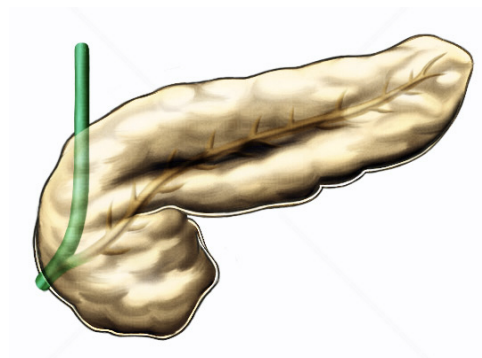


**Dissertação | Artigo de Revisão Bibliográfica
Mestrado Integrado em Medicina**

PANCREATITE LIGADA AO GENE SPINK1



André Miguel Leite da Costa

Mestrado Integrado em Medicina – 6º Ano Profissionalizante
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto
Morada: Av. Frei Bartolomeu dos Mártires nº34, 6ºE
4715-385 Braga - Portugal
andremlcosta@hotmail.com

Orientador

Dr. António Carlos Alves Santos

Licenciado em Biologia e Medicina

Assistente Hospitalar de Cirurgia Geral no CHP/HSA

Porto, 2010/2011

RESUMO

Introdução: A pancreatite é um problema de saúde importante, com incidência e prevalência crescentes, elevada morbilidade e custos económicos associados. Numa boa parte dos casos, a etiologia é apenas parcialmente conhecida. Evidências progressivamente consolidadas atribuem um papel relevante aos factores genéticos.

Objectivos: A presente revisão bibliográfica tem como objectivos: compreender as mutações no gene SPINK1 enquanto factor etiológico de pancreatite; perceber quais as implicações clínicas neste grupo de doentes; e constatar qual a sua dimensão socioeconómica, perspectivando uma possível diminuição de custos relacionados com o acompanhamento destes doentes.

Material e Métodos: O material bibliográfico utilizado para a realização deste artigo de revisão foi obtido através de uma pesquisa efectuada na base de dados electrónica PUBMED disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/.

Desenvolvimento: Nos últimos 10 anos foram feitos inúmeros estudos que envolveram o gene SPINK1. Há evidência de que mutações neste gene estão envolvidas em casos de pancreatite crónica de etiologia alcoólica, hereditária ou idiopática em adultos e crianças. Estão também associadas à pancreatite tropical calcificante. A mutação N34S é a mais frequentemente encontrada, embora haja diferenças entre os vários grupos étnicos. Dependendo do tipo de mutação, estas podem comportar-se como factores causais ou modificadoras da doença. Acredita-se que a maioria, incluindo N34S, estejam inseridas num modelo multi-factorial.

Conclusões: A pancreatite crónica é mais frequente no contexto de mutações no gene SPINK1. A mutação N34S é a mais frequente. Não está definido o modelo de hereditariedade. A análise genética poderá estar indicada para doentes sintomáticos em algumas situações pontuais, sendo importante referir que não dá o diagnóstico definitivo, nem está indicado como teste de rastreio. O curso clínico e a abordagem clínica da pancreatite associada a mutações SPINK1 não difere das restantes formas de pancreatite. Só uma compreensão da etiopatogenia na sua totalidade permitirá uma alteração da abordagem médica e do impacto socioeconómico da doença.

Palavras-chave: Pancreatitis; SPINK1/PSTI; Mutations; Genetic testing; Epidemiology; Socioeconomic impact.

ABSTRACT

Introduction: Pancreatitis is an important health problem with increasing incidence and prevalence, high morbidity and associated economic costs. In most cases, the cause is only partially understood. Progressively accumulated evidence seems to clearly implicate genetic factors.

Objectives: The purpose of this literature review is twofold: define the role of SPINK1 gene mutations as a contributory etiological factor in pancreatitis in an attempt to understand its clinical implications; and assess the potential socio-economic impact of future developments in this field of study on patient management.

Methods: The research strategy for this review was to consult the most recent literature available in the electronic database PUBMED available at www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/.

Development: Over the course of the last decade numerous studies have been carried out involving the SPINK1 gene. There is evidence that mutations in this gene are implicated in chronic pancreatitis cases in the presence additional known etiological factors such as alcohol, hereditary and idiopathic causes both in adults and children. They are also associated with tropical calcific pancreatitis. The N34S mutation is the most often reported, although there are differences between ethnic groups. Depending on the type of mutation, they may behave as causal factors or disease modifiers. It is believed that most, including N34S, are embedded into a multi-factorial model.

Conclusions: Chronic pancreatitis is more frequent in patients with co-existing SPINK1 gene mutations. The N34S mutation is the most common. It is not set the inheritance model. Genetic analysis may be indicated for symptomatic patients in some certain well defined situations, but it is important to note that its detection is neither diagnostic nor has yet been demonstrated to be a practical or effective means of screening selected patients. The clinical course and clinical management of pancreatitis with SPINK1 mutations does not differ from other forms of pancreatitis. Only a more complete understanding of the pathology of chronic pancreatitis and the possible contribution of these genetic mutations will ultimately have an impact of the medical management and alter the socio-economic burden of this disease.

Keywords: Pancreatitis; SPINK1/PSTI; Mutations; Genetic testing; Epidemiology; Socioeconomic impact.

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias do pâncreas continuam a ser um importante problema de saúde¹. Evidências sugerem que o aumento da incidência e prevalência da pancreatite crónica (PC) tem sido acompanhado pelo aumento proporcional de admissões hospitalares. O doente com PC necessita de hospitalização para tratar eventos agudos, dor, maldigestão ou complicações como pseudoquistos. Num estudo alemão, a média de internamento hospitalar para os doentes admitidos com PC foi de 18 +/-13 dias. Esse mesmo estudo constatou que 34% eram medicados com analgésicos diariamente, 57% com suplementos enzimáticos, 25% com insulina e 4% com anti-diabéticos orais². Dados do Hospital de Santo António – Centro Hospital do Porto mostram que, no período de 10 anos entre Janeiro de 2010 e Janeiro de 2011, houve 1908 episódios de internamento com os diagnósticos de pancreatite aguda (PA) e PC. Esse valor representa um total de 23415 dias de internamento, com uma média de 12,3 dias por doente³.

O prolongado e variável curso da PC torna difícil a quantificação de custos directos e indirectos e valores monetários precisos não estão disponíveis. O seu impacto socioeconómico é difícil de quantificar devido à existência de poucos dados, mas é muito provável que os custos para os cuidados de saúde e a sociedade estejam em crescendo. Estes aspectos têm sido observados na Europa².

A doença inflamatória pancreática pode ser classificada como aguda ou crónica^{4,5}.

A PA é uma doença geralmente não progressiva e que tem como substrato uma resposta inflamatória aguda à lesão pancreática⁶, sendo geralmente consideradas três fases na sua fisiopatologia. O primeiro passo no desenvolvimento da pancreatite pensa-se que seja a inapropriada e prematura activação da tripsina no interior das células acinares^{4,5,7}. Uma variedade de mecanismos foram propostos incluindo a ruptura da sinalização do cálcio dentro das células acinares, a clivagem do tripsinogénio para tripsina pela hidrolase lisossomal catepsina-B e a diminuição intracelular da actividade do inibidor da tripsina pancreática. Uma vez activada, a tripsina activa uma variedade de pro-enzimas digestivas no pâncreas capazes de causar a auto-digestão do órgão⁷. Há diversos mecanismos capazes de inibir a auto-digestão pancreática pela tripsina activada: síntese de enzimas na forma de pro-

enzimas inactivas; a enzima de activação enteropeptidase está localizada fora do pâncreas; a produção de antiproteases como a mesotripsina, que degrada o tripsinogénio, e o inibidor da protease serina Kazal tipo 1 (SPINK1), que inibe reversivelmente a tripsina activada; e secreções com baixa concentração de cálcio, ricas em bicarbonato e pH elevado, que são afectadas pela produção anormal do regulador de condutância transmembranar da fibrose quística (CFTR)^{4,8}. O SPINK1, também denominado PSTI (do inglês *pancreatic secretory trypsin inhibitor*), inibe até 20% da actividade da tripsina pancreática, sendo uma importante defesa contra a activação prematura do tripsinogénio^{1,4,9}. Estes mecanismos podem sofrer alterações por mutações causadoras de perda ou ganho de função, resultando na activação prematura da tripsina⁵. Na segunda fase, há uma série de eventos intra-acinares que produzem lesão celular e tecidual, que induzem edema e inflamação local associada à libertação de mediadores inflamatórios. Na terceira fase, a lesão das células acinares induz uma variedade de respostas locais e sistémicas que incluem a produção de citocinas, de espécies de oxigénio reactivo e anormalidades na circulação local, surgindo a inflamação peripancreática e sistémica, com atingimento de órgãos remotos como o pulmão^{5,7,10}. Do ponto de vista fisiopatológico, a auto-digestão e inflamação podem ser causadas quer pelo aumento de actividade proteolítica quer pela diminuição da inibição das proteases¹¹. Em grande parte, a severidade do decurso clínico é determinado pela magnitude destes eventos, que representam a resposta inflamatória⁵.

A PC é definida como uma doença inflamatória contínua do pâncreas caracterizada por alterações morfológicas irreversíveis que causam tipicamente dor abdominal, episódios repetidos de PA e destruição fibrótica do órgão, resultando em perda permanente de função exócrina e, eventualmente endócrina^{1,12,13}. No fase precoce do seu desenvolvimento, pode ser difícil distinguir da PA apenas pelo padrão clínico⁵.

Mais do que uma simples doença, a PC é um síndrome de condições inflamatórias destrutivas que englobam sequelas de lesões pancreáticas contínuas a longo prazo^{1,12}. Recentemente, avanços na biologia celular, genética e técnicas de imagem com o intuito de estudar a pancreatite, trouxeram informação acrescida acerca da fisiopatologia, genética e anatomia do pâncreas⁴. Continua, no entanto, apenas parcialmente conhecida¹⁴.

Há uma diferença entre os que têm risco de desenvolver PC e os que realmente a desenvolvem. O primeiro passo da PC parece ser o “evento inaugural ou sentinela”

que cursa com um processo inflamatório do pâncreas (hipótese SAPE, *sentinel acute pancreatitis event*). O segundo passo é a agressão repetida e prolongada capaz de activar mecanismos anti-inflamatórios imunitários que conduzem o processo fibrótico progressivo e destrutivo, acabando em PC¹².

Na última década muitos estudos forneceram evidência de que ataques repetidos de PA podem progredir para PC^{5,13}. Pesquisas mais actuais sugerem que a PC é um estágio precedido de pancreatite aguda que progrediu com inflamação crónica e recorrente até à fase final de fibrose⁵. A mais forte evidência desta ligação é a pancreatite hereditária (PH), caracterizada por ataques recorrentes de PA com evolução para PC em cerca de 50% dos doentes¹².

As alterações histológicas incluem fibrose irregular, perda de células acinares, perda de ilhotas, e infiltrados de células inflamatórias^{1,5}. Tanto a inacessibilidade relativa do pâncreas ao exame físico, como a inespecificidade da dor abdominal associada à pancreatite, tornam difícil fazer o seu diagnóstico. Este fica muitas vezes dependente da elevação sistémica de amilase e/ou lipase, frequente da PA mas não tanto na PC. Muitos doentes com PC não padecem dessas elevações enzimáticas, sendo que só existe uma evidência objectiva da doença em alguns doentes que demonstram sinais e sintomas de insuficiência exócrina pancreática que, juntamente com as alterações patológicas crónicas, só se manifestam tardiamente⁴. Para que a insuficiência exócrina se manifeste é necessário um dano pancreático superior a 90%¹⁵.

Actualmente, o diagnóstico clínico depende da identificação de características clínicas, funcionais, morfológicas e histológicas definidas que caracterizam a via final patológica comum de uma variedade de enfermidades pancreáticas. Assim, os actuais sistemas de classificação da PC focam-se nos efeitos generalizados do processo destrutivo, antes da etiologia¹.

Com poucas excepções, a exacta etiologia da maioria dos casos de PC é apenas parcialmente conhecida. Os factores de risco e etiologias da PC podem ser categorizados, segundo o Sistema TIGAR-O (Quadro 1, a seguir), em: tóxico-metabólicos; idiopáticos; genéticos; auto-imunes; PA recorrente e severa; e obstrutivos².

Toxic-metabolic

- Alcohol
- Tobacco smoking
- Hypercalcemia (hyperparathyroidism)
- Hyperlipidemia
- Chronic renal failure
- Medication (phenacetin abuse, possibly from chronic renal insufficiency)
- Toxins [organotin compounds (tin hydrocarbons), e.g. DBTC]

Idiopathic

- Early onset
- Late onset
- Tropical (tropical calcific pancreatitis, fibrocalculous pancreatic diabetes)
- Other

Genetic

- Autosomal dominant (cationic trypsinogen, codon 29 e 122 mutations)
- Autosomal recessive/modifiers genes [CFTR; SPINK1, cationic trypsinogen (codon 16, 22, 23); and possible α 1-antitrypsinogen mutations]

Autoimmune

- Isolated autoimmune chronic pancreatitis
- Syndromic autoimmune chronic pancreatitis (sjogren's syndrome; inflammatory bowel disease; and primary biliary cirrhosis-associated chronic pancreatitis)

Recurrent and severe acute pancreatitis

- Post-necrotic (severe acute pancreatitis)
- Recurrent acute pancreatitis
- Vascular diseases/ischaemic
- Post-irradiation

Obstructive

- Pancreas divisum
- Sphincter of Oddi disorders (controversial)
- Duct obstruction (e.g. tumor)
- Pré-ampullary duodenal wall cysts
- Post-traumatic pancreatic duct scars

Quadro 1: Sistema de classificação TIGAR-O para factores de risco e etiologias da pancreatite crónica [Etemab, B., and D.C. Whitcomb (2001), *Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new developments*. Gastroenterology, 120(3): p.682-707].

Entre adultos dos Estados Unidos e países ocidentais, o álcool é a causa mais comum de PC clinicamente evidente¹⁴, enquanto a fibrose quística é a causa mais frequente em crianças⁵. Foram propostos vários mecanismos como a obstrução ductal litiásica, toxicidade directa do etanol ou stresse oxidativo. O mecanismo exacto da pancreatite alcoólica não é conhecido. Como apenas 5-10% dos alcoólicos pesados desenvolvem a doença, inúmeros estudos sugeriram que o álcool representa apenas um factor de risco no desenvolvimento da PC em indivíduos com predisposição ambiental e genética^{1,14}. Evidências crescentes sugerem que a PC alcoólica e a PC idiopática são doenças complexas que se desenvolvem no contexto de múltiplos factores de risco e

repetidos insultos ao órgão¹². Foram identificados outros factores etiológicos como a hereditariedade, o tabaco, variações anatómicas e várias doenças metabólicas¹⁶.

Em aproximadamente um terço (25-40%) dos casos de PC nos adultos, nenhum factor etiológico é encontrado e são rotulados de PC idiopática^{9,11}.

Vários estudos suspeitam que até 15% dos doentes com PC idiopática possam ter uma pancreatite devida a alterações genéticas¹⁵. A PC tem sido associada a mutações nos genes codificadores do tripsinogénio catiónico (PRSS1), do SPINK1 e do regulador da condutância transmembranar da fibrose quística (CFTR)¹³.

A PH é caracterizada por ataques recorrentes de PA dolorosa em idade precoce, resultando, eventualmente, em PC com perda de função. É uma condição autossómica dominante, com uma penetrância de aproximadamente 80%. As mutações responsáveis foram inicialmente identificadas por Whitcomb et al. no gene PRSS1, que codifica o tripsinogénio catiónico. As duas mutações mais frequentemente identificadas são a N29I e R122H. Existem outras, mais raras^{9,14}. Alguns estudos demonstraram mutações no gene PRSS1 tanto em doentes com PH como em doentes com PC idiopática, que resultam no aumento de actividade da tripsina no parênquima pancreático¹¹.

Muitas famílias com alta frequência de pancreatite consistente com um modelo autossómico dominante de hereditariedade, não transportam qualquer mutação no gene PRSS1⁹. O mesmo acontece com muitos doentes com PC idiopática¹¹. Desta forma, foram estimuladas investigações noutros genes potenciais causadores de doença, sendo que os envolvidos na inibição da actividade da tripsina pancreática ou regulação da função secretória pancreática tinham particular interesse¹⁷.

Foi proposta a hipótese de mutações no gene CFTR provocarem disfunção pancreática como resultado da secreção insuficiente de bicarbonato e diminuição do pH nos ductos pancreáticos, levando à predisposição individual para auto-activação do tripsinogénio, obstrução ductal por diminuição da solubilidade das proteínas e alteração da secreção de zimogénio⁸.

Por outro lado, pelo presumível envolvimento na primeira linha de defesa contra a activação prematura da tripsina, mutações no gene SPINK1 prejudicam a capacidade de inactivação da tripsina nas secreções pancreáticas, tendo sido associadas com a PC em crianças e adolescentes e, mais tarde, com outras formas de pancreatite como a PC alcoólica, PC idiopática e PH^{8,12,14}. A capacidade protectora do SPINK1 é limitada

porque para que o seu mecanismo inibitório fosse totalmente eficaz era exigida uma proporção de 1:1 com a tripsina, sendo esta última sintetizada em excesso. De qualquer forma, o SPINK1 é uma proteína reactiva de fase aguda e a sua expressão está marcadamente aumentada durante a inflamação. Esta característica limita a extensão dos ataques de PA por promover maior capacidade inibitória quando esta é mais necessária¹².

A determinação da etiologia continua a ganhar importância central nos estudos fisiopatológicos, nas análises multi-factoriais, na compreensão da história natural e clínica de cada alteração capaz de levar à PC e no desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento¹.

Tem sido estimado que nos Estados Unidos a PA motiva cerca de 210,000 admissões hospitalares por ano⁷.

Estudos mostram cerca 5,000 novos casos de PA por ano nos Estados Unidos, com uma taxa de mortalidade de 10%¹⁵.

A PA não é comum na infância. As primeiras séries publicadas apontavam 2-9 doentes por ano. Estudos mais recentes demonstram um aumento desses valores para 100 ou mais doentes com PA por ano. A razão para esta observação está por explicar^{5,10}.

A grande maioria dos doentes com PC necessita de cuidados médicos frequentes e elaborados relacionados com os ataques recorrentes de dor abdominal¹⁶, continuando, por isso, a ser uma das maiores fontes de morbilidade nos Estados Unidos¹.

A incidência, prevalência e as manifestações da PC com doença evidente descritas inicialmente subestimavam o verdadeiro espectro desta doença. Os primeiros estudos de Copenhaga, Estados Unidos e México referiam uma incidência semelhante de cerca de 4 por 100,000 habitantes por ano e uma prevalência de 13 por 100,000 habitantes. Alterações subsequentes no consumo de álcool por todo o mundo e o aumento da sensibilidade de testes diagnósticos levantaram a possibilidade de haver muitos mais doentes com PC do que inicialmente suspeitado¹.

Suspeita-se de uma incidência da PC de 8.2 novos casos por 100,000 habitantes e uma prevalência de 26.4 casos por 100,000 habitantes, embora seja provável que incidência e prevalência reais sejam ainda subestimadas, pois a pancreatite não relacionada com o álcool foi essencialmente ignorada^{2,15}.

Ainda continua indefinido o número exacto de doentes que sofrem de PA recorrente ou PC¹⁵.

Estudos mais recentes na Europa mostram uma idade média de diagnóstico da PC de 49-59 anos. A idade de diagnóstico depende, no entanto, da etiologia subjacente sendo que para a PC alcoólica, idiopática, familiar e tropical têm idades médias de 40.8, 27.0, 18.8 e 9.8 anos, respectivamente².

A PC afecta predominantemente o sexo masculino, com 73-91% dos casos, que pode ser explicado pelo alta proporção de homens entre os alcoólicos².

Comparativamente a qualquer outra etnia, os negros têm maior taxa de hospitalização por PC².

O número de doentes que sofre de disfunção exócrina subclínica é desconhecido¹⁵.

A mortalidade aproxima-se dos 50% aos 20 anos após o diagnóstico¹⁶. Doentes com PH não têm maior mortalidade quando comparados com a população geral, independentemente de sexo, tabagismo ou diabetes mellitus².

Na autópsia, a prevalência de PC varia de 0,04 a 5%¹⁵.

A prevalência de PC na infância é certamente mais baixa do que a PA. A incidência pode ter vindo a aumentar nos últimos 10 a 15 anos, mas não há estimativas confiáveis da verdadeira prevalência^{5,10}.

2. DESENVOLVIMENTO

A predisposição genética para a PC em algumas famílias foi reconhecida em 1952 por Comfort et al. Em 1996, a descoberta de que mutações no gene PRSS1 eram causadoras de PH abriram um novo capítulo na PC¹.

O SPINK1 é uma proteína com peso molecular de 6.5kDa e constituída por 56 aminoácidos, possuindo um local reactivo na posição 18 que é substrato específico para o local activo da tripsina, inibindo-a especificamente por bloqueio físico^{1,9}. O gene humano codificador do SPINK1 tem 7.5 kb de comprimento, está dividido em 4 exões e com localização cromossómica 5q32^{9,18}. Codifica um produto de 79 aminoácidos que inclui um peptídeo de sinalização de 23 aminoácidos¹⁹. Na Figura 1, estão representadas as características estruturais do gene SPINK1.

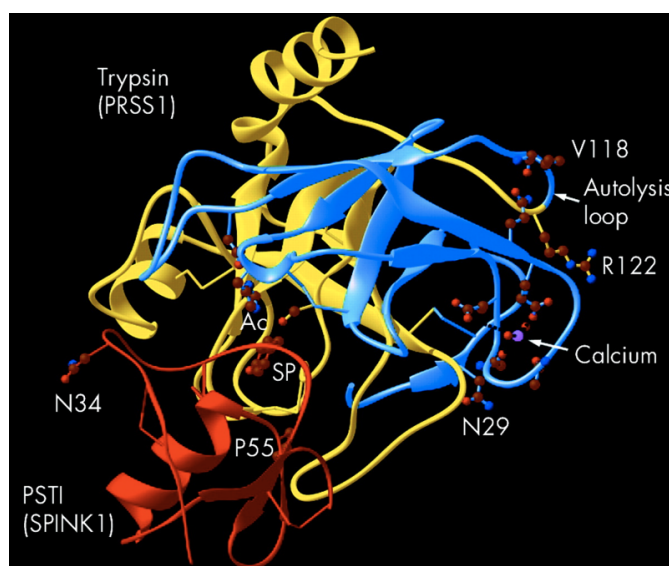


Figura 1: Características estruturais dos genes PRSS1 e SPINK1. No gene SPINK1, a vermelho, N34 e P55 estão representados [Whitcomb, D.C. (2004), *Value of genetic testing in the management of chronic pancreatitis*. Gut, 53(11): p-1710-7].

A proteína é sintetizada, armazenada e secretada pelas células acinares pancreáticas exócrinas juntamente com o tripsinogénio, estando co-localizado com este nos grânulos de zimogénio. Segundo os modelos de mecanismos de protecção das células

acinares, o SPINK1 actua como primeira linha de defesa contra o tripsinogénio prematuramente activado na célula acinar¹. Um outro ponto de vista é que a expressão do SPINK1 no pâncreas normal é baixa, mas marcadamente elevada na inflamação activa. Desta forma, o SPINK1 não será a primeira linha de defesa contra a PA, mas antes a expressão aumentada desta proteína após a inflamação limitará a lesão prolongada associada à tripsina²⁰. Devido ao desequilíbrio estequiométrico de 1:5 entre o SPINK1 e o tripsinogénio, o primeiro é apenas capaz de inibir 20% da potencial tripsina. Como mutações de ganho de função na tripsina causam PA e PC, foi proposta que a perda de função do seu inibidor teria efeito semelhantes, com subida dos níveis de tripsina activa acima dos níveis basais^{1,21}. Na Figura 2, estão demonstradas as consequências funcionais das mutações no gene SPINK1.

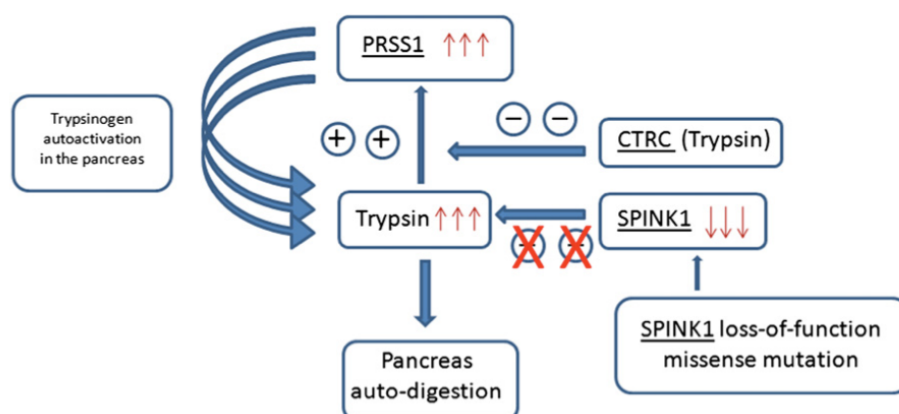


Figura 2: Consequências funcionais das mutações no gene SPINK1. O SPINK1 previne a prematura activação da tripsina no pâncreas ao inibir cerca de 20% da sua actividade. Foi sugerido que mutações no SPINK1 com perda de função associada aumentam a quantidade de tripsina activada, evento que conduz à pancreatite crónica [Derikx, M.H., and J.P. Drenth (2010), *Genetic factors in chronic pancreatitis; implications for diagnosis, management and prognosis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 24(3): p.251-70].

Foi em 2000 que emergiu o papel das mutações no gene SPINK1 na fisiologia da PC¹⁸. Até à data não haviam sido descritas quaisquer mutações neste gene²³. Todas as mutações descritas no gene SPINK1 no contexto da pancreatite podem ser consultadas em <http://www.uni-leipzig.de/pancreasmutation/db.html>²². A mutação N34S do gene SPINK1 é a mais frequentemente encontrada associada a pancreatite e a melhor estudada até à data. O mecanismo sugerido foi que a mutação N34S no gene SPINK1 tornava a proteína incapaz de inibir a tripsina no seu local catalítico activo. É

sabido que mutações genéticas dão origem a diferenças estruturais nas proteínas codificadas e que essas diferenças estruturais podem afectar a função da proteína. A mutação N34S pode resultar na inversão das cadeias laterais e em alteração da conformação da cadeia principal dentro do segmento de ligação. Estas alterações na estrutura terciária da proteína podem resultar em interacção alterada com a enzima e, talvez, levar a uma ligação fraca e inibição branda ou a um cessar mais rápido da ligação²¹.

Chen et al., analisaram 14 famílias francesas com PH clínica e 30 doentes com PC idiopática. Apenas 6 famílias não tinham qualquer mutação para o gene PRSS1²⁰. Descreveram 7 mutações (c.1-253T>C, IVS1-37T>C, N34S, c.1-41G>A, P55S, c.1-174C>T e c.1-22C>T) no gene SPINK1, sugerindo as três primeiras como polimorfismos neutros e as restantes como polimorfismos raros também presentes no grupo controlo, concluindo que nenhuma delas afectaria funcionalmente o fenótipo. Embora tenha sido o primeiro estudo a identificar e compreender mutações neste gene capazes de serem associadas à pancreatite^{23,24}, estas alterações não se comportaram nem como causa nem como modificadores da doença, sendo excluídas da patogénese da PH e da PC idiopática²¹.

Witt et al. reconheceram primeiramente a alta incidência (cerca de 23%) de mutações no gene SPINK1 em 96 crianças e adolescentes alemães com PC idiopática ou com história familiar da doença^{11,24,25}, em que N34S (19%) e P55S representavam a grande maioria das alterações. Não detectaram qualquer diferença fenotípica entre heterozigóticos ou homozigóticos para a mutação N34S. Com isto, demonstraram pela primeira vez que estas eram mutações causadoras de PC. Os dados sugerem que doentes com PC possam sofrer de uma doença autossómica recessiva como resultado de mutações no gene SPINK1 ou como resultado da combinação de alterações genéticas no SPINK1 e de outros genes ainda não identificados¹¹.

Pfutzer et al. analisaram um grupo maior de doentes (120 no total) americanos e europeus e confirmaram a associação positiva entre PC idiopática ou hereditária e alterações no gene SPINK1, tal como demonstrara Witt et al. Mutações N34S ou P55S foram observadas em 25% dos doentes. Como a prevalência na população geral foi de apenas 2% (semelhante ao estudo de Chen et al.), a maior frequência destas mutações no grupo de PC idiopática suportava o seu papel na patogénese na doença, quer estivessem presentes alterações homozigóticas, heterozigóticas ou

heterozigóticas compostas. O risco associado seria baixo, cerca de 1%. Foram encontradas novos polimorfismos (D50E, IVS3+125C>A, IVS3+184T>A), que estavam ausentes no grupo controlo. Não foi demonstrado que a doença pudesse estar associada ao *locus* do SPINK1 em modelo autossómico dominante. A refutar esse modelo está também o facto das mutações heterozigóticas N34S e P55S serem frequentes na população geral enquanto a PC idiopática era rara, tornando obrigatório assumir uma improvável penetrância de 1%. Não ficou demonstrado que o modelo recessivo estivesse envolvido, pois doentes com mutações heterozigóticas não seriam sintomáticos. Seguindo a mesma ordem de ideias, se as mutações SPINK1 isoladas causassem doença, a idade de início e dos sintomas seria mais precoce e estes mais severos em homozigotos ou heterozigóticos compostos. A idade de início e a severidade eram semelhantes, independentemente da homo ou heterozigotia²¹. Curiosamente, 87% dos doentes com mutações no gene SPINK1 desenvolveram pancreatite antes dos 20 anos, contra apenas 64% dos doentes sem mutações. Não apresentarem qualquer mutação PRSS1 era um dado comum entre todos. Esta é uma explicação apenas parcial para a distribuição bimodal (apresentação precoce na segunda década e tardia na sexta década) da PC idiopática¹. Propuseram que essas alterações eram modificadoras de doença, mais do que causadoras, possivelmente por diminuírem o limiar de ocorrência da pancreatite causada por outros factores genéticos ou ambientais^{21,22}.

Pendl et al. obtiveram resultados semelhantes aos de Witt et al. e Pfuzer et al. Em doentes com PC, a mutação N34S ocorre com maior frequência do que mutações no gene PRSS1²⁶.

Baseados na informação anterior, em 2001 Kaneko et al. iniciaram a análise genómica do gene SPINK1 em 32 doentes japoneses com historial de PC na família, com pancreatite de início em idade juvenil ou com PC idiopática. Neste caso, as alterações N34S representavam estavam presentes em apenas 9% da amostra populacional, uma frequência menor do que nos 2 estudos anteriores. Foi a primeira descrição da mutação N34S em mongóis. Uma nova mutação (c.1-215G>A) foi descrita com uma frequência significativamente maior nos doentes do que nos indivíduos normais. Não se pôde, no entanto, excluir a possibilidade de ser um polimorfismo raro. Os seus resultados apontam que tanto esta nova mutação como a N34S sejam factores predisponentes para PC, independentemente da etnia, actuando como modificadores da doença. Estes autores focam o estado da arte e sublinham o desconhecimento de

uma possível associação entre mutações no gene SPINK1 e a PC alcoólica, um aspecto extremamente importante uma vez que se trata da etiologia mais frequente²⁴. Embora a maioria das crianças com a mutação N34S não desenvolvessem pancreatite, o seu risco estava sabidamente aumentado. Noone et al. conseguiram mostrar, mais uma vez, que esta associação também é aplicada a adultos com PC idiopática. Não foram encontradas outras mutações SPINK1 para além de N34S. Curioso, foi observar que o risco de pancreatite estava aumentado 20 vezes com o estado de portador da mutação N34S e 900 vezes com mutações CFTR e SPINK1 em trans-heterozigotia. Assim, heterozigotia para a mutação N34S aumenta o risco de pancreatite independentemente da presença de mutações CFTR; a heterozigotia para a mutação N34S e para mutações CFTR tinham efeitos aditivos no risco de pancreatite. Como as mutações SPINK1 e CFTR predis põem à pancreatite por diferentes mecanismos (um envolvendo as células acinares e outro as células ductais), são diferentes os potenciais alvos terapêuticos para cada uma delas. Deixam no ar a ideia de que testes genotípicos para CFTR e SPINK1 poderão ser úteis em doentes com pancreatite não-alcoólica, descrita maioritariamente como idiopática²⁷.

Kuwata et al. investigaram a presença de mutações em 15 doentes com PA, 8 com PC e 33 voluntários saudáveis. Foram identificadas duas mutações num doente com PC: N34S no exão 3 e R67C no exão 4, apresentando heterozigotia composta. Nenhuma destas mutações foi observada nos restantes e o doente desenvolveu sintomatologia em idade relativamente precoce, sendo sugestivo de que ambas estejam associadas à PC na população japonesa. Posteriormente foi feita a pesquisa dessas mesmas mutações em familiares do doente afectado e relatada a homozigotia N34S de um tio materno com PC. Três outros membros da família, embora não padecessem de pancreatite, eram também hetero ou homozigóticos para N34S, apontando para uma doença de baixa penetrância tal como sugerido por Pfuzer et al. Por outro lado, o facto de o tio não ter a mutação R67C é sugestivo de que esta seja um polimorfismo não relacionado com a doença. De qualquer forma, não foi registada em mais nenhum dos restantes 55 indivíduos, sugerindo uma relativa contribuição de R67C para a pancreatite em doentes heterozigóticos para N34S. A mesma perspectiva de Pfuzer et al. é partilhada, sendo possível a predisposição para a pancreatite pelas mutações N34S apenas quando outros factores estão presentes²⁸. Deste estudo, é importante referir que houve falha na associação destas mutações com a pancreatite idiopática uma vez que a sua incidência era semelhante entre o grupo de doentes com

pancreatite idiopática e o grupo de controlos saudável. Witt et al. conseguiram demonstrá-lo²⁹.

Shimosegawa et al. analisaram alterações genéticas no SPINK1 em 32 doentes japoneses que desenvolveram PC em idade juvenil ou tinham história familiar da doença. Foram detectadas em 5 destes doentes e em nenhum dos 117 indivíduos do grupo controlo, sugerindo a associação com PC idiopática no Japão. Desses 5 doentes, 3 deles apresentavam a mutação N34S. Esta frequência de 9% da mutação N34S parece ser menor do que nos caucasianos, como reportado anteriormente com valores entre os 19-25%²⁹.

Em 2002, Threadgold et al. analisaram a mutação N34S numa coorte maior (217) de doentes com PH, PC idiopática ou PC alcoólica, com um grupo controlo de 200 indivíduos. A prevalência de N34S em doentes com PC alcoólica foi de 6%, bastante mais elevada do que os 0,8% nos controlos, resultados semelhantes aos de outros estudos entretanto realizados. De alguma forma a mutação estará envolvida da patogénese da PC alcoólica. Cerca de 18% dos doentes com PC idiopática eram portadores da mutação N34S, sendo que apenas 2 deles eram homozigóticos. Mais nenhum caso de homozigotia foi identificado na restante coorte. Como a prevalência da mutação nos indivíduos normais era de apenas 2,5%, comprova-se a associação entre esta mutação e a PC idiopática. A prevalência combinada na população geral deste estudo resulta da prevalência de 1,58% de indivíduos americanos, 1,50% de franceses e 0,36% de alemães, indicando que a prevalência da mutação N34S seja muito mais variada geograficamente do que inicialmente suspeitado. A prevalência de N34S, quando comparada com a ainda mais baixa prevalência da PC idiopática (~0,0066%), opõe-se à perspectiva de que a mutação era causadora de PC idiopática de uma forma autossómica dominante com baixa penetrância, suportando o ponto de vista de Pfuzer et al. A mutação também não se mostrou associada a um início precoce da actividade da doença ou qualquer aspecto de severidade. O modelo autossómico recessivo ligada ao gene SPINK1 também não pôde ser suportado pois, ao contrário de que aconteceu neste e em estudos anteriores, os heterozigóticos não deveriam ser sintomáticos. A sugestão de que N34S poderá interagir com outros genes, levanta dúvidas sobre quais e de que forma. Esta mutação não é capaz de explicar a penetrância de 80% relacionada com o gene PRSS1 mutante pois a sua prevalência é de apenas 1% nas famílias com PH. Outra possibilidade era o gene CFTR, associado com 37% dos doentes com PC idiopática e 10% dos doentes com

PC alcoólica. Em Liverpool, as mutações CFTR estão presentes em 5% da população e N34S em cerca de 4%, sendo esperado que 0,2% da população tivesse a presença de ambas simultaneamente e, conseqüentemente, a doença. Não é o que acontece, e o CFTR não é um bom candidato a segundo gene. Não se prova que N34S seja directamente causativa de pancreatite, nem que mutações no gene SPINK1 sejam simplesmente modificadores da doença. A segregação de N34S em doentes com pancreatite continua por explicar. Sugerem outras possibilidades, tal como a mutação N34S causar aumento de penetrância de um outro gene predisponente para pancreatite ou a própria mutação N34S ser apenas mais prevalente numa população com alta incidência de pancreatite relacionada com outros motivos desconhecidos. O papel patológico da mutação N34S na pancreatite é mais complexo do que inicialmente esperado⁹.

Ainda no ano de 2002, Drenth et al. constataram a maior prevalência (12,2%) de mutações no gene SPINK1 (sendo N34S a mais numerosa) entre os doentes adultos com PC de várias etiologias do que no grupo controlo (1/120). A mesma tendência acontece tanto na PC idiopática como na PC alcoólica. Verificaram também que a mutação N34S está associada a um início tardio da doença quando comparada com os portadores de mutações PRSS1, mas mais precoce do que o grupo controlo. Mais uma vez não foram confirmadas os modelos autossómico recessivo ou dominante¹⁶.

Gaia et al. compararam a frequência de mutações CFTR e SPINK1, nomeadamente N34S, em doentes com PC idiopática e PC alcoólica, tentando examinar o curso clínico da doença em cada uma e estabelecer diferenças clínicas. Demonstraram que os genes investigados estão envolvidos com a PC idiopática por duas razões: a mutação N34S foi encontrada em 3,4% destes doentes e em nenhum do grupo com PC alcoólica; nos doentes com PC idiopática havia um aumento de predisposição familiar à doença pancreática. Referem que estas mutações não estarão envolvidas nas formas de PC de etiologia alcoólica. Não obtiveram qualquer evidência de que a idade de início e o curso clínico da doença fosse influenciado pela presença destas mutações. A baixa penetrância das mutações e o risco de desenvolvimento da doença para os familiares dos doentes, continuam sem explicação. Não é claro como deve ser feito o acompanhamento destes doentes³⁰.

Num estudo feito com 39 doentes com diagnóstico de PC idiopática, Audrézet et al. demonstraram que as mutações no gene SPINK1 eram frequentes, sendo encontradas em 10,3% (considerando apenas N34S) a 15,4% dos doentes (juntando c.1-41G>A e -

2C>A, alterações também encontradas, sendo a segunda uma nova variante). No grupo controlo a prevalência era de apenas 1,5%. Encontraram também trans-heterozigotia CFTR/SPINK1 em 3 doentes, sugerindo fortemente a interacção entre diferenças *loci* de susceptibilidade na patogénese da doença³¹.

Baseados no estudo anterior, Francesco Perri et al. fizeram o mesmo tipo de análise numa coorte de 37 italianos. Apenas identificaram a mutação P55S num homem de 35 anos com PA recorrente desde os 28 anos, representando uma prevalência de 2,7%. Estes achados parecem diminuir a contribuição relativa do gene SPINK1 para a etiologia da PC idiopática, mostrando claramente que a procura de novos factores genéticos ou ambientais encontra-se longe de estar completa³².

Bernardino et al. estudaram as mutações SPINK1 em 82 brasileiros com diagnóstico de PC idiopática, alcoólica ou hereditária, sendo a PC alcoólica dominante com 64 doentes. Em nenhum dos grupos, incluindo o grupo controlo, foi identificada a mutação N34S, que parece não aumentar a susceptibilidade desta população para a pancreatite. Foram descritas 4 mutações (c.1-253T>C, c.1-164G>C, c.1-7T>G, S25S), sendo que apenas a primeira foi significativamente mais frequente nos doentes do que no grupo controlo (12,2% vs. 5%) podendo representar um factor de risco para desenvolvimento de pancreatite nesta população. Os restantes representarão possíveis polimorfismos neutros³³.

Mutações no gene SPINK1 foram igualmente estudadas em doentes com PC familiar e juvenil no Japão. Em 2003, Kuwata et al. registaram 3 mutações exónicas: N34S, R67C e 272C>T. Esta última, foi encontrada em apenas 2 doentes e como tem sido descrita com grande frequência em voluntários saudáveis noutros estudos, acredita-se que seja um polimorfismo neutro. A mutação R67C, apenas reportada por este autor num estudo anterior, foi encontrada em 2 doentes e parece ser restrita à população japonesa. Não demonstra, no entanto, qualquer particularidade clínica quando comparada com outras mutações. A mutação N34S mereceu mais destaque pois foi encontrada em 6 doentes com historia familiar (3 famílias) e num doente com pancreatite juvenil. Consolidando os dados obtidos noutros estudos, foi detectada a co-segregação de N34S com 2 mutações intrónicas: IVS1-37T>C e IVS3-69insTTTT. Uma vez que estas duas mutações aparecem sempre co-segregadas com N34S, os autores propõem que esta última seja uma mutação ancestral evolucionária. Sugerem que estas mutações podem ter um papel importante na perda de função do SPINK1, quer separadamente quer conjuntamente com N34S. Dizem haver dados suficientes

que suportam o desenvolvimento de pancreatite através da mutação N34S: a análise teórica feita por computador refere uma diminuição da actividade do SPINK1 devido à mutação N34S que modifica a conformação próxima do local activo; a frequência da mutação N34S é significativamente mais elevada em doentes com pancreatite do que saudáveis; o rácio elevado de associação entre pancreatite e homozigotia N34S, que é sugestivo de um modelo recessivo³⁴.

Schneider et al. avaliaram a presença de mutações no gene SPINK1 em doentes com PC alcoólica nos Estados Unidos. Foi encontrada a mutação N34S em 6,3% dos doentes com PC alcoólica e, embora a população em estudo seja insuficiente para provar uma associação, este valor foi semelhante ao encontrado na Europa por Witt et al. Por outras palavras, a baixa frequência de mutações N34S entre os doentes com PC alcoólica sugere que esta variante genética não tem um papel importante na maioria dos doentes. Não houve qualquer diferença no decurso clínico da doença entre os doentes com PC alcoólica que tinham ou não mutações N34S, nomeadamente para a severidade da doença, que era avaliada tendo em conta a idade de início, os achados imagiológicos, a necessidade de intervenções cirúrgicas e o número de hospitalizações. A presença da mutação não parece ter um efeito dominante no fenótipo na pancreatite alcoólica²⁵.

Hirota et al. analisaram a função da proteína recombinante N34S e não conseguiram demonstrar a perda de função desta proteína³⁵. Um outro estudo anterior tinha já constatado a inalteração tanto da função do SPINK1 N34S como da susceptibilidade da tripsina, indicando que outros mecanismos além da modificação conformacional de N34S possam contribuir para a predisposição para PC nos portadores desta mutação³⁶. As mutações intrónicas (complexo IVS1-37T>C + N34S + IVS3-69insTTTT), mais do que N34S por si só, podem estar associadas com a diminuição de função de SPINK1. Alternativamente, a digestão relacionada com outras enzimas para além da tripsina pode estar aumentada. Para a mutação R67C, uma extensa alteração conformacional da proteína foi altamente sugerida, estando relacionada com o desenvolvimento da pancreatite³⁵.

Weiss et al. estudaram as mutações SPINK1 (N34S) e a expressão fenotípica em doentes com PH associada a mutações PRSS1. Concluíram que as mutações SPINK1 são relativamente incomuns nos doentes com PH e, quando presentes, não alteram nem a penetrância nem o fenótipo. Não estão, portanto, relacionadas com o desenvolvimento ou não de diabetes secundário. Estes dados não excluem as

mutações SPINK1 de afectarem o início da pancreatite em geral e não contribuem para a discussão do seu envolvimento com a PC idiopática³⁷.

A elevação sérica de cálcio é um conhecido factor de risco para o desenvolvimento de pancreatite, pois leva à activação prematura do tripsinogénio. Felderbauer et al. estudaram uma família com hipercalcémia hipocalciúrica familiar (HHF) e história de PC documentada. Registaram mutações N34S em todos os membros da família, embora apenas 2 tenham desenvolvido PC. Curiosamente, estes doentes tinham HHF causada por uma mutação nova e esporádica (518T>C) no gene *CaSR* (do inglês, *calcium sensing receptor*), podendo representar um factor predisponente ainda não identificado para PC. Estes dados indicam que a trans-heterozigotia SPINK1/*CASR* induzem a PC nesta família. Estes resultados suportam a hipótese de que as mutações SPINK1 actuam como modificadores da doença, sugerindo um ainda mais complexo modelo genético para a PC relacionada com alterações SPINK1³⁸.

Francesco Perri et al. compararam, mais tarde, as mutações CFTR, PRSS1 e SPINK1 em 45 doentes com PC alcoólica e 34 com doença hepática alcoólica, todos com semelhante quantidade de consumo de álcool. Até à data, nenhuma alteração genética tinha sido claramente associada a PC alcoólica, e este estudo não trouxe novidades nesse aspecto. Nenhuma mutação, inclusivé N34S, foi encontrada com prevalência significativamente superior no grupo com PC. Também não foram registados casos de trans-heterozigotia CFTR/SPINK1 ou heterozigotia composta. Como apenas 5-10% dos alcoólicos desenvolve PC, continuam por descobrir as supostas bases genéticas que modulam o metabolismo do álcool ou a resposta inflamatória pancreática ao abuso de álcool. Este estudo tinha, no entanto, uma amostra bastante pequena de doentes e não analisou um grupo controlo saudável³⁹.

Maréchal et al. expandiram o conhecimento mutacional do gene SPINK1 em 46 famílias francesas com pelo menos 2 casos de PA recorrente ou PC. Excluíram doentes com mutações PRSS1 ou com a mutação N34S, a mais frequente do gene SPINK1. A mutação c.27delC heterozigótica (delecção de um único nucleotídeo) foi encontrada em 2 famílias e representa a primeira deleção reportada no gene. Pensa-se que dá origem a uma proteína mutante totalmente disfuncional. Curiosamente, numa das famílias esta mutação segregou com a doença em duas gerações, com uma penetrância de 75%. Na outra família, esta deleção actuou como um factor de susceptibilidade de baixa penetrância para a doença. Uma outra mutação, c.87+1G>A, foi encontrada numa terceira família, tendo consequência funcional. Nenhuma destas

mutações foi descrita em qualquer dos 300 controlos saudáveis. Os autores defendem que uma mutação no gene SPINK1 será causadora ou modificadora da doença dependendo da natureza dessa mutação e da sua interacção com outros factores genéticos ou ambientais, devendo a discussão ser feita no contexto. Nesta linha de raciocínio, será mais apropriado falar num *locus* de susceptibilidade. Contrastando com o que tem sido concluído para a mutação N34S, as mutações c.27delC e c.2T>C causam perda total de função das proteínas mutantes e parecem actuar mais como causadoras de doença⁴⁰.

Ao avaliarem doentes coreanos com PC alcoólica, Lee et al. pesquisaram a prevalência da mutação N34S no gene SPINK1. Num universo de 43 doentes com média de idade de 51.3 anos, foi encontrado apenas 1 heterozigótico para N34S (2,4%), não estando presente em nenhum dos 35 controlos saudáveis. É uma prevalência bastante inferior à encontrada nos europeus, e que poderá reflectir as diferenças entre os grupos étnicos. Concluíram que esta mutação é rara e não desempenha um papel importante na etiologia da PC alcoólica na Coreia⁴¹.

Em 2006 foi feito, por Masson et al., um estudo inovador em termos de detecção de mutações no gene SPINK1. Até à data todas as mutações e polimorfismos detectados (cerca de 30) eram substituições de um único nucleotídeo ou micro-inserções/delecções, sendo posta a hipótese de que grandes rearranjos genómicos no SPINK1 pudessem ser responsáveis por alguns casos de PC. Avaliaram 47 famílias francesas com 2 ou mais casos de PC ou PA recorrente sem presença de mutações conhecidas em qualquer um dos 3 genes mais frequentes e em que os factores etiológicos mais comuns como álcool e litíase foram excluídos. Uma grande deleção genómica c.1-320_c.55 + 961del1336 bp foi encontrada numa família em que 8 de 15 irmãos padeciam de PC. Três desses eram heterozigóticos para essa mutação, sendo que os pais e outros familiares próximos saudáveis não foram avaliados. A mutação não foi encontrada em nenhum dos 50 controlos saudáveis. É um achado que tanto expande o espectro de mutações conhecidas do gene SPINK1 como identifica um novo mecanismo mutacional causativo de PC⁴².

Em 2007, Király et al. foram os primeiros a demonstrar em termos genéticos e bioquímicos a associação entre alterações no peptídeo sinalizador com perda grave de função do SPINK1 e um elevado risco de PC. Deste forma, estas alterações são consideradas causadoras de doença, não modificadoras. Uma nova mutação, L14R, foi identificada em 2 famílias, encaixando num modelo autossómico dominante. A

penetrância é elevada mas incompleta, assemelhando-se à penetrância típica das mutações PRSS1 que caracterizam a clássica PH. Esta nova mutação, afecta exactamente o mesmo aminoácido que a mutação L14P, anteriormente descrita por Witt et al. Uma outra variante encontrada em doentes africanos mas não em caucasianos, L12F, assume extrema importância ao demonstrar que nem todas as alterações no peptídeo sinalizador estão associadas com pancreatite e que existe uma relação directa entre os efeitos funcionais das alterações e a doença. L14P e L14R abolem a secreção de SPINK1 com perda total de função, enquanto L12F não trazia qualquer alteração secretória. É importante diferenciar mutações que devem ser consideradas “severas” daquelas que conferem um risco menor de pancreatite e que devem ser apelidadas de “moderadas”. Estas últimas, como N34S, estão tipicamente associadas com a PC idiopática e factores genéticos e ambientais adicionais influenciarão a sua expressão¹⁸.

Recentemente, Schneider et al. investigaram a trans-heterozigotia CFTR/SPINK1 como causa de PC idiopática, sendo confirmados os resultados já obtidos por Noone et al. Houve um aumento de risco de pancreatite nestes doentes, mas embora esta associação patológica tenha sido feita, outros factores de risco na PC idiopática não podem ser postos de parte. Neste estudo, a maioria dos doentes com PC idiopática ou pancreatite idiopática familiar que eram heterozigóticos para as variantes SPINK1, eram-no também para as variantes CFTR. Nos que não tinham qualquer variante CFTR, cerca de 50% eram homozigóticos ou heterozigóticos compostos para variantes do SPINK1, uma condição que pode ser suficiente para causar PC, tal como foi proposto por Witt et al. e já confirmado por Pfuzer et al. O alto risco conferido pelas variantes poligénicas CFTR-SPINK1 é igualmente indicado pela idade de início mais precoce em doentes com PC idiopática, sugerindo que factores ambientais não identificados estão relacionados com a expressão da doença em idades mais avançadas⁴³.

Gasiorowska et al. descreveram a frequência de mutações SPINK1 em 33 doentes polacos adultos com PC alcoólica e 14 com PC idiopática, assim como também investigaram a sua relação com o curso clínico da doença. A frequência de mutações em doentes com PC alcoólica foi de 18%, maior do que a observada em estudos da Europa e Estados Unidos. Também a mutação N34S foi detectada em 6,5% dos controlos, um valor igualmente elevado comparativamente a outros estudos. A frequência de mutações no doentes com PC idiopática foi de 28,6% que vai de acordo

com estudos anteriores e que confirmam a associação. Estes valores poderão ocorrer devido a uma maior prevalência das mutações N34S na população polaca. Este trabalho falhou na tentativa de associar as mutações com um fenótipo mais severo de PC, e que incluía a existência de diabetes mellitus, calcificações, pseudoquistos, alterações no ducto pancreático principal, colestase e intervenções terapêuticas¹⁴.

Embora as mutações no gene SPINK1 estejam claramente associadas com a PC, o seu papel definitivo é ainda controversia. A mutação N34S poderá estar associada com o cancro pancreático decorrente de uma PC crónica severa e de longa duração, semelhante ao que acontece no gene PRSS1. Este mecanismo seria possível se se confirmasse que os portadores da mutação N34S tendem a um início mais precoce e uma evolução mais severa da doença⁴⁴.

Uma forma particular de pancreatite associada ao gene SPINK1 é a pancreatite tropical calcificante (PTC). A PTC é uma forma idiopática, juvenil e não-alcoólica de PC extremamente prevalente em alguns países asiáticos e africanos em desenvolvimento e localizados nos trópicos¹⁹. Os doentes apresentam-se tipicamente em idade jovem com dor abdominal recorrente e deficiências nutricionais. A PC leva a uma perda progressiva de células beta pancreáticas e os doentes acabam por desenvolver uma diabetes insulino-dependente antes dos 30 anos⁴⁵. Esta diabetes, apelidada de diabetes pancreática fibrocalculosa (FCPD, do inglês *fibrocalculous pancreatic diabetes*) é assim uma forma de diabetes secundária à PTC. A etiologia da FCPD é sugerida como multifactorial, co-existindo factores ambientais e genéticos envolvidos. A PTC difere da PC alcoólica e da PC idiopática pela idade mais jovem de início, a calcificação pancreática, a alta incidência de diabetes insulino-dependente e uma incidência excepcionalmente elevada de cancro pancreático^{19,45}.

Vários estudos investigaram doentes com PTC e pesquisaram mutações no gene SPINK1. Foram encontradas mutações em cerca de 50% dos doentes, onde N34S era a mais frequente^{19,45}. Alguns autores tentaram distinguir a FCPD e a PTC com base em características clínicas. As mutações foram identificadas em igual frequência quer em doentes com FCPD como em doentes com PTC sem diabetes, sugerindo a mesma base genética. A idade média de início para doentes com PTC sem diabetes foi cerca de 14 anos mais precoce do que nos doentes com FCPD (21 vs. 35 anos). No entanto, é importante referir que a PTC sem diabetes e a FCPD são indistinguíveis com base

em achados patológicos. A idade de início, presença ou ausência de diabetes e a idade de início da diabetes entre heterozigotos ou homozigotos para N34S não mostrou diferenças significativas, sendo pouco provável um modelo autossómico dominante ou recessivo de hereditariedade. Estes dados sugerem uma base genética comum para a PTC com factores genéticos e ambientais adicionais responsáveis pela variação do fenótipo na FCPD e nos doentes com PTC sem diabetes. Confirma-se o papel causal da mutação N34S na pancreatite e simultaneamente na patogénese da PTC¹⁸. Foram descritas outras mutações no gene SPINK1 em doentes com PTC, mas que carecem ainda de confirmação⁴⁶. A predisposição genética para a PTC é, em parte, semelhante à PC idiopática nos países desenvolvidos⁴⁷.

Actualmente estamos numa era em que a tecnologia de estudo genético se vai intrometendo na área clínica, resultando na capacidade de o médico obter prontamente informação genética detalhada de um doente. A capacidade de detecção de mutações tem-se tornado cada vez mais simples, mas a capacidade de interpretar com precisão os resultados tem-se tornado mais complexa⁴⁸.

Com a descoberta de mutações associadas à pancreatite, a questão dos testes sintomáticos e pré-sintomáticos levanta-se. Pfuzer et al., defendem que como apenas <1% dos heterozigóticos para mutações SPINK1 desenvolvem a doença, não há indicações para o teste pré-sintomático. Uma vez que parecem ser preditivas de um início de sintomatologia mais precoce do que na PC idiopática, testes após os 20 anos de idade não trazem qualquer benefício para os doentes²¹. Quase 90% dos doentes com mutações SPINK1 desenvolvem pancreatite antes dos 20 anos⁵.

Noone et al. defendiam que, devido à elevada frequência de mutações nos genes CFTR, SPINK1 e PRSS1 em doentes com PC, os testes genéticos poderiam ser úteis em doentes seleccionados. Tendo em conta que cada gene produz o fenótipo de pancreatite segundo mecanismos diferentes, diferentes alvos terapêuticos poderiam ser definidos. Uma vez que os estudos iniciais não associaram a pancreatite de etiologia alcoólica com estas mutações, apontam para a possível utilidade dos testes genéticos ao distinguir pancreatite alcoólica dos casos idiopáticos²⁷.

Em Abril de 2001, durante o *Third International Symposium of Inherited Diseases of the Pancreas*, foi feito um consenso relativamente às mutações no gene SPINK1: ao contrário das mutações PRSS1 que poderiam ser efectuadas em contexto clínico apropriado, para o SPINK1 apenas se executavam mediante protocolos aprovados

pelo Comité de Ética de Pesquisa. No entanto, desde essa altura, muitas outras mutações e genes foram investigados e é razoável que as recomendações sejam discutidas e revistas²². Os testes genéticos para doenças pancreáticas tornaram-se uma prática médica importante⁵.

A mutação mais frequente do gene SPINK1, N34S, tem uma elevada frequência na população geral (1-4%) mas está associada com uma baixa penetrância (<1%). Até as mutações mais severas têm uma penetrância consideravelmente baixa (por exemplo, 29% para c.27delC) quando comparadas com as mutações no gene PRSS1. Com esta baixa penetrância e perante a sua associação com a PC de várias etiologias, as mutações SPINK1 são suspeitas de actuarem como factores modificadores ou predisponentes para a doença, mais do que causadores⁴⁸.

Desta forma, a detecção de mutações no SPINK1 entre indivíduos sintomáticos dá informação incompleta no que diz respeito à etiopatogenia global da pancreatite. A baixa penetrância dá origem a uma taxa inaceitavelmente elevada de falsos positivos e não permite que a detecção de mutações seja usada em indivíduos assintomáticos ou com uma simples dor abdominal inexplicada. Não está indicado o seu uso quer como teste diagnóstico, quer como teste de rastreio⁴⁸.

Um aspecto importante dos testes genéticos é o aconselhamento. Qualquer doente deve ser informado sobre os aspectos gerais e específicos de um teste genético antes de este ser efectuado. Também deve ser claro que, no caso das mutações SPINK1, a sua presença não prediz o percurso da doença nem afecta a sua abordagem clínica²².

O diagnóstico de PC numa fase precoce é extremamente difícil. O esclarecimento total da predisposição genética poderia tornar possível o diagnóstico mais precoce e a detecção de doentes em risco⁴⁹.

Em crianças e adolescentes, nos quais a influência de factores ambientais como o álcool e o tabaco é mínima, os factores genéticos terão um papel importante na determinação da susceptibilidade para a PC e a sua progressão⁴⁹. Devido à variedade de etiologias nas crianças, a perspicácia clínica deve ditar que tipo de investigação é mais pertinente para um episódio inicial de PA. As formas hereditárias de pancreatite em crianças incluem a PH e a PC em contexto de fibrose quística. A história familiar de pancreatite poderá ser indicação para teste genético¹⁰.

Excepto para as mutações PRSS1, o risco genético para a PC não é alto. Entre os portadores de mutações SPINK1 ou CFTR que aumentam o risco de pancreatite em 50 vezes ou em 900 vezes quando ambos os genes são afectados, a maioria nunca

desenvolve PC. Embora haja associação entre as mutações SPINK1 e a PC juvenil ou familiar, a associação da mutação N34S com o início precoce da doença parece ser mínimo ou ausente, indicando uma etiologia multifactorial. Actualmente é possível apenas fazer uma dedução estatística acerca do risco de PC⁴⁹, tal como mostra o Gráfico 1.

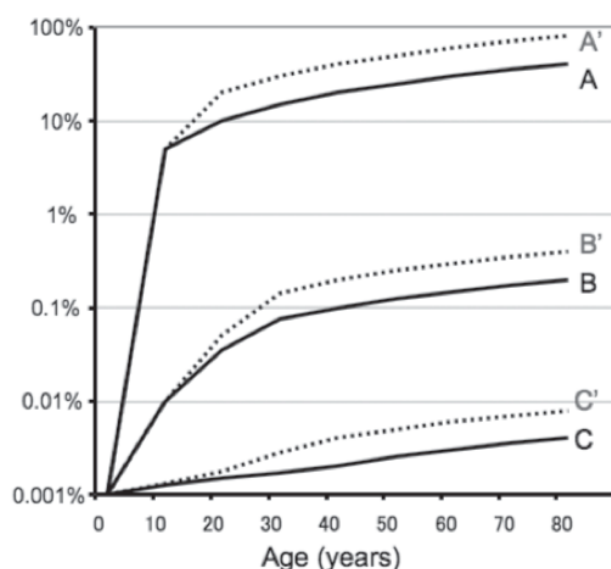


Gráfico 1: Risco genético e incidência cumulativa da PC. O risco genético é assumido como constante durante toda a vida. *A*, o modelo para o gene PRSS; a incidência cumulativa da PC durante a vida é de 40%. *B*, o modelo para os genes CFTR e SPINK1; a incidência cumulativa da PC durante a vida é de 0.2%. *C*, o modelo para a população geral; a incidência cumulativa da PC durante a vida é de 0.004%. *A'*, *B'* e *C'*, o risco está aumentado pela presença de factores ambientais como o tabaco e o álcool [Naruse, S., K. Fujiki, and H. Ishiguro (2007), *Is genetic analysis helpful for diagnosing chronic pancreatitis in its early stage?* J Gastroenterol, 42 Suppl 17: p.60-5].

Numa outra perspectiva, poderão estar indicados testes genéticos tanto para mutações PRSS1 como SPINK1 em doentes sintomáticos e com uma das seguintes características: ataques recorrentes de PA e história familiar positiva; PC inexplicada e história familiar positiva; PC inexplicada sem história familiar e com exclusão de outras causas (anormalidades anatómicas, doenças metabólicas, trauma, fibrose quística, doença inflamatória intestinal, álcool); episódio inexplicável de pancreatite em criança³⁶.

Considerando que indivíduos com pancreatite idiopática ou não relacionada com o consumo de álcool vivem, muitas vezes, estigmatizados como alcoólicos devido à sua doença, será reconfortante ter provas da sua susceptibilidade genética⁸.

Parece haver uma associação entre mutações heterozigóticas no gene SPINK1 e no gene CFTR (trans-heterozigotia). No entanto esta evidência parece ser mais comum na pancreatite idiopática do que mutações homozigóticas ou heterozigóticas compostas nestes genes, como aconteceria nas doenças autossómicas recessivas. Também a heterozigotia nestes genes está presente em muitas famílias afectadas por pancreatite, mas nunca seguindo um modelo mendeliano clássico. Tudo isto aponta para um complexo modelo genético⁵⁰.

Embora os testes para mutações SPINK1 em crianças com PC possa fornecer informação acerca dos factores predisponentes, actualmente a maioria dos especialistas não aconselham testes genéticos para este gene⁵.

No entanto, enquanto a associação entre N34S e a PC foi firmemente estabelecida, a presença desta mutação em doente com mutações PRSS1 conhecidas parece não alterar quer o fenótipo da doença quer a sua penetrância⁵¹ e pode não ajudar ao aconselhamento do doente e da família¹⁰.

O factor limitante actual é a não compreensão do mecanismo de ligação entre a heterozigotia no gene SPINK1 e a pancreatite. Sem conhecimento do contexto correcto ou de outros factores de risco que interagem entre as mutações e a pancreatite, o valor dos testes genéticos continua limitado. A identificação de heterozigotia nem explica a doença num doente com pancreatite, nem é preditiva de verosimilhança clínica para uma pessoa não afectada⁵⁰.

No entanto, é verdade que ainda nenhum indivíduo homozigótico para a mutação N34S mas sem PC foi descrito. Tipicamente, os familiares dos doentes com PC associada a esta mutação do SPINK1 não têm pancreatite. Uma terapia específica para a PC geneticamente determinada ainda não foi estabelecida. O tratamento sintomático não difere do das outras formas de pancreatite⁵².

Considerando o facto de cerca de 50% dos doentes com PTC terem o gene SPINK1 mutado e que destes a maioria apresenta a mutação N34S, nestas regiões endémicas será razoável testar geneticamente aqueles que se apresentam com pancreatite. Devem ser informados sobre o risco de desenvolver a doença e sobretudo uma das suas complicações frequentes que é o cancro do pâncreas. Estratégias de prevenção

apropriadas seriam úteis para os portadores do alelo mutante, de forma a modificar as complicações a longo prazo¹⁹.

3. CONCLUSÕES

A pancreatite permanece um grande desafio diagnóstico à luz do estado actual da arte. Devido à natureza relativamente oculta da PC, particularmente na sua fase inicial, o diagnóstico é muitas vezes difícil. Embora seja necessário continuar a expandir o conhecimento, a descoberta de mutações associadas à PC trouxe algumas modificações. A percentagem de doentes com PC idiopática foi reduzida e continuará a diminuir.

A PC é mais frequente nos doentes com mutações no gene SPINK1. Está parcialmente conhecida a consequência funcional de algumas destas mutações no desempenho da proteína SPINK1, embora ainda careçam de consolidação científica para que possam ser indubitavelmente consideradas um factor etiológico de pancreatite. A mutação N34S é a mais frequentemente relatada, havendo algumas variações étnicas. O modelo de hereditariedade não está esclarecido, mas acredita-se num modelo complexo e multifactorial. É necessário esclarecer a interacção entre vários factores genéticos e ambientais.

As indicações para a realização de testes genéticos continuam por definir. No entanto, com base no conhecimento actual, a análise genética não estará indicada para indivíduos assintomáticos. Nos doentes sintomáticos, embora acrescente informação apenas parcial acerca da etiologia global da doença, poderá estar indicada em algumas situações: episódios recorrentes de PA ou PC de etiologia não explicada, juntamente com uma história familiar contribuidora; PC de etiologia não explicada, sem história familiar, mas com exclusão de outras causas; episódio inexplicável de pancreatite em criança, nomeadamente na presença de uma história familiar da doença; pancreatite desenvolvida nas regiões endémicas de PTC. A análise genética de mutações SPINK1 não deverá ser restrita a doentes com menos de 20 anos, pois são necessários mais estudos que clarifiquem a associação com um início mais precoce da doença.

O curso clínico da doença parece ser semelhante aos restantes casos de pancreatite. Uma abordagem clínica específica para a PC geneticamente determinada ainda não foi estabelecida. O tratamento sintomático não difere do das outras formas de pancreatite. Todos devem ser estimulados a cessar o consumo alcoólico e o tabagismo.

É importante sublinhar que a análise genética não dá o diagnóstico definitivo, nem está indicado como teste de rastreio. Esta tendência poderá mudar futuramente e o diagnóstico precoce ser o ponto chave para a redução de custos inerentes à morbilidade da PC.

Continua obscura a proporção exacta de custos relacionados com a pancreatite crónica que se devem à própria doença, como diabetes ou insuficiência exócrina, ou às consequências das co-morbilidades associadas. Como a incidência e as admissões hospitalares estão em crescendo, os custos de saúde irão inevitavelmente aumentar. No entanto, é difícil quantificar o impacto socioeconómico da pancreatite por causa da carência de dados concretos.

Todas as descobertas na área da genética relacionada com esta patologia têm sido pequenos passos rumo à compreensão da sua etiopatogenia. Só assim será possível intervir de uma forma eficaz e modificar o percurso da doença, permitindo uma alteração no padrão socioeconómico actual.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Etemab, B., and D.C. Whitcomb (2001), *Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new developments*. Gastroenterology, 120(3): p.682-707.
2. Jupp, J. D. Fine, and C.D. Johnson (2010), *The epidemiology and socioeconomic impact of chronic pancreatitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 24(3): p.219-31.
3. Dados fornecidos pelo Serviço de Informação e Gestão do Hospital de Santo António - Centro Hospitalar do Porto (2011).
4. Mitchell, R.M., M.F. Byrne, and J. Baillie (2003), *Pancreatitis*. Lancet, 361(9367): p.1447-55.
5. Lowe, M.E. (2004), *Pancreatitis in childhood*. Curr Gastroenterol Rep, 6(3): p240-6.
6. Triviño, T., G.J. Filho, and F.R. Torrez (2002), *Pancreatite aguda: o que mudou?* GED, 21(2): p.69-76.
7. Banks, P.A. and M.L. Freeman (2006), *Practice guidelines in acute pancreatitis*. Am J Gastroenterol, 101(10): p.2379-400.
8. Treiber, M., C. Schlag, and R.M. Schmid (2008), *Genetics of pancreatitis: a guide for clinicians*. Curr Gastroenterol Rep, 10(2): p.122-7.
9. Threadgold, J., et al. (2002), *The N34S mutation of SPINK1 (PSTI) is associated with familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease*. Gut, 50(5): p.128-81.
10. Lowe, M.E. and J.B. Greer (2008), *Pancreatitis in children and adolescents*. Curr Gastroenterol Rep, 10(2): p.128-35.
11. Witt, H., et al. (2000), *Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis*. Nat Genet, 25(2): p.213-6.
12. Whitcomb, D.C. (2005), *Risk, etiology, and pathofisiology of chronic pancreatitis*. Pancreatitis and Its Complications, Humana Press, Inc.
13. Schneider, A., J.M. Lohr, and M.V. Singer (2007), *The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction as a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease*. J Gastroenterol, 42(2): p.101-19.

14. Gasiorowska, A., et al. (2010), *The prevalence of cationic trypsinogen (PRSS1) and serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) gene mutations in polish patients with alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis*. Dig Dis Sci.
15. Dienstag JL. (2009), *Abordagem ao doente com doença pancreática*. Harrison Medicina Interna, 17^a ed. McGraw Hill. Rio de Janeiro.
16. Drenth, J.P., R. te Morsche, and J.B. Jansen (2002), *Mutations in serine protease inhibitor Kazal type 1 are strongly associated with chronic pancreatitis*. Gut, 50(5): p.687-92.
17. Tzetzis, M., et al. (2007), *Contribution of the CFTR gene, the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (SPINK1) and the cationic trypsinogen gene (PRSS1) to the etiology of recurrent pancreatitis*. Clin Genet, 71(5): p.451-7.
18. Kiraly, O., et al. (2007), *Signal peptide variants that impair secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause autosomal dominant hereditary pancreatitis*. Hum Mutat, 28(5): p.469-76.
19. Chandak, G.R., et al. (2002), *Mutations in the pancreatic secretory inhibitor gene (PSTI/SPINK1) rather than the cationic trypsinogen gene (PRSS1) are significantly associated with tropical calcific pancreatitis*. J Med Genet, 39(5): p.347-51.
20. Kandula, L., D.C. Whitcomb, and M.E. Lowe (2006), *Genetic issues in pediatric pancreatitis*. Curr Gastroenterol Rep, 8(3): p.248-53.
21. Pfutzer, R.H., et al. (2000), *SPINK1/PSTI polymorphisms act as a disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis*. Gastroenterology, 119(3): p.615-23.
22. Derikx, M.H., and J.P. Drenth (2010), *Genetic factors in chronic pancreatitis; implications for diagnosis, management and prognosis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 24(3): p.251-70.
23. Chen, J.M., et al (2000), *Mutational analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in hereditary and sporadic chronic pancreatitis*. J Med Genet, 37(1): p.67-9.
24. Kaneko, K., et al. (2001), *Analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene mutations in Japanese patients with chronic pancreatitis*. J Hum Genet, 46(5): p.293-7.

25. Schneider, A., et al. (2003), *Limited contribution of the SPINK1 N34S mutation to the risk and severity of alcoholic chronic pancreatitis: a report from the United States*. Dig Dis Sci, 48(6): p.1110-5.
26. Pendl, H., et al. (2001), *High frequency of the N34S mutation in the SPINK1 gene in chronic pancreatitis detected by a new PCR-RFLP assay*. Am J Med Genet, 100(3): p.252-3.
27. Noone, P.G., et al. (2001), *Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations*. Gastroenterology, 121(6): p.1310-9.
28. Kuwata, K., et al. (2001), *Genetic mutations in exons 3 and 4 of the pancreatic secretory inhibitor in patients with pancreatitis*. J Gastroenterol, 36(9): p.612-8.
29. Shimosegawa, T. (2001), *Do point mutations in the PSTI (SPINK1) gene truly contribute to the pathogenesis of chronic pancreatitis?* J Gastroenterol, 36(9): p.645-7.
30. Gaia, E., et al. (2002), *Germline mutations in CFTR and PSTI genes in chronic pancreatitis patients*. Dig Dis Sci, 47(11): p.2416-21.
31. Audrézet, M.P., et al. (2002), *Determination of the relative contribution of three genes – the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene – to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis*. Eur J Hum Genet, 10(2): p.100-6.
32. Perri, F., A. Piepoli, and A. Andriulli (2002), *On the role of CFTR, PRSSI and PSTI/SPINK1 in idiopathic chronic pancreatitis*. Eur J Hum Genet, 11(2): p.107-8.
33. Bernardino, A.L., et al. (2003), *CFTR, PRSSI and SPINK1 mutations in the development of pancreatitis in Brazilian patients*. JOP, 4(5): p.169-77.
34. Kuwata, K., et al. (2003), *Mutational analysis of the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene in familial and juvenile pancreatitis in Japan*. J Gastroenterol, 38(4): p.365-70.
35. Hirota, M., et al. (2003), *Significance of trypsin inhibitor gene mutation in the predisposition to pancreatitis*. International Congress Series. 1255: p.41-8
36. Rosendahl, J., et al. (2007), *Hereditary chronic pancreatitis*. Orphanet J Rare Dis, 2: p.1.

37. Weiss, F.U., et al. (2003), *SPINK1 mutations and phenotypic expression in patients with pancreatitis associated with trypsinogen mutations*. J Med Genet, 40(4): p.e40.
38. Felderbauer, P., et al. (2003), *A novel mutation of the calcium sensing receptor gene is associated with chonic pancreatitis in a family with heterozygous SPINK1 mutations*. BMC Gastroenterol, 3: p.34.
39. Perri, F., et al. (2003), *Mutation analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, the cationic trypsinogen (PRSS1) gene, and the serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) gene in patients with alcoholic chronic pancreatitis*. Eur J Hum Genet, 11(9): p.687-92.
40. Le Marechal, C., et al. (2004), *Two novel severe mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (SPINK1) cause familial and/or hereditary pancreatitis*. Hum Mutat, 23(2): p.205.
41. Lee, K.H., et al. (2005), *Mutation analysis of SPINK1 and CFTR gene in Korean patients with alcoholic chronic pancreatitis*. Dig Dis Sci, 50(10): p.1852-6.
42. Masson, E., et al. (2006), *Detection of a large genomic deletion in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene*. Eur J Hum Genet, 14(11): p.1204-8.
43. Schneider, A., et al. (2011), *Combined bicarbonate conductance.-impairing variants in CFTR and SPINK1 variantes are associated with chronic pancreatic in patients without cystic fibrosis*. Gastroenterology, 140(1): p.162-71.
44. Hucl, T., et al. (2007), *SPINK1 variants in young-onset pancreatic cancer*. J Gastroenterol, 42(7): p.599.
45. Bhatia, E., et al. (2002), *Tropical calcific pancreatitis in young-onset pancreatic cancer*. Gastroenterology, 123(4): p.1020-5.
46. Schneider, A., et al. (2002), *SPINK1/PSTI mutations are associated with tropical pancreatitis and type II diabetes mellitus in Bangladesh*. Gastroenterology, 123(4): p.1026-30.
47. Hassan, Z., et al. (2002), *SPINK1 is a susceptibility gene for fibrocalculous pancreatic diabetes in subjects from the Indian subcontinent*. Am J hum Genet, 71(4): p.964-8.

48. Ooi, C.Y., et al. (2010), *Genetic testing in pancreatitis*. *Gastroenterology*, 138(7): p.2202-6, 2206 e1.
49. Naruse, S., K. Fujiki, and H. Ishiguro (2007), *Is genetic analysis helpful for diagnosing chronic pancreatitis in its early stage?* *J Gastroenterol*, 42 Suppl 17: p.60-5.
50. Whitcomb, D.C. (2004), *Value of genetic testing in the management of chronic pancreatitis*. *Gut*, 53(11): p-1710-7.
51. Boulling, A., et al. (2007), *Functional analysis of pancreatitis-associated missence mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene*. *Eur J Hum Genet*, 15(9): p.936-42.
52. Kuhn, A.C., et al. (2005), *Chronic pancreatitis with pancreaticolithiasis and pseudocyst in a 5-year-old boy with homozygous SPINK1 mutation*. *Pediatr Radiol*, 35(9): p.902-5.