



Response to polysaccharide antigens in patients with ataxia-telangiectasia

Resposta a antígenos polissacarídicos em pacientes com ataxia-telangiectasia

Maria Cristina Guerra-Maranhão¹, Beatriz T. Costa-Carvalho²,
Victor Nudelman³, Patrícia Barros-Nunes⁴, Magda M. S. Carneiro-Sampaio⁵,
Cristina Arslanian⁶, Aparecida T. Nagao-Dias⁷, Dirceu Solé⁸

Resumo

Objetivo: Estudar a produção de anticorpos a antígenos polissacarídicos em pacientes com ataxia-telangiectasia.

Casística e método: Utilizando a técnica de ELISA, determinamos os níveis de IgG aos sorotipos 1, 3, 5, 6B, 9V e 14 do pneumococo em 14 pacientes com ataxia-telangiectasia, antes e após a imunização com a vacina pneumocócica 23-valente. Resposta adequada a cada sorotipo foi definida como IgG $\geq 1,3 \mu\text{g/ml}$ ou o incremento de quatro vezes dos níveis pós em relação aos pré-imunização.

Resultados: Seis pacientes (43%) não responderam a todos os sorotipos analisados, quatro a apenas um sorotipo, um paciente a dois, dois a três e apenas um paciente a quatro dos seis sorotipos analisados. Nenhum paciente apresentou resposta adequada a todos os sorotipos testados. Os níveis de IgG ao pneumococo pós-imunização foram superiores aos pré-imunização para todos os sorotipos testados, exceto o 3. Apesar disso, os valores médios pós-imunização foram inferiores a $1,3 \mu\text{g/ml}$ para todos os sorotipos analisados, exceto o 14. A média de incremento da resposta foi inferior a quatro para todos os sorotipos analisados.

Conclusão: Nossos resultados sugerem que pacientes com ataxia-telangiectasia têm grande risco de apresentar resposta inadequada ao pneumococo, o que pode ser uma das causas das infecções sinopulmonares de repetição.

J Pediatr (Rio J). 2006;82(2):132-6: Ataxia-telangiectasia, Streptococcus pneumoniae, pneumococo, polissacarídeo, imunodeficiência, imunidade humoral, anticorpo.

Abstract

Objective: To analyze the production of antibodies to polysaccharide antigens in patients with ataxia-telangiectasia.

Patients and methods: We used the ELISA technique to measure the levels of IgG antibodies to serotypes 1, 3, 5, 6B, 9V and 14 of *Streptococcus pneumoniae* in 14 patients with ataxia-telangiectasia before and after immunization with 23-valent polysaccharide vaccine. Adequate response to individual polysaccharide can be defined as a postimmunization antibody titer equal to or greater than $1.3 \mu\text{g/ml}$ or as a minimum fourfold increase over the baseline (preimmunization) value.

Results: Six (43%) patients showed an absent response to all serotypes analyzed. Four patients showed adequate response to only one serotype, one patient to two serotypes, two patients to three serotypes and only one patient to four out of six serotypes analyzed. No patient had adequate response to all serotypes tested. Postimmunization pneumococcus IgG levels were higher than preimmunization levels to all serotypes analyzed, except for serotype 3. In spite of this, the mean postimmunization levels were lower than $1.3 \mu\text{g/ml}$ in all serotypes, except for serotype 14. Mean increment was less than four in all serotypes analyzed.

Conclusion: Our results suggest that patients with ataxia-telangiectasia are at a high risk of having an impaired response to pneumococcus, which may be one of the causes of recurrent sinopulmonary infections in these patients.

J Pediatr (Rio J). 2006;82(2):132-6: Ataxia-telangiectasia, Streptococcus pneumoniae, pneumococcus, polysaccharide, immunodeficiency, humoral immunity, antibody.

1. Mestre, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP.
2. Professora adjunta, Departamento de Pediatria, UNIFESP, São Paulo, SP.
3. Médico, Hospital Albert Einstein, São Paulo, SP.
4. Doutora, UNIFESP, São Paulo, SP.
5. Professora titular, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.
6. Especialista em Laboratório, Laboratório de Imunologia de Mucosas, Instituto de Ciências Biomédicas, Univ. de São Paulo (ICB-USP), São Paulo, SP.
7. Professora, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE.
8. Professor titular, Departamento de Pediatria, UNIFESP, São Paulo, SP.

Fonte financiadora: FAPESP.

Artigo submetido em 26.08.05, aceito em 09.11.05.

Como citar este artigo: Guerra-Maranhão MC, Costa-Carvalho BT, Nudelman V, Barros-Nunes P, Carneiro-Sampaio MM, Arslanian C, et al. Response to polysaccharide antigens in patients with ataxia-telangiectasia. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82:132-6.

Introdução

A ataxia-telangiectasia (AT) é uma doença de herança autossômica recessiva que cursa com ataxia cerebelar progressiva, deficiência do sistema imunológico, infecções sinopulmonares, anormalidades cutâneas, incluindo a telangiectasia, predisposição à malignidade, radiosensibilidade e envelhecimento precoce^{1,2}. É causada por uma mutação no gene ATM codificado no cromossomo 11q22-23, que contém 66 éxons³. Pacientes com AT apresentam nível intracelular indetectável de ATM ou ausência de atividade catalítica².

Embora apresentem predisposição a infecções de repetição e disfunções do sistema imunológico, tanto humoral como celular, ainda não se identificou uma anormalidade única no sistema imunológico desses pacientes^{4,5}. Apesar de apresentarem níveis normais de IgG, 80% dos pacientes com AT apresentam deficiência de subclasse IgG2; para as demais, não há padrão definido⁶⁻⁸. A produção de anticorpos a antígenos virais e bacterianos pode estar deficiente. As relações entre o mecanismo imunopatogênico com disfunção da ATM, imunodeficiência e infecção ainda não foram estabelecidas.

O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de anticorpos a polissacarídeos após imunização com a vacina polissacarídica 23-valente em pacientes com AT.

Casuística e métodos

Catorze pacientes (nove masculinos, idades entre 4 e 17 anos) com AT foram avaliados independentemente de apresentarem história clínica de infecção de repetição. Todos eles foram diagnosticados como tendo AT, baseado em critérios estabelecidos pelo Grupo Europeu de Imunodeficiência (ESID) e pelo Grupo Pan-Americano de Imunodeficiência (PAGID)⁹. A avaliação da imunidade humoral foi realizada pela dosagem das imunoglobulinas séricas (G, M e A), sendo que, em sete desses pacientes, foram também dosadas as subclasses de IgG (imunodifusão radial). Os valores obtidos foram comparados aos de controles normais de mesma idade¹⁰. A capacidade de produção de anticorpos a antígenos protéicos foi avaliada pela determinação de pelo menos dois anticorpos a antígenos vacinais: tétano, difteria, rubéola ou sarampo.

A avaliação da produção de anticorpos a antígenos polissacarídicos foi realizada com a determinação dos níveis séricos de anticorpos (IgG) aos sorotipos 1, 3, 5, 6B, 9V, e 14 do pneumococo por ELISA¹¹. Amostras de soro foram colhidas dos pacientes, antes e 6 semanas após imunização com a vacina polissacarídica 23-valente (Pneumo23®-Pasteur-Mérieux). A resposta imunológica adequada a um determinado sorotipo foi definida como a presença de níveis séricos de anticorpos IgG $\geq 1,3 \mu\text{g/ml}$ ou o incremento de quatro vezes dos níveis pós em relação aos pré-imunização¹¹. Para análise das variáveis, empregamos testes não-paramétricos (Wilcoxon), considerando como significantes os valores de alfa menores ou iguais a 5%. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa, e todos os responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Resultados

Todos os pacientes iniciaram com sintomas de ataxia nos dois primeiros anos de vida, e 11 (78%) com as telangiectasias oculares e/ou cutâneas. Apesar disso, o diagnóstico de AT foi realizado mais tardiamente (2 a 11 anos). Oito (57%) pacientes apresentaram infecções sinopulmonares de repetição. O valor da alfa-fetoproteína variou de 61,7 a 857 ng/ml (normal: < 5-10 ng/ml).

Níveis séricos de IgA menores ou iguais a 7 mg/dl foram observados em 7/14 (50%) pacientes; em apenas quatro (28%), os níveis foram adequados (Figura 1). Ao contrário do observado para IgA, os níveis séricos de IgM estavam elevados em 11 (78%), normais em 2/14 e baixos em 1/14 pacientes (Figura 2). A IgG foi a imunoglobulina que apresentou a maior porcentagem de valores dentro da normalidade (78%). Apenas um paciente teve níveis inferiores ao percentil 3 para idade (Figura 3). Com relação às concentrações de subclasses de IgG realizadas em sete pacientes, a IgG1 foi normal para todos, e a IgG3 estava em concentração adequada em seis dos sete pacientes. Nível de IgG2 abaixo do percentil 3 para a idade foi observado em apenas um paciente, e de IgG4, em três.

A produção de anticorpos a pelo menos dois antígenos protéicos foi normal em todos os pacientes analisados.

Com relação à produção de anticorpos a antígenos polissacarídicos, seis pacientes não responderam aos seis sorotipos analisados, 4/14 responderam a apenas um, 1/14 a dois, 2/14 a três e apenas 1/14 teve resposta adequada a quatro sorotipos, sendo este o paciente que apresentou nível baixo de IgG2. Os níveis médios de anticorpos aos diferentes sorotipos, antes e após imunização, estão sumarizados na Tabela 1. A média dos níveis de anticorpos após imunização foi inferior a $1,3 \mu\text{g/ml}$ para todos os sorotipos analisados, exceto para o sorotipo 14 (Tabela 1). Comparando os níveis pré e pós-imunização, observamos que, à exceção do sorotipo 3, todos os outros apresentaram níveis pós maiores que os pré-imunização. Embora a concentração dos níveis pós-imunização tenha sido mais elevada, a média

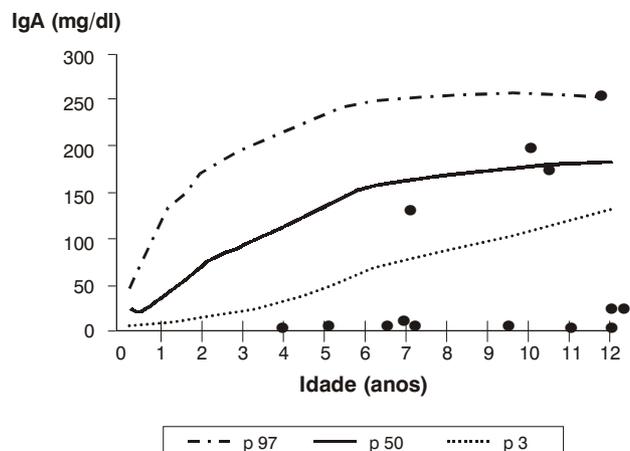


Figura 1 - Níveis de IgA em pacientes com ataxia-telangiectasia comparados à curva de normalidade de população brasileira¹⁰

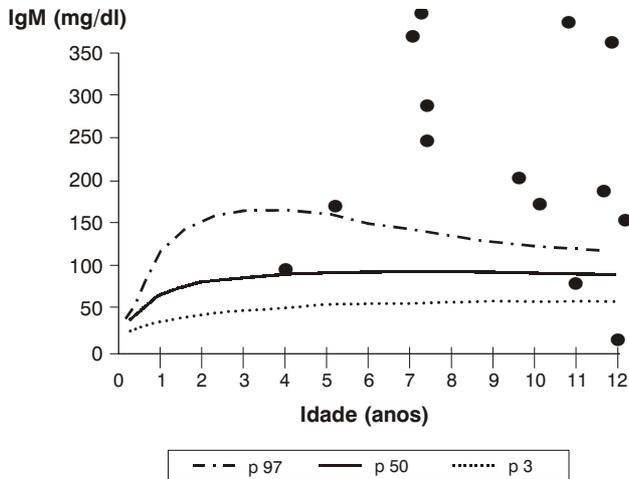


Figura 2 - Níveis de IgM em pacientes com ataxia-telangiectasia comparados à curva de normalidade de população brasileira¹⁰

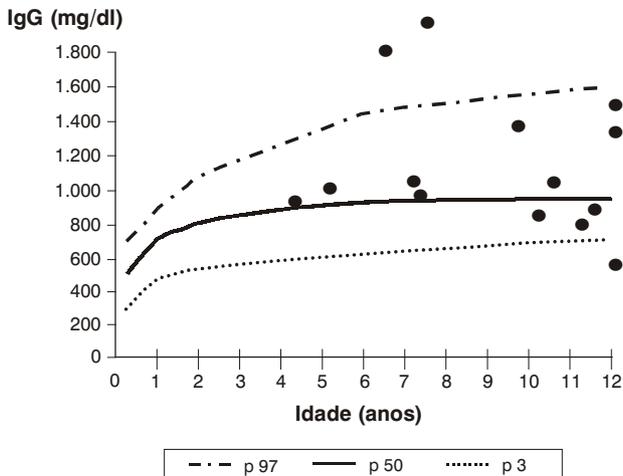


Figura 3 - Níveis de IgG em pacientes com ataxia-telangiectasia comparados à curva de normalidade de população brasileira¹⁰

do incremento foi menor que quatro para todos os sorotipos (Tabela 1). O maior número de resposta positiva foi para os sorotipos 5 e 14 (5/14 e 4/14, respectivamente) seguida pelos sorotipos 1 e 9B (2/14) e 6 (1/14). Nenhum dos pacientes apresentou resposta adequada ao sorotipo 3. Dentre os seis pacientes com ausência de resposta a todos os sorotipos analisados, dois apresentavam níveis normais das três classes de imunoglobulinas, três apresentavam níveis reduzidos de IgA com IgM elevada e um paciente com nível reduzido de IgM. Os níveis de IgG2, que estavam normais, foram avaliados em apenas dois desses seis pacientes.

Discussão

A ataxia estava presente em todos os pacientes antes dos 2 anos de idade, e a telangiectasia em 11/14 pacientes.

O diagnóstico mais tardio aconteceu aos 11 anos de idade. A dificuldade em confirmar o diagnóstico de AT nesses pacientes reflete o desconhecimento sobre a doença em nosso meio. Os diagnósticos mais precoces foram realizados naqueles cujos irmãos já tinham diagnóstico prévio de AT. O desconhecimento sobre a doença foi responsável pelo excesso de exames radiológicos a que alguns desses pacientes foram submetidos, o que é contra-indicado nessa síndrome pela sensibilidade à radiação que apresentam. Nenhum paciente estava recebendo algum tipo de tratamento no momento do diagnóstico. Todos os pacientes foram imunizados de acordo com o calendário oficial de vacinação, incluindo BCG, sem relato de efeito adverso. Todos os pacientes apresentavam elevação da alfa-fetoproteína, sendo esta a anormalidade mais característica e consistente desses pacientes¹².

As infecções pulmonares são frequentes em pacientes com AT, podendo progredir para bronquiectasia e fibrose pulmonar. Apenas oito de nossos pacientes tinham história pregressa de infecções sinopulmonares. Alguns pacientes só apresentam infecções respiratórias em uma fase mais tardia da doença, sendo muito raras infecções por germes oportunistas². Além da deficiência imunológica, a aspiração de saliva por problemas neurológicos de deglutição é um fator predisponente importante no aparecimento de pneumonias nesses pacientes^{2,4}.

A AT foi inicialmente associada à deficiência de IgA, presente em 60 a 70% dos pacientes^{6,8}. Níveis de IgA inferiores a 7 mg/dl foram detectados em 50% de nossos pacientes, na maioria das vezes associados à elevação de IgG e/ou IgM e ao número reduzido de CD4 (dados não mostrados). Níveis elevados de IgM têm sido observados em pacientes com AT⁸, algumas vezes simulando síndrome de hiperviscosidade, o que sugere haver uma disfunção na maturação e diferenciação dos linfócitos B. A associação entre deficiência de IgA e ausência de resposta a antígeno polissacarídico tem sido descrita¹³. Dos sete pacientes com IgA < 7 mg/dl, três não responderam à vacina pneumocócica, dois tiveram resposta adequada a um sorotipo, um a três sorotipos e outro a quatro sorotipos. Este último foi o que apresentou a melhor resposta pós-imunização.

Níveis normais de IgG têm sido observados em pacientes com AT^{5,6,8}, em concordância com os nossos achados. Resultados controversos têm sido descritos para subclasses de IgG em pacientes com AT⁶⁻⁸. Entretanto, a presença de níveis de IgG2 abaixo da normalidade não reflete necessariamente uma imunodeficiência¹⁴. Stray-Pedersen et al. observaram relação positiva entre os níveis de anticorpos ao pneumococo e os níveis de IgG2¹. Não foi possível verificar essa relação entre nossos pacientes, pois apenas dois pacientes com ausência de resposta tinham níveis de IgG2 avaliados e com níveis dentro da normalidade¹. O único paciente com nível baixo de IgG2 foi o que apresentou resposta adequada para o maior número de sorotipos.

Antígenos polissacarídicos são descritos como timo-independentes e receptores de complemento nas células B (CD21) parecem ser cruciais para uma resposta adequada a esses antígenos^{15,16}. Todos os pacientes estudados apre-

Tabela 1 - Níveis médios de anticorpos aos sorotipos de pneumococo ($\mu\text{g/ml}$) antes e após imunização com vacina pneumocócica 23-valente em pacientes com ataxia e telangiectasia (n = 14)

Sorotipos	Pré (LI-LS)	Pós (LI-LS)	Incremento médio	Pré x pós (Wilcoxon)
1	0,34 (0,12-0,87)	0,57 (0,14-1,5)	1,73	p = 0,018
3	0,29 (0,13-0,49)	0,33 (0,07-0,95)	0,32	p > 0,05
5	0,56 (0,15-0,72)	0,91 (0,07-4,0)	1,67	p = 0,027
6B	0,32 (0,14-1,58)	0,45 (0,08-2,3)	1,13	p = 0,027
9V	0,24 (0,03-0,45)	0,48 (0,06-1,5)	3,47	p = 0,032
14	0,48 (0,24-0,85)	3,70 (0,01-37)	3,61	p < 0,05

LI = limite inferior; LS = limite superior; Pré = pré-imunização; Pós = pós-imunização.

sentavam níveis normais do complemento hemolítico total (CH50) (dados não mostrados).

Em humanos, o anticorpo predominante para antígenos polissacarídicos do pneumococo é da subclasse IgG2¹⁷. A imunização com a vacina polissacarídica do pneumococo, seguida da avaliação da IgG específica aos sorotipos incluídos na vacina, é um método confiável para identificar a deficiência na produção de anticorpo a esses antígenos¹¹. Neste estudo, incluímos os sorotipos responsáveis por grande número de doenças invasivas por pneumococo no Brasil¹⁸ e observamos que os sorotipos 5 e 14 foram os mais imunogênicos neste grupo de pacientes. A intensidade da resposta aos polissacarídeos aumenta com a idade, sendo muito pequena ou ausente nos dois primeiros anos de vida¹¹. Como os nossos pacientes apresentavam idade igual ou superior a 4 anos no momento da imunização, podemos afastar o problema da imaturidade do sistema imunológico como causa de resposta inadequada. Recentemente, Sanal et al.¹⁹ relataram ausência de resposta a antígenos polissacarídicos em 22/31 pacientes com AT. Cinco pacientes responderam a apenas um sorotipo, um paciente a dois sorotipos, e três pacientes a mais de três sorotipos. Não observamos correlação entre a produção desses anticorpos e a presença ou ausência da proteína ATM intracelular. Todos os pacientes, com exceção de um, apresentavam mutação tipo homocigoto truncada, e não foi observada correlação entre essa mutação distal ou proximal com a produção de anticorpos ao pneumococo. Esses pacientes também não apresentaram resposta adequada ao pneumococo, mesmo após imunização com a vacina conjugada²⁰. Resposta inadequada ao pneumococo e ao *Haemophilus*

influenzae tipo b após imunização foi também observada por outros autores¹. A resposta inadequada a antígenos polissacarídicos, além de freqüente neste grupo de pacientes, ocorre independente da presença de infecção de repetição. Outro dado muito importante é que nossos pacientes apresentam diferentes tipos de mutação²¹, o que significa que a produção inadequada de anticorpos a antígenos polissacarídicos parece ser independente da mutação identificada.

A capacidade das células B em expressar imunoglobulinas na superfície com idêntica especificidade antigênica, mas diferentes funções efetoras, resulta da capacidade que essas células têm de fazer a recombinação do *switch* de classe (CSR – *class switch recombination*). A proteína ATM parece ter importância no processamento da CSR e na transdução de sinais em linfócitos B¹. Células de pacientes com AT apresentam defeito de sinalização no receptor de célula B (BCR), com o envolvimento de uma disfunção da tirosina quinase²².

Nossos resultados sugerem que pacientes com AT têm grande risco de apresentar resposta inadequada ao pneumococo, o que pode ser uma das causas das infecções sinopulmonares de repetição. Tratamento precoce deve ser instituído na suspeita de infecção por essa bactéria.

Agradecimentos

Aos pacientes e familiares que colaboraram na realização deste trabalho.

Referências

1. Stray-Pedersen A, Jonsson T, Heiberg A, Lindman CR, Widing E, Aaberge IS, et al. The impact of an early truncating founder ATM mutation on immunoglobulins, specific antibodies and lymphocyte populations in ataxia-telangiectasia patients and their parents. *Clin Exp Immunol.* 2004;137:179-86.
2. Lavin MF, Lederman HM. Chromosomal breakage syndromes associated with immunodeficiency. In: Stiehm ER, Ochs HD, Winkelstein JA. *Immunologic disorders in infants & children.* 5th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2004. p. 580-7.
3. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A single ataxia-telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 1995;268:1749-53.
4. Regueiro JR, Porras O, Lavin M, Gatti RA. Ataxia-telangiectasia. A primary immunodeficiency revisited. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2000;20:177-206.
5. Sanal O, Ersoy F, Yel L, Tezcan I, Metin A, Özyürek H, et al. Impaired IgG antibody production to pneumococcal polysaccharides in patients with ataxia-telangiectasia. *J Clin Immunol.* 1999;19:326-34.
6. Gatti RA, Bick M, Tam CF, Medici MA, Oxelius VA, Holland M, et al. Ataxia-telangiectasia: a multiparameter analysis of eight families. *Clin Immunol Immunopathol.* 1982;23:501-16.
7. Oxelius VA, Berkel AI, Hanson LA. IgG2 deficiency in ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med.* 1982;306:515-7.
8. Rivat-Peran L, Buriot D, Salier JP, Rivat C, Dumitresco SM, Griscelli C. Immunoglobulins in ataxia-telangiectasia: evidence for IgG4 and IgA2 subclass deficiencies. *Clin Immunol Immunopathol.* 1981;20:99-110.
9. Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies. <http://www.esid.org>.
10. Fujimura MD. Níveis séricos das subclasses de IgG em crianças normais e nefróticas [tese de doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1991.
11. Sorensen R, Leiva L, Javier III FC, Sacerdote DM, Bradford N, Butler B, et al. Influence of age on the response to Streptococcus pneumoniae vaccine in patients with recurrent infections and normal immunoglobulin concentrations. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102:215-21.
12. Waldman TA, McIntire KR. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with ataxia telangiectasia. *Lancet.* 1972;2:1112-5.
13. Lane PJL, MacLennan ICM. Impaired IgG2 anti-pneumococcal antibody responses in patients with recurrent infection and normal IgG2 levels but no IgA. *Clin Exp Immunol.* 1986;65:427-33.
14. Shackelford PG, Granoff DM, Madassery JV, Scott MG, Nahm MH. Clinical and immunologic characteristics of healthy children with subnormal serum concentrations of IgG2. *Pediatr Res.* 1990;27:16-21.
15. Lopis MJP, Harms G, Hardonik MJ, Timens W. Human immune response to pneumococcal polysaccharides: complement-mediated localization preferentially on CD21-positive splenic marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97:1015-24.
16. Grifioen AW, Rijkers GT, Janssens-Korpela P, Zegers BJM. Pneumococcal polysaccharides complexed with C3d bind to human B lymphocytes via complement receptor type 2. *Infect Immun.* 1991;59:1839-45.
17. Barret DJ, Ayoub EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol.* 1986;63:127-34.
18. Brandileone MCC, Vieira VSD, Zanella RC, Landgraf IM, Helles CEA, De Escragnole Taunay A, et al. Distribution of serotype of Streptococcus pneumoniae isolated from invasive infections over a 16-year period in the greater São Paulo area, Brazil. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2789-91.
19. Sanal O, Ozbas-Gerceker F, Yel L, Ersoy F, Tezcan I, Berkel AI, et al. Defective anti-polysaccharide antibody response in patients with ataxia-telangiectasia. *Turk J Pediatr.* 2004;46:208-13.
20. Sanal O, Ersoy F, Tezcan I, Metin A, Turul T, Gariboglu S, et al. Antibody response to a seven-valent pneumococcal conjugated vaccine in patients with ataxia-telangiectasia. *J Clin Immunol.* 2004;24:411-7.
21. Coutinho G, Mitui M, Campbell C, Costa Carvalho BT, Nahas S, Sun X, et al. Five haplotypes account for fifty-five percent of ATM mutations in Brazilian patients with ataxia telangiectasia: seven new mutations. *Am J Med Genet A.* 2004;126:33-40.
22. Khanna KK, Yan J, Watters D, Hobson K, Beamish H, Spring K, et al. Defective signaling through the B cell antigen receptor in Epstein-Barr virus transformed ataxia-telangiectasia cells. *J Biol Chem.* 1997;272:9489-95.

Correspondência:

Beatriz T. Costa-Carvalho
Rua Jacques Félix, 314/31, Vila Nova Conceição
CEP 04509-001 – São Paulo, SP
Tel./Fax: (11) 5574.0548, (11) 5579.1590
E-mail: beacarvalho@terra.com.br