

ORIGINAL

Estudio de los niveles de ligando CD40 en pacientes con síndrome coronario agudo

Ángel San Miguel Hernández^{a,*}, Blanca Martín Armentia^a, Alicia Armentia Medina^a y José Manuel Rodríguez Valencia^b

^a Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, España

^b Centro de Salud La Rondilla, Valladolid, España

Recibido el 7 de abril de 2011; aceptado el 17 de mayo de 2011

Accesible en línea el 16 de julio de 2011

PALABRAS CLAVE

Ligando CD40 soluble;
Síndrome coronario agudo

Resumen

Introducción: El ligando CD40 (CD40L) es un miembro de la superfamilia TNF con funciones importantes en el control de la inmunidad humoral dependiente del timo y en respuestas inmunes mediadas por células. Es una glicoproteína de 39 KDa, constituida por 261 aa, que tanto puede formar homotrimeros como experimentar clivaje proteolítico para producir formas solubles de 15-18 KDa. Niveles elevados de la forma soluble de CD40 L (sCD40L) han sido observados en suero de pacientes con LES, leucemia linfocítica crónica y angina inestable. Niveles altos de ambas formas, unida a membrana y soluble de CD40L, en pacientes con angina, sugiere que CD40L juega un papel patogénico en el proceso aterosclerótico y en promover síndromes coronarios agudos (SCA).

Material y métodos: Hemos analizado los niveles séricos de sCD40L en 56 pacientes con SCA (edad: $54,4 \pm 13,4$ años) procedentes del Servicio de Medicina Interna de nuestro Hospital y los hemos comparado con los de 22 individuos sanos ($42,7 \pm 8,4$ años). Como método de determinación hemos utilizado un inmunoensayo CD40 Quantikine, que es un ELISA en fase sólida diseñado para medir ligando CD40 humano en suero utilizando CD40 humano recombinante expresado por *E. coli*. A efectos comparativos, para pacientes ACS, se han realizado también determinaciones de troponina mediante un método quimioluminiscente propio del analizador Elecsys 2100 de Roche Diagnostics.

Resultados: Las determinaciones séricas de sCD40L en los pacientes hipertensos han proporcionado una concentración media de 1.048 ± 157 pg/mL, significativamente diferente ($p < 0,05$) de la obtenida para individuos sanos, 547 ± 65 pg/mL. El estudio de comparación entre sCD40L y troponina T ha dado lugar a la ecuación de correspondencia: troponina T = $1,48 * CD40L - 0,004$.

Discusión: La proteína procoagulante y proinflamatoria CD40L representa un objetivo nuevo en el tratamiento de la arterosclerosis y el SCA. Actualmente, la evaluación de riesgo en pacientes con SCA se está realizando por medio del análisis de troponinas, que son marcadores de la presencia de necrosis en células de miocardio. El valor de la determinación de sCD40L radica en

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: asanmiguel@saludcastillayleon.es (A. San Miguel Hernández).

KEYWORDS

Soluble CD40 ligand;
Acute coronary
syndrome

GAKO-HITZAK

CD40 ligando
disolbagarria;
Sindrome koronario
akutua

que, al ser éste un indicador de la activación de plaquetas y de las placas inestables, puede ser considerado un indicador de riesgo previo al desarrollo de necrosis de células cardíacas.

© 2011 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Study of CD40 ligand levels in patients with acute coronary syndrome**Abstract**

Introduction: The CD40 ligand (CD40L) is a member of the tumor necrosis factor superfamily and plays an important role in the regulation of thymus-dependent humoral immunity and cell-mediated immune responses. This ligand is a 39 kDa, 261 amino acid (aa) glycoprotein that can form either homotrimers or undergo proteolytic cleavage to produce soluble forms of CD40 (i.e. 15-18 kDa). Elevated levels of soluble CD40L (sCD40L) have been observed in the sera of patients with systemic lupus erythematosus, chronic lymphocytic leukemia and unstable angina. Enhanced levels of both soluble and membrane-bound CD40L in angina patients suggest that CD40L plays a pathogenic role in the atherosclerotic process and in promoting acute coronary syndromes (ACS).

Material and methods: We analyzed serum sCD40L levels in 56 patients with ACS (aged 54.4 ± 13.4 years) from the internal medicine department of our hospital compared with levels in 22 healthy controls (aged 43 ± 8 years). To measure sCD40 we used the Quantikine CD40 ligand immunoassay, a solid-phase ELISA designed to measure human CD40 in serum using *E. coli*-expressed recombinant human CD40. For comparison purposes, troponin T data was measured in patients with ACS. These data were obtained by a chemiluminescent method using the Elecsys 2100 Roche Diagnostics analyzer.

Results: Mean values of CD40L were significantly higher in healthy controls (546.7 ± 64.7 pg/mL) than in ACS patients: $1,048 \pm 157$ pg/mL ($p < 0.05$). The comparison study between troponin T and CD40L generated the following regression equation: Troponin T = $1.48 * CD40L - 0.004$.

Discussion: The proinflammatory and procoagulant protein CD40L represents a novel target in the treatment of atherosclerosis and ACS. Currently, risk evaluation in patients with ACS can be carried out by troponin analysis. Although troponins are only markers of myocardial necrosis, sCD40L is a marker of platelet activation and unstable plaques and can thus be used to identify disease activity before the development of cardiac cell necrosis.

© 2011 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

CD40 ligando mailaren ikerketa sindrome koronario akutua duten pazienteengan**Laburpena**

Sarrera: CD40 ligandoa (CD40L) TNF superfamiliakoa da, eta funtsezko eginkizuna du timoko humore-immunitatearen kontrolean eta zelula bidezko erantzun immuneetan, 39 kDa 261 aminoazidoz (aa) osatutako glikoproteina bat da, homotrimeroko osa ditzakeena edo klibaje proteolitikoak jasan dezakeena, 15-18 kDa-ko forma disolbagarriak ekoizteko. CD40 L (sCD40L) forma disolbagarriaren tasa altuak ikusi dira lupus eritematoso sistemikoa, leuzemia linfositiko kronikoa eta angina ezegonkorra duten pazienteen serumean. Bi forma horien (mintzera lotutako CD40L eta CD40L disolbagarria) tasa altuak aurkitu dira angina daukaten pazienteengan; hortaz, horrek iradokitzen du CD40L-k eginkizun patogenikoa daukala prozesu ateroklerotikoan eta sindrome koronario akutua (SKA) eragitean.

Materiala eta metodoak: Gurutzetako Ospitaleko Barne Medikuntzako Zerbitzuko SKA daukaten 56 pazienteren (adina: $54,4 \pm 13,4$ urte) sCD40L serum mailak aztertu ditugu, eta 22 pertsona osasuntsuren sCD40L serum mailarekin ($42,7 \pm 8,4$) alderatu. Determinazio-metodo gisa, CD40 Quantikine immunosaiakuntza erabili dugu. Hori fase solidoan dagoen ELISA bat da, giza CD40 ligandoa serumean neurtzeko diseinatua, *E. coli* bidez adierazitako giza CD40 birkonbinatzailea erabiliz. Alderaketa egiteko, SKA daukaten pazienteei troponina-determinazioak ere egin zaizkie, Roche Diagnostics-en Elecsys 2100 analizatzailearen kimilumineszentsia-metodo bat erabilita.

Emaitzak: Paziente hipertentsoetan sCD40L-ren serum determinazioaren kontzentrazioa batez beste 1.048 ± 157 pg/mL zen; emaitza nahiko bestelakoa da ($p < 0,05$) pertsona osasuntsuetan lortutakoarekin alderatuta: 547 ± 65 pg/mL. sCD40L-ren eta Troponina T-ren arteko alderaketa-ikerketak korrespondentzia-ekuazio baterako bide eman dute: Troponina T = $1,48 * CD40L - 0,004$.

Eztabaida: CD40L proteina prokoagulatzaile eta proinflamatorioak beste helburu bat irudikatzen du, arteroeskleriaren eta SKAren tratamenduan. Gaur egun, SKA daukaten pazienteen arriskuen

ebaluazioa troponinak aztertzearen bidez egiten da. Azken horiek miokardioko zeluletan nekrosia markatzen dute. sCD40L-ren determinazioaren balioa honetan datza: plaketak eta plaka eze-gonkorak aktibatzeako adierazlea denez, zelula kardiakoen nekrosia garatu aurreko arrisku-adierazletzat har daiteke.

© 2011 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Argitaratzailea: Elsevier España, S.L. Eskubide guztiak gordeta.

Introducción

En la actualidad, la aterosclerosis constituye la causa principal de morbimortalidad en los países desarrollados¹. A pesar de los avances en el conocimiento de los factores de riesgo, así como en los tratamientos, la enfermedad aterosclerótica coronaria sigue constituyendo una gran preocupación y sigue siendo objeto importante de estudio.

Han resultado de gran importancia los estudios que han aportado nuevas luces al conocimiento fisiopatológico de la aterogénesis. En el momento presente se sabe que el proceso aterogénico es un proceso complejo en el que están implicados varios mecanismos. La acumulación de lípidos en la pared arterial y la formación de trombos en los vasos, van acompañados de la producción de procesos inflamatorios crónicos en la proliferación celular². La formación del trombo sobre una placa aterosclerótica es compleja, correspondiéndose con ruptura de placa en un 70% y sin ruptura en un 30%¹.

Entre los factores que participan en la rotura de la placa de ateroma y consiguiente formación de trombos está el estrés oxidativo que produce la expresión de células endoteliales de moléculas y quimiocinas de adhesión tisular que favorecen la atracción de células inflamatorias al interior del ateroma³⁻⁵. Los macrófagos y las células del músculo liso del interior del ateroma sobreexpresan mediadores inflamatorios, enzimas proteolíticas y factores trombogénicos^{3,6,7}.

Las placas ateroscleróticas contienen células inflamatorias tales como los macrófagos. Estas enzimas proteolíticas que junto con las enzimas fibrinolíticas degradan la capa fibrosa de la placa, producen la inestabilidad de la misma y contribuyen a su ruptura⁸.

Por ello, los mediadores de la inflamación representan un papel importante en la formación y rotura de las placas y por lo tanto en la iniciación de los episodios coronarios agudos, así como en su progresión y evolución. Un elevado número de marcadores como las citoquinas, interleuquina 6 (Il-6) y factor de necrosis tumoral (TNF), proteína C reactiva, fibrinógeno y otros factores de la coagulación, moléculas de adhesión intracelular y celular vascular puede ser utilizado con fines pronósticos.

Entre los mediadores inflamatorios que producen células vasculares activadas como los macrófagos, están el ligando CD40. Las placas de ateroma humano contienen este ligando y su receptor CD40^{3,9}.

El ligando CD40 soluble, también denominado CD 145 o gp 39, es un complejo formado por una proteína transmembrana estructural y una molécula soluble de adherencia tisular. Se expresa en los linfocitos y las plaquetas activadas y constituye el nexo entre el sistema inflamatorio y los procesos trombóticos vasculares¹⁰. Su gen se localiza en el brazo largo del cromosoma X humano. Pertenece a la familia del TNF. Desde el punto de vista estructural forma homotrímeros de

otros miembros de la superfamilia TNF. El clivaje proteolítico puede también producir formas solubles del CD40. Las células T activadas pueden expresar ambas una membrana asociada y una forma soluble del CD40 ligando. Las formas solubles y unida a membrana de CD40 ligando son activas¹¹.

El receptor para ligando CD40 es CD40, proteína integral de membrana de 40 a 45 kDa que contiene 4 dominios extracelulares ricos en cisteína y que pertenecen a la superfamilia del receptor TNF¹².

La interacción del CD40 ligando con CD40, además de inducir la proliferación de un isótopo de conexión en linfocitos B, media en gran variedad de respuestas inflamatorias e inmunes¹³.

Relación LCD40 soluble y aterosclerosis

Los diferentes tipos celulares que constituyen el ateroma tales como los macrófagos, células T, células endoteliales, fibroblastos y células del músculo liso, expresan moléculas CD40 y CD40 ligando. Las interacciones entre CD40 y CD40 ligando inducen la producción de citoquinas, metaloproteinasas, factores de crecimiento y factores procoagulantes que están normalmente presentes en el ateroma humano¹⁴. Existe gran número de estudios que relacionan las interacciones CD40 y CD40 ligando en los procesos cardiovasculares¹⁵.

Los estadios fisiopatológicos que intervienen en el síndrome coronario agudo (SCA) varían entre una fase inicial, donde predominan las complicaciones resultantes del accidente de placa (trombo coronario), y una fase evolutiva donde cobra relevancia la persistencia de la placa residual, con la probabilidad de nuevas rupturas.

El ligando CD40 es un marcador de la actividad plaquetaria y está relacionado de forma directa con la desestabilización de la placa de ateroma. Los marcadores de activación plaquetaria son importantes en el diagnóstico y estratificación de estos pacientes. La particularidad de la utilización del ligando CD40 soluble como marcador de necrosis miocárdica es que está involucrado en la fisiopatología de los SCA en forma activa. Otros marcadores de necrosis miocárdica como la troponina cardiaca, por el contrario no están relacionados en la fisiopatología de los SCA.

Los marcadores biopatológicos de la enfermedad coronaria abarcan desde fenómenos de actividad inflamatoria de los procesos ateroscleróticos, la isquemia celular, la muerte del tejido miocárdico y las alteraciones hemodinámicas relacionadas, etc.

Objetivos

Estudiar el ligando CD40 para ver su utilidad en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento en pacientes con SCA.

Material y métodos

Se analizaron 56 pacientes con SCA, con una edad media de $54,4 \pm 13,4$, procedentes del Servicio de Medicina Interna, y se compararon con 22 sanos con edades medias de $42,7 \pm 8,4$ años.

El inmunoensayo de ligando CD40 Quantikine (Vitro SA), es un ELISA en fase sólida diseñado para medir ligando CD40 humano en suero. Contiene ligando CD40 humano recombinante expresado por *E. coli* y sirve para cuantificar con precisión el factor recombinante. Los resultados obtenidos usando CD40 humano natural mostraron curvas lineales que eran paralelas a las curvas estándar obtenidas usando el estándar del kit Quantikine. Estos resultados indican que el ligando CD40 de Quantikine puede ser usado para determinar los valores de masa relativa para el ligando CD40 humano que ocurre naturalmente.

Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo enzimático en sándwich cuantitativo. Un anticuerpo específico policlonal para ligando CD40 ha sido impregnado en una microplaca. Los estándares y muestras son pipeteados en los pocillos y cualquier ligando CD40 presente se une al anticuerpo inmovilizado. Después del lavado y eliminadas las sustancias no unidas, un anticuerpo policlonal unido a una enzima, específica para ligando CD40, se añade a los pocillos. A continuación del lavado para eliminar cualquier reactivo de enzima anticuerpo no unido, se añade una solución de sustrato y se desarrolla el color en proporción a la cantidad de ligando CD40 unido en el paso inicial. El desarrollo del color se para y se mide la intensidad del mismo.

Resultados y discusión

Al estudiar los niveles de ligando CD40 en el grupo control, hemos encontrados unos valores medios de CD40L en 22 pacientes sanos de $546,7 \pm 64,72$ pg/ml, frente a 56 pacientes con SCA con una media de $1.048,24 \pm 156,95$ pg/ml, encontrándose entre ellos diferencias estadísticamente significativas (tabla 1 y fig. 1).

Igualmente se correlacionaron los valores de los pacientes con SCA que tenían realizada la troponina T cardiaca, mediante un método de quimioluminiscencia (Elecys 2100, Roche Diagnósticos), obteniéndose los siguientes resultados medios en 40 de los mismos pacientes ($2,24 \pm 1.69$ ng/ml).

Cuando tratamos de correlacionar los valores de troponina T cardiaca y de ligando CD40, obtuvimos la asociación que recoge la recta de regresión $\text{TrT} = 1,48 * \text{LCD40} - 0,0041$ ($n = 40$) ($r^2 = 0,04$).

Los SCA representan una variedad de entidades clínicas con diferentes pronósticos, producto de los múltiples mecanismos fisiopatológicos involucrados. Las alteraciones

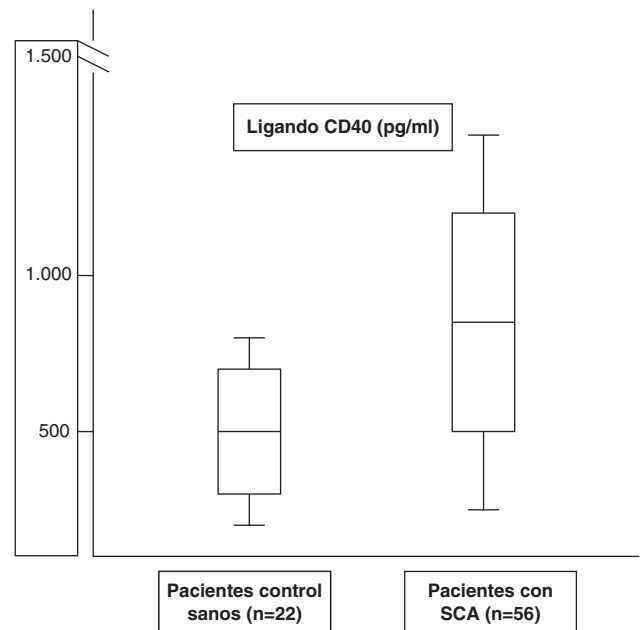


Figura 1 Niveles medios de ligando CD40 en pacientes controles y en pacientes con SCA.

reológicas, el estrés hemodinámico sobre placas ateroscleróticas crónicas, el incremento exagerado del tono vascular coronario y procesos inflamatorios, entre otros, desencadenan el accidente de las placas. En la etapa inicial de este fenómeno el objetivo terapéutico es actuar sobre la activación de las plaquetas y la trombina, vía final común de estos procesos.

Posteriormente, hay que identificar estos mecanismos iniciales desencadenantes de la inestabilidad clínica. La historia natural de los SCA evidencia que nos enfrentamos a una enfermedad crónica, con eventos que persisten más allá de la internación.

La evaluación pronóstica de la placa fija residual es insuficiente para reconocer la persistente inestabilidad vascular o la vulnerabilidad global de los pacientes y no permite predecir la evolución clínica, abriendo el capítulo del riesgo oculto en la angina inestable. Recientes estudios demuestran la participación del sistema inmunoinflamatorio en la génesis y complicaciones del proceso aterosclerótico.

La determinación de este fenómeno biológico abre un nuevo campo en la comprensión de esta patología, al identificar al grupo de pacientes en riesgo. La proteína C reactiva, utilizada inicialmente en la medición de este fenómeno, comenzó la etapa de la predicción de eventos a través del riesgo serológico. En el futuro, los biomarcadores más específicos de vulnerabilidad serán comunes y de gran utilidad en

Tabla 1 Niveles medios de ligando CD40 y otros parámetros estadísticos en el grupo control de 22 pacientes sanos y en 56 pacientes con síndrome coronario agudo

	Controles sanos (n = 22)	Pacientes con SCA (n = 56)	Significación
sCD40L (pg/ml)	$546,7 \pm 64,72$. Mediana = 214,3. Moda = 109,7. Rango (38,3-947,3)	$1.048,24 \pm 156,95$. Mediana = 425,67. Moda = 281,9. Rango (73,8-3.813,9)	$p < 0,05$

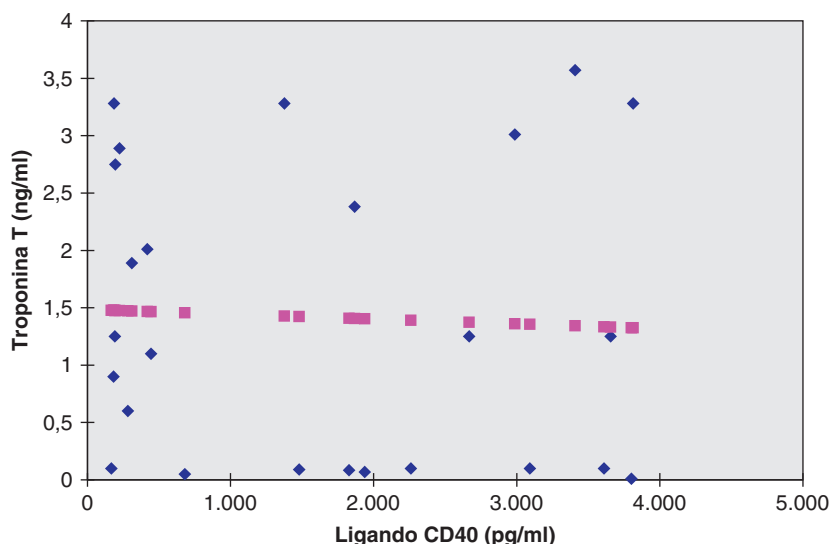


Figura 2 Recta de regresión obtenida, al estudiar la asociación existente entre troponina T cardíaca y ligando CD40, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. $TrT = 1,48 * LCD40 - 0,0041$ ($n = 40$) ($r^2 = 0,04$).

la práctica cotidiana (interleuquinas, CD40, etc.). La incorporación de los mismos posee un mayor impacto clínico, en la población de pacientes de riesgo intermedio, donde aún continúa el dilema sobre la predicción de eventos a largo plazo. En el alto y bajo riesgo, el papel es menor, ya que en la actualidad está más definida la conducta a seguir.

En los últimos años se han venido realizando numerosos estudios encaminados a establecer el valor del ligando CD40 como marcador con fines de pronóstico, diagnóstico y terapéutico. Schonbeck et al¹⁶ observaron que en personas aparentemente sanas, niveles elevados de ligando CD40 soluble predecían riesgos aumentados de lesiones ateroscleróticas y accidentes cardiovasculares (fig. 2).

Heeschen et al¹⁷ confirman en su estudio que el ligando CD40 es un marcador de la activación de las plaquetas y de los procesos tromboticos e inflamatorios que aumentan el riesgo cardíaco. El valor pronóstico de este marcador fue validado en pacientes con dolor torácico, asociándose niveles elevados de ligando CD40 con pacientes con SCA y con alto riesgo de infarto y muerte. Estos autores también estudian el valor del ligando CD40 como marcador del efecto terapéutico de la inhibición del receptor glicoproteico IIb/IIIa en los pacientes con SCA. En pacientes con niveles elevados del marcador el fármaco abciximab redujo el riesgo de eventos negativos, mientras que en aquellos que no presentaban niveles elevados de marcador no se observan beneficios con dicho fármaco.

Aukrust et al¹⁸, en un estudio realizado, concluyen que pacientes con angina inestable presentan niveles de ligando CD40 solubles elevados, no ocurriendo con pacientes con angina estable o personas sanas.

En otros estudios^{19,20}, además de confirmar la importancia del ligando CD40 soluble en la fisiopatología del SCA, establecen la utilidad de dicho marcador para identificar pacientes con alto riesgo de lesiones ateroscleróticas y tromboticas.

La proteína procoagulante y proinflamatoria CD40L representa por tanto un objetivo nuevo en el tratamiento de la arterosclerosis y el SCA. Varios agentes terapéuticos han mostrado modular la expresión del CD40L. Actualmente, la

evaluación de riesgo en pacientes con SCA se puede realizar por medio del análisis de troponinas, pero esto corresponde a la presencia de necrosis en células de miocardio. El valor de ligando CD40 soluble se considera como un indicador de riesgo previo al desarrollo de necrosis de células cardíacas. Este marcador puede ser un indicador de la activación de plaquetas y de las placas inestables que provee información adicional a la de otros marcadores.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Casas Pina T. Mediadores de inflamación de aterosclerosis: el papel del ligando CD4. En: Actualidades en el Laboratorio Clínico. Madrid, AEFA. 2004.
2. Ross R, Atherosclerosis. An inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115–26.
3. Aikawa M, Libby P. Mecanismos principales de estabilización de la placa aterosclerótica mediante reducción lipídica. *Cardiovascular Risk Factor.* 2000;9:105–18.
4. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1859–67.
5. Cotran RS, Briscoe DM. Endothelial cells in inflammation. En: Kelly W, Harris E, Ruddy S, Sledge C, editors. *Textbook of Rheumatology.* Philadelphia: WB Saunders Publishing Co; 1997. p. 183–98.
6. Celentano DC, Frishman WH. Matrix metalloproteinases and coronary artery disease: a novel therapeutic target. *J Clin Pharmacol.* 1997;37:991–1000.
7. Taubman MB, Fallon JT, Schecter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, et al. Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1997;78:200–4.
8. Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, et al. Membrane type I matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation.* 1999;99:3103–9.

9. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:1931–6.
10. Iglesias R, Jose Lescano A. Síndromes coronarios agudos Evaluación del riesgo oculto. *Rev Costarric Cardiol*. 2004;6:31–6.
11. Badier M. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2003;348:1104–11.
12. Martínez Villarreal AM, Montoya Guarín CJ. Moléculas accesorias. *Revista Asociación Colombiana Alergia. Asma e Inmunología*. 2000;9. Disponible en: <http://www.encolombia.com/medicina/alergia/alergia9200moleculas-vol4.htm>.
13. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, et al. The CD40 ligand, gp 39, is defective in activated T cells from patient with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell*. 1993;72:291–300.
14. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:111–35.
15. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:4–43.
16. Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation*. 2001;104:2266–8.
17. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al. Soluble CD40 Ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2003;348:1104–11.
18. Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina: possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1999;100:614–27.
19. Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, Leong GY, Phillips DR, Gold HK. Cardiopulmonary bypass induces release of soluble CD40 ligand. *Circulation*. 2002;105:2849–54.
20. Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation*. 2003;107:1123–8.