

ORIGEN CELULAR DE MICROPARTÍCULAS CIRCULANTES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA Y CÁNCER

R. Otero Candelera¹, V. Sánchez López¹, T. Elías Hernández¹, L. Jara Palomares¹, E. Arellano Orden¹, M. Ferrer Galván¹, I. Asensio Cruz¹, J.M. Sánchez Díaz¹, A. González-Castro¹, R. Sánchez Gil¹, M. Chaves Conde³, J. Rodríguez Martorell².

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Unidad médico-quirúrgica de Enfermedades Respiratorias. ²Servicio de Hematología. ³Servicio de Oncología del Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla. ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Spain. Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

Resumen

Las micropartículas (MPs) son unas vesículas extracelulares consideradas potentes efectores celulares. Están presentes en individuos sanos y se encuentran elevadas en estados patológicos como enfermedades inflamatorias, neoplásicas y trombosis. La relación entre enfermedad tromboembólica venosa (ETV) y cáncer está bien establecida. Se piensa que las MPs serían una conexión patogénica entre ambas entidades. De confirmarse, podrían utilizarse como biomarcadores.

Nuestro objetivo fue caracterizar las MPs en ambas patologías atendiendo a su origen celular (celular, endotelial, plaquetar, leucocitario y las que exhibían en su superficie mucina 1). También se estudiaron parámetros funcionales como el dímero D (DD) y la P-selectina soluble (sPS).

Se consideraron 96 pacientes con ETV idiopática y 85 con neoplasias avanzadas de pulmón, gástrico o páncreas. A todos ellos se les realizó un seguimiento clínico de dos años en el que se excluyeron del estudio aquellos que fueron diagnosticados de cáncer en el grupo de ETV o que desarrollaron trombosis en el grupo de pacientes neoplásicos. Finalmente, se analizaron 82 pacientes con ETV y 68 con cáncer.

En nuestros resultados encontramos que las MPs totales y las MPs de origen plaquetar diferenciaban ambos grupos de pacientes. Además, se determinaron cifras significativamente mayores de DD y sPS ($p < 0,001$) en el grupo de ETV.

Las diferencias encontradas entre ambos grupos, teniendo en cuenta el origen de las MPs, podrían estar causadas por las características protrombóticas del grupo neoplásico y por el secuestro de las mismas dentro de los coágulos activos en el grupo de ETV.

Palabras clave: Micropartículas, cáncer, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, coagulación.

CELULAR ORIGIN OF CIRCULATING MICROPARTICLES IN PATIENTS WITH VENOUS THROMBOEMBOLISM AND CANCER

Abstract:

Microparticles (MPs) are extracellular vesicles considered to be powerful cellular effectors. They are present in healthy individuals and are elevated in pathological conditions such as inflammatory and neoplastic diseases, and thrombosis. The relationship between venous thromboembolism (VTE) and cancer has been well established. MPs are thought to be a pathogenic connection between the two entities. If confirmed, they could be used as biomarkers.

Our aim was to characterize the MPs in both diseases according to their cellular origin (cellular, endothelial, platelet, leukocyte and those that exhibited mucin 1 on their surface). Functional parameters such as D-dimer (DD) and soluble P-selectin (sPsel) were also studied.

96 patients with idiopathic VTE and 85 with advanced lung, stomach or pancreatic neoplasia were considered. All of them were followed clinically for two years and those who were diagnosed with cancer in the VTE group or those who developed thrombosis in the group of neoplastic patients were excluded from the study. Finally, 82 VTE patients and 68 cancer patients were analyzed.

In our results, we found that total MPs and platelet-derived MPs differentiated both patient groups. Additionally, significantly greater numbers of DD and sPsel ($p < 0.001$) were determined in the VTE group.

The differences found between both groups, taking into account the origin of the MPs, could be caused by the prothrombotic characteristics of the neoplastic group and their sequestration within active clots in the VTE group.

Key words: microparticles, cancer, deep vein thrombosis, pulmonary embolism, coagulation.

Recibido: 6 de junio de 2016. Aceptado: 10 de octubre de 2017.

Remedios Otero Candelera
rotero@separ.es

INTRODUCCIÓN

Las micropartículas (MPs) son microvesículas de entre 0,1 y 1 μm , liberadas por las células durante procesos de activación, daño o apoptosis¹⁻⁵. Inicialmente, se consideraba que estaban desprovistas de cualquier función biológica, pero hoy en día se considera que están implicadas en diversos procesos fisiopatológicos, como procesos hemostáticos, inflamación o migración celular⁶⁻⁹. Las MPs están presentes en individuos sanos, pero se han encontrado niveles elevados en pacientes con diversas patologías inflamatorias, neoplásicas y también vasculares, incluyendo trombosis arteriales y venosas⁹⁻¹³. Estudios experimentales con modelos animales han demostrado que determinados tipos de MPs pueden acelerar la formación de trombos *in vivo*¹⁴. En pacientes neoplásicos se han encontrado niveles de MPs elevados¹⁵ y se postula que éstas podrían explicar, en gran parte, la asociación entre la aparición de fenómenos trombóticos y el cáncer. Esta asociación está firmemente establecida y existen datos que la avalan desde hace décadas^{1,2}. La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) está implicada en la comorbilidad y mortalidad de los pacientes con cáncer. De hecho, la embolia pulmonar (EP) es la segunda causa de muerte entre los pacientes neoplásicos, sólo por detrás de la neoplasia en sí misma¹⁶. No todas las neoplasias presentan el mismo riesgo de padecer trombosis. Los adenocarcinomas en estadios avanzados, de origen pancreático, gástrico o pulmonar son perfiles de riesgo elevado⁵. Por otro lado, hasta el 15 % de las ETV idiopáticas preceden al diagnóstico de un cáncer, el cual podría ser el causante de la trombosis. La búsqueda de biomarcadores que diagnostiquen precozmente la neoplasia en el paciente con trombosis y/o predigan el riesgo de ETV en el paciente con cáncer es de gran interés clínico. El dímero D (DD) es un producto de la degradación de la fibrina y por tanto un marcador directo de la fibrinólisis cuyos valores se encuentran elevados en procesos trombóticos en los cuales la fibrinólisis está activada. El DD está incluido en los algoritmos diagnósticos de la ETV en la población general, pero su papel como biomarcador de la trombosis en pacientes con cáncer no está demostrado. Las MPs son otros de los posibles biomarcadores que han atraído el interés de investigadores y clínicos, aunque no están aún implementados.

Pensamos que la caracterización de las MPs en estas dos enfermedades, la ETV y el cáncer, podría proporcionar información útil para diseños futuros de estudios prospectivos, en los cuales se exploraría el papel predictivo de éstas con respecto al diagnóstico de las complicaciones trombóticas en los pacientes con cáncer y el diagnóstico del cáncer oculto en la ETV idiopática.

Consideramos que una primera aproximación podría ser la valoración de las MPs según el origen celular en estas patologías de etiopatogenia dispar, pero asociadas en la práctica médica.

Nuestro objetivo fue la comparación de la caracterización de las MPs según su origen celular en pacientes con ETV idiopática y pacientes con cáncer no asociado a ETV, además de la determinación de otros parámetros funcionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño: estudio observacional prospectivo de dos grupos de pacientes; uno formado por pacientes con ETV idiopática y otro formado por pacientes con cáncer avanzado de pulmón, gástrico o pancreático no asociado a ETV. En ambas poblaciones se cuantificaron los niveles de MPs circulantes y su procedencia celular.

Pacientes:

Grupo de pacientes con ETV

Criterios de inclusión: pacientes diagnosticados ambulatoriamente de trombosis venosa profunda (TVP) o pacientes diagnosticados de EP que durante los dos años de seguimiento no fueron diagnosticados de cáncer. Se admitieron pacientes con tratamiento anticoagulante iniciado hasta 72 h antes de la inclusión en el estudio.

Criterios de exclusión: pacientes diagnosticados de neoplasia durante el periodo de seguimiento. El protocolo de búsqueda de neoplasia oculta en pacientes con ETV será realizado según la propuesta realizada por Jara-Palomares y cols¹⁷.

Grupo de pacientes con cáncer

Criterios de inclusión: pacientes con diagnóstico citológico o histológico de carcinoma de pulmón no microcítico, estadio IV o III B, con derrame pleural o pericárdico o con carcinoma gástrico o pancreático metastásico, procedentes de consultas externas de Oncología. Estos pacientes no habían sufrido ningún evento previo relacionado con ETV y no estaban en tratamiento o profilaxis con heparinas de bajo peso molecular.

Criterios de exclusión: pacientes con cáncer que son diagnosticados mediante pruebas objetivas de ETV (TVP y/o EP) o trombosis arteriales durante el periodo de seguimiento.

Todos los pacientes considerados para el estudio firmaron el consentimiento informado.

Extracción de muestras sanguíneas: a todos los pacientes se les extrajo sangre con una aguja de calibre 21, sin usar compresión o con mínima oclusión venosa, en tubos de plástico con citrato trisódico 0,109 M (Vacutainer®, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) descartando los primeros 3 mL. Las muestras se procesaron dentro de la primera hora tras su extracción; se centrifugaron a 1.500 g durante 30 min a 4 °C y sin freno, con el fin de obtener plasma conteniendo las MPs y plasma libre de plaquetas (PLP). El PLP se distribuyó en alícuotas que se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

Cuantificación y caracterización de MPs por citometría de flujo: de todos los pacientes se determinaron en plasma los niveles de MPs totales y de MPs de procedencia plaquetar, utilizando el citómetro LSR Fortessa (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica). Para la detección de MPs totales se utilizó la anexina V, conjugada con CF Blue (Immunostep, Salamanca, España), que reconoce y se une a la fosfatidilserina presente en la superficie de la micropartícula. Para la detección de MPs de procedencia plaquetar (PMPs) y MPs de procedencia endotelial (EMPs) se utilizaron los anticuerpos para humano anti CD31 y anti CD41 conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina cianina 7 (PECy7) respectivamente (Beckman Coulter, Marsella, Francia), para la detección de MPs de procedencia leucocitaria (LMPs) se utilizó el anticuerpo para humano anti CD45 FITC (Beckman Coulter, Marsella, Francia) y para la detección de las MPs, con expresión de mucina 1 en superficie (MPs-MUC1+), se utilizó el anticuerpo para humano anti CD227-FITC (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica).

La calibración del citómetro para la detección de MPs se llevó a cabo utilizando la combinación de bolas fluorescentes Megamix-Plus SSC (Biotex, Marsella, Francia), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las MPs se definieron como los eventos recogidos dentro de la región de MPs establecida y positivos para la anexina V. Las PMPs se identificaron como aquellas MPs positivas para los anticuerpos anti CD31 y anti CD41, las EMPs como MPs positivas para CD31 y negativas para CD41, las LMPs como MPs positivas para CD45 y las MPs-MUC1+ como MPs positivas para CD227. Como

control negativo, se utilizaron los controles de isotipo correspondientes para cada anticuerpo. Para el cálculo de la concentración de MPs a partir del valor absoluto se utilizaron esferas de conteo (6 µm) con una concentración alrededor de 1.000 esferas/µL (Perfect-Count Microspheres; Cytognos, Salamanca, España). Los resultados se expresaron como eventos/mL.

Determinaciones de Dímero D y P-selectina soluble: el dímero D (DD) se determinó mediante análisis inmunoturbidimétrico LiaTest DDi (Diagnostic Stago, Parsippany, Nueva York, EEUU), utilizando un analizador STA-R. Los resultados se expresaron en µg/mL.

Los niveles de P-selectina soluble (sPS) soluble en plasma se detectaron mediante la técnica ELISA (Human sPselectin/CD62P Immunoassay; RD Systems, Minneapolis, MN, EEUU). Los resultados se expresaron en µg/mL.

Análisis estadístico: los resultados cuantitativos se expresaron como media y desviación estándar y los cualitativos como valores absolutos y frecuencias. Para la comparación de variables cuantitativas entre diferentes grupos clínicos se utilizó el test de la T pareada de Student y para la comparación de las cualitativas la Chi-cuadrado. Las pruebas se consideraron significativas con valores de $p < 0,05$. El análisis de los resultados se realizó mediante el paquete de software estadístico SPSS 22 para Windows.

RESULTADOS

Desde enero de 2011 a noviembre de 2013 se reclutaron 181 pacientes; 96 en el grupo de pacientes con ETV, de los cuales 14 de ellos fueron finalmente excluidos por un diagnóstico de neoplasia durante los 2 años de seguimiento, y 85 pacientes en el grupo de las neoplasias, de los cuales se excluyeron 17 por el desarrollo de algún proceso trombótico en el seguimiento. Por tanto, el análisis se realizó sobre 82 pacientes con ETV idiopática y 68 diagnosticados de cáncer. En este último grupo, 56 (82,4 %) fallecieron dentro del periodo de seguimiento. En ninguno de ellos hubo un episodio de ETV durante el seguimiento, ni la trombosis fue la causa de la muerte.

Los pacientes con cáncer fueron más jóvenes ($p = 0,026$), predominantemente hombres ($p = 0,018$), fumadores ($p < 0,001$) y más frecuentemente con hábito enólico (34 %). En el momento del reclutamiento, 45 (66 %) recibían diversas pautas de quimioterapia. Los pacientes con ETV idiopática fueron mayores e hipertensos ($p = 0,001$), en un 45 % mujeres. En la tabla 1 se resumen las características clínicas de ambas poblaciones.

En cuanto a las poblaciones de MPs estudiadas, se encontraron niveles de MPs totales significativamente más elevados en los pacientes neoplásicos con respecto a los pacientes diagnosticados de ETV (cáncer: $26.454 \times 10^3 \pm 4.238 \times 10^3$; ETV: $14.787 \times 10^3 \pm 1146 \times 10^3$; $p = 0,01$). Un patrón similar se observó en el número de PMPs (cáncer: $22.263 \times 10^3 \pm 3.973 \times 10^3$; ETV: $11.118 \times 10^3 \pm 1.004 \times 10^3$; $p = 0,008$). No se apreciaron diferencias para el resto de orígenes celulares estudiados (endotelial y leucocitario) ni para las MPs-MUC-1+ (Tabla 2).

En cuanto a los niveles de DD y sPS, ambos parámetros se encontraron significativamente más elevados en el grupo de pacientes con ETV con respecto a los pacientes con cáncer ($p < 0,001$; Tabla 2).

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con enfermedad tromboembólica venosa (ETV) idiopática y cáncer. IMC: índice de masa corporal; DS: desviación estándar.

Características	ETV idiopática (n = 82)	Cáncer (n = 68)
Edad, años (media ± DS)	63,4 ± 14,5	62,3 ± 11,3
Género masculino n (%)	45 (54,9)	50 (73,5)
IMC, kg/m2 (media ± DS)	31,0 ± (5,4)	26,6 ± 5,6
Fumador, n (%)	27 (32,9)	52 (76,5)
Consumo de alcohol, n (%)	10 (12,2)	23 (33,8)
Hipertensión, n (%)	44 (53,7)	17 (25,0)
Dislipemia, n (%)	22 (26,8)	23 (33,8)
Diabetes, n (%)	13 (15,9)	9 (13,2)
Enfermedad respiratoria crónica, n (%)	20 (24,4)	15 (22,1)
Cardiopatía isquémica, n (%)	7 (8,5)	2 (2,9)
Insuficiencia renal crónica, n (%)	5 (6,1)	6 (8,8)
Demencia, n (%)	13 (16,0)	6 (8,8)

Tabla 2. Micropartículas (MPs) circulantes de origen celular y otras determinaciones funcionales en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa (ETV) y cáncer. EMPs: MPs de origen endotelial; PMPs: MPs de origen plaquetar; LMPs: MPs de origen leucocitario; MPs-MUC1+: MPs que exhiben en su superficie mucina 1; sP-selectina: P-selectina soluble. Los resultados se expresaron como media y desviación estándar. Significación: $p < 0,05$.

DDeterminaciones	ETV (n =82)	Cáncer (n =68)	Valor de p
MPs totales/mL (x103)	14787 ± 1146	26454 ± 4238	0,01
EMPs/mL	27027 ± 3170	25432 ± 2056	0,687
PMPs/mL (x103)	11118 ± 1004	22263 ± 3973	0,008
LMPs/mL	98705 ± 9104	96818 ± 9147	0,885
MPs-MUC1+/mL	135118 ± 41377	251606 ± 91310	0,239
Dímero D (µg/L)	6869 ± 944	1327 ± 227	< 0,001
sP-selectina (ng/mL)	58,92 ± 3,21	40,80 ± (2,06)	< 0,001

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos comparado los niveles de diferentes poblaciones de MPs entre dos grupos de pacientes, uno formado por pacientes diagnosticados de ETV idiopática y otro formado por pacientes con cáncer no asociado a trombosis. De forma adicional, se compararon los niveles de DD y sPS. En nuestros resultados observamos niveles de MPs totales y de PMPs sorprendentemente más elevados en el grupo de pacientes con cáncer que en el de ETV y niveles de DD y sPS más elevados en el grupo de trombosis que en el de cáncer. Las PMPs son consideradas MPs procoagulantes, implicadas en el inicio y propagación del tromboembolismo venoso^{18,19}. Se conoce que las PMPs están elevadas en pacientes con ETV²⁰. Sin embargo, diversos autores puntualizan que encontrar niveles elevados en la ETV depende del grupo con el que se realice la comparación²¹. Estos autores compararon los niveles de PMPs en un grupo de pacientes diagnosticados de EP con sujetos sanos, con y sin factores de riesgo cardiovascular. Sólo encontraron diferencias significativas entre los pacientes con EP y los sujetos sanos sin factores de riesgo cardiovascular. En el grupo con EP, la extracción de la muestra se realizó justo antes de comenzar el tratamiento anticoagulante. Esto no coincide con nuestro estudio, en el cual se admitía la extracción de muestra hasta 72 horas tras el inicio de la anticoagulación. En nuestro contexto, hubiera sido inviable

establecer un diseño de estudio en el que se extrajera sangre antes del inicio de la anticoagulación, ya que guías de práctica clínica admiten el inicio del tratamiento antes de la confirmación diagnóstica²². Por otra parte, los pacientes que componen nuestro grupo con cáncer son los que en otras series publicadas presentaban mayor número de MPs procoagulantes²³. Por lo tanto, la diferencia encontrada en nuestro estudio no debería tomarse en términos absolutos. Deben tenerse en cuenta varios aspectos, como la comparación con un grupo de pacientes con cáncer con alto riesgo procoagulante, el momento de la extracción de muestras, el cual puede ser dentro de las 72 h de tratamiento anticoagulante del paciente con ETV o que gran parte de las PMPs circulantes en los pacientes con un proceso trombótico activo pueden estar atrapadas en los coágulos, infringiendo un falso descenso en las MPs circulantes.

Las MPs-MUC1+, aunque no se referían a ninguna estirpe celular concreta, fueron determinadas con el fin de identificar las MPs procedentes de células tumorales, sobre todo de adenocarcinoma. Está descrito que las células tumorales pueden sobreexpresar a nivel de membrana MUC1, por lo que MPs con este origen podrían identificarse utilizando este tipo de antígeno. Sin embargo, en nuestros resultados no hemos encontrado diferencias entre el grupo de ETV y el grupo de cáncer. Otros autores han encontrado niveles de MPs-MUC1+ más elevadas en pacientes con cáncer²⁴. Esta discrepancia podía ser debida al perfil de pacientes seleccionados en cada estudio, el tipo de neoplasia o el estadio podrían afectar a la expresión de MUC1 en las células tumorales. Por otro lado, aunque las células tumorales puedan sobreexpresar MUC1 en superficie, esta proteína no es exclusiva de células tumorales, otros tipos de células pueden dar lugar a MPs-MUC1+, ya que esta proteína también está implicada en el sistema inmune, atrapando a patógenos²⁵.

El DD es uno de los marcadores utilizados en los algoritmos diagnósticos de la ETV, tanto en su expresión de TVP como de EP. Ensayos clínicos y estudios prospectivos²⁶ con miles de pacientes han respaldado el alto valor predictivo negativo del DD. Sin embargo, el valor diagnóstico del DD en pacientes con cáncer está más cuestionado. Aunque el DD es altamente sensible para la trombosis, no es nada específico, ya que puede estar elevado también en situaciones proinflamatorias y neoplásicas. Especialmente, se pone en duda si el nivel de corte de 500 µg/L es el adecuado en una población con cáncer. En nuestro grupo de pacientes con cáncer sin ETV, la media de DD fue de 1.327 ± 227 µg/L. Esto puede sugerir que quizás un punto de corte por encima de 1.000 µg/L en este grupo.

La sPS es una proteína implicada en funciones de adhesión celular, almacenada en gránulos intracitoplásmicos de plaquetas y células endoteliales. Al activarse estas células, la PS es translocada a la membrana plasmática, permitiendo la interacción con sus ligandos²⁷. Juega un papel fundamental en la migración inicial de los leucocitos al foco de inflamación, pero también es importante en la agregación plaquetaria mediante puentes plaquetas-fibrina y plaquetas-plaquetas al área vascular dañada²⁸. La trombina es uno de los estímulos para que la PS sea secretada desde las células endoteliales. Pero también se ha reconocido el papel de la PS en procesos de metástasis tumorales, favoreciendo el proceso de migración y diseminación de las células tumorales²⁹. En nuestros grupos de estudio, la determinación de sPS tiene un comportamiento similar al DD, indicando que, aunque podría estar elevada en pacientes con cáncer metastásicos, también se eleva significativamente en la ETV aguda. Todos nuestros pacientes estaban en estadios avanzados de su neoplasia, aunque no conocemos el tratamiento oncológico específico que estaban siguiendo y si éste podría afectar a los niveles de sPS. Se ha apuntado el potencial papel de esta proteína en el diagnóstico de la ETV³⁰. Otros autores han señalado su papel predictivo en el diagnóstico de las ETV en pacientes con cáncer³¹. Añadir biomarcadores como el DD y la sPS a la escala de predicción clínica de Khorana mejoraba la precisión diagnóstica. Los autores defienden dos puntos de corte para ambos biomarcadores con potencial valor en la predicción de eventos trombóticos en pacientes con cáncer; DD ≥ 1.440 µg/L y sPS ≥ 53,1 ng/mL. Estas cifras son coherentes con las medias que hemos obtenido en nuestra muestra de pacientes con cáncer sin ETV, las cuales estaban por debajo de las mismas.

Basándonos en nuestros resultados podemos decir que determinadas poblaciones de MPs circulantes como niveles de MPs totales y niveles de PMPs, podrían diferenciar entre pacientes con ETV idiopática y pacientes con cáncer no asociado a ETV. Estas observaciones necesitarían ser validadas en futuros estudios de cohortes de pacientes con cáncer y pacientes con ETV, enfocados en el papel de las MPs como biomarcadores del evento trombótico en el paciente con cáncer y de la neoplasia oculta en el paciente con ETV. A la hora de interpretar nuestros resultados debemos tener en cuenta que se trata de un estudio preliminar con un reducido tamaño muestral, en el que se admitieron pacientes con ETV que durante obtención de la muestra podrían estar ya bajo tratamiento anticoagulante, aunque fuera por un periodo inferior a 72 h.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S et al. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *Jama*. 2005;293(6):715-22.
2. Sousou T, Khorana A. Identifying cancer patients at risk for venous thromboembolism. *Hamostaseologie*. 2009; 29 (1):121-4.
3. Lechner D, Weltermann A. Chemotherapy-induced thrombosis: a role for microparticles and tissue factor? *Semin Thromb Hemost*. 2008; 34 (2): 199-203.
4. Otten HM, Mathijssen J, ten Cate H et al. Symptomatic venous thromboembolism in cancer patients treated with chemotherapy: an underestimated phenomenon. *Arch Intern Med*. 2004; 164 (2): 190-4.
5. Sorensen HT, Mellekjær L, Steffensen FH et al. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 1998; 338 (17): 1169-73.
6. Edgington TS, Ruf W, Rehemtulla A et al. The molecular biology of initiation of coagulation by tissue factor. *Curr Stud Hematol Blood Transfus*. 1991 (58): 15-21.
7. Moll T, Czyz M, Holzmüller H et al. Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells. Binding of NF kappa B-, AP-1-, and Sp1-like transcription factors. *J Biol Chem*. 1995; 270 (8): 3849-57.
8. 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. *Thromb Haemost*. 1999; 81 (1): 1-7.
9. Larsen E, Celi A, Gilbert GE et al. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*. 1989; 59 (2): 305-12.
10. Sako D, Chang XJ, Barone KM, et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*. 1993; 75 (6): 1179-86.
11. Owens AP, 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*. 2011; 108 (10): 1284-97.
12. Zahra S, Anderson JA, Stirling D et al. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br J Haematol*. 2011; 152 (6): 688-700.
13. Thaler J, Ay C, Pabinger I. Clinical significance of circulating microparticles for venous thromboembolism in cancer patients. *Hamostaseologie*. 2012; 32 (2): 127-31.
14. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R et al. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med*. 2009; 206 (9): 1913-27.
15. Thaler J, Ay C, Weinstabl H et al. Circulating procoagulant microparticles in cancer patients. *Ann Hematol*. 2011; 90 (4): 447-53.
16. Siegel R, Ma J, Zou Z et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64 (1): 9-29.
17. Jara-Palomares L, Rodríguez-Matute C, Elías-Hernández T et al. Testing for occult cancer in patients with pulmonary embolism: results from a screening program and a two-year follow-up survey. *Thromb Res*. 2010; 125 (1): 29-33.
18. Blann AD, Lip GY. Virchow's triad revisited: the importance of soluble coagulation factors, the endothelium, and platelets. *Thromb Res*. 2001; 101 (4): 321-7.
19. Sobieszczyk P, Fishbein MC, Goldhaber SZ. Acute pulmonary embolism: don't ignore the platelet. *Circulation*. 2002; 106 (14): 1748-9.
20. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45 (9): 1467-71.
21. Bal L, Ederhy S, Di Angelantonio E et al. Factors influencing the level of circulating procoagulant microparticles in acute pulmonary embolism. *Arch Cardiovasc Dis*. 2010; 103 (6-7): 394-403.
22. Kearon C, Akl EA, Ornelas J et al. Antithrombotic Therapy for VTE Disease: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2016; 149 (2): 315-52.
23. Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK et al. Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2009; 7 (8): 1421-3.
24. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK et al. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*. 2007; 5 (3): 520-7.
25. Linden SK, Sheng YH, Every AL et al. MUC1 limits *Helicobacter pylori* infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy. *PLoS pathogens*. 2009; 5 (10): e1000617.
26. Stein PD, Hull RD, Patel KC et al. D-dimer for the exclusion of acute venous thrombosis and pulmonary embolism: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2004; 140 (8): 589-602.
27. Wein M, Sterbinsky SA, Bickel CA et al. Comparison of human eosinophil and neutrophil ligands for P-selectin: ligands for P-selectin differ from those for E-selectin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995; 12 (3): 315-9.
28. Cleator JH, Zhu WQ, Vaughan DE et al. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood*. 2006; 107 (7): 2736-44.
29. Kohler S, Ullrich S, Richter U et al. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer*. 2010; 102 (3): 602-9.
30. Antonopoulos CN, Sfyroeras GS, Kakisis JD et al. The role of soluble P selectin in the diagnosis of venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2014; 133 (1): 17-24.
31. Ay C, Dunkler D, Marosi C et al. Prediction of venous thromboembolism in cancer patients. *Blood*. 2010; 116 (24): 5377-82.