

Artigo
Original

3

Auto-Anticorpo Antibeta1-Adrenorreceptor na Cardiomiopatia Dilatada e na Miocardite

Autoantibodies Against the β_1 Adrenergic Receptor in Dilated Cardiomyopathy and Myocarditis

Andrea Tostes de Oliveira¹, Vitor Pordeus¹, Ciria Carolina Quintero Hernandez Dias²,
Luiz Dias², Antônio Carlos Campos de Carvalho², Evandro Tinoco Mesquita²

Resumo

Fundamentos: Auto-anticorpo contra a segunda alça extracelular do β_1 -adrenorreceptor (anti- β_1 -EC II) tem sido detectado em alguns pacientes com cardiomiopatia dilatada (CMD) e com miocardite. Em experimentos com animais, esse auto-anticorpo pode causar redução da contratilidade miocárdica.

Objetivo: Identificar a presença do auto-anticorpo antibeta₁ - segunda alça extracelular (anti- β_1 -EC II) em pacientes com cardiomiopatia dilatada não-inflamatória (CMD) e com miocardite.

Métodos: Foram estudados 18 pacientes portadores de insuficiência cardíaca (IC), com média de idade 48,2±11,9 anos, sendo 61% do sexo masculino, e 20 pacientes compondo o grupo-controle com média de idade 22,8±1,7 anos, sendo 50% do sexo masculino. Os pacientes com IC foram estratificados em dois grupos: Grupo I, com CMD não-inflamatória (n=8) e Grupo II, com miocardite (n=10) que apresentavam cintilografia miocárdica com Ga-67 positiva ou biópsia endomiocárdica positiva baseado no critério de Dallas. Para a pesquisa do anticorpo anti- β_1 -adrenorreceptor, foi utilizado um peptídeo sintético correspondente β_1 -EC II pelo método ELISA.

Resultados: Os pacientes com IC apresentavam níveis de anticorpos de 0,40±0,37 e o grupo-controle de 0,27±0,15, não havendo diferença significativa no nível do ELISA, (p=0,48). No Grupo I, o anticorpo estava presente em 2 pacientes e no Grupo II em 7 (70%), p=0,06. Níveis dos títulos de anticorpos foram mais elevados no Grupo II (0,53±0,36) em relação ao Grupo I (0,23±0,31), (p=0,033).

Conclusão: O resultado sugere uma resposta auto-imune anormal na miocardite, necessitando de estudos adicionais futuros para melhor compreensão.

Abstract

Background: An autoantibody against the second extracellular loop of a cardiac β_1 adrenergic receptor (AR) has been detected in some patients with dilated cardiomyopathies (DCM) and myocarditis. In animal experiments, this autoantibody has been shown to reduce myocardial contractility.

Objective: To identify the presence of the autoantibody that acts against the second extracellular loop of β_1 -adrenergic receptors in patients with non-inflammatory dilated cardiomyopathy and myocarditis.

Methods: Eighteen patients with heart failure were studied, with an average age of 48.2±11.9 and 61% men, as well as twenty patients in the control group with an average age of 22.8±1.7 and 50% men. The patients with heart failure were divided into two groups: Group I with non-inflammatory DCM (n=8) and Group II with myocarditis (n=10), who were diagnosed by Ga-67 myocardial scintigraphy or endomyocardial biopsy using the Dallas criteria. They were screened for the anti- β_1 -adrenergic receptor autoantibody by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test, using a synthetic peptide corresponding to β_1 -EC II.

Results: Patients with heart failure presented autoantibodies at 0.40±0.37, while healthy subjects posted 0.27±0.15, with no significant differences in the ELISA level (p=0.48). The antibody was detected in two patients in Group I and in seven patients (70%) in Group II (p=0.06). These results demonstrate that autoantibody titers were higher in Group II (0.53±0.36) than in Group I (0.23±0.31) (p=0.033).

Conclusions: The results suggest anomalous autoimmune responses in myocarditis, indicating that further studies are required for better understanding.

¹ Hospital Universitário Antonio Pedro - Universidade Federal Fluminense (UFF) - Niterói (RJ), Brasil

² Laboratório de Eletrofisiologia Antônio Paes de Carvalho - Instituto de Biofísica Carlos Chagas - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - Rio de Janeiro (RJ), Brasil

Palavras-chave: Auto-anticorpos, Cardiomiopatia dilatada, Receptor β_1 -adrenérgico, Auto-imunidade

Keywords: Autoantibodies, Dilated cardiomyopathy, β_1 adrenergic receptor, Autoimmunity

Introdução

Respostas auto-imunes contra vários antígenos miocárdicos têm sido envolvidas na patogênese da cardiomiopatia dilatada (CMD) idiopática e da miocardite, e auto-anticorpos contra proteínas de células cardíacas têm sido detectados nos soros desses pacientes. Auto-anticorpos circulantes para uma variedade de antígenos cardíacos, incluindo receptores acoplados a proteínas G-beta (β) 1-adrenorreceptores e receptores muscarínicos, proteínas mitocondriais, difosfato de adenosina, proteínas trifosfato de adenosina, e cadeia pesada de miosina¹⁻⁴.

O papel dos auto-anticorpos, evidenciando efeitos deletérios sobre o cardiomiócito e contribuindo na etiopatogenia das CMD, vem sendo elucidado. Wallukat et al. demonstraram efeitos cardiodepressores e cardioestimulantes de auto-anticorpos circulantes através de um ensaio com cultura de cardiomiócitos murinos⁴. Os pacientes portadores de CMD idiopática, de 30% a 50% evidenciam os mesmos efeitos crono e inotrópicos sobre a cultura celular, sugerindo que a doença pode ter realmente uma patogênese comum².

Tem sido demonstrado que auto-anticorpos β_1 -adrenérgico humano (β_1 -AR), apresentam atividades cardioestimulantes que podem estar envolvidos na iniciação e na progressão da CMD. Especificamente, anticorpos que atuam no segundo domínio da segunda alça extracelular (EC II) podem ser particularmente relevantes. Recentemente, foi demonstrado que ratos imunizados com anticorpos β_1 -EC II (100% seqüência idêntica rato/humano) desenvolveram anticorpos anti- β_1 -EC II e CMD progressiva. Subseqüentemente, a transferência de anticorpos anti- β_1 -EC II de ratos imunizados para ratos saudáveis também transferiu a doença, resultando em evidência direta para a relação causa e efeito entre anticorpos anti- β_1 -AR estimulantes e CMD⁵.

O anticorpo anti- β_1 -EC II tem sido detectado de 33% a 95% dos pacientes com CMD, em 10% dos pacientes com CMD isquêmica e 0% a 16% em indivíduos normais, dependendo da estratégia de *screening* utilizada⁹. Estudos prévios mostram que pacientes com CMD com anticorpos anti- β_1 -EC II exibem mais acentuado grau de disfunção ventricular esquerda, alta prevalência de morte súbita quando comparados a pacientes com ausência desses auto-anticorpos⁶⁻⁸.

O objetivo deste estudo é identificar em pacientes com CMD não-inflamatória e com miocardite, a presença

do auto-anticorpo contra a segunda alça extracelular do β_1 -adrenorreceptor.

Métodos

Foram selecionados prospectivamente 18 pacientes portadores de IC de origem não-isquêmica, no período de janeiro de 2005 a agosto de 2005. Os critérios de inclusão foram: as classes funcionais (CF II a IV, seguindo o critério da *New York Heart Association* – NYHA) e a fração de ejeção do VE inferior a 50% em repouso (identificados ao ecocardiograma bidimensional, pelo método de Simpson).

Os pacientes foram acompanhados no ambulatório de Cardiologia do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP); foram informados sobre os procedimentos de investigação incluídos no estudo e, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram submetidos ao protocolo que envolvia avaliação clínica, coleta de sangue para a dosagem do anticorpo anti- β_1 -EC II, ecocardiograma bidimensional (ECO) e exames de cardioimagem. A terapia regular da IC incluía inibidores da enzima conversora da angiotensina (ou antagonistas dos receptores de angiotensina II), digitálicos, diuréticos, espirolactona. Foram selecionados apenas os pacientes admitidos no ambulatório, sem uso prévio de betabloqueadores e, após a coleta do sangue, iniciava-se a medicação.

Os pacientes com IC foram estratificados em dois grupos: Grupo I, com CMD não-inflamatória e Grupo II, com miocardite. No Grupo I (n=8), 5 pacientes apresentavam cintilografia miocárdica com Galium (Ga)-67 negativa para miocardite, e 3 pacientes apresentavam história clínica não sugestiva de miocardite. O diagnóstico de miocardite (n=10) foi feito através da cintilografia miocárdica com Ga-67 positiva, ou biopsia endomiocárdica positiva baseado no critério de Dallas⁹.

Os critérios de exclusão foram: doença de Chagas, doença orovalvar – de moderada a grave –, diabetes mellitus ou outra doença endócrina, doenças do colágeno, neoplasias, hipertensão arterial sistêmica (HAS) estágio 3 (Consenso SBC), uso prévio de betabloqueador, uso de drogas ilícitas, consumo de álcool e infecção recente. Os pacientes com história de *angina pectoris* ou idade superior a 50 anos, com dois ou mais fatores de risco, foram submetidos à coronariografia. A doença coronariana epicárdica aterosclerótica foi excluída por cineangiocoronariografia, com

identificação de lesão aterosclerótica obstrutiva maior ou igual 50% de uma ou mais artérias coronárias.

O grupo-controle foi constituído por 20 indivíduos sadios, selecionados após avaliação clínica, para estabelecimento de níveis de referência de normalidade de anticorpo contra a segunda alça extracelular do β_1 -adrenorreceptor.

O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina / Hospital Universitário Antônio Pedro da UFF.

A pesquisa do anticorpo anti- β_1 -adrenorreceptor foi realizada no Laboratório de Eletrofisiologia Antônio Paes de Carvalho, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O reconhecimento do peptídeo sintético cuja seqüência corresponde à segunda alça extracelular (o2) do β_1 -AR (HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTN) foi feito através do ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). Para tanto, cada poço de uma microplaca de titulação (*Corning, Inc., USA*) foi recoberto com 500ng de peptídeo em tampão carbonato de sódio 0,05M, pH 9,6 e incubado por 12 horas a 4°C. Após esse período, os poços foram saturados com PBS +5% (v/v) de soro fetal bovino e *Tween-20*, 0,05% por 90 minutos a 25°C para o bloqueio dos sítios de ligação residuais. As amostras de soro CMD (cardiomiopatia dilatada), miocardite ou NBD (doadores normais) foram diluídas 1:100 ou 1:50 em PBS - soro fetal bovino +0,05% (v/v) *Tween-20* (PBS-SFB-T) e incubadas com o peptídeo por 180 minutos a 37°C. Diluições seriadas de um anticorpo policlonal de coelho, específico contra a segunda alça extracelular (o2) do β_1 -AR, foram utilizadas como controle positivo. IgG biotinilada de cabra anti-IgG humana ou anti-IgG de camundongo foi diluída (1:5000) em PBS-SFB-T e deixada para reagir, por 60 minutos a 37°C. As interações dos anticorpos foram detectadas através de estreptavidina conjugada à peroxidase (1 μ g/ml) em PBS-T. Peróxido de hidrogênio + diamina de o-fenilano foram usados como substrato para a enzima, e o desenvolvimento de cor foi medido a uma absorbância de 450nm. Como resultado, foi aplicada a média dos valores obtidos no grupo-controle.

A análise estatística foi realizada empregando-se os seguintes métodos: para a comparação de dados quantitativos (por exemplo, ELISA) entre dois grupos (IC e controle) foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, pois as variáveis não apresentaram distribuição normal (distribuição gaussiana), devido principalmente à dispersão dos dados e ao tamanho reduzido da amostra; para a comparação de dados qualitativos (ELISA alterado) foi aplicado o teste do qui-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher. O critério de determinação de significância adotado foi o nível

de 5%. A análise estatística foi processada pelo *software* estatístico SAS® *System*.

Resultados

Foram estudados 18 pacientes portadores de IC, com média de idade 48,2 \pm 11,9 anos, sendo 61,1% do sexo masculino, e classe funcional II de 61,1%. O grupo-controle foi composto por 20 pacientes, com média de idade 22,8 \pm 1,7 anos, sendo 50% do sexo masculino. Os pacientes com IC apresentavam níveis de títulos do anticorpo anti- β_1 -EC II de 0,40 \pm 0,37, e o grupo-controle de 0,27 \pm 0,15, não havendo diferença significativa no nível do ELISA entre os dois grupos ($p=0,48$). A Tabela 1 apresenta as características clínicas dos pacientes com IC e do grupo-controle.

No Grupo I, a média de idade foi 46,5 \pm 10 anos, sendo 50% masculino; no Grupo II, a média de idade foi 49,6 \pm 13 anos, sendo 70% masculino ($p=0,62$). O ECO mostrou o valor médio da FEVE pelo método de Simpson: no Grupo I foi 37,1 \pm 6,5% e no Grupo II foi 33,8 \pm 8,6% ($p=0,3$). A classe funcional II foi a mais freqüente no Grupo II ($n=6$). A maioria dos pacientes apresentava tempo de doença menor que seis meses: 6 pacientes do Grupo I e 5 pacientes do Grupo II. A Tabela 2 apresenta as características clínicas dos Grupos I e II.

O anticorpo anti- β_1 -EC II esteve presente em 9 pacientes com IC: 2 pacientes (25%) do Grupo I e 7 pacientes (70%) do Grupo II ($p=0,06$). Os níveis dos títulos do anticorpo anti- β_1 -EC II foram mais elevados no Grupo II, com 0,53 \pm 0,36 em relação ao Grupo I, com 0,23 \pm 0,31 ($p=0,033$) (Figura 1). Não se evidenciou correlação dos títulos do anticorpo anti- β_1 -EC II em relação à idade e FE, em ambos os grupos (Tabela 3).

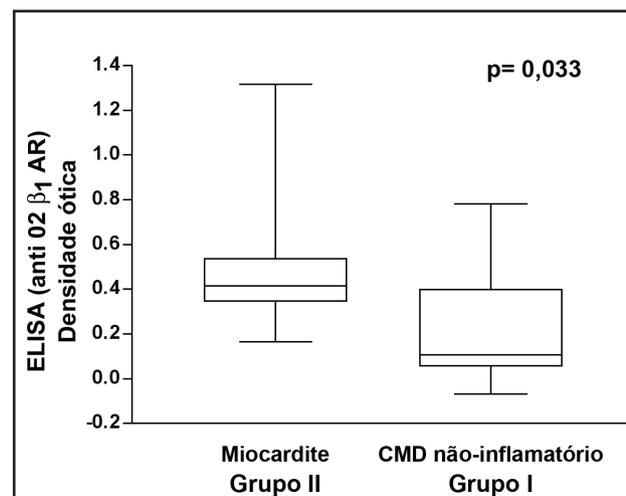


Figura 1
Concentrações de anti-02- β_1 AR nos Grupos miocardite e CMD não-inflamatória.

Tabela 1
Características Clínicas dos Pacientes com IC e do Grupo-controle

	ICC (n=18)	Controle (n=20)	p
Idade (anos)	48,2 ± 11,9	22,8±1,70	<0,001
Sexo n (%)			0,49
Masculino	11 (61,1)	10 (50)	
Feminino	7 (38,9)	10 (50)	
Fração de ejeção de VE (%)	35,3 ± 7,77	-	-
Tempo de doença n (%)			
< 6 meses	11 (61,1)	-	-
> 6 meses e <12 meses	7 (38,9)	-	-
CF (NYHA) n (%)			
II	10 (55,6)	-	-
III	4 (22,2)	-	-
IV	4 (22,2)	-	-
Infecção prévia n (%)			
Presente	8 (44,4)	-	-
Ausente	10 (55,6)	-	-
Cintilografia miocárdica n (%)			
Positiva	9 (64,3)	-	-
Negativa	5 (35,7)	-	-
Digoxina (mg/d) (n)	0,25 ± 0 (6)	-	-
Furosemida (mg/d) (n)	40 ± 27,9 (10)	-	-
Captopril (mg/d) (n)	52,5 ± 21 (10)	-	-
Enalapril (mg/d) (n)	15,71 ± 5,3 (7)	-	-
Losartan (mg/d) (n)	50 ± 0 (2)	-	-
Espiro lactona (mg/d)(n)	25 ± 0 (8)	-	-

VE=ventrículo esquerdo; CF=classe funcional (NYHA)

Valores expressos em média ± erro-padrão

Tabela 2
Características Clínicas dos Grupos I e II

	Grupo I (CMD não-inflamatória) (n=8)	Grupo II (miocardite) (n=10)	p
Idade (anos)	46,5±10,7	49,6±13,1	0,62
Sexo % (n)			
Masculino	50 (4)	70 (7)	ns
Feminino	50 (4)	30 (3)	
Fração de ejeção de VE (%)	37,13±6,56	33,80±8,6	0,30
Tempo de doença, (n)			
<6 meses	5	6	ns
> 6 meses e <12 meses	3	4	ns
Classe funcional (NYHA) (n)			
II	4	6	ns
III	2	2	ns
IV	2	2	ns
Digoxina (mg/d) (n)	0,25±0 (3)	0,25±0 (3)	ns
Furosemida (mg/d) (n)	60±40 (4)	53,3±20,6 (6)	ns
Captopril (mg/d) (n)	66,6±14,4 (3)	46,4±21,3 (7)	ns
Enalapril (mg/d) (n)	17,5±5 (4)	12,5±5 (4)	ns
Espiro lactona (mg/d) (n)	25±0 (2)	25±0 (6)	ns
Anticorpo anti 02 β1- AR positivos % (n)	25 (2)	70 (7)	0,057

n=número de pacientes; Valores expressos em média ± erro-padrão

Tabela 3

Comparação de níveis de títulos de ELISA no Grupo I (CMD não-inflamatória) e no Grupo II (miocardite)

Variável	Grupo I (n=8)	Grupo II (n=10)	p
ELISA (valor)	0,23±0,31	0,53±0,36	0,033
Idade (anos)	46,50±10,76	49,60±13,17	0,62
FE (%)	37,13±6,56	33,80±8,6	0,30

Valores expressos em média ± desvio-padrão

Discussão

O anticorpo anti-β1-EC II esteve presente em 70% dos pacientes com miocardite (Grupo II) e 25% com CMD (Grupo I) $p=0,06$. Foram encontrados títulos mais elevados do anticorpo anti-β1-EC II na miocardite, havendo uma diferença significativa na titulação pelo ELISA ($p=0,03$), sugerindo uma resposta auto-imune anormal na miocardite.

Desde as primeiras descrições sobre auto-anticorpos circulantes anti-beta-1-adrenorreceptor na CMD, vários grupos têm investigado as implicações funcionais das anormalidades auto-imunes relacionadas nos receptores miocárdicos sobre desenvolvimento e/ou curso da doença. Entretanto, dependendo dos critérios de seleção e dos métodos imunológicos empregados, a prevalência e/ou o impacto funcional de tais anticorpos podem se apresentar diferentes¹⁰.

De acordo com estudos prévios, foi achada alta prevalência (51%) de anticorpos diretamente contra vários domínios sintéticos β-receptores quando se teve por base o peptídeo similar, quando o ELISA foi testado. Somente a metade desses anticorpos detectados reconhece e se acopla à membrana do receptor β-adrenérgico, ligando-se diretamente ao domínio da segunda alça extracelular, sugerindo induzir a ativação do β-receptor^{7,11}.

Diferentes estudos têm mostrado a presença do anticorpo anti-β1 adrenorreceptor em pacientes com graus mais avançados de disfunção ventricular esquerda em relação a pacientes com anticorpos negativos¹². Neste trabalho não foram encontradas diferenças entre o grau de disfunção ventricular e a idade. A falta de associação do anticorpo com a gravidade da disfunção ventricular ou com a idade se deve, possivelmente, ao tamanho pequeno da amostra.

Anormalidades na imunidade humoral e celular têm sido descritas na miocardite e na CMD. Um episódio de necrose dos miócitos induz a ocorrência de reações imunes, podendo resultar em fibrose como um fenômeno comum na CMD. Ao longo desses anos, têm se identificado diferentes auto-anticorpos cardíacos em pacientes com miocardite e CMD. Entretanto, há

dúvida se esses auto-anticorpos são diretamente patogênicos ou meramente representam marcadores humorais da imunidade. Logo, alguns auto-anticorpos podem, em parte, representar apenas um repertório imunológico normal, nem sempre patogênico¹³.

Estímulo crônico da atividade, o betarreceptor cria um círculo vicioso chamado de superestimulação adrenérgica, promovendo manifestações crônicas de IC. Então o anticorpo, que estabiliza o receptor ativo e sensibiliza o sistema betaadrenérgico para catecolaminas, poderia causar efeitos em longo prazo na IC, suportando a evidência da alta prevalência de anticorpo na CMD e associação com severa disfunção ventricular, e com pior prognóstico^{7,10-12,14}.

Portadores de IC com anticorpos positivos têm sido beneficiados com a técnica de imunoadsorção. É um novo método terapêutico que promove a remoção de auto-anticorpos; é capaz de interferir no estado imunoinflamatório sistêmico e miocárdico, ocasionando melhora dos parâmetros funcionais, e de induzir remodelamento cardíaco reverso. Essa nova técnica, ainda experimental, necessita de estudos fase III direcionados para desfechos clínicos robustos, tais como mortalidade e redução de hospitalizações por IC para sua incorporação na prática clínica^{13,15-17}.

Uma das limitações do presente estudo é o tamanho pequeno da amostra, a não-avaliação funcional e ao grupo-controle sem IC - que era significativamente mais jovem em relação aos pacientes portadores de IC, podendo ter influenciado nos valores obtidos para os auto-anticorpos.

Conclusão

O presente estudo identificou a presença do anticorpo anti-β1-EC II na IC e com titulações mais elevadas na miocardite, abrindo perspectivas para novas investigações e avaliação para o estudo funcional desse auto-anticorpo.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

Referências

1. Störk S, Boivin V, Horf R, et al. Stimulating autoantibodies directed against the cardiac β_1 -adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy. *Am Heart J*. 2006;4:697-704.
2. Caforio AL, Mahon NJ, Tom F, et al. Circulation cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail*. 2002;4:411-17.
3. Limas JC. Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1997;95:1979-980.
4. Wallukat G, Müller J, Podlowski S, et al. Agonist-like beta-Adrenoceptor antibodies in heart failure. *Am J Cardiol*. 1999;83:75H-79H.
5. Jahns R, Boivin V, Lohse MJ. Beta 1-adrenergic receptor directed autoimmunity as a cause of dilated cardiomyopathy in rats. *Int J Cardiol*. 2006;112(1):7-14.
6. Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, et al. Autoantibodies against the second extracellular loop of β_1 -adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:418-24.
7. Matsui S, Fu M. Pathological importance of anti-G-protein coupled receptor autoantibodies. *Int J Cardiol*. 2006;112:27-29.
8. Burvall L, Tang MS, Isic A, et al. Antibodies against the beta-1-adrenergic receptor induce progressive development of cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:1001-1007.
9. Aretz HT. Myocarditis the Dallas criteria. *Hum Pathol*. 1987;18:619-24.
10. Jahns R, Boivin V, Siegmund C, et al. Activating beta-1-adrenoceptor antibodies are not associated with cardiomyopathies secondary to valvular or hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:1545-551.
11. Jahns R, Boivin V, Lohse MJ. β_1 -adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16:20-22.
12. Jahns R, Boivin V, Siegmund C, et al. Autoantibodies activating human β_1 -adrenergic receptors are reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation*. 1999;99:649-54.
13. Felix SB, Staudt A, Baumann G. Immunoabsorption as a new therapeutic principle for treatment of dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2002;4(suppl I):163-68.
14. Jane-wit D, Altuntas CZ, Johnson JM, et al. β_1 -adrenergic receptor autoantibodies mediate dilated cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*. 2007;116:399-410.
15. Mobini R, Maschke H, Waagstein F. New insight into the pathogenesis of cardiomyopathy: possible underlying autoimmune mechanisms and therapy. *Autoimmunity Rev*. 2004;3:277-84.
16. Felix SB, Staudt A. Non-specific immunoadsorption in patients with dilated cardiomyopathy: mechanisms and clinical effects. *Int J Cardiol*. 2006;112:30-33.
17. Mann LD. Autoimmunity, immunoglobulin adsorption and dilated cardiomyopathy: has the time come for randomized clinical trials? *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:184-86.