación directa de los valores absolutos. Como alternativa, utilizaron las PMPs marcadas con mayor intensidad de fluorescencia como control interno para la comparación [326]. Sin embargo, los niveles de MPs pueden variar incluso dentro del mismo sujeto/paciente siendo necesaria la búsqueda de una estrategia más adecuada. A finales de 2016 Lacroix y colaboradores realizaron un estudio donde compararon niveles de PMPs entre diferentes tipos de citómetros utilizando las Megamix-Plus como estrategia de calibración. Para el recuento absoluto de MPs emplearon unas esferas de contaje, no comercializadas en aquél entonces, de pequeño tamaño (3 μm). Con el uso de estas esferas no encontraron diferencias en cuanto al contaje de PMPs entre citómetros de Beckman Coulter y citómetros de BD lo que apoya nuestra hipótesis sobre el excesivo tamaño de las esferas de contaje convencionales. El estudio tenía algunas limitaciones como que se requería el uso de unas bolas para calibrar la fluorescencia de los citómetros y de un entrenamiento

especial para la interpretación de los datos de los citómetros aunque se tratara de personal de citometría experimentado [304].

Las MPs tienen una gran relevancia clínica como biomarcadores de un amplio abanico de procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo su relevancia clínica se ve obstaculizada por una falta de estandarización metodológica. Basándonos en nuestros resultados, sustentados además por estudios realizados con posterioridad por otros grupos de trabajo, podemos decir que la determinación de MPs en diferentes tipos de citómetros es un método fiable, siempre y cuando se realice una correcta calibración de los equipos con las bolas adecuadas según el tipo de citómetro. Para una comparación óptima del conteo absoluto entre citómetros muy probablemente sea necesario el uso de unas esferas de conteo de un tamaño menor a las convencionales y especialmente diseñadas para el conteo de MPs por citometría. Futuros trabajos que contribuyan a la validación del conteo de MPs mediante esta nueva estrategia de calibración y que aborden las limitaciones aún existentes son de vital importancia para continuar avanzando en la estandarización y comparación de MPs entre plataformas citométricas. Mientras tanto, el uso de Megamix-Plus como estrategia de calibración parece ser una opción válida a falta de nuevos estudios multicéntricos que lo corroboren.

3. Caracterización fenotípica diferencial de MPs en dos grupos de pacientes, uno de ETV idiopática y otro de cáncer

Los estudios metodológicos previos sirvieron como herramienta para la realización de este tercer estudio centrado en la caracterización de MPs circulantes en pacientes con ETV y pacientes con cáncer. Consideramos que el diseño y análisis planteado en este tercer estudio es novedoso, en tanto que hasta el momento, es el primer trabajo enfocado en comparar los niveles de MPs entre pacientes con ETV que no han desarrollado cáncer y pacientes con cáncer que no han desarrollado ETV y cuyo objetivo es caracterizar las MPs de estas dos patologías como paso previo a su estudio como biomarcadores de la trombosis en el paciente oncológico y de la neoplasia subyacente en el paciente con trombosis. En nuestros resultados, observamos que tanto los niveles de MPs+FT como los niveles de dímero D y sP-selectina destacaban por encontrarse más elevados en aquellos pacientes con ETV que en los pacientes con cáncer. Estas observaciones se reafirmaron cuando se comparó la cohorte de pacientes de ETV con los 3 subgrupos de cáncer (pulmón, gástrico o pancreático y colon) sobre todo en el caso del dímero D y de la sP-selectina. Por otra parte, se observó que las

MPs+PSGL1 se encontraban más elevadas en el grupo de cáncer gástrico o pancreático que en el grupo de ETV.

Papel de las MPs como marcadores de ETV en pacientes con cáncer

Tal y como se ha descrito con anterioridad, el hallazgo de marcadores que ayuden a estratificar el riesgo de trombosis en los pacientes con cáncer tiene una gran relevancia clínica y las MPs son uno de los potenciales biomarcadores más estudiados en este sentido [161, 245, 246, 262]. Nuestros resultados indican que niveles de MPs+FT elevados en pacientes con cáncer podrían predecir la aparición de ETV aunque esta observación sería necesaria validarla mediante un estudio de cohorte longitudinal. Las MPs+FT no son exclusivas del grupo de pacientes con ETV, hemos detectado también MPs+FT en el grupo de pacientes con cáncer que no desarrollaron trombosis pero en un número bastante inferior [ETV: 15021 (23524); Cáncer 10462 (17043); $p = 0,027$]. El tamaño muestral de nuestra serie podría influir en la amplitud de los IC y en el efecto del ligero solapamiento existente entre los intervalos de ambos grupos de pacientes con esta población concreta de MPs. Pensamos que nuestros resultados nos permiten identificar las MPs más relevantes en este contexto clínico y nos sustentan la realización de estudios de validación en una cohorte de pacientes neoplásico más amplia. Estos resultados son consistentes con otros existentes en la literatura médica, existen trabajos que atribuyen a las MPs+FT un papel en la formación y progresión del trombo [328] y consideran que las MPs+FT podrían actuar como marcadores para identificar pacientes con alto riesgo de desarrollar trombosis[329]. La mayoría de trabajos sobre MPs y ETV están diseñados en pacientes con cáncer o en modelos animales con cáncer. Se considera que las células tumorales liberan MPs+FT [298, 330] que podrían estar implicadas en la trombogénesis del proceso tumoral [161, 243, 331, 332]. En modelos experimentales de ratón se ha demostrado que líneas celulares de cáncer de pulmón o de páncreas liberan MPs+FT *in vitro* capaces de favorecer la formación de trombos *in vivo* cuando son inyectadas en un modelo animal de ratón [298]. En otro trabajo similar en el que para observar el papel del FT de procedencia tumoral en la trombosis utilizaron un modelo ortotópico animal al que se le inyectaron células cancerígenas pancreáticas con FT activo, observaron que la activación de la coagulación estaba mediada por el FT pero sorprendentemente, menos del 5 % de la actividad del FT se asoció con las MPs derivadas de tumor [333]. Esto sugería que las MPs derivadas del tumor no eran las únicas implicadas en la aparición del estado procoagulante/protrombótico del cáncer y que otras fuentes de FT

como las MPs+FT de otros orígenes o las células del propio tumor podrían estar jugando un papel importante.

En cuanto a los estudios clínicos, la mayoría encuentran niveles de MPs+FT y de actividad procoagulante dependiente del FT presente en las MPs más elevados en los pacientes con cáncer que han desarrollado trombosis que en aquellos que no la desarrollaron [243, 245, 246, 331, 334], pero son trabajos en su mayoría de carácter retrospectivo. Existe una carencia de estudios clínicos prospectivos centrados en analizar el valor de las MPs como predictores del evento trombotico en los pacientes con cáncer y que incluyan además un número elevado de pacientes. En un estudio prospectivo con una pequeña serie de pacientes con cáncer de páncreas encontraron un valor predictivo para el desarrollo de ETV en la actividad de las MPs+FT [262], mientras que en otro estudio con pacientes diagnosticados de mieloma múltiple no encontraron dicha asociación [335]. Un estudio retrospectivo caso-control observó que el valor medio de MPs+FT en pacientes oncológicos con ETV asociada era significativamente mayor que en pacientes con ETV idiopática o aquellos pacientes diagnosticados de cáncer pero sin ETV asociada [247]. Estos autores observaron también una asociación entre los niveles de MPs+FT y la aparición de trombosis. Sin embargo, otro estudio retrospectivo caso control transversal no encontró una asociación significativa entre niveles elevados de MPs+FT y la ETV en pacientes con cáncer incluso cuando el subgrupo de pacientes con cáncer más ETV presentaba niveles más elevados de MPs+FT que los pacientes con cáncer sin ETV [336]. En el primer estudio más de la mitad de pacientes con cáncer que desarrollaron ETV estaban diagnosticados de cáncer de mama, ovario, linfoma o renal y la determinación de los niveles de MPs+FT se realizó mediante citometría de flujo basada en la impedancia, mientras que en el segundo trabajo la mayoría de los pacientes con cáncer que desarrollaron ETV estaban diagnosticados de cáncer gastrointestinal, pulmonar pancreático o de próstata y realizaron la determinación de MPs mediante citometría de flujo basada en la dispersión de la luz. Estas diferencias metodológicas podrían justificar la inconsistencia entre los resultados de ambos estudios.

Papel de las MPs circulantes como posibles marcadores de neoplasia oculta en pacientes con ETV idiopática

En conexión con la identificación de biomarcadores predictores del riesgo de ETV en pacientes con cáncer, la detección precoz de la neoplasia oculta en los pacientes con ETV supone otro reto desde el punto de vista clínico. Son menos los trabajos orientados en esta

dirección [95] aunque las MPs siguen siendo uno de los candidatos más prometedores. En nuestra serie hemos obtenido resultados interesantes al respecto. En primer lugar se ha puesto de manifiesto que el paciente con cáncer es muy heterogéneo y no hemos encontrado una población de MPs característica de un grupo de neoplasias de localizaciones y cursos clínicos diversos, a pesar de que casi todas ellas eran homogéneas histológicamente y la mayoría correspondían a adenocarcinomas con un estadio avanzado de la enfermedad (estadio IV: 86.5 %). Aún así, hemos encontrado diferencias en los niveles de MPs+PSGL1 de pacientes con cáncer gástrico o pancreático no asociados a fenómenos tromboembólicos y pacientes con ETV que no desarrollan cáncer. Esto nos indica que niveles elevados de MPs+PSGL1 en pacientes con una ETV idiopática nos puede justificar una búsqueda más activa hacia el diagnóstico posterior de una neoplasia gástrica-pancreática. Evidentemente, esta hipótesis que se deriva de nuestro trabajo ha de ser validada en futuros estudios más ampliamente.

El encontrar los niveles de MPs+PSGL1 más elevados en el grupo de cáncer que en el grupo de trombosis a priori puede sorprender ya que está muy bien establecida la asociación de la P-selectina y sus ligandos a los procesos trombóticos [337-339]. La captación y acumulación de las MPs+PSGL1 en el trombo podría explicar el descenso de los niveles circulantes de estas MPs en los pacientes con ETV. Esta teoría ha sido sugerida por otros grupos [140, 337] y existen publicaciones en las que han observado la acumulación y el reclutamiento de MPs procoagulantes durante el proceso de formación del trombo *in vivo* [238, 298]. Por otro lado, recientes estudios han atribuido a la P-selectina y sus ligandos un papel en la expansión del tumor y en la metástasis. Algunos autores han observado que las células de adenocarcinoma requieren la presencia de PSGL1 para activar a las plaquetas [340] y junto con la activación plaquetar favorecer la metástasis [341]. En ratones deficientes para P- y L-selectina, células derivadas de adenocarcinoma de colon han provocado metástasis más atenuadas que en los ratones control [342]. Estas observaciones sustentarían la elevación de MPs+PSGL1 en los pacientes con cáncer gástrico o pancreático encontrada en nuestro trabajo sobre todo, si se tiene en cuenta que este subgrupo de cáncer incluye los tipos de cáncer con mayor capacidad de expansión y de metástasis dentro de los 3 subgrupos estudiados.

Aunque hemos partido de la hipótesis de que en ciertos pacientes con ETV idiopáticas “subyace” una neoplasia oculta que aún no se ha puesto de manifiesto clínicamente, existe otra teoría que considera a la trombosis una de las causas que podría ayudar a desencadenar

el cáncer en determinados pacientes. En un estudio prospectivo realizaron un seguimiento anual durante 4 años a 3052 varones sanos de edad media y observaron que en los sujetos con una activación persistente (durante al menos 2 años consecutivos) del estado de coagulación, (midieron fibrinopéptido A, fragmento protrombina 1+2, FXIIa, fibrinógeno, FVIIag) se duplicaba la tasa de incidencia del cáncer comparados con aquellos que tenían un estado hemostático no activado de forma persistente (19,9 % versus 10,0 %; $p < 0,001$). A pesar de esta mayor incidencia, sólo un 19 % de los sujetos con activación persistente del estado hemostático desarrollaron cáncer en 11 años de seguimiento, sin embargo su tasa de mortalidad por personas año era mayor con respecto pacientes con cáncer sin activación persistente [343]. Estos datos sugerirían que la activación persistente de la vía de coagulación y el proceso tumoral podrían ser procesos independientes que cuando convergen entre sí la activación persistente del proceso hemostático tendría un importante papel en la fase preclínica del cáncer, aumentando la probabilidad de establecimiento de la neoplasia, favoreciendo una más rápida proliferación y una más rápida metástasis.

Papel del dímero D y de la sP-selectina

En nuestros resultados observamos niveles de dímero D y de sP-selectina marcadamente más elevados en los pacientes con ETV que los pacientes con cáncer (Figura 31). Ensayos clínicos y estudios prospectivos reconocen el importante papel del dímero D como valor predictivo negativo en el diagnóstico del evento trombotico y su medición está incluida en los algoritmos comúnmente utilizados para el diagnóstico de ETV. Sin embargo, el valor predictivo del dímero D en algoritmos diagnósticos de ETV en pacientes oncológicos es hoy en día materia de debate. Aunque existe una clara relación entre niveles elevados de dímero D y evento trombotico, el dímero D también puede estar elevado en situaciones pro-inflamatorias y de neoplasia. Recientemente, se ha cuestionado si el punto de corte de 500 $\mu\text{g/L}$ utilizado en el algoritmo diagnóstico de la ETV es apropiado para poblaciones específicas, las cuales presentan ya de por sí niveles de dímero más elevados que la población general. En nuestro grupo de pacientes con cáncer la mediana (IC inferior; IC superior) para el dímero D ha sido de 687 $\mu\text{g/L}$ (609; 980) sugiriendo que un punto de corte de 1000 $\mu\text{g/L}$ podría ser adecuado para algoritmos de diagnóstico de ETV en pacientes oncológicos. El dímero D también ha sido propuesto como marcador para la detección de cáncer oculto en pacientes con trombosis. Un reciente estudio retrospectivo longitudinal encontró una asociación entre los niveles de dímero D muy elevados ($> 4000 \text{ ng/mL}$) y la existencia de un cáncer subyacente en una cohorte de 824 pacientes con ETV idiopática [344]. Estudios

previos avalan esta teoría, en concreto, un estudio longitudinal prospectivo de pacientes con TVP observó que niveles de dímero D por encima de 4000 mg/L en el momento del diagnóstico de la TVP o tras 4 días de tratamiento se asocia con una mayor prevalencia del cáncer durante los 34 meses de seguimiento [345]. En nuestro trabajo hemos encontrado para el grupo de pacientes con ETV idiopática un valor de mediana (IC inferior; IC superior) de 3890 ug/L (3598; 4735), datos que podrían ser compatibles con el punto de corte de 4000 ng/mL propuesto para los pacientes con ETV y neoplasia subyacente.

En cuanto a la sP-selectina hemos encontrado un comportamiento similar al obtenido con el dímero D, lo cual indica que aunque los niveles de sP-selectina se encuentren elevados en pacientes con cáncer avanzado (el 86 % en estadio IV) ya metastásico, estos niveles aumentan de forma marcada tras la trombosis aguda. Se ha sugerido que la sP-selectina podría tener un papel en el diagnóstico de la ETV. Hay autores que sugieren que la P-selectina podría funcionar como marcador predictor del evento trombótico en el paciente oncológico y consideran que cuando tanto dímero D como sP-selectina son incluidos en la escala predictiva de Khorana modificada, se mejora la especificidad de la misma. Estos autores recomiendan puntos de corte igual o superior a 1440 mg/L para el dímero D e igual o superior a 53,1 ng/mL para la sP-selectina como valores predictivos de alto riesgo de trombosis en pacientes con cáncer. Estos valores propuestos están en concordancia con los resultados obtenidos en nuestro estudio, en el cual observamos valores por debajo de estos puntos de corte para el grupo de cáncer sin ETV [dímero D mediana (IC): 687 (609; 980), sP-selectina mediana (IC): 33,7 (31,8; 38,4).

En resumen, diferencias en los niveles de MPs circulantes (MPs+FT y MPs+PSGL1) podrían tener capacidad para discriminar entre pacientes con ETV idiopática y pacientes con cáncer sin ETV. Estas observaciones nos llevarían a validar el papel discriminatorio de estas MPs en futuros estudios de cohortes centrados en la búsqueda de biomarcadores de eventos trombóticos en pacientes oncológicos y de neoplasia oculta en pacientes con ETV.

VII. Conclusiones

1. Los niveles y actividad procoagulante de las MPs en el plasma se alteran por la velocidad de centrifugación y por la congelación de la muestra. El empleo de centrifugaciones a mayor velocidad disminuyen el número y la actividad de las MPs y la congelación-descongelación del plasma aumenta tanto los niveles de MPs como su actividad. Sin embargo, la temperatura de centrifugación no modifica las propiedades de las MPs. Por ello, para garantizar una comparación fiable de resultados en los estudios sobre MPs es necesario emplear la misma velocidad de centrifugación y la misma condición de conservación del plasma.
2. La citometría de flujo es un método fiable para la determinación de MPs en los citómetros Beckman Coulter y BD calibrados con sus correspondientes Megamix-Plus. Con esta estrategia de calibración se observó una alta correlación entre los niveles tanto de MPs totales como de PMPs detectados en ambos citómetros aunque se detectó un mayor número de ambos tipos de MPs en el Navios que en el LSR Fortessa. El empleo de la misma marca y tipo de citómetro junto con las correspondientes bolas de calibración es una estrategia adecuada para la comparación absoluta de resultados de MPs. La comparación entre citómetros de diferente marca y/o características técnicas calibrados con Megamix también es adecuada si se realiza una comparación relativa o porcentual de los resultados.
3. Entre los pacientes con cáncer que no desarrollan trombosis y los pacientes con ETV idiopática se han encontrado diferencias en cuanto a los niveles de MPs+FT, niveles de dímero D y niveles de sP-selectina siendo todos ellos significativamente mayores en los pacientes con ETV. Para los pacientes con cáncer no existe globalmente un tipo característico de MPs. No obstante, los pacientes con cáncer de tipo gástrico o pancreático que no desarrollan trombosis presentaban niveles más elevados de MPs+PSGL1 que aquellos pacientes con ETV idiopática. Las diferencias encontradas entre los niveles de MPs circulantes (MPs+FT y MPs+PSGL1) de pacientes con ETV idiopática y pacientes con cáncer que no desarrollan trombosis podrían servir como un punto de partida para futuros estudios. Nuestros resultados apuntan a que dado la heterogeneidad de la biopatología del cáncer es recomendable abordar las preguntas clínicas de investigación en un marco restringido de tipo y localización del tumor y situación clínica concreta.

VIII. Bibliografía

- 1 Girard P, Musset D, Parent F, Maitre S, Phlippoteau C, Simonneau G. High prevalence of detectable deep venous thrombosis in patients with acute pulmonary embolism. *Chest*. 1999; **116**: 903-8.
- 2 Monreal M, Ruiz J, Fraile M, Bonet M, Davant E, Muchart J, Vallejos V. Prospective study on the usefulness of lung scan in patients with deep vein thrombosis of the lower limbs. *Thrombosis and haemostasis*. 2001; **85**: 771-4.
- 3 Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, Coll I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia. *American journal of human genetics*. 2000; **67**: 1452-9.
- 4 Ariens RA, de Lange M, Snieder H, Boothby M, Spector TD, Grant PJ. Activation markers of coagulation and fibrinolysis in twins: heritability of the prethrombotic state. *Lancet*. 2002; **359**: 667-71. 10.1016/S0140-6736(02)07813-3.
- 5 Larsen TB, Sorensen HT, Skytthe A, Johnsen SP, Vaupel JW, Christensen K. Major genetic susceptibility for venous thromboembolism in men: a study of Danish twins. *Epidemiology*. 2003; **14**: 328-32.
- 6 Heit JA, Phelps MA, Ward SA, Slusser JP, Petterson TM, De Andrade M. Familial segregation of venous thromboembolism. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2004; **2**: 731-6. 10.1111/j.1538-7933.2004.00660.x.
- 7 Zoller B, Ohlsson H, Sundquist J, Sundquist K. Familial risk of venous thromboembolism in first-, second- and third-degree relatives: a nationwide family study in Sweden. *Thrombosis and haemostasis*. 2013; **109**: 458-63. 10.1160/TH12-10-0743.
- 8 Heit JA, Spencer FA, White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2016; **41**: 3-14. 10.1007/s11239-015-1311-6.
- 9 Anderson FA, Jr., Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, Forcier A, Dalen JE. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Archives of internal medicine*. 1991; **151**: 933-8.
- 10 Hansson PO, Welin L, Tibblin G, Eriksson H. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in the general population. 'The Study of Men Born in 1913'. *Archives of internal medicine*. 1997; **157**: 1665-70.
- 11 Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Archives of internal medicine*. 1998; **158**: 585-93.
- 12 Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thrombosis and haemostasis*. 2000; **83**: 657-60.
- 13 Cushman M, Tsai AW, White RH, Heckbert SR, Rosamond WD, Enright P, Folsom AR. Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *The American journal of medicine*. 2004; **117**: 19-25. 10.1016/j.amjmed.2004.01.018.
- 14 Heit JA. Venous thromboembolism: disease burden, outcomes and risk factors. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005; **3**: 1611-7. 10.1111/j.1538-7836.2005.01415.x.
- 15 Tagalakis V, Patenaude V, Kahn SR, Suissa S. Incidence of and mortality from venous thromboembolism in a real-world population: the Q-VTE Study Cohort. *The American journal of medicine*. 2013; **126**: 832 e13-21. 10.1016/j.amjmed.2013.02.024.
- 16 Huang W, Goldberg RJ, Anderson FA, Kiefe CI, Spencer FA. Secular trends in occurrence of acute venous thromboembolism: the Worcester VTE study (1985-2009). *The American journal of medicine*. 2014; **127**: 829-39 e5. 10.1016/j.amjmed.2014.03.041.

- 17 Spencer FA, Emery C, Lessard D, Anderson F, Emani S, Aragam J, Becker RC, Goldberg RJ. The Worcester Venous Thromboembolism study: a population-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism. *Journal of general internal medicine*. 2006; **21**: 722-7. 10.1111/j.1525-1497.2006.00458.x.
- 18 Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrom J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007; **5**: 692-9. 10.1111/j.1538-7836.2007.02450.x.
- 19 White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation*. 2003; **107**: 14-8. 10.1161/01.CIR.0000078468.11849.66.
- 20 van Ommen CH, Heijboer H, Buller HR, Hirasing RA, Heijmans HS, Peters M. Venous thromboembolism in childhood: a prospective two-year registry in The Netherlands. *The Journal of pediatrics*. 2001; **139**: 676-81. 10.1067/mpd.2001.118192.
- 21 Goldhaber SZ, Visani L, De Rosa M. Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry (ICOPER). *Lancet*. 1999; **353**: 1386-9.
- 22 White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of idiopathic deep venous thrombosis and secondary thromboembolism among ethnic groups in California. *Annals of internal medicine*. 1998; **128**: 737-40.
- 23 Schneider D, Lilienfeld DE, Im W. The epidemiology of pulmonary embolism: racial contrasts in incidence and in-hospital case fatality. *Journal of the National Medical Association*. 2006; **98**: 1967-72.
- 24 Zakai NA, McClure LA, Judd SE, Safford MM, Folsom AR, Lutsey PL, Cushman M. Racial and regional differences in venous thromboembolism in the United States in 3 cohorts. *Circulation*. 2014; **129**: 1502-9. 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006472.
- 25 Hooper WC, Holman RC, Heit JA, Cobb N. Venous thromboembolism hospitalizations among American Indians and Alaska Natives. *Thrombosis research*. 2002; **108**: 273-8.
- 26 Heit JA, Sobell JL, Li H, Sommer SS. The incidence of venous thromboembolism among Factor V Leiden carriers: a community-based cohort study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005; **3**: 305-11. 10.1111/j.1538-7836.2004.01117.x.
- 27 España GMpeEdlETe. Estudio sobre la enfermedad tromboembólica venosa en España. *Madrid: Imago Concept Image*. 2006.
- 28 de Miguel-Diez J, Jimenez-García R, Jimenez D, Monreal M, Guijarro R, Otero R, Hernandez-Barrera V, Trujillo-Santos J, Lopez de Andres A, Carrasco-Garrido P. Trends in hospital admissions for pulmonary embolism in Spain from 2002 to 2011. *The European respiratory journal*. 2014; **44**: 942-50. 10.1183/09031936.00194213.
- 29 Guijarro Merino R, Montes Santiago J, San Roman Teran CM. [Epidemiology of venous thromboembolic disease in Spain]. *Medicina clinica*. 2008; **131 Suppl 2**: 2-9.
- 30 Otero Candellera R, Grau Segura E, Jimenez Castro D, Uresandi Romero F, Lopez Villalobos JL, Calderon Sandubete E, Medrano Ortega FJ, Cayuela Dominguez A, Sociedad Espanola de Neumología y Cirugía T. [Prophylaxis of venous thromboembolism]. *Archivos de bronconeumología*. 2008; **44**: 160-9.
- 31 Goldhaber SZ. Pulmonary embolism. *The New England journal of medicine*. 1998; **339**: 93-104. 10.1056/NEJM199807093390207.
- 32 Stein PD, Henry JW. Prevalence of acute pulmonary embolism among patients in a general hospital and at autopsy. *Chest*. 1995; **108**: 978-81.
- 33 Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, Lohse CM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thrombosis and haemostasis*. 2001; **86**: 452-63.
- 34 Lilienfeld DE. Decreasing mortality from pulmonary embolism in the United States, 1979-1996. *International journal of epidemiology*. 2000; **29**: 465-9.

- 35 Janke RM, McGovern PG, Folsom AR. Mortality, hospital discharges, and case fatality for pulmonary embolism in the Twin Cities: 1980-1995. *Journal of clinical epidemiology*. 2000; **53**: 103-9.
- 36 Horlander KT, Mannino DM, Leeper KV. Pulmonary embolism mortality in the United States, 1979-1998: an analysis using multiple-cause mortality data. *Archives of internal medicine*. 2003; **163**: 1711-7. 10.1001/archinte.163.14.1711.
- 37 Kopcke D, Harryman O, Benbow EW, Hay C, Chalmers N. Mortality from pulmonary embolism is decreasing in hospital patients. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2011; **104**: 327-31. 10.1258/jrsm.2011.100395.
- 38 Sogaard KK, Schmidt M, Pedersen L, Horvath-Puho E, Sorensen HT. 30-year mortality after venous thromboembolism: a population-based cohort study. *Circulation*. 2014; **130**: 829-36. 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009107.
- 39 Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Predictors of survival after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based, cohort study. *Archives of internal medicine*. 1999; **159**: 445-53.
- 40 Echeagaray Agara M, Alonso Martinez JL, Urbieta Echezarreta MA, Abinzano Guillen ML, Gonzalez Arencibia C, Solano Ramirez M. [Pulmonary thromboembolism: long term course and clinical epidemiology]. *Anales de medicina interna*. 2003; **20**: 451-6.
- 41 Beyth RJ, Cohen AM, Landefeld CS. Long-term outcomes of deep-vein thrombosis. *Archives of internal medicine*. 1995; **155**: 1031-7.
- 42 Carson JL, Kelley MA, Duff A, Weg JG, Fulkerson WJ, Palevsky HI, Schwartz JS, Thompson BT, Popovich J, Jr., Hobbins TE, et al. The clinical course of pulmonary embolism. *The New England journal of medicine*. 1992; **326**: 1240-5. 10.1056/NEJM199205073261902.
- 43 Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Moffatt K, Johnston M, Stevens P, Hirsh J. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood*. 1995; **86**: 3685-91.
- 44 Janata K, Holzer M, Domanovits H, Mullner M, Bankier A, Kurtaran A, Bankl HC, Laggner AN. Mortality of patients with pulmonary embolism. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2002; **114**: 766-72.
- 45 Stratton MA, Anderson FA, Bussey HI, Caprini J, Comerota A, Haines ST, Hawkins DW, O'Connell MB, Smith RC, Stringer KA. Prevention of venous thromboembolism: adherence to the 1995 American College of Chest Physicians consensus guidelines for surgical patients. *Archives of internal medicine*. 2000; **160**: 334-40.
- 46 Goldhaber SZ, Dunn K, MacDougall RC. New onset of venous thromboembolism among hospitalized patients at Brigham and Women's Hospital is caused more often by prophylaxis failure than by withholding treatment. *Chest*. 2000; **118**: 1680-4.
- 47 Cushman M, Creager MA. Improving Awareness and Outcomes Related to Venous Thromboembolism. *Jama*. 2015; **314**: 1913-4. 10.1001/jama.2015.15107.
- 48 Heit JA, O'Fallon WM, Petterson TM, Lohse CM, Silverstein MD, Mohr DN, Melton LJ, 3rd. Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study. *Archives of internal medicine*. 2002; **162**: 1245-8.
- 49 Tapson VF, Hyers TM, Waldo AL, Ballard DJ, Becker RC, Caprini JA, Khetan R, Wittkowsky AK, Colgan KJ, Shillington AC, Committee NS. Antithrombotic therapy practices in US hospitals in an era of practice guidelines. *Archives of internal medicine*. 2005; **165**: 1458-64. 10.1001/archinte.165.13.1458.
- 50 Clagett GP, Anderson FA, Jr., Heit J, Levine MN, Wheeler HB. Prevention of venous thromboembolism. *Chest*. 1995; **108**: 312S-34S.
- 51 Maynard GA, Morris TA, Jenkins IH, Stone S, Lee J, Renvall M, Fink E, Schoenhaus R. Optimizing prevention of hospital-acquired venous thromboembolism (VTE):

- prospective validation of a VTE risk assessment model. *Journal of hospital medicine*. 2010; **5**: 10-8. 10.1002/jhm.562.
- 52 Planquette B, Maurice D, Peron J, Mourin G, Ferre A, Sanchez O, Meyer G. Knowledge of the diagnostic algorithm for pulmonary embolism in primary care. *European journal of internal medicine*. 2015; **26**: 18-22. 10.1016/j.ejim.2014.11.005.
- 53 Tomkowski WZ, Dybowska M, Kuca P, Andziak P, Jawien A, Ziaja D, Malek G, Gorska M, Davidson BL, investigators A. Effect of a public awareness campaign on the incidence of symptomatic objectively confirmed deep vein thrombosis: a controlled study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012; **10**: 2287-90. 10.1111/j.1538-7836.2012.04915.x.
- 54 Guijarro R, de Miguel-Diez J, Jimenez D, Trujillo-Santos J, Otero R, Barba R, Monreal M. Pulmonary embolism, acute coronary syndrome and ischemic stroke in the Spanish National Discharge Database. *European journal of internal medicine*. 2016; **28**: 65-9. 10.1016/j.ejim.2015.10.006.
- 55 Otero Candellera RJP, L. Enfermedad tromboembólica venosa. Diagnóstico y tratamiento. In: Soto Campos JG, ed. *Manual de diagnóstico y terapéutica en neumología*. Madrid: Ergon, 2016, 477-500.
- 56 Wells PS, Anderson DR, Bormanis J, Guy F, Mitchell M, Gray L, Clement C, Robinson KS, Lewandowski B. Value of assessment of pretest probability of deep-vein thrombosis in clinical management. *Lancet*. 1997; **350**: 1795-8. 10.1016/S0140-6736(97)08140-3.
- 57 Wells PS, Anderson DR, Rodger M, Ginsberg JS, Kearon C, Gent M, Turpie AG, Bormanis J, Weitz J, Chamberlain M, Bowie D, Barnes D, Hirsh J. Derivation of a simple clinical model to categorize patients probability of pulmonary embolism: increasing the models utility with the SimpliRED D-dimer. *Thrombosis and haemostasis*. 2000; **83**: 416-20.
- 58 Le Gal G, Righini M, Roy PM, Sanchez O, Aujesky D, Bounameaux H, Perrier A. Prediction of pulmonary embolism in the emergency department: the revised Geneva score. *Annals of internal medicine*. 2006; **144**: 165-71.
- 59 Stein PD, Chenevert TL, Fowler SE, Goodman LR, Gottschalk A, Hales CA, Hull RD, Jablonski KA, Leeper KV, Jr., Naidich DP, Sak DJ, Sostman HD, Tapson VF, Weg JG, Woodard PK, Investigators PI. Gadolinium-enhanced magnetic resonance angiography for pulmonary embolism: a multicenter prospective study (PIOPED III). *Annals of internal medicine*. 2010; **152**: 434-43, W142-3. 10.7326/0003-4819-152-7-201004060-00008.
- 60 De Caterina R, Husted S, Wallentin L, Andreotti F, Arnesen H, Bachmann F, Baigent C, Huber K, Jespersen J, Kristensen SD, Lip GY, Morais J, Rasmussen LH, Siegbahn A, Verheugt FW, Weitz JI. Vitamin K antagonists in heart disease: current status and perspectives (Section III). Position paper of the ESC Working Group on Thrombosis--Task Force on Anticoagulants in Heart Disease. *Thrombosis and haemostasis*. 2013; **110**: 1087-107. 10.1160/TH13-06-0443.
- 61 Corrigan D, Prucnal C, Kabrhel C. Pulmonary embolism: the diagnosis, risk-stratification, treatment and disposition of emergency department patients. *Clinical and experimental emergency medicine*. 2016; **3**: 117-25. 10.15441/ceem.16.146.
- 62 Sanson BJ, Simioni P, Tormene D, Moia M, Friederich PW, Huisman MV, Prandoni P, Bura A, Rejto L, Wells P, Mannucci PM, Girolami A, Buller HR, Prins MH. The incidence of venous thromboembolism in asymptomatic carriers of a deficiency of antithrombin, protein C, or protein S: a prospective cohort study. *Blood*. 1999; **94**: 3702-6.
- 63 Folsom AR, Aleksic N, Wang L, Cushman M, Wu KK, White RH. Protein C, antithrombin, and venous thromboembolism incidence: a prospective population-based study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002; **22**: 1018-22.

- 64 Folsom AR, Cushman M, Tsai MY, Aleksic N, Heckbert SR, Boland LL, Tsai AW, Yanez ND, Rosamond WD. A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *Blood*. 2002; **99**: 2720-5.
- 65 Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. Factor V Leiden and the risk for venous thromboembolism in the adult Danish population. *Annals of internal medicine*. 2004; **140**: 330-7.
- 66 van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR. High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003; **1**: 2677-8.
- 67 Folsom AR, Cushman M, Tsai MY, Heckbert SR, Aleksic N. Prospective study of the G20210A polymorphism in the prothrombin gene, plasma prothrombin concentration, and incidence of venous thromboembolism. *American journal of hematology*. 2002; **71**: 285-90. 10.1002/ajh.10229.
- 68 Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet*. 1995; **345**: 152-5.
- 69 Tripodi A, Chantarangkul V, Martinelli I, Bucciarelli P, Mannucci PM. A shortened activated partial thromboplastin time is associated with the risk of venous thromboembolism. *Blood*. 2004; **104**: 3631-4. 10.1182/blood-2004-03-1042.
- 70 Thaler J, Ay C, Mackman N, Bertina RM, Kaider A, Marosi C, Key NS, Barcel DA, Scheithauer W, Kornek G, Zielinski C, Pabinger I. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012; **10**: 1363-70. 10.1111/j.1538-7836.2012.04754.x.
- 71 Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994; **369**: 64-7. 10.1038/369064a0.
- 72 Ginsburg KS, Liang MH, Newcomer L, Goldhaber SZ, Schur PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. Anticardiolipin antibodies and the risk for ischemic stroke and venous thrombosis. *Annals of internal medicine*. 1992; **117**: 997-1002.
- 73 Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996; **88**: 3698-703.
- 74 den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *The New England journal of medicine*. 1996; **334**: 759-62. 10.1056/NEJM199603213341203.
- 75 Libourel EJ, Bank I, Meinardi JR, Balje -Volkers CP, Hamulyak K, Middeldorp S, Koopman MM, van Pampus EC, Prins MH, Buller HR, van der Meer J. Co-segregation of thrombophilic disorders in factor V Leiden carriers; the contributions of factor VIII, factor XI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and lipoprotein(a) to the absolute risk of venous thromboembolism. *Haematologica*. 2002; **87**: 1068-73.
- 76 Flordal PA, Bergqvist D, Ljungstrom KG, Torngren S. Clinical relevance of the fibrinogen uptake test in patients undergoing elective general abdominal surgery--relation to major thromboembolism and mortality. Fragmin Multicentre Study Group. *Thrombosis research*. 1995; **80**: 491-7.
- 77 Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama*. 1998; **280**: 605-13.
- 78 Kemmeren JM, Algra A, Grobbee DE. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *Bmj*. 2001; **323**: 131-4.

- 79 Grady D, Wenger NK, Herrington D, Khan S, Furberg C, Hunninghake D, Vittinghoff E, Hulley S. Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease. The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Annals of internal medicine*. 2000; **132**: 689-96.
- 80 Gomes MP, Deitcher SR. Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Archives of internal medicine*. 2004; **164**: 1965-76. 10.1001/archinte.164.18.1965.
- 81 Martínez del Prado P, Isla Casado D. Epidemiología, etiopatogenia, factores de riesgo y pronóstico de la ETV. Diagnóstico de la ETV: TEP, TVP y trombosis asociada a catéter. *II Consenso SEOM sobre la Enfermedad Tromboembólica en pacientes con Cáncer*. Barcelona: Esmon Publicidad, S.A, 2013.
- 82 Otten HM, Mathijssen J, ten Cate H, Soesan M, Inghels M, Richel DJ, Prins MH. Symptomatic venous thromboembolism in cancer patients treated with chemotherapy: an underestimated phenomenon. *Archives of internal medicine*. 2004; **164**: 190-4. 10.1001/archinte.164.2.190.
- 83 Prandoni P, Piccioli A, Girolami A. Cancer and venous thromboembolism: an overview. *Haematologica*. 1999; **84**: 437-45.
- 84 Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thromboembolism. *The Lancet Oncology*. 2005; **6**: 401-10. 10.1016/S1470-2045(05)70207-2.
- 85 Sorensen HT, Mellekjaer L, Steffensen FH, Olsen JH, Nielsen GL. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *The New England journal of medicine*. 1998; **338**: 1169-73. 10.1056/NEJM199804233381701.
- 86 Falanga A. Thrombosis and malignancy: an underestimated problem. *Haematologica*. 2003; **88**: 607-10.
- 87 Prandoni P, Lensing AW, Buller HR, Cogo A, Prins MH, Cattelan AM, Cuppini S, Noventa F, ten Cate JW. Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *The New England journal of medicine*. 1992; **327**: 1128-33. 10.1056/NEJM199210153271604.
- 88 Cornuz J, Pearson SD, Creager MA, Cook EF, Goldman L. Importance of findings on the initial evaluation for cancer in patients with symptomatic idiopathic deep venous thrombosis. *Annals of internal medicine*. 1996; **125**: 785-93.
- 89 Nordstrom M, Lindblad B, Anderson H, Bergqvist D, Kjellstrom T. Deep venous thrombosis and occult malignancy: an epidemiological study. *Bmj*. 1994; **308**: 891-4.
- 90 Lee AY. Thrombosis and cancer: the role of screening for occult cancer and recognizing the underlying biological mechanisms. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2006: 438-43. 10.1182/asheducation-2006.1.438.
- 91 Monreal M, Lafoz E, Casals A, Inaraja L, Montserrat E, Callejas JM, Martorell A. Occult cancer in patients with deep venous thrombosis. A systematic approach. *Cancer*. 1991; **67**: 541-5.
- 92 Monreal M, Lensing AW, Prins MH, Bonet M, Fernandez-Llamazares J, Muchart J, Prandoni P, Jimenez JA. Screening for occult cancer in patients with acute deep vein thrombosis or pulmonary embolism. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2004; **2**: 876-81. 10.1111/j.1538-7836.2004.00721.x.
- 93 Sannella NA, O'Connor DJ, Jr. "Idiopathic" deep venous thrombosis: the value of routine abdominal and pelvic computed tomographic scanning. *Annals of vascular surgery*. 1991; **5**: 218-22. 10.1007/BF02329376.
- 94 Jara-Palomares L, Rodriguez-Matute C, Elias-Hernandez T, Rodriguez-Portal JA, Lopez-Campos JL, Garcia-Ibarra H, Barrot-Cortes E, Otero-Candelera R. Testing for occult cancer in patients with pulmonary embolism: results from a screening program and a two-year follow-up survey. *Thrombosis research*. 2010; **125**: 29-33. 10.1016/j.thromres.2009.04.012.

- 95 Carrier M, Lazo-Langner A, Shivakumar S, Tagalakis V, Zarychanski R, Solymoss S, Routhier N, Douketis J, Danovitch K, Lee AY, Le Gal G, Wells PS, Corsi DJ, Ramsay T, Coyle D, Chagnon I, Kassam Z, Tao H, Rodger MA, Investigators S. Screening for Occult Cancer in Unprovoked Venous Thromboembolism. *The New England journal of medicine*. 2015; **373**: 697-704. 10.1056/NEJMoa1506623.
- 96 Piccioli A, Lensing AW, Prins MH, Falanga A, Scannapieco GL, Ieran M, Cigolini M, Ambrosio GB, Monreal M, Girolami A, Prandoni P, Group SI. Extensive screening for occult malignant disease in idiopathic venous thromboembolism: a prospective randomized clinical trial. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2004; **2**: 884-9. 10.1111/j.1538-7836.2004.00720.x.
- 97 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015; **136**: E359-86. 10.1002/ijc.29210.
- 98 Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quiros JR, Rojas D, Aleman A, Torrella A, Chico M, Vicente M, Diaz JM, Larranaga N, Marcos-Gragera R, Sanchez MJ, Perucha J, Franch P, Navarro C, Ardanaz E, Bigorra J, Rodrigo P, Bonet RP, Group RW. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2017. 10.1007/s12094-016-1607-9.
- 99 Falanga A, Russo L, Verzeroli C. Mechanisms of thrombosis in cancer. *Thrombosis research*. 2013; **131 Suppl 1**: S59-62. 10.1016/S0049-3848(13)70024-0.
- 100 Lyman GH, Khorana AA, Kuderer NM, Lee AY, Arcelus JI, Balaban EP, Clarke JM, Flowers CR, Francis CW, Gates LE, Kakkar AK, Key NS, Levine MN, Liebman HA, Tempero MA, Wong SL, Prestrud AA, Falanga A, American Society of Clinical Oncology Clinical P. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013; **31**: 2189-204. 10.1200/JCO.2013.49.1118.
- 101 Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *Jama*. 2005; **293**: 715-22. 10.1001/jama.293.6.715.
- 102 Cronin-Fenton DP, Sondergaard F, Pedersen LA, Fryzek JP, Cetin K, Acquavella J, Baron JA, Sorensen HT. Hospitalisation for venous thromboembolism in cancer patients and the general population: a population-based cohort study in Denmark, 1997-2006. *British journal of cancer*. 2010; **103**: 947-53. 10.1038/sj.bjc.6605883.
- 103 Chew HK, Wun T, Harvey D, Zhou H, White RH. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Archives of internal medicine*. 2006; **166**: 458-64. 10.1001/archinte.166.4.458.
- 104 Khorana AA, Dalal M, Lin J, Connolly GC. Incidence and predictors of venous thromboembolism (VTE) among ambulatory high-risk cancer patients undergoing chemotherapy in the United States. *Cancer*. 2013; **119**: 648-55. 10.1002/cncr.27772.
- 105 Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Sanchez J, Olson RE. Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. *The American journal of medicine*. 2006; **119**: 60-8. 10.1016/j.amjmed.2005.06.058.
- 106 Walker AJ, Card TR, West J, Crooks C, Grainge MJ. Incidence of venous thromboembolism in patients with cancer - a cohort study using linked United Kingdom databases. *European journal of cancer*. 2013; **49**: 1404-13. 10.1016/j.ejca.2012.10.021.
- 107 Connolly GC, Dalal M, Lin J, Khorana AA. Incidence and predictors of venous thromboembolism (VTE) among ambulatory patients with lung cancer. *Lung cancer*. 2012; **78**: 253-8. 10.1016/j.lungcan.2012.09.007.

- 108 Blom JW, Vanderschoot JP, Oostindier MJ, Osanto S, van der Meer FJ, Rosendaal FR. Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006; **4**: 529-35. 10.1111/j.1538-7836.2006.01804.x.
- 109 Alcalay A, Wun T, Khatri V, Chew HK, Harvey D, Zhou H, White RH. Venous thromboembolism in patients with colorectal cancer: incidence and effect on survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; **24**: 1112-8. 10.1200/JCO.2005.04.2150.
- 110 Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Fisher RI, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism in hospitalized neutropenic cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; **24**: 484-90. 10.1200/JCO.2005.03.8877.
- 111 Dickmann B, Ahlbrecht J, Ay C, Dunkler D, Thaler J, Scheithauer W, Quehenberger P, Zielinski C, Pabinger I. Regional lymph node metastases are a strong risk factor for venous thromboembolism: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *Haematologica*. 2013; **98**: 1309-14. 10.3324/haematol.2012.073338.
- 112 Haddad TC, Greeno EW. Chemotherapy-induced thrombosis. *Thrombosis research*. 2006; **118**: 555-68. 10.1016/j.thromres.2005.10.015.
- 113 Seng S, Liu Z, Chiu SK, Proverbs-Singh T, Sonpavde G, Choueiri TK, Tsao CK, Yu M, Hahn NM, Oh WK, Galsky MD. Risk of venous thromboembolism in patients with cancer treated with Cisplatin: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012; **30**: 4416-26. 10.1200/JCO.2012.42.4358.
- 114 Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Archives of internal medicine*. 2000; **160**: 809-15.
- 115 Trujillo-Santos J, Nieto JA, Tiberio G, Piccioli A, Di Micco P, Prandoni P, Monreal M, Registry R. Predicting recurrences or major bleeding in cancer patients with venous thromboembolism. Findings from the RIETE Registry. *Thrombosis and haemostasis*. 2008; **100**: 435-9.
- 116 Khorana AA. Cancer-associated thrombosis: updates and controversies. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2012; **2012**: 626-30. 10.1182/asheducation-2012.1.626.
- 117 Shen VS, Pollak EW. Fatal pulmonary embolism in cancer patients: is heparin prophylaxis justified? *Southern medical journal*. 1980; **73**: 841-3.
- 118 Sorensen HT, Mellemkjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *The New England journal of medicine*. 2000; **343**: 1846-50. 10.1056/NEJM200012213432504.
- 119 Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007; **5**: 632-4. 10.1111/j.1538-7836.2007.02374.x.
- 120 Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Lyman GH. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer*. 2005; **104**: 2822-9. 10.1002/cncr.21496.
- 121 Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood*. 2008; **111**: 4902-7. 10.1182/blood-2007-10-116327.
- 122 Ay C, Dunkler D, Marosi C, Chiriack AL, Vormittag R, Simanek R, Quehenberger P, Zielinski C, Pabinger I. Prediction of venous thromboembolism in cancer patients. *Blood*. 2010; **116**: 5377-82. 10.1182/blood-2010-02-270116.

- 123 Ay C, Pabinger I. Predictive potential of haemostatic biomarkers for venous thromboembolism in cancer patients. *Thrombosis research*. 2012; **129 Suppl 1**: S6-9. 10.1016/S0049-3848(12)70008-7.
- 124 Streiff MB, National Comprehensive Cancer Center N. The National Comprehensive Cancer Center Network (NCCN) guidelines on the management of venous thromboembolism in cancer patients. *Thrombosis research*. 2010; **125 Suppl 2**: S128-33. 10.1016/S0049-3848(10)70030-X.
- 125 Soria JM, Morange PE, Vila J, Souto JC, Moyano M, Tregouet DA, Mateo J, Saut N, Salas E, Elosua R. Multilocus genetic risk scores for venous thromboembolism risk assessment. *Journal of the American Heart Association*. 2014; **3**: e001060. 10.1161/JAHA.114.001060.
- 126 Soria JM, Fontcuberta J. New approaches and future prospects for evaluating genetic risk of thrombosis. *Haematologica*. 2005; **90**: 1212-22.
- 127 Germain M, Saut N, Greliche N, Dina C, Lambert JC, Perret C, Cohen W, Oudot-Mellakh T, Antoni G, Alessi MC, Zelenika D, Cambien F, Tired L, Bertrand M, Dupuy AM, Letenneur L, Lathrop M, Emmerich J, Amouyel P, Tregouet DA, Morange PE. Genetics of venous thrombosis: insights from a new genome wide association study. *PloS one*. 2011; **6**: e25581. 10.1371/journal.pone.0025581.
- 128 Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, Martinez-Marchan E, Mateo J, Borrell M, Stone W, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J. A quantitative-trait locus in the human factor XII gene influences both plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *American journal of human genetics*. 2002; **70**: 567-74. 10.1086/339259.
- 129 Corral J, Hernandez-Espinosa D, Soria JM, Gonzalez-Conejero R, Ordonez A, Gonzalez-Porrás JR, Perez-Ceballos E, Lecumberri R, Sanchez I, Roldan V, Mateo J, Minano A, Gonzalez M, Alberca I, Fontcuberta J, Vicente V. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood*. 2007; **109**: 4258-63. 10.1182/blood-2006-08-040774.
- 130 Soria JM, Lopez S. [The genetics of thrombosis in cancer]. *Medicina clinica*. 2015; **144 Suppl 1**: 26-30. 10.1016/S0025-7753(15)30015-4.
- 131 Guyton A. *Human physiology and mechanisms of disease*. 1994.
- 132 Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *The American journal of pathology*. 1989; **134**: 1087-97.
- 133 Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007; **27**: 1687-93. 10.1161/ATVBAHA.107.141911.
- 134 Bick RL, Dukes ML, Wilson WL, Fekete LF. Antithrombin III(AT-III) as a diagnostic aid in disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis research*. 1977; **10**: 721-9.
- 135 Lane DA, Bayston T, Olds RJ, Fitches AC, Cooper DN, Millar DS, Jochmans K, Perry DJ, Okajima K, Thein SL, Emmerich J. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis*. 1997; **77**: 197-211.
- 136 Meijer P, Haverkate F, Kluft C. Performance goals for the laboratory testing of antithrombin, protein C and protein S. *Thrombosis and haemostasis*. 2006; **96**: 584-9.
- 137 Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science*. 1964; **145**: 1310-2.
- 138 Stern DM, Kaiser E, Nawroth PP. Regulation of the coagulation system by vascular endothelial cells. *Haemostasis*. 1988; **18**: 202-14.
- 139 Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood reviews*. 2003; **17 Suppl 1**: S1-5.

- 140 Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine*. 2008; **359**: 938-49. 10.1056/NEJMra0801082.
- 141 Hoppe B, Tolou F, Radtke H, Kiesewetter H, Dorner T, Salama A, Marburg I. Polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thromboembolism. *Blood*. 2005; **105**: 1549-51. 10.1182/blood-2004-08-3328.
- 142 Bhattacharjee P, Bhattacharyya D. An Insight into the Abnormal Fibrin Clots — Its Pathophysiological Roles. In: Kolev K, ed. *Fibrinolysis and Thrombolysis*. Rijeka: InTech, 2014, Ch. 01.
- 143 Pineo GF, Hull RD. Thrombophilia: disorders predisposing to venous thromboembolism. *Bailliere's clinical haematology*. 1998; **11**: 525-40.
- 144 Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*. 1991; **78**: 3114-24.
- 145 Woodburn KR, Rumley A, Lowe GD, Pollock JG. Fibrinogen and markers of fibrinolysis and endothelial damage following resolution of critical limb ischaemia. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 1995; **10**: 272-8.
- 146 Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thrombosis and haemostasis*. 1980; **43**: 77-89.
- 147 Kluft C, Dooijewaard G, Emeis JJ. Role of the contact system in fibrinolysis. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1987; **13**: 50-68. 10.1055/s-2007-1003475.
- 148 Booyse FM, Aikens ML, Grenett HE. Endothelial cell fibrinolysis: transcriptional regulation of fibrinolytic protein gene expression (t-PA, u-PA, and PAI-1) by low alcohol. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1999; **23**: 1119-24.
- 149 Bodary PF, Wickenheiser KJ, Eitzman DT. Recent advances in understanding endogenous fibrinolysis: implications for molecular-based treatment of vascular disorders. *Expert reviews in molecular medicine*. 2002; **4**: 1-10. doi:10.1017/S1462399402004362.
- 150 Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006; **26**: 2594-604. 10.1161/01.ATV.0000246775.14471.26.
- 151 Nieuwland R, Sturk A. Why do cells release vesicles? *Thrombosis research*. 2010; **125 Suppl 1**: S49-51. 10.1016/j.thromres.2010.01.037.
- 152 Chiva-Blanch G, Suades R, Crespo J, Pena E, Padro T, Jimenez-Xarrie E, Marti-Fabregas J, Badimon L. Microparticle Shedding from Neural Progenitor Cells and Vascular Compartment Cells Is Increased in Ischemic Stroke. *PloS one*. 2016; **11**: e0148176. 10.1371/journal.pone.0148176.
- 153 Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011; **31**: 15-26. 10.1161/ATVBAHA.109.200956.
- 154 Campello E, Spiezia L, Radu CM, Simioni P. Microparticles as biomarkers of venous thromboembolic events. *Biomarkers in medicine*. 2016; **10**: 743-55. 10.2217/bmm-2015-0063.
- 155 Nomura S, Niki M, Nisizawa T, Tamaki T, Shimizu M. Microparticles as Biomarkers of Blood Coagulation in Cancer. *Biomarkers in cancer*. 2015; **7**: 51-6. 10.4137/BIC.S30347.
- 156 George M, Ganesh MR, Sridhar A, Jena A, Rajaram M, Shanmugam E, Dhandapani VE. Evaluation of Endothelial and Platelet Derived Microparticles in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2015; **9**: OC09-13. 10.7860/JCDR/2015/14493.6920.
- 157 Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, Sakamoto T, Yoshimura M, Jinnouchi H, Ogawa H. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery

- disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005; **45**: 1622-30. 10.1016/j.jacc.2005.02.047.
- 158 Tokes-Fuzesi M, Woth G, Ernyey B, Vermes I, Muhl D, Bogar L, Kovacs GL. Microparticles and acute renal dysfunction in septic patients. *Journal of critical care*. 2013; **28**: 141-7. 10.1016/j.jcrc.2012.05.006.
- 159 Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*. 2003; **41**: 211-7.
- 160 Takeshita J, Mohler ER, Krishnamoorthy P, Moore J, Rogers WT, Zhang L, Gelfand JM, Mehta NN. Endothelial cell-, platelet-, and monocyte/macrophage-derived microparticles are elevated in psoriasis beyond cardiometabolic risk factors. *Journal of the American Heart Association*. 2014; **3**: e000507. 10.1161/JAHA.113.000507.
- 161 Geddings JE, Mackman N. Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood*. 2013; **122**: 1873-80. 10.1182/blood-2013-04-460139.
- 162 Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, Horstman LL, Soriano AO, Zambrano JP, Ahn YS. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005; **45**: 1467-71. 10.1016/j.jacc.2004.12.075.
- 163 Owens AP, 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circulation research*. 2011; **108**: 1284-97. 10.1161/CIRCRESAHA.110.233056.
- 164 Biro E, Akkerman JW, Hoek FJ, Gorter G, Pronk LM, Sturk A, Nieuwland R. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005; **3**: 2754-63. 10.1111/j.1538-7836.2005.01646.x.
- 165 Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, Sturk A, Dignat-George F, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J, Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM, Nomura S, Shet AS, Key NS, Hebbel RP. Measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2004; **2**: 1842-51. 10.1111/j.1538-7836.2004.00936.x.
- 166 Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011; **68**: 2667-88. 10.1007/s00018-011-0689-3.
- 167 Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013; **200**: 373-83. 10.1083/jcb.201211138.
- 168 Alenquer M, Amorim MJ. Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses*. 2015; **7**: 5066-83. 10.3390/v7092862.
- 169 Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2009; **9**: 581-93. 10.1038/nri2567.
- 170 Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Critical reviews in oncology/hematology*. 1999; **30**: 111-42.
- 171 VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research*. 2003; **59**: 277-87.
- 172 Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis and rheumatism*. 2005; **52**: 3337-48. 10.1002/art.21350.
- 173 Tan KT, Lip GY. The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2005; **94**: 488-92. 10.1160/TH05-03-0201.
- 174 Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation research*. 2010; **107**: 1047-57. 10.1161/CIRCRESAHA.110.226456.

- 175 Kooijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schiffelers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *International journal of nanomedicine*. 2012; **7**: 1525-41. 10.2147/IJN.S29661.
- 176 Shah MD, Bergeron AL, Dong JF, Lopez JA. Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. *Platelets*. 2008; **19**: 365-72. 10.1080/09537100802054107.
- 177 Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thrombosis and haemostasis*. 2009; **101**: 439-51.
- 178 Zahra S, Anderson JA, Stirling D, Ludlam CA. Microparticles, malignancy and thrombosis. *British journal of haematology*. 2011; **152**: 688-700. 10.1111/j.1365-2141.2010.08452.x.
- 179 Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS letters*. 2006; **580**: 5313-20. 10.1016/j.febslet.2006.08.082.
- 180 Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in cell biology*. 2009; **19**: 43-51. 10.1016/j.tcb.2008.11.003.
- 181 Toth B, Nikolajek K, Rank A, Nieuwland R, Lohse P, Pihusch V, Friese K, Thaler CJ. Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles. *Platelets*. 2007; **18**: 515-21. 10.1080/09537100701525843.
- 182 Madden LA, Vince RV, Sandstrom ME, Taylor L, McNaughton L, Laden G. Microparticle-associated vascular adhesion molecule-1 and tissue factor follow a circadian rhythm in healthy human subjects. *Thrombosis and haemostasis*. 2008; **99**: 909-15. 10.1160/TH08-01-0030.
- 10.1160/TH08-01-0030.
- 183 Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006; **20**: 1487-95. 10.1038/sj.leu.2404296.
- 184 Park JE, Tan HS, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, Lim SK, Sze SK. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2010; **9**: 1085-99. 10.1074/mcp.M900381-MCP200.
- 185 Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer research*. 2006; **66**: 4795-801. 10.1158/0008-5472.CAN-05-4579.
- 186 Doeuvre L, Plawinski L, Toti F, Angles-Cano E. Cell-derived microparticles: a new challenge in neuroscience. *Journal of neurochemistry*. 2009; **110**: 457-68. 10.1111/j.1471-4159.2009.06163.x.
- 187 Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003; **1**: 1655-62.
- 188 Kolowos W, Gaipf US, Sheriff A, Voll RE, Heyder P, Kern P, Kalden JR, Herrmann M. Microparticles shed from different antigen-presenting cells display an individual pattern of surface molecules and a distinct potential of allogeneic T-cell activation. *Scandinavian journal of immunology*. 2005; **61**: 226-33. 10.1111/j.1365-3083.2005.01551.x.
- 189 Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood cells, molecules & diseases*. 2006; **36**: 182-7. 10.1016/j.bcmd.2005.12.019.
- 190 Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*. 1995; **80**: 919-27.
- 191 Wu Y, Tibrewal N, Birge RB. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends in cell biology*. 2006; **16**: 189-97. 10.1016/j.tcb.2006.02.003.

- 192 Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE, Thiagarajan P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood*. 2009; **113**: 1332-9. 10.1182/blood-2008-07-167148.
- 193 Stahl AL, Sartz L, Karpman D. Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2011; **117**: 5503-13. 10.1182/blood-2010-09-309161.
- 194 Nomura S, Nakamura T, Cone J, Tandon NN, Kambayashi J. Cytometric analysis of high shear-induced platelet microparticles and effect of cytokines on microparticle generation. *Cytometry*. 2000; **40**: 173-81.
- 195 Combes V, Dignat-George F, Mutin M, Sampol J. A new flow cytometry method of platelet-derived microvesicle quantitation in plasma. *Thrombosis and haemostasis*. 1997; **77**: 220.
- 196 Terrisse AD, Puech N, Allart S, Gourdy P, Xuereb JM, Payrastre B, Sie P. Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010; **8**: 2810-9. 10.1111/j.1538-7836.2010.04088.x.
- 197 Takano K, Asazuma N, Satoh K, Yatomi Y, Ozaki Y. Collagen-induced generation of platelet-derived microparticles in whole blood is dependent on ADP released from red blood cells and calcium ions. *Platelets*. 2004; **15**: 223-9. 10.1080/09537100410001682797.
- 198 Chung AW, Radomski A, Alonso-Escolano D, Jurasz P, Stewart MW, Malinski T, Radomski MW. Platelet-leukocyte aggregation induced by PAR agonists: regulation by nitric oxide and matrix metalloproteinases. *British journal of pharmacology*. 2004; **143**: 845-55. 10.1038/sj.bjp.0705997.
- 199 Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*. 2006; **107**: 3537-45. 10.1182/blood-2005-02-0618.
- 200 Tschuor C, Asmis LM, Lenzlinger PM, Tanner M, Harter L, Keel M, Stocker R, Stover JF. In vitro norepinephrine significantly activates isolated platelets from healthy volunteers and critically ill patients following severe traumatic brain injury. *Critical care*. 2008; **12**: R80. 10.1186/cc6931.
- 201 Xiao H, Jepkorir CJ, Harvey K, Remick DG. Thrombin-induced platelet microparticles improved the aggregability of cryopreserved platelets. *Cryobiology*. 2002; **44**: 179-88.
- 202 Brown MD, Fearheller DL, Thakkar S, Veerabhadrapa P, Park JY. Racial differences in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial microparticles and interleukin-6 production. *Vascular health and risk management*. 2011; **7**: 541-50. 10.2147/VHRM.S22930.
- 203 Del Turco S, Basta G, Lazzerini G, Evangelista M, Rainaldi G, Tanganelli P, Camera M, Tremoli E, De Caterina R. Parallel decrease of tissue factor surface exposure and increase of tissue factor microparticle release by the n-3 fatty acid docosahexaenoate in endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis*. 2007; **98**: 210-9.
- 204 Abid Hussein MN, Boing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thrombosis and haemostasis*. 2007; **98**: 1096-107.
- 205 Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I. C-reactive protein induces release of both endothelial microparticles and circulating endothelial cells in vitro and in vivo: further evidence of endothelial dysfunction. *Clinical chemistry*. 2011; **57**: 1757-61. 10.1373/clinchem.2011.169839.
- 206 Simoncini S, Njock MS, Robert S, Camoin-Jau L, Sampol J, Harle JR, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circulation research*. 2009; **104**: 943-51. 10.1161/CIRCRESAHA.108.183285.

- 207 Perez-Casal M, Thompson V, Downey C, Welters I, Wyncoll D, Thachil J, Toh CH. The clinical and functional relevance of microparticles induced by activated protein C treatment in sepsis. *Critical care*. 2011; **15**: R195. 10.1186/cc10356.
- 208 Burger D, Montezano AC, Nishigaki N, He Y, Carter A, Touyz RM. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011; **31**: 1898-907. 10.1161/ATVBAHA.110.222703.
- 209 Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *The Journal of biological chemistry*. 1990; **265**: 3809-14.
- 210 Boulanger CM, Amabile N, Guerin AP, Pannier B, Leroyer AS, Mallat CN, Tedgui A, London GM. In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension*. 2007; **49**: 902-8. 10.1161/01.HYP.0000259667.22309.df.
- 211 Szotowski B, Antoniak S, Goldin-Lang P, Tran QV, Pels K, Rosenthal P, Bogdanov VY, Borchert HH, Schultheiss HP, Rauch U. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovascular research*. 2007; **73**: 806-12. 10.1016/j.cardiores.2006.12.018.
- 212 Eyre J, Burton JO, Saleem MA, Mathieson PW, Topham PS, Brunskill NJ. Monocyte- and endothelial-derived microparticles induce an inflammatory phenotype in human podocytes. *Nephron Experimental nephrology*. 2011; **119**: e58-66. 10.1159/000329575.
- 213 Ben-Hadj-Khalifa-Kechiche S, Hezard N, Poitevin S, Remy MG, Florent B, Mahjoub T, Nguyen P. Differential inhibitory effect of fondaparinux on the procoagulant potential of intact monocytes and monocyte-derived microparticles. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2010; **30**: 412-8. 10.1007/s11239-010-0490-4.
- 214 Gonzalez-Cano P, Mondragon-Flores R, Sanchez-Torres LE, Gonzalez-Pozos S, Silva-Miranda M, Monroy-Ostria A, Estrada-Parra S, Estrada-Garcia I. Mycobacterium tuberculosis H37Rv induces ectosome release in human polymorphonuclear neutrophils. *Tuberculosis*. 2010; **90**: 125-34. 10.1016/j.tube.2010.01.002.
- 215 Ullal AJ, Pisetsky DS. The release of microparticles by Jurkat leukemia T cells treated with staurosporine and related kinase inhibitors to induce apoptosis. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. 2010; **15**: 586-96. 10.1007/s10495-010-0470-3.
- 216 Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *Journal of immunology*. 2006; **177**: 1975-80.
- 217 Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, Weyrich AS, Harrison KA, Murphy RC, Zimmerman GA, McIntyre TM. Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *The Journal of biological chemistry*. 2003; **278**: 33161-8. 10.1074/jbc.M305321200.
- 218 Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood reviews*. 2007; **21**: 157-71. 10.1016/j.blre.2006.09.001.
- 219 Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *The Journal of biological chemistry*. 1989; **264**: 17049-57.
- 220 Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis research*. 2003; **109**: 175-80.
- 221 Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2003; **1**: 2434-43.

- 222 Fritzsching B, Schwer B, Kartenbeck J, Pedal A, Horejsi V, Ott M. Release and intercellular transfer of cell surface CD81 via microparticles. *Journal of immunology*. 2002; **169**: 5531-7.
- 223 Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation*. 1998; **102**: 136-44. 10.1172/JCI2592.
- 224 Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology*. 2005; **20**: 22-7. 10.1152/physiol.00029.2004.
- 225 Jy W, Minagar A, Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro LM, Horstman LL, Bidot C, Ahn YS. Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2004; **9**: 3137-44.
- 226 Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*. 2000; **95**: 1317-23.
- 227 Distler JH, Huber LC, Hueber AJ, Reich CF, 3rd, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2005; **10**: 731-41. 10.1007/s10495-005-2941-5.
- 228 Huber LC, Jungel A, Distler JH, Moritz F, Gay RE, Michel BA, Pisetsky DS, Gay S, Distler O. The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2007; **12**: 363-74. 10.1007/s10495-006-0622-7.
- 229 Boing AN, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets*. 2008; **19**: 96-103. 10.1080/09537100701777295.
- 230 Abid Hussein MN, Nieuwland R, Hau CM, Evers LM, Meesters EW, Sturk A. Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005; **3**: 888-96. 10.1111/j.1538-7836.2005.01240.x.
- 231 Huang PH, Huang SS, Chen YH, Lin CP, Chiang KH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, Chen JW, Lin SJ. Increased circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria. *Journal of hypertension*. 2010; **28**: 1655-65. 10.1097/HJH.0b013e32833a4d0a.
- 232 Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Perez C, Saez C, Panes O, Matus V, Mezzano D. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thrombosis and haemostasis*. 2006; **95**: 94-9.
- 233 Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood*. 2004; **104**: 3190-7. 10.1182/blood-2004-03-0935.
- 234 Gross PL, Furie BC, Merrill-Skoloff G, Chou J, Furie B. Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development. *Journal of leukocyte biology*. 2005; **78**: 1318-26. 10.1189/jlb.0405193.
- 235 Reinhardt C, von Bruhl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschiedt L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *The Journal of clinical investigation*. 2008; **118**: 1110-22. 10.1172/JCI32376.
- 236 Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nature medicine*. 2002; **8**: 1175-81. 10.1038/nm782.
- 237 Hrachovinova I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayr J, Camphausen RT, Widom A, Xia L, Kazazian HH, Jr., Schaub RG, McEver RP, Wagner DD. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nature medicine*. 2003; **9**: 1020-5. 10.1038/nm899.

- 238 Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *The Journal of experimental medicine*. 2003; **197**: 1585-98. 10.1084/jem.20021868.
- 239 Perez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, Zuzel M, Fukudome K, Toh CH. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica*. 2009; **94**: 387-94. 10.3324/haematol.13547.
- 240 Perez-Casal M, Downey C, Fukudome K, Marx G, Toh CH. Activated protein C induces the release of microparticle-associated endothelial protein C receptor. *Blood*. 2005; **105**: 1515-22. 10.1182/blood-2004-05-1896.
- 241 Dejouvencel T, Doeuvre L, Lacroix R, Plawinski L, Dignat-George F, Lijnen HR, Angles-Cano E. Fibrinolytic cross-talk: a new mechanism for plasmin formation. *Blood*. 2010; **115**: 2048-56. 10.1182/blood-2009-06-228817.
- 242 Lacroix R, Dignat-George F. Microparticles: new protagonists in pericellular and intravascular proteolysis. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2013; **39**: 33-9. 10.1055/s-0032-1333310.
- 243 Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thrombosis and haemostasis*. 2007; **97**: 119-23.
- 244 Lopez-Vilchez I, Escolar G, Diaz-Ricart M, Fuste B, Galan AM, White JG. Tissue factor-enriched vesicles are taken up by platelets and induce platelet aggregation in the presence of factor VIIa. *Thrombosis and haemostasis*. 2007; **97**: 202-11.
- 245 Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007; **5**: 520-7. 10.1111/j.1538-7836.2007.02369.x.
- 246 Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009; **7**: 1421-3. 10.1111/j.1538-7836.2009.03504.x.
- 247 Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res*. 2009; **15**: 6830-40. 10.1158/1078-0432.CCR-09-0371.
- 248 Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer seminars in immunopathology*. 2005; **27**: 375-87. 10.1007/s00281-005-0004-1.
- 249 Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell cycle*. 2009; **8**: 2014-8. 10.4161/cc.8.13.8988.
- 250 Zwicker JI, Furie BC, Furie B. Cancer-associated thrombosis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2007; **62**: 126-36. 10.1016/j.critrevonc.2007.01.001.
- 251 Morel O, Morel N, Freyssinet JM, Toti F. Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets*. 2008; **19**: 9-23. 10.1080/09537100701817232.
- 252 Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*. 2005; **105**: 1734-41. 10.1182/blood-2004-05-2042.
- 253 Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology*. 2008; **10**: 619-24. 10.1038/ncb1725.

- 254 van Doormaal FF, Kleinjan A, Di Nisio M, Buller HR, Nieuwland R. Cell-derived microvesicles and cancer. *The Netherlands journal of medicine*. 2009; **67**: 266-73.
- 255 Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R, Sabatier F, Simoncini S, Njock SM, Jourde N, Brunet P, Camoin-Jau L, Sampol J, Dignat-George F. Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis*. 2010; **104**: 456-63. 10.1160/TH10-02-0111.
- 256 Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer research*. 2003; **63**: 4331-7.
- 257 Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, Howell SB. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2005; **4**: 1595-604. 10.1158/1535-7163.MCT-05-0102.
- 258 Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS one*. 2010; **5**: e12688. 10.1371/journal.pone.0012688.
- 259 Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis*. 2009; **30**: 580-8. 10.1093/carcin/bgp030.
- 260 Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR, Lee SN. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *British journal of haematology*. 2004; **124**: 376-84.
- 261 Varon D, Hayon Y, Dashevsky O, Shai E. Involvement of platelet derived microparticles in tumor metastasis and tissue regeneration. *Thrombosis research*. 2012; **130 Suppl 1**: S98-9. 10.1016/j.thromres.2012.08.289.
- 262 Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, Wang JG, Hyrien O, Hathcock J, Mackman N, Taubman MB. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2008; **6**: 1983-5. 10.1111/j.1538-7836.2008.03156.x.
- 263 Aharon A, Brenner B. Microparticles, thrombosis and cancer. *Best practice & research Clinical haematology*. 2009; **22**: 61-9. 10.1016/j.beha.2008.11.002.
- 264 Pabinger I, Thaler J, Ay C. Biomarkers for prediction of venous thromboembolism in cancer. *Blood*. 2013; **122**: 2011-8. 10.1182/blood-2013-04-460147.
- 265 Zwicker JI, Liebman HA, Bauer KA, Coughney T, Campigotto F, Rosovsky R, Mantha S, Kessler CM, Eneman J, Raghavan V, Lenz HJ, Bullock A, Buchbinder E, Neuberg D, Furie B. Prediction and prevention of thromboembolic events with enoxaparin in cancer patients with elevated tissue factor-bearing microparticles: a randomized-controlled phase II trial (the Microtec study). *British journal of haematology*. 2013; **160**: 530-7. 10.1111/bjh.12163.
- 266 Lacroix R, Judicone C, Mooberry M, Boucekine M, Key NS, Dignat-George F, The ISSCW. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013. 10.1111/jth.12207.
- 267 Vidal C, Spaulding C, Picard F, Schaison F, Melle J, Weber S, Fontenay-Roupie M. Flow cytometry detection of platelet procoagulation activity and microparticles in patients with unstable angina treated by percutaneous coronary angioplasty and stent implantation. *Thrombosis and haemostasis*. 2001; **86**: 784-90.
- 268 Christersson C, Johnell M, Siegbahn A. Evaluation of microparticles in whole blood by multicolour flow cytometry assay. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2013; **73**: 229-39. 10.3109/00365513.2013.769278.
- 269 Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles:

- towards standardization of protocol. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012; **10**: 437-46. 10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x.
- 270 Muñoz-Hernandez R, Vallejo-Vaz AJ, Sanchez Armengol A, Moreno-Luna R, Caballero-Eraso C, Macher HC, Villar J, Merino AM, Castell J, Capote F, Stiefel P. Obstructive sleep apnoea syndrome, endothelial function and markers of endothelialization. Changes after CPAP. *PLoS one*. 2015; **10**: e0122091. 10.1371/journal.pone.0122091.
- 271 Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *Journal of immunological methods*. 2012; **375**: 207-14. 10.1016/j.jim.2011.10.012.
- 272 Mullier F, Bailly N, Chatelain C, Chatelain B, Dogne JM. Pre-analytical issues in the measurement of circulating microparticles: current recommendations and pending questions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013; **11**: 693-6. 10.1111/jth.12171.
- 273 Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes*. 2002; **51**: 2840-5.
- 274 Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *The Journal of clinical investigation*. 1999; **104**: 93-102. 10.1172/JCI4985.
- 275 van der Zee PM, Biro E, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clinical chemistry*. 2006; **52**: 657-64. 10.1373/clinchem.2005.057414.
- 276 Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *The Keio journal of medicine*. 2004; **53**: 210-30.
- 277 van Beers EJ, Schaap MC, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, Meijers JC, Biemond BJ, group Cs. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*. 2009; **94**: 1513-9. 10.3324/haematol.2009.008938.
- 278 Suades R, Padro T, Alonso R, Mata P, Badimon L. High levels of TSP1+/CD142+ platelet-derived microparticles characterise young patients with high cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2015; **114**: 1310-21. 10.1160/TH15-04-0325.
- 279 *Flow Cytometry. Principles and Applications*. Humana Press Inc, 2007.
- 280 Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003; **102**: 2678-83. 10.1182/blood-2003-03-0693.
- 281 Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, ten Have K, Eijssman L, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation*. 1997; **96**: 3534-41.
- 282 Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, Nieuwland R, Brooks SA, Ferry B. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thrombosis research*. 2011; **127**: 370-7. 10.1016/j.thromres.2010.12.014.
- 283 Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scandinavian journal of immunology*. 2007; **66**: 159-65. 10.1111/j.1365-3083.2007.01984.x.
- 284 Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology*. 2010; **6**: 21-9. 10.1038/nrrheum.2009.229.

- 285 Pirro M, Schillaci G, Paltriccia R, Bagaglia F, Menecali C, Mannarino MR, Capanni M, Velardi A, Mannarino E. Increased ratio of CD31+/CD42- microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006; **26**: 2530-5. 10.1161/01.ATV.0000243941.72375.15.
- 286 Reynes G, Vila V, Fleitas T, Reganon E, Font de Mora J, Jorda M, Martinez-Sales V. Circulating endothelial cells and procoagulant microparticles in patients with glioblastoma: prognostic value. *PLoS one*. 2013; **8**: e69034. 10.1371/journal.pone.0069034.
- 287 Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F, Workshop IS. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010; **8**: 2571-4. 10.1111/j.1538-7836.2010.04047.x.
- 288 Poncelet P, Robert S, Bouriche T, Bez J, Lacroix R, Dignat-George F. Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter? *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2016; **89**: 148-58. 10.1002/cyto.a.22685.
- 289 Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfusion medicine reviews*. 2006; **20**: 1-26. 10.1016/j.tmr.2005.08.001.
- 290 Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thrombosis and haemostasis*. 2011; **105**: 396-408. 10.1160/TH10-09-0595.
- 291 Xu Y, Nakane N, Maurer-Spurej E. Novel test for microparticles in platelet-rich plasma and platelet concentrates using dynamic light scattering. *Transfusion*. 2011; **51**: 363-70. 10.1111/j.1537-2995.2010.02819.x.
- 292 He Z, Tang Y, Qin C. Increased circulating leukocyte-derived microparticles in ischemic cerebrovascular disease. *Thrombosis research*. 2017; **154**: 19-25. 10.1016/j.thromres.2017.03.025.
- 293 Tziatzios G, Polymeros D, Spathis A, Triantafyllou M, Gkolfakis P, Karakitsos P, Dimitriadis G, Triantafyllou K. Increased levels of circulating platelet derived microparticles in Crohn's disease patients. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2016; **51**: 1184-92. 10.1080/00365521.2016.1182582.
- 294 Kissova J, Ovesna P, Bulikova A, Zavrelva J, Penka M. Increasing procoagulant activity of circulating microparticles in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: a single-centre experience. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2015; **26**: 448-53. 10.1097/MBC.0000000000000293.
- 295 Campello E, Spiezia L, Radu CM, Bulato C, Gavasso S, Tormene D, Woodhams B, Dalla Valle F, Simioni P. Circulating microparticles and the risk of thrombosis in inherited deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thrombosis and haemostasis*. 2016; **115**: 81-8. 10.1160/TH15-04-0286.
- 296 Shantsila E, Montoro-Garcia S, Gallego P, Lip GY. Circulating microparticles: challenges and perspectives of flow cytometric assessment. *Thrombosis and haemostasis*. 2014; **111**: 1009-14. 10.1160/TH13-11-0937.
- 297 Papadavid E, Diamanti K, Spathis A, Varoudi M, Andreadou I, Gravanis K, Theodoropoulos K, Karakitsos P, Lekakis J, Rigopoulos D, Ikonomidis I. Increased levels of circulating platelet-derived microparticles in psoriasis: Possible implications for the associated cardiovascular risk. *World journal of cardiology*. 2016; **8**: 667-75. 10.4330/wjc.v8.i11.667.
- 298 Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2009; **206**: 1913-27. 10.1084/jem.20082297.

- 299 Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoord R, Lecompte T, Beguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*. 2002; **32**: 249-53. 73575.
- 300 Exner T, Joseph J, Low J, Connor D, Ma D. A new activated factor X-based clotting method with improved specificity for procoagulant phospholipid. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2003; **14**: 773-9. 10.1097/01.mbc.0000061366.73802.df.
- 301 Rank A, Liebhardt S, Zwirner J, Burges A, Nieuwland R, Toth B. Circulating microparticles in patients with benign and malignant ovarian tumors. *Anticancer research*. 2012; **32**: 2009-14.
- 302 Agouti I, Cointe S, Robert S, Judicone C, Loundou A, Driss F, Brisson A, Steschenko D, Rose C, Pondarre C, Bernit E, Badens C, Dignat-George F, Lacroix R, Thuret I. Platelet and not erythrocyte microparticles are procoagulant in transfused thalassaemia major patients. *British journal of haematology*. 2015; **171**: 615-24. 10.1111/bjh.13609.
- 303 Suades R, Padro T, Alonso R, Lopez-Miranda J, Mata P, Badimon L. Circulating CD45+/CD3+ lymphocyte-derived microparticles map lipid-rich atherosclerotic plaques in familial hypercholesterolaemia patients. *Thrombosis and haemostasis*. 2014; **111**: 111-21. 10.1160/TH13-07-0612.
- 304 Cointe S, Judicone C, Robert S, Mooberry MJ, Poncelet P, Wauben M, Nieuwland R, Key NS, Dignat-George F, Lacroix R. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2016. 10.1111/jth.13514.
- 305 Geddings JE, Mackman N. Comment on "tissue factor expressed by microparticles is associated with mortality but not with thrombosis in cancer patients". *Thrombosis and haemostasis*. 2014; **111**: 180-1. 10.1160/TH13-07-0599.
- 306 Martinez-Sales V, Sanchez-Lazaro I, Vila V, Almenar L, Contreras T, Reganon E. Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction. *Disease markers*. 2011; **31**: 75-82. 10.3233/DMA-2011-0801.
- 307 Hernandez C, Roncal C, Orbe J, Paramo JA. "tissue factor expressed by microparticles is associated with mortality but not with thrombosis in cancer patients." reply to a comment by Geddings and Mackman. *Thrombosis and haemostasis*. 2014; **111**: 182. 10.1160/TH13-10-0824.
- 308 Lechner D, Weltermann A. Circulating tissue factor-exposing microparticles. *Thrombosis research*. 2008; **122 Suppl 1**: S47-54. 10.1016/S0049-3848(08)70019-7.
- 309 Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, Woywodt A, Lovric S, Haller H, Haubitz M, Erdbruegger U. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vascular health and risk management*. 2010; **6**: 1125-33. 10.2147/VHRM.S13236.
- 310 Lee RD, Barcel DA, Williams JC, Wang JG, Boles JC, Manly DA, Key NS, Mackman N. Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity. *Thrombosis research*. 2012; **129**: 80-5. 10.1016/j.thromres.2011.06.004.
- 311 Hellum M, Ovstebo R, Troseid AM, Berg JP, Brandtzaeg P, Henriksson CE. Microparticle-associated tissue factor activity measured with the Zymuphen MP-TF kit and the calibrated automated thrombogram assay. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2012; **23**: 520-6. 10.1097/MBC.0b013e328354a256.
- 312 Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010; **77**: 502-14. 10.1002/cyto.a.20886.

- 313 Ahmad S AA, Langer F, Desai H, Amaya M, Francis J. Importance of pre-analytical variables in the measurement of platelet-derived microparticles. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005; **3(Suppl 1)**: OR 372.
- 314 Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British journal of haematology*. 2004; **125**: 804-13. 10.1111/j.1365-2141.2004.04974.x.
- 315 Dignat-George F, Freyssinet JM, Key NS. Centrifugation is a crucial step impacting microparticle measurement. *Platelets*. 2009; **20**: 225-6; author reply 7-8. 10.1080/09537100902795500.
- 316 Weber H KM KP, Weltermann A. Comparison of different methods for isolation and storage of microparticles from human blood. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007; **5(Suppl 2)**:P-M-445.
- 317 Mobarrez F, Antovic J, Egberg N, Hansson M, Jorneskog G, Hulthenby K, Wallen H. A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles. *Thrombosis research*. 2010; **125**: e110-6. 10.1016/j.thromres.2009.10.006.
- 318 Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, Robert S, Lamy E, Plawinski L, Camoin-Jau L, Gurewich V, Angles-Cano E, Dignat-George F. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2007; **110**: 2432-9. 10.1182/blood-2007-02-069997.
- 319 Piccin A, Murphy C, Eakins E, Kunde J, Corvetta D, Di Pierro A, Negri G, Guido M, Sainati L, Mc Mahon C, Smith OP, Murphy W. Circulating microparticles, protein C, free protein S and endothelial vascular markers in children with sickle cell anaemia. *Journal of extracellular vesicles*. 2015; **4**: 28414. 10.3402/jev.v4.28414.
- 320 Ayers L, Stoewhas AC, Ferry B, Latshang TD, Lo Cascio CM, Sadler R, Stadelmann K, Tesler N, Huber R, Achermann P, Bloch KE, Kohler M. Circulating levels of cell-derived microparticles are reduced by mild hypobaric hypoxia: data from a randomised controlled trial. *European journal of applied physiology*. 2014; **114**: 1067-73. 10.1007/s00421-014-2837-6.
- 321 Nielsen MH, Beck-Nielsen H, Andersen MN, Handberg A. A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. *Journal of extracellular vesicles*. 2014; **3**. 10.3402/jev.v3.20795.
- 322 van der Pol E, van Gemert MJ, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012; **10**: 919-30. 10.1111/j.1538-7836.2012.04683.x.
- 323 Chandler WL, Yeung W, Tait JF. A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2011; **9**: 1216-24. 10.1111/j.1538-7836.2011.04283.x.
- 324 Parida BK, Garrastazu H, Aden JK, Cap AP, McFaul SJ. Silica microspheres are superior to polystyrene for microvesicle analysis by flow cytometry. *Thrombosis research*. 2015; **135**: 1000-6. 10.1016/j.thromres.2015.02.011.
- 325 Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraud L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2009; **7**: 190-7. 10.1111/j.1538-7836.2008.03200.x.
- 326 Poncelet P, Robert S, Faussat A.M., Gameiro, C., Mullier, F. Standardization of flow cytometry-based microparticle analysis for cytometers using side scatter for size measurements. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012; **11(suppl 3)**:FVB20.
- 327 Sanchez-Lopez V, Vila-Liante V, Arellano-Orden E, Elias-Hernandez T, Ramon-Nunez LA, Jara-Palomares L, Martinez-Sales V, Gao L, Otero-Candelera R. High correlation between 2 flow cytometry platforms in the microparticles analysis using a new calibrated

- beads strategy. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2015; **166**: 733-9. 10.1016/j.trsl.2015.08.006.
- 328 van Es N, Bleker S, Sturk A, Nieuwland R. Clinical Significance of Tissue Factor-Exposing Microparticles in Arterial and Venous Thrombosis. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2015; **41**: 718-27. 10.1055/s-0035-1556047.
- 329 Manly DA, Boles J, Mackman N. Role of tissue factor in venous thrombosis. *Annual review of physiology*. 2011; **73**: 515-25. 10.1146/annurev-physiol-042210-121137.
- 330 Date K, Hall J, Greenman J, Maraveyas A, Madden LA. Tumour and microparticle tissue factor expression and cancer thrombosis. *Thrombosis research*. 2013; **131**: 109-15. 10.1016/j.thromres.2012.11.013.
- 331 Haubold K, Rink M, Spath B, Friedrich M, Chun FK, Marx G, Amirkhosravi A, Francis JL, Bokemeyer C, Eifrig B, Langer F. Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles is increased in patients with early-stage prostate cancer. *Thrombosis and haemostasis*. 2009; **101**: 1147-55.
- 332 Sartori MT, Della Puppa A, Ballin A, Campello E, Radu CM, Saggiorato G, d'Avella D, Scienza R, Cella G, Simioni P. Circulating microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade glioma: a potential prothrombotic role. *Thrombosis and haemostasis*. 2013; **110**: 378-85. 10.1160/TH12-12-0957.
- 333 Wang JG, Geddings JE, Aleman MM, Cardenas JC, Chantrathammachart P, Williams JC, Kirchhofer D, Bogdanov VY, Bach RR, Rak J, Church FC, Wolberg AS, Pawlinski R, Key NS, Yeh JJ, Mackman N. Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. *Blood*. 2012; **119**: 5543-52. 10.1182/blood-2012-01-402156.
- 334 Manly DA, Wang J, Glover SL, Kasthuri R, Liebman HA, Key NS, Mackman N. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thrombosis research*. 2010; **125**: 511-2. 10.1016/j.thromres.2009.09.019.
- 335 Auwerda JJ, Yuana Y, Osanto S, de Maat MP, Sonneveld P, Bertina RM, Leebeek FW. Microparticle-associated tissue factor activity and venous thrombosis in multiple myeloma. *Thrombosis and haemostasis*. 2011; **105**: 14-20. 10.1160/TH10-03-0187.
- 336 Campello E, Spiezia L, Radu CM, Bulato C, Castelli M, Gavasso S, Simioni P. Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism. *Thrombosis research*. 2011; **127**: 473-7. 10.1016/j.thromres.2011.01.002.
- 337 Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends in molecular medicine*. 2004; **10**: 171-8. 10.1016/j.molmed.2004.02.008.
- 338 Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thrombosis and haemostasis*. 1999; **81**: 1-7.
- 339 Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, de Gaetano G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thrombosis research*. 2012; **129**: 263-6. 10.1016/j.thromres.2011.10.010.
- 340 Shao B, Wahrenbrock MG, Yao L, David T, Coughlin SR, Xia L, Varki A, McEver RP. Carcinoma mucins trigger reciprocal activation of platelets and neutrophils in a murine model of Trousseau syndrome. *Blood*. 2011; **118**: 4015-23. 10.1182/blood-2011-07-368514.
- 341 Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; **111**: E3053-61. 10.1073/pnas.1411082111.
- 342 Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; **99**: 2193-8. 10.1073/pnas.261704098.

- 343 Miller GJ, Bauer KA, Howarth DJ, Cooper JA, Humphries SE, Rosenberg RD. Increased incidence of neoplasia of the digestive tract in men with persistent activation of the coagulant pathway. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2004; **2**: 2107-14. 10.1111/j.1538-7836.2004.01011.x.
- 344 Han D, o Hartaigh B, Lee JH, Cho IJ, Shim CY, Chang HJ, Hong GR, Ha JW, Chung N. Impact of D-Dimer for Prediction of Incident Occult Cancer in Patients with Unprovoked Venous Thromboembolism. *PLoS one*. 2016; **11**: e0153514. 10.1371/journal.pone.0153514.
- 345 Schutgens RE, Beckers MM, Haas FJ, Biesma DH. The predictive value of D-dimer measurement for cancer in patients with deep vein thrombosis. *Haematologica*. 2005; **90**: 214-9.

*Anexo I: Consentimiento
informado*

**HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARA EL ESTUDIO DE
MICROPARTICULAS CIRCULANTES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD
TROMBOEMBOLICA VENOSA Y CANCER**

Se le ha solicitado su participación en el estudio de investigación llamado: *“Estudio de Micropartículas circulantes en pacientes con Enfermedad Tromboembólica Venosa y Cáncer”*, cuya investigadora principal es la Dra. Remedios Otero Candelera.

Desde hace muchos años los médicos sabemos que existe una relación entre el hecho de padecer trombosis venosas y de padecer algún tipo de tumor. El diagnóstico del tumor o de la trombosis puede ser indistintamente antes o después. En otras palabras, se puede diagnosticar una trombosis y meses después el tumor o viceversa. Esto ocurre en el 16% de trombosis venosas que no se conoce la causa. En el caso de los tumores, existe entre un 5 a un 15% que posteriormente padecen trombosis. El presente estudio pretende hallar un marcador en sangre que nos indique con más precisión cuales son los pacientes más predispuestos. Los beneficios de esta investigación serían conocer en qué enfermos tendríamos que intensificar la búsqueda de un tumor oculto para diagnosticarlo lo antes posible, tratar y mejorar el pronóstico. Por otro lado, serviría para realizar medidas de prevención antitrombótica en pacientes con tumores. Su participación se concreta en una extracción de sangre venosa periférica y una serie de revisiones médicas. Su participación en el estudio es voluntaria. Puede negarse a participar y suspender su participación en cualquier momento sin penalización alguna ni pérdida de beneficios de asistencia médica a los que tiene derecho. Trataremos de hacer coincidir la extracción sanguínea y las revisiones con las que usted tendrá concertadas para su asistencia médica. Así le evitaremos más molestias y desplazamientos de los necesarios a las consultas.

HOJA DE INFORMACIÓN A LOS CONTROLES
ESTUDIO DE MICROPARTICULAS CIRCULANTES EN PACIENTES CON
ENFERMEDAD
TROMBOEMBOLICA VENOSA Y CANCER

Se le ha solicitado su participación en el estudio arriba citado cuya investigadora principal es la Dra. Remedios Otero Candelera.

Dicho proyecto estudia la relación existente entre el Cáncer y las Trombosis Venosas. Usted no tiene ninguna de estas enfermedades y es por lo que precisamente le hemos pedido su colaboración. Necesitamos conocer los niveles de las sustancias, que vamos a medir en los pacientes del estudio, en otras personas libres de estas enfermedades para poder establecer controles. Las sustancias que mediremos se llaman micropartículas y precisan que la extracción de sangre se haga de forma cuidadosa y posteriormente procesada con rapidez. Los beneficios de esta investigación recaerán en una mejor atención de las personas que padecen cáncer avanzado y de personas que hayan tenido una trombosis venosa o embolia pulmonar sin causa aparente. Su participación se concreta en una extracción de sangre venosa periférica que se hará coincidir con alguna otra que precise de forma rutinaria como control de su salud. Puede negarse a participar y suspender su participación en cualquier momento sin penalización alguna ni pérdida de beneficios de asistencia médica a los que tiene derecho.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título: *“Estudio de Micropartículas circulantes en pacientes con Enfermedad Tromboembólica Venosa y Cáncer”*.

Yo,.....

(Nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(Nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera.

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad a participar en el estudio.

Fecha Firma del participante

Fecha Firma del testigo

Anexo II: Publicaciones

A continuación se especifican las publicaciones cuyos resultados se muestran en el presente trabajo de tesis.

- Sánchez-López V, Vila-Liante V, Arellano-Orden E, Elías-Hernández T, Ramón-Nuñez LA, Jara-Palomares L, Martínez-Sales V, Gao L, Otero-Candelera R. **High correlation between 2 flow cytometry platforms in the microparticles analysis using a new calibrated beads strategy.** Transl Res. 2015 Dec; 166(6):733-9. doi: 10.1016/j.trsl.2015.08.006. Epub 2015 Aug 20.

- Vila-Liante V, Sánchez-López V, Martínez-Sales V, Ramón-Nuñez LA, Arellano-Orden E, Cano-Ruiz A, Rodríguez-Martorell FJ, Gao L, Otero-Candelera R. **Impact of sample processing on the measurement of circulating microparticles: storage and centrifugation parameters.** Clin Chem Lab Med. 2016 Nov 1;54(11):1759-1767. doi: 10.1515/cclm-2016-0036.

