MARIANGES ZADROZNY GOUVÊA DA COSTA

Frequência de tabagismo e das mutações N34S e P55S do gene *Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 1* (SPINK1) e da mutação R254W do gene *Quimotripsina C* (CTRC) em pacientes portadores de pancreatite crônica e em controles

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências
Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Profa. Dra. Suzane Kioko Ono

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Marianges Zadrozny Gouvêa da

Frequência de tabagismo e das mutações N34S e P55S do gene *Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 1* (SPINK1) e da mutação R254W do gene Quimotripsina C (CTRC) em pacientes portadores de pancreatite crônica e em controles / Marianges Zadrozny Gouvêa da Costa. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Suzane Kioko Ono.

Descritores: 1.Pancreatite crônica 2.Alcoolismo 3.Hábito de fumar 4.Genética
5.Inibidor da tripsina pancreática de Kazal 6.Quimotripsina C

USP/FM/DBD-219/15

DEDICATÓRIA

A meu marido Marcelo, com amor e gratidão, por me apoiar, cobrar e incentivar, por ter participado de todas as etapas da elaboração deste trabalho e, principalmente, por acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Dulce Reis Guarita por tudo que me ensinou, por tua amizade, carinho e gentileza.

À Prof.^a Dra. Suzane Kioko Ono pela orientação e exemplo de dedicação e empenho.

Aos membros do Grupo de Pâncreas pela contribuição na coleta dos dados clínicos.

À Júlia Glória Lucatelli Pires pela enorme contribuição ao trabalho, participando ativamente em todas as etapas e auxiliando de maneira fundamental na realização dos estudos genéticos.

Ao Laboratório de Investigação Médica 07 e à toda equipe pela disponibilização do parque de equipamentos e disponibilidade de ajuda sempre que foi necessária.

Ao Departamento de Gastroenterologia da FMUSP pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos pacientes e voluntários que participaram desta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente cooperaram com este estudo.

À FAPESP, à Capes e à Fundação Família Alves de Queiroz pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Epidemiologia e Estatística do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela realização das análises estatísticas.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Pancreatite crônica	1
1.2. Fatores de risco para a pancreatite crônica	2
1.2.1. Alcoolismo	2
1.2.2. Tabagismo	4
1.2.3. Outras causas	5
1.2.4. Fatores de risco genéticos	5
1.2.4.1. PRSS1	5
1.2.4.2. SPINK1 e CTRC	6
1.2.4.2.1. SPINK1	6
1.2.4.2.2. CTRC	8
1.2.4.3. Outros Genes	10
1.3. Justificativa	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Questões éticas	13
3.2. Casuística	13
3.3. Estudo genético	15

3.3.1. Extração do DNA	16
3.3.2. Eletroforese	16
3.3.3. Amplificação por PCR	17
3.3.4. Purificação do DNA	18
3.3.5. Quantificação do DNA	19
3.3.6. Sequenciamento do DNA	19
3.4. Análise estatística	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Características sócio demográficas, hábitos de vida, aspectos clínicos e resultados de exames complementares da população em estudo	21
4.2. Resultados dos testes genéticos	32
4.2.1. Avaliação da extração de DNA genômico	32
4.2.2. Avaliação da amplificação por PCR	33
4.2.3. Análise de Sequenciamento	35
4.3. Testes de associação entre a mutação N34S do gene SPINK1 ou a ocorrência de tabagismo e características da doença pancreática	38
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

Apêndice

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características estruturais dos genes PRSS1 e SPINK1	7
Figura 2 -	Características estruturais do gene CTRC	8
Figura 3 -	Fisiologia do tripsinogênio	10
Figura 4 -	Distribuição da casuística	15
Figura 5 -	Distribuição dos pacientes do Grupo A segundo a etiologia da pancreatite	21
Figura 6 -	Avaliação da extração de DNA genômico	32
Figura 7 -	Avaliação da amplificação por PCR	33
Figura 8 -	Avaliação da amplificação por PCR	34
Figura 9 -	Eletroferograma do gene SPINK 1	35
Figura 10 -	Eletroferograma do gene SPINK1	35
Figura 11 -	Eletroferograma do gene CTRC	35
Figura 12 -	Eletroferograma do gene CTRC	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Desenho dos primers SPINK1 e CTSC	17
Tabela 2 -	Reagentes utilizados para o preparo da Reação em Cadeia da Polimerase	18
Tabela 3 -	Distribuição dos grupos A, B e C por gênero	22
Tabela 4 -	Idade dos pacientes pertencentes aos grupos A, B e C	23
Tabela 5 -	Características raciais dos pacientes pertencentes aos grupos A e B	24
Tabela 6 -	Distribuição dos grupos A e B pela escolaridade	25
Tabela 7 -	Frequência de tabagismo e descrição da carga tabágica nos grupos A e B	26
Tabela 8 -	Quantidade e tempo de ingestão de etanol nos pacientes com pancreatite crônica por álcool e nos etilistas crônicos sem pancreatite	27
Tabela 9 -	Distribuição dos grupos A e B pela presença de comorbidades	28
Tabela 10 -	Características clínicas dos pacientes pertencentes ao grupo A	29
Tabela 11 -	Distribuição dos grupos A e B segundo os níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), amilase e lipase	30
Tabela 12 -	Alterações pancreáticas detectadas por exames de imagem em pacientes do grupo A	31
Tabela 13 -	Distribuição dos grupos segundo a frequência dos genótipos AA, AG, CC, CT do gene SPINK1	36
Tabela 14 -	Distribuição dos grupos segundo a frequência dos genótipos CC, CT do gene CTSC	37
Tabela 15 -	Distribuição do Grupo A com e sem a mutação N34S do gene SPINK1 segundo a ocorrência de manifestação clínica	38
Tabela 16 -	Distribuição do Grupo A tabagista e não tabagista segundo a ocorrência de manifestação clínica	39
Tabela 17 -	Distribuição do Grupo A com e sem mutação do gene SPINK1 segundo a ocorrência de alterações morfológicas pancreáticas nos exames de imagem	40
Tabela 18 -	Distribuição do Grupo A tabagista e não tabagista segundo a ocorrência de alterações morfológicas pancreáticas em exames de imagem	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
1p36.21	Braço curto do 1º cromossomo na 36º banda e 21º sub-banda
5q32	Braço longo do 5º cromossomo na 32º banda
α	Alfa
A	Adenina
A>G	Substituição do nucleotídeo de A para G
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
β	Beta
C>T	Substituição do nucleotídeo de C para T
C	Citosina
CASR	Receptor sensor do cálcio
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cm	Centímetro
CTRC	Quimotripsina C
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg	DNA genômico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

Dra.	Doutora
et al.	E colaboradores
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Et-Br	Brometo de etídio
EUA	Estados Unidos da America
FA	Fosfatase Alcalina
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Grama
GGT	Gamaglutamil transpeptidase
°C	Grau Celsius
G	Guanina
H ₂ O	Água
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da FMUSP
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Kb	Quilobase
KDa	Quilodalton
LIM	Laboratório de investigação médica
M	Molaridade ou concentração molar
mg	Miligrama
MilliQ	Água deionizada e purificada pela Millipore©

min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Micromolar
N	Número
Nm	Nanômetro
pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol
Prof. ^a	Professora
PRSS1	Gene tripsinogênio catiônico
qsp	Quantidade suficiente para
RNM	Ressonância nuclear magnética
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
seg	Segundo
SNPs	Do inglês single-nucleotide polymorphisms ou polimorfismos de nucleotídeo único
SPINK1	Serine protease inhibitor Kazal type 1
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
TC	Tomografia computadorizada
TBE	Tris borato EDTA

TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador beta um
U	Unidade
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
US	Ultrassom
USE	Ultrassonografia Endoscópica
V/cm	Volt por centímetro
VEGF	Fator de crescimento endotelial

RESUMO

COSTA MZG. *Frequência de tabagismo e das mutações N34S e P55S do gene Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 1 (SPINK1) e da mutação R254W do gene Quimotripsina C (CTRC) em pacientes portadores de pancreatite crônica e em controles* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A pancreatite crônica é uma desordem complexa, na qual a interação entre fatores ambientais e genéticos resulta na enfermidade. O presente estudo incluiu 148 pacientes com diagnóstico de pancreatite crônica, 110 etilistas crônicos e 297 controles sadios com o objetivo de investigar a frequência de tabagismo e das mutações N34S e P55S do gene SPINK1 e R254W do gene CTRC nesta população. Foi aplicado questionário presencial e realizada reação de sequenciamento para a pesquisa das mutações genéticas, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os portadores de pancreatite crônica possuíam etiologia alcoólica em 74% das vezes e idiopática em 26%. A pancreatite alcoólica apresentou-se de maneira distinta da pancreatite crônica idiopática, sendo que o primeiro grupo é composto por maior prevalência do gênero masculino (88,18% *versus* 34,21%), por maior média de idade (55,64 anos *versus* 45,20 anos), menor frequência de caucasianos (63,89% *versus* 84,21%), menor escolaridade (23,30% concluíram ensino médio ou superior *versus* 57,89%) e maior frequência de repercussões da doença, como diarreia (54,21% *versus* 24,24%), emagrecimento (56,07% *versus* 24,24%), diabetes melito (57,94% *versus* 36,36%) e ocorrência de pseudocistos pancreáticos (31,78% *versus* 12,12%), repercussões estas que não foram acompanhadas de maior frequência de alterações morfológicas, como calcificações pancreáticas ou dilatação do ducto pancreático principal. A frequência de tabagismo foi significativamente maior em pacientes com pancreatite crônica alcoólica do que em etilistas sem pancreatite crônica, podendo ser considerado cofator de risco para o desenvolvimento da pancreatite crônica entre alcoolistas ($p = 0,002$); a frequência da mutação N34S do gene SPINK1 em pacientes com pancreatite crônica foi de 3,38%, maior do que a frequência de 0,49% encontrada nos grupos controle ($p = 0,016$); a frequência de 2,03% da mutação P55S do gene SPINK1 e a frequência de 0,67% da mutação R254W do gene CTRC, encontradas nos pacientes com pancreatite crônica, não diferiram estatisticamente quando comparadas às frequências, de 0,49% de ambas mutações, encontradas nos grupos controle. ($p =$

0,120 e 0,751). Pela investigação da associação de tabagismo e da mutação N34S do gene SPINK1 com as características clínicas e morfológicas da pancreatite crônica, verificou-se que a mutação N34S não se associou a maior gravidade da apresentação clínica ou morfológica da pancreatite crônica; no entanto o tabagismo associou-se a maior frequência de diabetes melito entre os portadores de pancreatite crônica. Concluiu-se que o tabagismo e a mutação N34S do gene SPINK1 podem ser considerados cofatores de risco para o desenvolvimento da pancreatite crônica.

Descritores: pancreatite crônica; alcoolismo; hábito de fumar; genética; inibidor de tripsina pancreática de Kazal; quimotripsina C.

ABSTRACT

COSTA MZG. *Frequency of tabagism and N34S and P55S mutation of Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 1 gene (SPINK1) and R254W mutation of Chymotrypsin C gene (CTRC) in patients with chronic pancreatitis and controls* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Chronic pancreatitis is a complex disorder in which the interaction between environmental and genetic factors results in the disease. This study included 148 patients with chronic pancreatitis, 110 chronic alcoholics and 297 healthy controls in order to investigate the frequency of smoking and N34S and P55S mutation of SPINK1 gene and R254W of CTRC gene in this population. A questionnaire was applied and gene sequencing was done, after having the Informed Consent Statement. Those with chronic pancreatitis had alcoholic etiology in 74% of cases and idiopathic in 26%. Alcoholic pancreatitis presented in a distinct way of idiopathic chronic pancreatitis. The first group is composed of a higher prevalence of males (88.18% versus 34.21%), by higher mean age (55.64 years versus 45.20 years), lower frequency of Caucasians (63.89% versus 84.21%), lower education (23.30% completed secondary or higher education versus 57.89%) and worst impact from the disease such as diarrhea (54.21% versus 24.24%), weight loss (56.07% versus 24.24%), diabetes mellitus (57.94% versus 36.36%) and occurrence of pancreatic pseudocysts (31.78% versus 12 , 12%). These effects were not accompanied by increased frequency of morphological changes, such as pancreatic calcifications or dilation of the main pancreatic duct. The frequency of smoking was significantly higher in patients with alcoholic pancreatitis than in alcoholics without chronic pancreatitis, therefore tabagism may be considered as a cofactor for the development of chronic pancreatitis among alcoholics ($p = 0.002$); the frequency of N34S mutation of SPINK1 gene in patients with chronic pancreatitis was 3.38%, higher than the rate of 0.49% found in the control groups ($p = 0.016$); the frequency of 2.03% of the P55S mutation of SPINK1 gene and the frequency of 0.67% of the CTRC gene R254W mutation found in patients with chronic pancreatitis were not statistically different when compared to the frequencies of 0.49% of both mutations, found in the control groups. ($p = 0.120$ and 0.751) For the investigation of the association of smoking and N34S mutation of SPINK1 gene with the clinical and morphological features of chronic pancreatitis, it was noticed that the N34S mutation

did not determine a greatest severity in the presentation of chronic pancreatitis, however smoking was associated with a higher frequency of diabetes mellitus in patients with chronic pancreatitis. It was concluded that smoking and the N34S mutation of SPINK1 gene are positively correlated with chronic pancreatitis.

Descriptors: chronic pancreatitis; alcoholism; smoking; genetics; trypsin inhibitor, Kazal pancreatic; chymotrypsin C.

1. INTRODUÇÃO

Na introdução deste trabalho serão abordados inicialmente, alguns aspectos da pancreatite crônica, doença alvo desta pesquisa, descrevendo as suas características clínicas e a sua epidemiologia, para, em seguida, discorrer a respeito dos fatores de risco para o desenvolvimento da pancreatite crônica, dentre elas as características genéticas, como as mutações dos genes SPINK1 e CTSC, objetivo desta pesquisa.

1.1. A Pancreatite crônica

A pancreatite crônica é caracterizada por destruição progressiva da glândula pancreática, mediada por inflamação crônica, apoptose, necrose e obstruções ductais que levam a substituição do parênquima normal por fibrose (1).

Este cenário conduz, em muitos casos, à sintomatologia exuberante, sendo que a manifestação clínica mais frequente é a dor abdominal, que se apresenta em crises recorrentes que mimetizam uma pancreatite aguda, ou de forma contínua e incapacitante (2).

Em trabalho realizado no Brasil, a dor estava presente em 93,6% de 407 pacientes com pancreatite crônica estudados (3); em estudo multicêntrico nos EUA, 77% de 540 portadores da doença apresentavam-se com dor, o que se associou a redução na qualidade de vida dos pacientes, hospitalizações e uso de analgésicos (4).

Com a evolução da pancreatite crônica, pode ocorrer insuficiência funcional da glândula, tanto de sua porção exócrina, que se manifesta por má absorção, esteatorréia ou emagrecimento, como endócrina, que se apresenta com quadro de diabetes melito do tipo 3C (1, 5, 6).

No Brasil, 31,7% de 407 pacientes com pancreatite crônica apresentavam-se com má absorção e 37,8% com diabetes melito (3), na Coreia, o diabetes estava presente em 31,6% de 814 pacientes (7), na Itália, a insuficiência exócrina ocorreu em 31% de 885 pacientes e a insuficiência endócrina em 45% de 834 (8), na China foi observado que 22,5% de 387 pacientes diagnosticados com pancreatite crônica tinham diabetes melito (9).

Além das manifestações clínicas acima descritas, os pacientes portadores de pancreatite crônica podem ter complicações como compressão gastrointestinal (3,3%),

icterícia (24%), pseudocistos pancreáticos (35,9%), derrames cavitários (13,3%), necrose pancreática (4,7%), abscessos (3,6%), hemorragia digestiva (2,3%) e fístula pancreática (1,1%) (10), o que os leva a ter menor expectativa de vida do que a população sem a doença (11, 12).

Estudos populacionais visando a epidemiologia da pancreatite crônica são pouco frequentes e as informações a respeito da incidência e da prevalência da doença são, na maioria das vezes, procedentes dos Estados Unidos, da Europa e do Japão (13, 14).

Assim, nos Estados Unidos, a incidência da doença foi de 4,05 por 100.000 habitantes, não se modificando com o passar do tempo, quando comparados registros de 1977 até 2006, e a prevalência foi de 41,76 por 100.000 habitantes no ano de 2006 (11). A Dinamarca, em 1979, reportou prevalência de 27,4 casos para cada 100.000 habitantes (15). Na França, em 2003, foi estimada incidência de cinco casos por 100.000 habitantes e prevalência de 16 por 100.000 habitantes (16) e no Japão foram realizados estudos epidemiológicos de 1974 a 2007, evidenciando que a prevalência neste país aumentou de 28,5, em 1994, para 36,9 por 100.000 habitantes em 2007 (17, 18). Na Índia, a prevalência é surpreendentemente alta, chegando a 114 a 200 por 100.000 habitantes (19).

Podem ser observadas diferenças de acordo com a região geográfica e com a época de realização da pesquisa, o que poderia ser explicado por variabilidade na frequência das causas da doença, na origem étnica ou na exposição desigual a fatores de risco ambientais. No entanto, comparações são difíceis, pois classificações e critérios diagnósticos variaram e, com o passar do tempo, os métodos diagnósticos se tornaram mais sensíveis, sugerindo que as diferenças podem não refletir reais mudanças na incidência da doença (13, 14).

1.2. Fatores de risco para a pancreatite crônica

1.2.1. Alcoolismo

Indubitavelmente, a causa mais frequente da pancreatite crônica é o consumo abusivo de etanol (14), já em 1878 foi reportada associação entre o alcoolismo e lesão pancreática (20). Historicamente, a ingestão de álcool foi apontada como causa de 70 a 90% das pancreatites crônicas (21) também em nosso meio; em levantamento realizado

em 1990 por Dani et al. (22), o alcoolismo foi responsável por 89,6% de 797 casos de pancreatite crônica.

Atualmente, a frequência reportada de ingestão alcoólica como causa de pancreatite crônica tem sido, na maioria das vezes, menor do que as mencionadas anteriormente. Assim, em 2009, levantamento Italiano que incluiu 893 pacientes com pancreatite crônica, 44% referiam ingerir mais do que 80g de etanol por dia por um período maior do que 5 anos (8). De maneira semelhante, nos EUA, em trabalho multicêntrico publicado em 2011, que incluiu 539 pacientes portadores de pancreatite crônica, o álcool foi o principal fator causal em 44,5% dos casos (23).

Possivelmente a redução da frequência de alcoolismo, como causa de pancreatite crônica, ocorreu porque as instituições recebem mais casos de pancreatite não alcoólica para investigação etiológica, havendo oportunidade de identificação de outras causas da doença, graças à maior disponibilidade de ferramentas diagnósticas (21).

Apesar do consumo abusivo de etanol ser o principal responsável pela maioria dos casos de pancreatite crônica, o álcool, isoladamente, não é suficiente para levar à doença. Tal afirmativa é corroborada pelo conhecimento de que apenas pequena proporção dos etilistas crônicos (5 a 10%) tem a afecção. Cofatores ambientais, genéticos ou sua interação tem papel na determinação da susceptibilidade à pancreatite crônica alcoólica (24).

A doença pancreática alcoólica deve ser entendida como uma desordem complexa, resultante de imperfeições em múltiplos pontos que, quando combinados, levam à falência dos sistemas de controle metabólico e homeostático. O reconhecimento dos fatores envolvidos, quais os genes, as proteínas e as células, bem como quais vias regem as interações e onde podem ocorrer os defeitos, propiciam melhor entendimento da fisiopatogenia da doença (25).

Há várias teorias que procuram explicar os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da pancreatite de etiologia alcoólica, não sendo as mesmas mutuamente excludentes (26).

A primeira, baseada no estudo da histologia pancreática, demonstra que a formação de rolas ductais, secundária à maior concentração protéica do suco pancreático, é a alteração que leva à obstrução, à fibrose e à calcificação. De fato, a maioria dos

pacientes já possui algum grau de lesão parenquimatosa quando apresenta sua primeira crise de agudização (27).

A segunda teoria defende que a lesão acinar secundária ao efeito tóxico do etanol leva a processo inflamatório que culmina em fibrose. Esta hipótese está fundamentada na demonstração de que metabólitos do álcool, como ésteres etílicos de ácidos graxos, causam depleção de adenosina trifosfato (ATP) e perda da regulação de cálcio que provocam dano mitocondrial e aumento da susceptibilidade à ativação do tripsinogênio intra-pancreático (28).

O álcool também ocasiona super regulação dos sistemas mediadores da produção de citocinas e de outras moléculas pró inflamatórias (proteína quinase C, fator nuclear κ B, proteína ativadora 1, etc), além de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) (29). Sendo assim, um evento sentinela incitaria a infiltração crônica por células inflamatórias, ativação de células estreladas pancreáticas e consequentemente fibrose (28).

1.2.2. Tabagismo

Existe dificuldade em demonstrar que o cigarro possa ser causa de pancreatite crônica, pois a prevalência de tabagismo aumenta proporcionalmente à ingestão de álcool, o que poderia ser um fator confundidor. Alguns trabalhos, recentemente publicados, apontam o cigarro como fator de risco independente para o desenvolvimento de pancreatite crônica (21); no entanto, no Brasil, não foram realizadas pesquisas que investigassem esta associação.

Na Dinamarca, em estudo populacional que acompanhou mais de 17.000 habitantes por período médio de 20 anos, foi verificado que 97 deles apresentaram pancreatite crônica, havendo associação dose/dependente com o tabagismo, evidenciando ser este um fator de risco independente da ingestão de álcool (30).

Nos Estados Unidos, em trabalho multicêntrico, o tabagismo também se apresentou como fator de risco independente para pancreatite crônica idiopática, quando realizada análise multivariada (23).

Em metanálise publicada em 2010, o cigarro aumentou o risco para o desenvolvimento de pancreatite crônica, sendo recomendada a cessação do tabagismo, além da abstinência do álcool (31).

Possíveis mecanismos mediados pelo cigarro, que poderiam levar à injúria ao pâncreas, seriam o aumento da liberação intracelular de cálcio pela célula acinar, a ativação das células estreladas com maior deposição de matriz extracelular e, conseqüentemente, fibrose, além da diminuição do fluxo sanguíneo ao parênquima pancreático (32).

1.2.3. Outras causas

Alterações metabólicas, como a hipercalcemia e a hipertrigliceridemia, pancreatite auto-imune e obstruções ductais, como as provocadas por neoplasias ou por malformações congênitas, também podem provocar doença pancreática em pequeno percentual de pacientes. No entanto, algumas vezes, a causa para a afecção pancreática não é encontrada, chegando em algumas séries a até 25% dos casos, sendo então chamadas de idiopática (33).

1.2.4. Fatores de risco genéticos

1.2.4.1. PRSS1

A biologia molecular muito contribuiu para o entendimento da fisiopatogenia da pancreatite. Em 1996, Whitcomb et al. (34) apresentaram a mutação R122H no gene tripsinogênio catiônico (PRSS1) como causa de pancreatite hereditária. A partir deste trabalho, comprovou-se que a inflamação pancreática é realmente associada à ativação enzimática e autodigestão do parênquima, como já proposto por Chiari em 1896 (35).

Mutações no gene PRSS1 tornam a tripsina prematuramente ativada resistente à inativação através de autólise, visto que resíduos de arginina na cadeia de peptídeos são reconhecidos como sítios de hidrólise pela própria tripsina. Na mutação R122H ocorre a substituição da arginina pela histidina no códon 122, localizada na face externa da molécula do tripsinogênio catiônico, levando a atividade inapropriada da tripsina, o que lesa células acinares, ductais e o interstício, por meio de injúria direta, ativação de outros zimogênios digestivos e estímulo imunogênico (36).

A pancreatite hereditária caracteriza-se pelo início precoce, já na infância, de surtos repetidos de pancreatite aguda, com evolução para fibrose e insuficiência pancreática e com alto risco de adenocarcinoma de pâncreas, cerca de 50 vezes maior do que o da população geral (37, 38). É uma doença rara, transmitida de forma autossômica

dominante, com penetrância por volta de 80%. Os critérios diagnósticos incluem o histórico familiar do paciente ou a pesquisa das mutações genéticas. (39, 40) Além da mutação R122H, a mais frequente nestes pacientes, a mutação N29I é a segunda mais encontrada e outras também foram identificadas, como, por exemplo, a A16V, D22G, E79K, K23R, N29T e R122C (41-48).

Não foi demonstrada significativa associação da pancreatite alcoólica com mutações no gene PRSS1, uma vez que na presença das mesmas a família acometida apresenta a doença pancreática precocemente, com sua manifestação pouco dependendo da interferência de fatores ambientais (49, 50).

1.2.4.2 SPINK1 e CTSC

Visto que mutações de ganho de função na tripsina, como as acima descritas no gene PRSS1, causam pancreatite crônica, foi então proposto que a perda de função de seus inibidores teria efeitos semelhantes, com subida dos níveis de tripsina ativa acima dos níveis basais (51).

1.2.4.2.1 SPINK1

Mecanismos de proteção pancreática dirigem-se contra a ativação do tripsinogênio e prevenção da atividade sustentada da tripsina (26). Neste papel, o gene serine protease inhibitor Kazal-type 1 (SPINK1) codifica proteína inibitória da tripsina, proteína esta sintetizada nas células acinares e capaz de inibir até 20% da atividade da tripsina intracelular, sendo considerada a primeira linha de defesa contra a acidental ativação prematura do tripsinogênio junto às células acinares (52, 53).

O SPINK1 é uma proteína com peso molecular de 6.5kDa, constituída por 56 aminoácidos, possuindo um local reativo na posição 18 que é substrato específico para o local ativo da tripsina, inibindo-a especificamente por bloqueio físico. O gene humano codificador do SPINK1 tem 7.5 kb de comprimento, está dividido em 4 exons e com localização cromossômica 5q32; codifica um produto de 79 aminoácidos, que inclui um peptídeo de sinalização de 23 aminoácidos (54). Na Figura 1, estão representadas as características estruturais do gene SPINK1.

Figura 1: Características estruturais dos genes PRSS1 e SPINK1. No gene SPINK1, em vermelho, N34 e P55 estão representados (55)

Em 2000, a análise de pacientes com pancreatite, nos quais não foram identificadas mutações no gene PRSS1, permitiu a identificação da mutação N34S no exon 3 do gene SPINK1 (*serine protease inhibitor Kazal type 1*) (56). Após novos trabalhos, ficou clara a associação desta mutação com a pancreatite, e em metanálise realizada por Aoun et al. (57), foram incluídos 24 estudos caso-controle que investigaram a frequência desta mutação em suas populações, concluindo-se que a mutação N34S está fortemente associada à pancreatite crônica, tanto de etiologia idiopática e tropical, como alcoólica, porém com menor impacto nesta última.

Na posição do 34º aminoácido o genótipo selvagem para o gene SPINK1 possui o par de bases AA e, quando mutado, ocorre a mudança da adenina pela guanidina; no heterozigoto, torna-se AG e o homozigoto mutado GG, mutação denominada N34S (58).

Outras mutações, além da N34S, foram encontradas no gene SPINK1, como, por exemplo, P55S, M1T, L14P e outras, porém em frequências menores do que a primeira (59).

Na posição do 55º. aminoácido, este gene possui o par de bases CC e, quando mutado, ocorre a mudança da citosina pela timidina; no heterozigoto, torna-se CT e o homozigoto mutado TT, mutação denominada P55S (59).

Pouco se conhece a respeito das repercussões que as mutações N34S ou P55S provocam na função da proteína SPINK1. A mutação N34S coincide com variantes

intrônicas e, possivelmente, seja, na verdade, um marcador da presença de outro polimorfismo responsável pela diminuição da função do SPINK1 (60, 61).

1.2.4.2.2 CTRC

O gene Quimotripsina C (CTRC) está localizado no cromossomo 1p36.21 e compreende 8 exons abrangendo 8,2 kb. O primeiro produto transcrito do CTRC humano é uma pré enzima, composto por um peptídeo de 239 aminoácidos, que é sintetizada pelas células acinares do pâncreas na forma de um zimogeno, tornando-se ativa no duodeno, após clivagem pela tripsina (62). Na Figura 2, estão representadas as características estruturais do gene CTRC.

A enzima CTRC possui função reguladora da atividade digestiva enzimática, sendo responsável pela degradação da tripsina e isoformas do tripsinogênio com alta especificidade. A CRTC cliva o peptídeo Leu81–Glu82 do tripsinogênio catiônico que é seguida de clivagem adicional pela própria tripsina, para resultar na degradação, sendo portanto mais um mecanismo defensivo contra pancreatite (62).

Figura 2: Características estruturais do gene CTRC. A mutação A73T na posição Ala73 está representada em vermelho e a mutação R254W na posição Arg254 está em verde. O segmento amarelo é deletado na mutação (63)

Em 2007, mutações no gene CTRC foram apontadas como fatores de risco para pancreatite crônica, após ter sido demonstrado seu papel na regulação da atividade

enzimática e posterior observação da associação das mutações genéticas com a doença (62).

Em estudo realizado por Rosendahl et al. (63), em 2008, a mutação R254W no exon 7 do gene CTRC foi identificada em 2,1% de 901 indivíduos com pancreatite idiopática ou familiar, contra 0,6% de 2804 controles ($p = 0,0004$). Foi encontrada em 2,3% de 348 pacientes com pancreatite crônica alcoólica e em 0,5% de 432 portadores de hepatopatia crônica causada pelo consumo de etanol, sendo esta diferença também estatisticamente significativa ($p = 0,03$). Outras mutações foram encontradas com frequências menores que a primeira.

Chang et al. (64) identificaram a ocorrência de outras variantes e haplótipos do gene CTRC em uma população de 126 pacientes portadores de pancreatite crônica de diversas etiologias, também com frequência de 2,3%.

A mutação denominada R254W ocorre pela mudança da citosina pela timidina na posição do 254º. aminoácido. O genótipo selvagem para o gene CTRC que possui o par de bases CC, no heterozigoto torna-se CT e no homozigoto mutado TT (63).

Rosendahl et al. (63) verificaram que a atividade da quimotripsina C, expressando a mutação R254W, secretada pelas células acinares está reduzida em aproximadamente 50%, quando comparada à de selvagens.

Na Figura 3, está ilustrado o modelo fisiopatológico das linhas de defesa contra a pancreatite dependente da tripsina. A conversão intra-pancreática sustentada do tripsinogênio em tripsina possui papel central no desenvolvimento da doença e os mecanismos de defesa contra a atividade indesejada da tripsina, como a inibição pelo SPINK1 e a degradação pela CTRC, estão representados (65).

Figura 3: Fisiologia do tripsinogênio. O tripsinogênio secretado pelas células acinares do pâncreas é ativado por enteropeptidases na luz duodenal, a tripsina inicia a ativação de outras pró-enzimas. Uma pequena quantidade de tripsinogênio é ativado no interior da glândula pancreática e, para evitar a autodigestão, há duas linhas de defesa: a inibição pelo *SPINK1* e a degradação pelo *CTRC* (65)

1.2.4.3.Outros Genes

Além da agressão provocada pela tripsina, outros fatores podem interferir na homeostase da atividade da glândula e levar à doença. A proteção das células ductais depende da manutenção do pH alcalino e do rápido fluxo enzimático para o duodeno, sendo necessária função normal do CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* ou regulador da condutância transmembrana da fibrose cística) (25, 66). Esta proteína está presente na superfície da maioria das células epiteliais humanas e funciona como um canal de cloro, também responsável pela secreção de bicarbonato para o suco pancreático. Em 1989, a fibrose cística foi atribuída a mutações neste gene e, desde então, mais de 1000 mutações foram descritas no gene CFTR; assim, a doença mostrou-se com um espectro fenotípico muito mais variado, podendo ocorrer de forma atípica ou monossintomática, como no desenvolvimento de doença pancreática isolada, secundária

a mutações que reduzem, mas não eliminam completamente, a função desta proteína (67).

Outro candidato a participação na instalação da pancreatite crônica seria o gene CASR (receptor sensor do cálcio). A hipercalcemia se associa à pancreatite, possivelmente pela ativação do tripsinogênio e estabilização da tripsina (51). A proteína CASR possui papel na homeostase do cálcio, tendo sido identificada, tanto em células ductais, quanto acinares (68, 69).

Recentemente, Whitcomb e colaboradores verificaram que variação genética na claudina 2, uma proteína de junção de células endoteliais, capaz de regular o fluxo de íons e água e expressa também entre células ductais e acinares do pâncreas, está associada à pancreatite crônica (70).

Não serão mencionados diversos outros genes investigados por vários autores, por fugirem do objetivo deste trabalho e por sua relevância permanecer interrogada (71).

1.3. Justificativa

Frente à introdução aqui apresentada, pode-se constatar que a pancreatite crônica é uma desordem complexa, na qual a interação entre fatores ambientais e genéticos, ainda pouco conhecidos, resulta na enfermidade. Novos estudos são necessários para melhorar a compreensão dos mecanismos que regem esta sobreposição de causas e, além disso, é fundamental o conhecimento do perfil da população aqui atendida, caracterizada por miscigenação racial e multiplicidade étnica, bastante variável nas diversas regiões do Brasil.

O presente estudo tem como objetivo investigar pacientes com diagnóstico de pancreatite crônica em relação à frequência de tabagismo e mutações genéticas que possam interferir na susceptibilidade individual. O foco do estudo serão os genes SPINK1 e CTSC que possuem funções semelhantes, protegendo o parênquima pancreático contra lesões causadas pela tripsina prematuramente ativada, inibindo-a ou degradando-a. As mutações ocorridas nestes genes são, possivelmente, fatores modificadores de doença, ao contrário daqueles causadores, como, por exemplo, as mutações no gene PRSS1; tais fatores modificadores, quando somados a outros fatores, como, por exemplo, a ingestão abusiva de álcool, poderiam culminar com o despotar da pancreatite crônica.

2. OBJETIVOS:

Verificar a frequência de tabagismo e das mutações N34S e P55S do gene SPINK1 e da mutação R254W do gene CTSC em pacientes portadores de pancreatite crônica, em etilistas crônicos sem pancreatite crônica e em controles sadios.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

Trata-se de estudo observacional, prospectivo, do tipo caso controle.

3.1. Questões éticas:

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão Ética Científica do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e submetido à avaliação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

3.2. Casuística:

A casuística incluiu três grupos: pacientes com diagnóstico de pancreatite crônica (grupo A), etilistas crônicos sem pancreatite crônica (grupo B) e controles sadios (grupo C).

O grupo A foi composto por pacientes matriculados no Ambulatório de Pâncreas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), o grupo B foi composto por etilistas crônicos procedentes de grupos de Alcoólicos Anônimos que compareceram voluntariamente para participação na pesquisa, após convite realizado pelos pesquisadores e os controles sadios (grupo C) foram doadores voluntários do Banco de Sangue deste mesmo Hospital.

Para a inclusão no grupo A, o diagnóstico de pancreatite crônica foi confirmado pela realização de exame de imagem (Ultrassom (US), Tomografia Computadorizada (TC), Ressonância Nuclear Magnética (RNM) ou Ultrassonografia Endoscópica (USE), em que foram visualizadas alterações morfológicas como calcificações, dilatação ductal e atrofia de parênquima, para pacientes submetidos à USE foram adotados os critérios de Rosemond para o diagnóstico da pancreatite crônica (72) em paciente com quadro clínico compatível. O diagnóstico da etiologia alcoólica da pancreatite foi estabelecido pelo relato de ingestão de pelo menos 100g de etanol ao dia para homens e 80g de etanol ao dia para mulheres, em um período mínimo de cinco anos. Foram incluídos pacientes sem causa definida para a doença, denominados portadores de pancreatite idiopática, após o afastamento das etiologias alcoólica, metabólica, autoimune e obstrutiva. Os pacientes não possuíam parentesco entre si.

Para a inclusão no grupo B, foi necessário o relato, pelo paciente, de ingestão de pelo menos 100g de etanol ao dia para homens e 80g de etanol ao dia para mulheres, em um período mínimo de cinco anos. O diagnóstico de pancreatite crônica foi afastado pela realização de exame de ultra-sonografia abdominal demonstrando pâncreas de aspecto preservado e ausência de quadro clínico compatível.

A inclusão do grupo C teve a intenção de demonstrar a frequência dos polimorfismos na população geral, independente da presença de fator de risco ambiental. Para este fim, foram incluídos neste grupo doadores voluntários do Banco de Sangue do Hospital sede da pesquisa.

Todo paciente que preencheu os critérios de inclusão recebeu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que foi lido, compreendido e assinado antes da coleta de dados, sendo permitido ao paciente retirar seu consentimento a qualquer momento.

Os pacientes selecionados para os grupos A e B responderam questionamentos a respeito de dados epidemiológicos, hábitos e vícios, além de informações quanto à evolução clínica, durante a consulta no Ambulatório de Pâncreas. Para isto, foi utilizado prontuário eletrônico com o conteúdo do questionário (Apêndice A)

A coleta de dados epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e de resultados dos exames de imagem para este projeto ocorreu entre maio de 2011 e fevereiro de 2012. Além destes, visto que o Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório de Investigação Médica 07 (LIM 07), pertencente à Disciplina de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade da Prof.^a Dra. Suzane Kioko Ono, conta com base de dados e de amostras de DNA, foram incluídos dados e amostras de DNA de casuísticas de trabalhos anteriormente realizados por este mesmo grupo de pesquisadores (66).

Foram excluídos pacientes menores de 18 anos de idade, com história duvidosa de alcoolismo (exceto os do grupo C), com sorologias para HIV, Hepatite B ou Hepatite C positivas e com diagnóstico de cirrose hepática.

Foram inicialmente selecionados para a pesquisa 200 pacientes no grupo A, 146 no grupo B e 362 doadores voluntários de sangue no grupo C. Destes, 52 foram excluídos do grupo A, 29 por informações registradas de forma incorreta ou insuficiente, um por sorologia viral positiva, 20 por diagnóstico não confirmado de pancreatite crônica e três

por parentesco, totalizando 148 pacientes incluídos no grupo A; 36 foram excluídos do grupo B, três por diagnóstico de pancreatite crônica, dois por diagnóstico de cirrose hepática, três por elevação de enzimas pancreáticas, sete por sorologias virais positivas e 21 por não realizarem os exames complementares solicitados ou por informações coletadas de forma incorreta ou insuficiente, totalizando 110 pacientes incluídos no grupo B. No grupo C, 65 foram excluídos, 60 por impossibilidade de realização do estudo molecular e cinco por informações registradas de forma incorreta ou insuficiente, totalizando 297 pacientes incluídos no grupo C.

Figura 4: Distribuição da casuística.

3.3. Estudo genético:

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue periférico, colhido em frascos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e armazenado a -20°C , após centrifugação e separação do creme leucocitário.

Foram pesquisadas as mutações N34S e P55S do gene SPINK1 e R254W do gene CTSC por meio de metodologia de sequenciamento.

Os estudos genéticos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM 07), pertencente à Disciplina de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Suzane Kioko Ono.

3.3.1. Extração do DNA:

O DNA genômico foi extraído a partir do creme leucocitário no sangue periférico, utilizando o *kit QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha)* e armazenado a – 20°C. Em um microtubo de 1,5 ml, foram adicionados 200 µL de creme leucocitário, 20 µL de proteinase K e 200 µL de buffer AL, em temperatura ambiente. Essa solução foi agitada em vortex por 15 seg. e incubada a 56° C por 10 min. Após breve centrifugação, foram acrescentados 200 µL de etanol 100% à amostra, misturando-se por agitação. Novamente, após breve centrifugação, essa solução foi transferida para uma coluna contendo sílica e foi centrifugada por 1 min a 8000 rpm. O tubo coletor foi descartado em local apropriado e a coluna contendo DNA genômico fixado foi transferida para um novo tubo coletor de 2ml. Foram acrescentados 500 µL de buffer AW1 e procedeu-se centrifugação a 8000 rpm novamente por 1 min. Após essa etapa, foram acrescentados 500 µL de buffer AW2 e procedeu-se, novamente, a centrifugação a 14000 rpm por 3 min. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 ml estéril e foram adicionados 200 µL de buffer AE. Por fim, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 1 min e centrifugada a 8000 rpm por 1 min. A integridade do DNA das amostras extraídas foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% coradas com brometo de etídio.

Para obter um controle positivo, foram selecionadas amostras de sangue de pacientes com hepatite, incluídos em estudo prévio (73), e foram realizadas as extrações do DNA das amostras: BR98, BR129, BR165, BR177 e com posterior amplificação dos genes SPINK1 e CTSC das mesmas.

3.3.2. Eletroforese:

A eletroforese foi usada para avaliar os fragmentos amplificados e purificados, a partir da amostra de DNA genômico. Foram utilizados cuba de eletroforese horizontal 12,5 cm X 12 cm e gel de agarose 2% (peso/volume) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), em tampão TBE 1 X (tris 10,8 g; 4,0 ml de EDTA 0,05 M e ácido bórico 5,5 g e H₂O em

quantidade suficiente para 1000 ml). As corridas foram realizadas sob uma tensão de 100 Volts, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio (EtBr) e fotografado com uma câmera fotográfica acoplada ao fotodocumentador, sob luz Ultra Violeta. O marcador de peso molecular 100bp DNA *ladder* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foi empregado para a análise da extração do DNA genômico e do DNA purificado.

3.3.3. Amplificação por PCR:

As regiões das mutações N34S e P55S do gene SPINK1 e R254W do gene CTRC foram amplificadas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tendo como fita molde o DNA genômico extraído anteriormente. Foram utilizados *primers* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) correspondentes à parte do *exon 3* do gene SPINK1 ao *exon 7* do gene CTRC. As sequências foram padronizadas, conforme observado na Tabela 1, na qual consta o gene, a sequência, o tamanho do produto (em pb), a porcentagem de CG, a temperatura e o tamanho do fragmento (em pb). Os reagentes utilizados para o preparo da PCR constam da Tabela 2, quando a Taq polimerase Gold foi utilizada, além de água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para 50 uL.

Tabela 1 – Desenho dos *primers* SPINK1 (mutação N34S e P55S) e CTRC (mutação R254W).

Primer SPINK1_ Mutação N34S					
Nome	Sequência 5'-3'	Tamanho (pb)	% CG	T.m.	Tamanho Fraq
SPINK_F	CTAGAACAATGTCTAGGACAATGAC	25	40%	51,38	732pb
SPINK_R	TCTCGGGGTGAGATTCATATTATC	24	41,67%	51,52	

Primer CTRC_CTPP_ Mutação R254W					
Nome	Sequência 5'-3'	Tamanho (pb)	% CG	T.m.	Tamanho Fraq
CTRC_F	CTCCCAGAATAAGGCCAAGG	20	55%	51,79	478pb
CTRC_R	GAATGAATAAACGCATGAATGAGTG	25	36%	51,87	

Tabela 2 - Reagentes utilizados para o preparo da PCR.

Reagentes	Concentração	Volume para uma reação
Água qsp 50µL	-	32,7µL
Tampão	10X	5,0µL
MgCl ₂ ;	50mM	4,0µL
dNTP	10mM	1,0µL
<i>primers</i> direto	10pmol/µL	1,0µL
<i>primers</i> reverso	10pmol/µL	1,0µL
Taq polimerase*	5U/µL	0,3µL
Amostra	-	5,0 µL

Para a padronização do controle positivo foram utilizados quatro amostras (BR98, BR129, BR165, BR177) e o controle negativo. As reações de PCR foram feitas utilizando o termociclador *Mastercycler Eppendorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

As condições para ciclagem foram as seguintes:

95° C - 5 min. Pré aquecimento da enzima;

95° C – 30 seg.	} 40 ciclos
61° C - 1 min.	
72° C - 2 min.	
72° C - 5min.	

Após o fim dos 40 ciclos, os produtos de PCR foram estocados a -20° C e submetidos a uma reação de eletroforese para avaliar a amplificação.

3.3.4. Purificação do DNA:

Para a purificação das amostras, foi utilizado o *kit Qiagen, Hilden, Alemanha*. Em cada coluna foi adicionado à amostra e o tampão PB (1:5). Após a centrifugação de 1 min a 13000 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionados 750 µL do tampão PE. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 1 min e o sobrenadante foi descartado. A centrifugação foi repetida a 13000 rpm por 1 min e novamente o

sobrenadante foi descartado. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5ml e foram acrescentados 50 µL do tampão EB no centro da membrana, permanecendo em temperatura ambiente por 5 min. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 1min e foram mantidas no freezer a -20°C.

3.3.5. Quantificação do DNA:

A quantificação de DNA das amostras foi analisada por espectrofotometria em comprimentos de onda de 260 e 280nm, realizado em NanoDrop ®. Foi utilizado 1 µL de cada amostra de PCR purificado para obter as leituras das absorbâncias. Para a determinação do branco a padronização foi feita com água Milli-Q.

A quantificação do DNA das amostras amplificadas foi determinada por espectrofotometria em comprimentos de onda de 260 e 280nm, realizada em NanoDrop ®. O cálculo da concentração do DNA foi determinado com base na absorbância A260. A relação A260/280 mostra a pureza do DNA e um valor de aproximadamente 1,8 é geralmente aceito como puro para o DNA

3.3.6. Sequenciamento do DNA:

Cerca de 40 a 50 ng da amostra purificada foram submetidos a uma reação de sequenciamento, utilizando-se o *kit Big Dye sequencing kit 3.1 (Applied Biosystems)*. Em cada amostra foram utilizados: 3,2 pmol de iniciador direto e reverso, 3 µL de *buffer Save money sequencing kit*, 1 microlitro de *Big Dye sequencing kit* e água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para 10 µL. A reação foi realizada no termociclador *Mastercycler Eppendorf* nas seguintes condições de ciclagem:

95° C – 20 min	}	25 ciclos
50° C – 15 min		
60° C – 3 seg		

Após o término dos ciclos, as reações foram precipitadas seguindo o protocolo com etanol, EDTA e Acetato de sódio (*Big Dye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit protocol – Applied Biosystems*). Em cada amostra foram colocados 2 µL de acetato de sódio (3M), 2 µL de EDTA (125mM), e 50 µL de etanol absoluto. As amostras foram

mantidas por 15 min em temperatura ambiente e protegido da luz. Posteriormente, foram centrifugadas a 3700 rpm por 30 min. O sobrenadante foi retirado por inversão e a placa foi centrifugada invertida por 1 min a 300 rpm. A seguir foi adicionado 70 µL de etanol a 70% e procedeu-se centrifugação a 2600 rpm por 15 min. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o precipitado seco a 55° C por aproximadamente 40 min no termociclador *Mastercycler Eppendorf*. Após a precipitação, as reações de sequenciamento, devidamente secas, foram ressuspensas em 10 µL de *HI-DItm* Formamida (*Applied Biosystems*). As sequências obtidas foram comparadas e analisadas, utilizando o programa *Bioedit Sequence Alignment Editor*.

3.4. Análise estatística:

Os dados obtidos do questionário, dos exames de imagem e do estudo genético foram registrados em banco de dados no programa Excel® e submetidos à análise estatística, sendo feitas comparações entre os grupos, a partir dos resultados obtidos.

Os testes de Dunnett, de Mann Whitney e o teste exato de Fisher foram utilizados.

Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de p foi <0,05.

4. RESULTADOS:

4.1. Características sócio demográficas, hábitos de vida, aspectos clínicos e resultados de exames complementares da população em estudo:

Para a descrição das características sócio demográficas, hábitos de vida, aspectos clínicos e resultados de exames complementares, os pacientes do grupo A foram divididos de acordo com a etiologia da pancreatite, alcoólica e idiopática, o que pode ser visto na figura 5. Nesta observou-se que 74% dos pacientes possuíam etiologia alcoólica e 26% não tinham causa definida para a doença pancreática crônica.

Figura 5: Distribuição dos pacientes do Grupo A segundo a etiologia da pancreatite.

Na Tabela 3 encontra-se a distribuição por gênero nos grupos A, B e C. Verifica-se que os homens eram a maioria entre os etilistas com (88,18%) e sem pancreatite (86,36%), enquanto que pacientes com pancreatite crônica idiopática eram na maioria das vezes mulheres (65,79%). Já os doadores voluntários de sangue distribuíam-se de maneira mais homogênea entre homens (55,89%) e mulheres (44,11%). Valor de $p < 0,001$.

Tabela 3 – Distribuição dos grupos A, B e C por gênero.

Variáveis e categorias	Grupo A		Grupo B	Grupo C	valor de p^*
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	Etilistas crônicos sem pancreatite	Doadores voluntários de sangue	
Gênero					
Masculino	88,18% (97/110)	34,21% (13/38)	86,36% (95/110)	55,89% (166/297)	$p < 0,001$
Feminino	11,82% (13/110)	65,79% (25/38)	13,64% (15/110)	44,11% (131/297)	

* teste exato de Fisher

Da Tabela 4 constam as médias das idades dos pacientes dos grupos A, B e C. No grupo A, a média de idade entre aqueles pacientes portadores de pancreatite de etiologia alcoólica, foi de 55,82 anos, com variação de 41 a 76 anos, entre os com pancreatite de etiologia idiopática, a média de idade foi de 45,2 anos, com variação de 22 a 76 anos. No grupo B, foi de 53,04 anos, com variação de 32 a 72 anos e no grupo C, que se mostrou mais jovem que os demais, a média foi de 33,91 anos, com variação de 18 a 57 anos. Para a comparação entre as médias, utilizou-se o teste de Dunnett, com valor de $p < 0,001$ quando comparados os grupos.

Tabela 4 – Idade dos pacientes pertencentes aos grupos A, B e C.

Variáveis e categorias	Grupo A		Grupo B	Grupo C	valor de p^{**}
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	Etilistas crônicos sem pancreatite	Doadores voluntários de sangue	
Idade (em anos)					
Média e desvio padrão	55,64 (41-76)	45,20 (22-76)	53,05 (32-72)	33,27 (18-62)	$p < 0,001$

****** teste de Dunnett.

Na Tabela 5, observa-se a distribuição racial dos pacientes pertencentes aos grupos A e B. Entre os pacientes com pancreatite crônica alcoólica, 63,89% eram da raça branca, 12,96% da raça negra, 21,3% eram pardos e dois pacientes eram orientais. Entre os pacientes com pancreatite crônica idiopática, 84,21% eram brancos e 15,79% eram pardos. No grupo B, composto por etilistas sem pancreatite, 53,93% eram da raça branca, 16,85% da raça negra, 28,09% eram pardos e um paciente era de origem indígena. O valor de p , quando comparadas as variáveis foi de 0,011.

Tabela 5 – Características raciais dos pacientes pertencentes aos grupos A e B.

Variáveis e categorias	Grupo A		Grupo B		valor de p^*
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	Etilistas crônicos sem pancreatite		
Raça					
Branca	63,89% (69/108)	84,21% (32/38)	55,05% (60/109)		
Negra	12,96% (14/108)	0,00% (00/38)	17,43% (19/109)		
Amarela	1,85% (02/108)	0,00% (00/38)	0,00% (00/109)		$p = 0,011$
Parda	21,30% (23/108)	15,79% (06/38)	26,61% (29/109)		
Indígena	0,00% (00/108)	0,00% (00/38)	0,92% (01/109)		

* Teste exato de Fisher

Da Tabela 6 consta a distribuição da escolaridade nos grupos A e B. Dentre aqueles que não possuíam histórico de alcoolismo, 57,89% completaram o ensino médio e destes, mais de 1/3 chegaram ao ensino superior. Dentre os pancreatopatas crônicos por álcool, somente 23,3% alcançaram o ensino médio, já dentre os etilistas crônicos sem pancreatite tal percentual chega a 37,28% ($p = 0,013$).

Tabela 6 – Distribuição dos grupos A e B pela escolaridade.

Variáveis e categorias	Grupo A		Grupo B	valor de p^*
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	Etilistas crônicos sem pancreatite	
Escolaridade				
Sem instrução	0,00% (00/103)	2,63% (01/38)	5,08% (03/59)	$p = 0,013$
Alfabetizado	2,91% (03/103)	2,63% (01/38)	1,69% (01/59)	
Fundamental	69,9% (72/103)	36,84% (14/38)	55,93% (33/59)	
Ensino médio	14,56% (15/103)	36,84% (14/38)	25,42% (15/59)	
Superior	8,74% (09/103)	21,05% (08/38)	11,86% (07/59)	

* Teste exato de Fisher

Na Tabela 7 encontra-se a distribuição da frequência de tabagismo e da carga tabágica em anos-maço nos grupos A, B e C. Verifica-se que, no grupo de pacientes com pancreatite crônica alcoólica, 91,36% foram tabagistas em algum momento da vida, com carga tabágica média de 36,06 anos-maço; no grupo de pacientes com pancreatite crônica idiopática, 24,00% foram tabagistas em algum momento da vida, com carga tabágica média de 26,17 anos-maço; no grupo B, 73,26% possuíam histórico de tabagismo, com carga tabágica média de 37,67 anos-maço, enquanto que, no grupo C, 22,77% foram tabagistas em algum momento da vida, com carga tabágica média de 7,70 anos-maço. Foi utilizado o teste de Fisher para a comparação da frequência de tabagismo, com valor de $p = 0,002$, quando a comparação foi entre os etilistas com e sem pancreatite e com valor de $p = 0,192$, quando a comparação foi entre os grupos que não possuíam histórico de alcoolismo. Foi utilizado o teste de Dunnett para a comparação entre as médias, demonstrando que a carga tabágica não diferiu ($p = 0,421$) entre os etilistas e foi maior ($p = 0,006$) nos pacientes com pancreatite idiopática do que nos doadores voluntários de sangue.

Tabela 7 - Frequência de tabagismo e descrição da carga tabágica nos grupos A e B

	Grupo A	Grupo B		Grupo A	Grupo C	
Variáveis e categorias	Pancreatite alcoólica	Etilistas sem pancreatite	valor de p	Pancreatite idiopática	Doadores voluntários de sangue	valor de p
Tabagismo						
Sim	91,36% (74/81)	73,26% (63/86)	$p^{*}=0,002$	24,00% (06/25)	22,77% (51/224)	$p^{*}=0,192$
Carga Tabágica						
Anos-maço	36,06 (03-162)	37,67 (03-116)	$p^{**}=0,421$	26,17 (02-45)	7,70 (01-45)	$p^{**}=0,006$

* Teste exato de Fisher

** Teste de Dunnett

Da Tabela 8 constam a quantidade e o tempo de ingestão de etanol nos pacientes com pancreatite crônica por álcool e nos etilistas crônicos sem pancreatite. Nos etilistas com pancreatite, a quantidade média de ingestão de etanol foi de 272,88g de etanol por dia e nos etilistas sem pancreatite foi de 302,61g de etanol por dia. Foi realizado teste de Mann Whitney para comparação das variáveis com valor de $p = 0,023$. Dentre os etilistas com doença pancreática, a média do tempo de ingestão de etanol foi de 22,23 anos e, dentre os etilistas que não desenvolveram a doença, foi de 23,93 anos, sendo, na comparação por teste de Mann Whitney, o valor de $p = 0,571$.

Tabela 8 – Quantidade e tempo de ingestão de etanol nos pacientes com pancreatite crônica por álcool e nos etilistas crônicos sem pancreatite

Variáveis e categorias	Pancreatite Alcoólica	Etilistas sem pancreatite	Valor de p^{***}
Quantidade de ingestão de etanol			
(gramas/dia)	272,88 (100 - 1125)	302,61 (100 - 1000)	$p = 0,023$
Tempo de ingestão de etanol			
(anos)	23,23 (5 - 50)	23,93 (5 - 50)	$p = 0,571$

***Teste exato de Mann Whitney

Na Tabela 9 observa-se a distribuição de comorbidades nos grupos A e B. A frequência de HAS foi de 31,43% entre os pacientes com pancreatite crônica alcoólica, de 18,18% entre os pacientes com pancreatite idiopática e de 17,27% entre etilistas sem pancreatite, com valor de $p = 0,039$; A frequência de doença psiquiátrica, foi de 9,52% entre os pacientes com pancreatite crônica alcoólica (9,52%) de 3,03% entre aqueles com pancreatite idiopática e de 0,91% entre etilistas sem pancreatite (0,91%) com valor de $p = 0,007$. A frequência de cardiopatia, pneumopatia, doença neurológica ou outras comorbidades não diferiu entre os grupos, tendo sido respectivamente de 11,43%, 9,09% e 4,55% para os grupos de pacientes com pancreatite alcoólica, idiopática e etilistas crônicos para cardiopatia, de 8,57%, 3,03% e 2,73%, respectivamente, para pneumopatia e de 5,71%, 6,06% e 5,45% para doença neurológica.

Tabela 9 – Distribuição dos grupos A e B pela presença de comorbidades.

Variáveis e categorias	Grupo A		Grupo B	valor de p^*
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	Etilistas crônicos sem pancreatite	
Comorbidade				
HAS	31,43% (33/105)	18,18% (06/33)	17,27% (19/110)	$p = 0,039$
Cardiopatia	11,43% (11/105)	9,09% (03/33)	4,55% (04/110)	$p = 0,175$
Pneumopatia	8,57% (09/105)	3,03% (01/33)	2,73% (03/110)	$p = 0,133$
Doença Neurológica	5,71% (06/105)	6,06% (02/33)	5,45% (06/110)	$p = 1,00$
Doença Psiquiátrica	9,52% (10/105)	3,03% (01/33)	0,91% (01/110)	$p = 0,007$
Outro	16,19% (17/105)	27,27% (09/33)	14,55% (16/110)	$p = 0,238$

* Teste exato de Fisher

Na Tabela 10, estão descritos os principais sintomas e complicações apresentados pelos pacientes do grupo A. Para comparação entre pacientes com pancreatite crônica de etiologia alcoólica e pancreatite idiopática, foi utilizado o teste exato de Fischer. A dor abdominal foi o sintoma mais frequentemente referido pelos pacientes, 70,09% e 75,75% respectivamente, e não diferiu entre os grupos, com valor de $p = 0,521$. Já a frequência de diarreia, emagrecimento, diabetes melito e ocorrência de pseudocisto foi maior nos pacientes com pancreatite crônica alcoólica do que nos doentes sem história prévia de alcoolismo, com valores de p menores de 0,05. A necessidade de cirurgia pancreática e a ocorrência de hemorragia digestiva não diferiu significativamente entre os grupos e somente um paciente com pancreatite alcoólica evoluiu com adenocarcinoma de pâncreas.

Tabela 10 – Características clínicas dos pacientes pertencentes ao grupo A

Variáveis e categorias	Grupo A		valor de p^*
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	
Sintoma ou complicação			
Dor abdominal	70,09% (75/107)	75,75% (25/33)	$p = 0,521$
Diarreia	54,21% (58/107)	24,24% (08/33)	$p = 0,006$
Emagrecimento	56,07% (60/107)	24,24% (08/33)	$p = 0,003$
Hemorragia digestiva	11,21% (12/107)	0,00% (00/33)	$p = 0,189$
Diabetes melito	57,94% (62/107)	36,36% (12/33)	$p = 0,031$
Pseudocisto	31,78% (34/107)	12,12% (04/33)	$p = 0,026$
Adenocarcinoma de pâncreas	0,93% (01/107)	0,00% (00/33)	$p = 1,000$
Cirurgia pancreática	31,17% (24/077)	15,15% (05/33)	$p = 0,066$

* Teste exato de Fisher

Da Tabela 11 constam os níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), gamaglutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), amilase e lipase dos pacientes dos grupos A e B. A média dos valores de AST, ALT, GGT, FA, amilase e lipase encontrados nos pacientes com pancreatite crônica alcoólica foi superior à dos pacientes com pancreatite idiopática ou do grupo de etilistas sem doença pancreática. Para a comparação, foi utilizado o teste exato de Fischer.

Tabela 11 – Distribuição dos grupos A e B segundo os níveis de alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), amilase e lipase

Variáveis e categorias	Grupo A		Grupo B	valor de <i>p</i>
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	Etilistas crônicos sem pancreatite	
Exame laboratorial				
AST (<37 UI/l)	33,45 (10 - 192)	20,53 (11 - 48)	21,44 (10 - 77)	<i>p</i> < 0,001
ALT (<41 UI/l)	30,25 (7 - 176)	21,94 (8 - 64)	21,78 (8 - 81)	<i>p</i> = 0,020
GGT (8 – 61 UI/l)	132,75 (11 -1768)	30,92 (6 – 112)	30,20 (11 - 132)	<i>p</i> < 0,001
FA (40 – 129 UI/l)	130,02 (45 - 1977)	74,58 (39 – 123)	70,10 (34 - 144)	<i>p</i> = 0,025
Amilase (28- 100 U/l)	93,95 (18 - 688)	87,56 (14 – 872)	75,91 (30 - 187)	<i>p</i> = 0,037
Lipase (13 – 60 U/l)	41,26 (4-797)	26,42 (5 – 92)	33,81 (15 - 60)	<i>p</i> < 0,001

* Teste exato de Fischer

A Tabela 12 salienta as alterações pancreáticas detectadas por exames de imagem em pacientes do grupo A. Entre os pacientes com pancreatite crônica alcoólica, 58,18% dos mesmos possuíam calcificações parenquimatosas, 42,73% apresentavam dilatação do ducto pancreático principal e 49,09% possuíam outras alterações. Quando investigada a ocorrência de alterações pancreáticas nos pacientes com pancreatite crônica idiopática, 59,45% possuíam calcificações parenquimatosas, 45,94% dilatações ductais e em 72,97% havia outras alterações. Não houve diferença na frequência das alterações morfológicas, exceto em “outras alterações”, que podem incluir atrofia parenquimatosa ou tortuosidade ductal, que foram mais frequentes entre pacientes com pancreatite idiopática. ($p = 0,013$).

Tabela 12 – Alterações pancreáticas detectadas por exames de imagem em pacientes do grupo A

Variáveis e categorias	Grupo A		valor de <i>p</i>
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	
Imagem			
Calcificações parenquimatosas	58,18% (64/110)	59,45% (22/37)	<i>p</i> = 1,000
Dilatação do ducto pancreático principal	42,73% (47/110)	45,94% (17/37)	<i>p</i> = 0,848
Outras alterações	49,09% (54/110)	72,97% (27/37)	<i>p</i> = 0,013

Obs. – Um dos pacientes com pancreatite idiopática e três dos pacientes com pancreatite alcoólica possuíam exame histológico.

4.2. Resultados dos testes genéticos:

4.2.1. Avaliação da extração de DNA genômico:

O DNA genômico foi extraído a partir do creme leucocitário no sangue periférico dos três grupos: pacientes com diagnóstico de pancreatite crônica (grupo A), etilistas crônicos sem pancreatite crônica ou cirrose hepática (grupo B) e controles saudáveis (grupo C). A integridade do DNA das amostras extraídas foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% coradas com brometo de etídio, as amostras extraídas apresentaram o DNA genômico íntegro, conforme figura 6.

Figura 6: Avaliação da extração de DNA genômico em gel de agarose 2%. O primeiro poço representa o marcador de peso molecular (100pb) *DNA ladder*. (*Invitrogen, Carlsbad, USA*). Os poços 2 a 4 representam pacientes com pancreatite crônica (grupo A): Pan 1, Pan 4 e Pan 8; os poços 5 a 7 representam etilistas crônicos (grupo B): CE 1, CE 3 e CE 4; os poços 8 a 10 representam controles saudáveis (grupo C): CS 42, CS 47 e CS 50. O poço 11 corresponde ao controle positivo: BR165 e o poço 12 ao controle negativo.

4.2.2. Avaliação da amplificação por PCR:

De acordo com o desenho do experimento foram amplificados fragmentos de 732 pb compreendendo a região promotora do gene SPINK1 e 478 pb do gene CTSC.

Os géis de agarose a 2% contendo os PCRs foram realizados utilizando 5 μ L do produto de PCR com 1,5 μ L de *Blue Juice* 10X (*Invitrogen, Carlsbad, EUA*) em corrida de 100 volts (figuras 7 e 8).

Figura 7: Avaliação da amplificação do exon 3 do gene SPINK1 por PCR em gel de agarose 2%. No primeiro poço está o marcador de peso molecular (100pb) *DNA ladder*. (*Invitrogen, Carlsbad, USA*). Nos poços 2 a 6 estão controles sadios (grupo C): BRC111, BRC116, BRC117, BRC118 e BRC119; nos poços 7 a 11 estão representadas as amostras de pacientes com pancreatite crônica (grupo A): Pan 120, Pan 121, Pan 125, Pan 128 e Pan 60; os poços 12 e 13 correspondem aos controles positivos BR129 e BR98; no poço 14 está representado o marcador (100pb) *DNA ladder*; nos poços 15 a 21 estão amostras de etilistas crônicos (grupo B): CE 11, CE 53, CE 60, CE 61, CP21, CP 22 e CP25; nos poços 22 a 24 estão controles sadios (grupo C): CS 56, CS 61 e CS 62. Do poço 25 consta o controle positivo (BR177) e do poço 26, o controle negativo.

Figura 8: Avaliação da amplificação do exon 7 do gene CTSC por PCR em gel de agarose 2%. No primeiro poço está o marcador de peso molecular (100pb) *DNA ladder*. (*Invitrogen, Carlsbad, USA*). Nos poços 2 a 5 estão representadas amostras de pacientes com pancreatite crônica (grupo A): Pan 133, Pan 135, Pan 136, Pan 138 e Pan 152. Nos poços 6 a 12 estão amostras de etilistas crônicos (grupo B): CE 9, CE 11, CE 15, CE 49 e CE 51. O poço 12 corresponde ao controle positivo (BR129) e o poço 13 é o controle negativo. O poço 14 apresenta novamente o marcador (100pb). Os poços 15 a 17 contém amostras de etilistas crônicos (grupo B): CP 32, CP 33 e CP 36; os poços 18 a 23 contém amostras de controles sadios (grupo C): BRC 139, BRC 140, BRC 142, CS 61, CS 71 e CS 76. Os poços 24 e 25 representam os controles positivos (BR98 e BR129). No poço 26 está o controle negativo.

4.2.3. Análise de Sequenciamento:

Nas figuras 9 a 12 estão exemplos de sequências das regiões definidas para pesquisa das mutações N34S e P55S do gene SPINK1 e da mutação R254W do gene CTRC.

Figura 9: Eletroferograma do gene SPINK1 localizado no exon 3 cromossomos 5 (5q32). Amostra PAN 25 apresenta as regiões N34S (A>G) e P55S (C>T) sem mutações.

Figura 10: Eletroferograma do gene SPINK1 localizado no exon 3 cromossomos 5 (5q32). Amostra PAN 214 apresenta as regiões N34S (A>G) sem mutações e P55S (C>T) apresenta os dois alelos. Portanto, caracteriza-se um heterozigoto.

Figura 11: Eletroferograma do gene CTRC localizado no cromossomo 1 (1p36.21). Amostra PAN 7 apresenta a região R254W sem mutações.

Figura 12: Eletroferograma do gene CTRC localizado no cromossomo 1 (1p36.21). Amostra PAN 19 apresenta um polimorfismo na região R254W de C>T.

Na Tabela 13, observa-se a distribuição dos genótipos AA, AG, CC e CT do gene SPINK1 nos grupos A, B e C. A presença da mutação N34S (AG) do gene SPINK1 foi encontrada em três pacientes com pancreatite crônica alcoólica, em dois pacientes com pancreatite idiopática, em nenhum etilista sem pancreatite e em um doador voluntário de sangue. Em todos os casos as mutações encontravam-se em heterozigose. A diferença, quando comparados casos (grupo A) e controles (grupos B e C), foi estatisticamente significativa ($p = 0,016$). A mutação P55S (CT) foi encontrada em três pacientes com pancreatite crônica alcoólica, em dois doadores voluntários de sangue, mas em nenhum paciente com pancreatite crônica idiopática ou em etilistas sem a doença. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos quanto a frequência da mutação P55S ($p = 0,120$).

Tabela 13 – Distribuição dos grupos segundo a frequência dos genótipos AA, AG, CC, CT do gene SPINK1.

Variáveis e categorias	Grupo A		Grupo B	Grupo C	valor de p
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	Etilistas crônicos sem pancreatite	Doadores voluntários de sangue	
Genótipo SPINK1					
AA (selvagem)	97,27% (107/110)	94,74% (36/38)	100% (110/110)	99,33% (295/297)	$p = 0,016$
AG (N34S)	2,73% (003/110)	5,26% (02/38)	0% (000/110)	0,67% (002/297)	
CC (selvagem)	97,27% (107/110)	100% (38/38)	100% (110/110)	99,33% (295/297)	
CT (P55S)	2,73% (003/110)	0% (00/38)	0% (000/110)	0,67% (002/297)	$p = 0,120$

*Teste exato de Fischer

Na Tabela 14, encontra-se a distribuição dos genótipos CC e CT do gene CTRC nos grupos A, B e C. Foi encontrada a mutação R254W em um paciente com pancreatite crônica alcoólica, em nenhum paciente com pancreatite idiopática, em um etilista crônico sem pancreatite e em um doador voluntário de sangue. Em todos os casos as mutações encontravam-se em heterozigose. Quando comparados os grupos não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,751$).

Tabela 14– Distribuição dos grupos segundo a frequência dos genótipos CC, CT do gene CTRC.

Variáveis e categorias	Grupo A		Grupo B	Grupo C	valor de p
	Pancreatite alcoólica	Pancreatite idiopática	Etilistas crônicos sem pancreatite	Doadores voluntários de sangue	
Genótipo					
CTRC					
CC	99,09%	100%	99,09%	99,63%	$p = 0,751$
(selvagem)	(109/110)	(38/38)	(109/110)	(267/268)	
CT	0,91%	0%	0,91%	0,37%	
(R254W)	(001/110)	(00/38)	(001/110)	(001/268)	

*Teste exato de Fischer

4.3. Testes de associação entre a mutação N34S do gene SPINK1 ou a ocorrência de tabagismo e características da doença pancreática.

Da Tabela 15 consta a frequência de ocorrência de sintomas ou complicações pancreáticas em pacientes do Grupo A com e sem a mutação N34S do gene SPINK 1. Foram comparadas as frequências de dor abdominal, diarreia, emagrecimento, hemorragia digestiva, diabetes melito, pseudocisto e de adenocarcinoma de pâncreas nos pacientes com pancreatite crônica alcoólica e nos pacientes com pancreatite crônica idiopática com e sem a mutação N34S do gene SPINK 1. Para a comparação, foi utilizado o teste exato de Fischer, com valores de $p > 0,05$.

Tabela 15– Distribuição do Grupo A com e sem a mutação N34S do gene SPINK1 segundo a ocorrência de manifestação clínica.

Variáveis e categorias	Pancreatite alcoólica com mutação N34S do gene SPINK1	Pancreatite alcoólica sem mutação N34S do gene SPINK1	Pancreatite idiopática com mutação N34S do gene SPINK1	Pancreatite idiopática sem mutação N34S do gene SPINK1	valor de p
Sintoma ou complicação					
Dor abdominal	100% (03/03)	69,23% (72/104)	100% (02/02)	74,19% (23/31)	$p = 0,322$
Diarreia	33,33% (01/03)	54,81% (57/104)	0% (00/02)	25,80% (08/31)	$p = 1,00$
Emagrecimento	33,33% (01/03)	56,73% (59/104)	0% (00/02)	25,80% (08/31)	$p = 1,00$
Hemorragia digestiva	33,33% (01/03)	10,58% (11/104)	0% (00/02)	0,00% (00/31)	$p = 0,067$
Diabetes	33,33% (01/03)	58,65% (61/104)	100% (02/02)	32,26% (10/31)	$p = 1,00$
Pseudocisto	33,33% (01/03)	31,73% (33/104)	0% (00/02)	12,90% (04/31)	$p = 1,00$
Adenocarcinoma de pâncreas	0,00% (00/03)	0,96% (01/104)	0% (00/02)	0,00% (00/31)	$p = 1,00$

Na Tabela 16 verifica-se a frequência de ocorrência de sintomas ou complicações pancreáticas em pacientes do Grupo A tabagistas e não tabagistas. Foram comparadas as frequências de dor abdominal, diarreia, emagrecimento, hemorragia digestiva, diabetes melito, pseudocisto e de adenocarcinoma de pâncreas nos pacientes com pancreatite crônica alcoólica e nos pacientes com pancreatite crônica idiopática tabagistas e não tabagistas. Para a comparação, foi utilizado o teste exato de Fischer, com valores de $p > 0,05$, exceto para diabetes melito, no qual foi encontrado valor de $p = 0,04$.

Tabela 16 – Distribuição do Grupo A tabagista e não tabagista segundo a ocorrência de manifestação clínica.

Variáveis e categorias	Grupo A				valor de p
	Presença de tabagismo na pancreatite alcoólica	Ausência de tabagismo na pancreatite alcoólica	Presença de tabagismo na pancreatite idiopática	Ausência de tabagismo na pancreatite idiopática	
Sintoma ou complicação					
Dor abdominal	66,22% (49/74)	85,71% (06/07)	50,00% (03/06)	88,24% (15/17)	$p = 0,14$
Diarreia	45,95% (34/74)	71,43% (05/07)	33,33% (02/06)	23,53% (04/17)	$p = 0,15$
Emagrecimento	56,76% (42/74)	57,14% (04/07)	16,67% (01/06)	35,29% (06/17)	$p = 0,13$
Hemorragia digestiva	8,11% (06/74)	14,29% (01/07)	0,00% (00/06)	5,88% (01/17)	$p = 0,78$
Diabetes	59,46% (44/74)	71,43% (05/07)	50,00% (03/06)	23,56% (04/17)	$p = 0,04$
Pseudocisto	33,78% (25/74)	14,29% (01/07)	16,67% (01/06)	5,88% (01/17)	$p = 0,08$
Adenocarcinoma de pâncreas	1,35% (01/74)	0,00% (00/07)	0,00% (00/06)	0,00% (00/17)	$p = 1,00$

Na tabela 17 observa-se a ocorrência de alterações morfológicas pancreáticas em exames de imagem em pacientes do Grupo A com e sem a mutação N34S do gene SPINK1. Foram comparadas as frequências de calcificações parenquimatosas, da dilatação do ducto pancreático principal e de outras alterações morfológicas da glândula que permitiram o diagnóstico da doença nos pacientes com pancreatite crônica alcoólica e nos pacientes com pancreatite crônica idiopática com e sem a mutação N34S do gene SPINK1. Para a comparação, foi utilizado o teste exato de Fischer, com valores de $p > 0,05$.

Tabela 17 – Distribuição do Grupo A com e sem mutação do gene SPINK1 segundo a ocorrência de alterações morfológicas pancreáticas nos exames de imagem.

Variáveis e categorias	Pancreatite alcoólica		Pancreatite idiopática	Pancreatite idiopática	valor de <i>p</i>
	com	Pancreatite	com	sem	
	mutação	alcoólica sem	mutação	mutação	
	N34S do	mutação	N34S do	N34S do	
	gene	N34S do	gene	gene	
	SPINK1	gene SPINK1	SPINK1	SPINK1	
Imagem					
Calcificações parenquimatosas	100% (03/03)	57,0% (61/107)	100% (02/02)	57,14% (20/35)	<i>p</i> = 0,15
Dilatação do ducto pancreático principal	33,3% (01/03)	42,9% (46/107)	100% (02/02)	42,8% (15/35)	<i>p</i> = 0,66
Outras alterações	66,6% (02/03)	48,6% (52/107)	100% (02/02)	71,4% (25/35)	<i>p</i> = 0,37

A Tabela 18 exibe a ocorrência de alterações morfológicas pancreáticas em exames de imagem em pacientes do Grupo A tabagistas e não tabagistas. Foram comparadas as frequências de calcificações parenquimatosas, da dilatação do ducto pancreático principal e de outras alterações morfológicas da glândula que permitiram o diagnóstico da doença nos pacientes com pancreatite crônica alcoólica e nos pacientes com pancreatite crônica idiopática tabagistas e não tabagistas. Para a comparação, foi utilizado o teste exato de Fischer, com valores de $p > 0,05$.

Tabela 18 – Distribuição do Grupo A tabagista e não tabagista segundo a ocorrência de alterações morfológicas pancreáticas em exames de imagem.

Variáveis e categorias	Grupo A				valor de p
	Pancreatite alcoólica tabagistas	Pancreatite alcoólica não tabagistas	Pancreatite idiopática tabagistas	Pancreatite idiopática não tabagistas	
Imagem					
Calcificações parenquimatosas	61,11% (44/72)	40,00% (02/05)	83,33% (05/06)	55,56% (10/18)	$p = 0,51$
Dilatação do ducto pancreático principal	45,86% (33/72)	40,00% (02/05)	83,33% (05/06)	33,33% (06/18)	$p = 0,21$
Outras alterações	51,39% (37/72)	40,00% (02/05)	50,00% (03/06)	55,56% (10/18)	$p = 0,93$

5. DISCUSSÃO:

Indaga-se qual a razão de, apesar ser o álcool o grande responsável pelo desenvolvimento da pancreatite crônica, somente pequeno percentual de etilistas apresentar comprometimento da glândula pancreática. E naqueles portadores de pancreatite que não possuem história prévia de ingestão de etanol suficiente para provocar a doença, o que levou à ocorrência de pancreatite?

O desenho deste trabalho incluiu três grupos para que se pudesse verificar o impacto do tabagismo e das mutações genéticas na presença ou na ausência do fator de risco ambiental (álcool), testando a hipótese de que o desenvolvimento da doença seria multifatorial.

Foi levantada a hipótese de que a população de pacientes com pancreatite crônica (grupo A) teria maior exposição ao tabaco ou maior frequência de mutações genéticas relacionadas aos genes SPINK1 e CTRC do que um grupo de indivíduos submetido ao fator de risco ambiental, o álcool, mas que não apresentasse alteração pancreática (grupo B).

Ocorreu expectativa diferente para o grupo C, pois, por não sofrer o impacto do alcoolismo, poderia exibir uma frequência de tabagismo ou de mutações genéticas semelhante à do grupo A sem, no entanto, desenvolver a doença.

O Grupo A, que incluiu os pacientes portadores de pancreatite crônica, divide-se, de acordo com o fator etiológico, em pacientes portadores de pancreatite alcoólica, desde que com antecedente de consumo de pelo menos 100g de etanol ao dia para os homens e 80g de etanol ao dia para as mulheres, em um período mínimo de cinco anos e em pacientes sem causa definida para a doença, após afastamento de etiologias alcoólica, metabólica, autoimune e obstrutiva; estes últimos pacientes foram denominados portadores de pancreatite idiopática. Dividir os pacientes de acordo com o fator etiológico mais fortemente associado à pancreatite é importante, pois as características clínicas, a evolução e as medidas terapêuticas e de prevenção podem diferir (51).

Neste estudo foi verificado que 74% dos pacientes com pancreatite crônica possuíam etiologia alcoólica e 26% não tinham causa definida para a doença pancreática crônica. A frequência do alcoolismo como etiologia para a pancreatite foi menor do que a anteriormente reportada por Dani et al. (22) no Brasil, publicada em

1990, quando o alcoolismo foi responsável por 89,6% dos 797 casos de pancreatite crônica estudados.

É semelhante à frequência de 69,7% de etiologia alcoólica para a pancreatite crônica encontrada no Japão (18) e é maior do que a frequência de 44% descritas por Frulloni et al. (8) e Gregory et al. (23).

Este dado pode não refletir a real frequência de distribuição destes fatores etiológicos no país ou, mesmo, na cidade de São Paulo, pois o Ambulatório de Pâncreas do HCFMUSP é um centro de referência para a assistência a pacientes com a doença, para o qual pacientes com pancreatite crônica são encaminhados, vindo, inclusive de outras regiões do país pela necessidade de investigação ou de tratamento não disponíveis em seus locais de origem. Tal fato sugere que o serviço possui um grupo de pacientes com características próprias. Além disso, este trabalho utilizou banco de dados e amostras do Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório de Investigação Médica 07 (LIM 07), pertencente à Disciplina de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade da Prof.^a Dra. Suzane Kioko Ono, o que pode ter interferido na frequência da etiologia da pancreatite, pois os pacientes foram selecionados para participação em pesquisas anteriores cujos objetivos foram distintos dos deste trabalho.

A descrição das características sócio demográficas da casuística incluída neste trabalho compreendeu as informações quanto ao gênero, idade, raça, estado civil e escolaridade.

Verificou-se que os homens eram a maioria entre os etilistas com (88,18%) e sem pancreatite (86,36%), enquanto que entre pacientes com pancreatite crônica idiopática eram somente 34,21%. Já os doadores voluntários de sangue distribuíam-se de maneira mais homogênea entre homens (55,89%) e mulheres (44,11%) (valor de $p < 0,001$).

Estas diferenças coincidem com aquelas encontradas por Yadav et al. que também encontraram uma maior frequência de homens (60,9%) entre os portadores de pancreatite crônica alcoólica, enquanto que os pacientes com pancreatite de etiologia não alcoólica distribuíam-se igualmente entre homens (51,1%) e mulheres (48,8%) (11).

A maior frequência de pancreatite crônica alcoólica e de etilistas crônicos sem pancreatite entre os indivíduos do gênero masculino ocorre pelo fato destes consumirem bebidas alcoólicas em maior quantidade e frequência do que os indivíduos do gênero

feminino, dado confirmado pelo levantamento sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira realizado por Laranjeira et al. (74).

O presente trabalho encontrou uma frequência maior de mulheres no grupo de pacientes com pancreatite idiopática do que outros trabalhos anteriormente realizados (11, 75), sugerindo a indagação se isto tenha ocorrido pela maior procura dos indivíduos do gênero feminino por auxílio médico, talvez por maior preocupação com a própria saúde, ou se, realmente, algum fator de risco não identificado incidiu mais sobre as mulheres deste grupo.

Observou-se que a média de idade entre etilistas com pancreatite, foi de 55,82 anos, semelhante à dos etilistas sem a doença, que foi de 53,04 anos. Os pacientes com pancreatite crônica idiopática possuíam média de idade de 45,2 anos, um pouco menor do que a dos anteriores, enquanto que, no grupo C, que mostrou-se mais jovem que os demais, a média foi de 33,91 anos, (valor de $p < 0,001$).

Estes resultados diferem dos descritos nos EUA (11), onde pacientes com pancreatite de etiologia não alcoólica possuíam média de idade de 64 anos, superior à média de idade de 51,5 anos dos pacientes de etiologia alcoólica.

Já na Índia (75), como no Brasil, indivíduos com pancreatite de etiologia não alcoólica também eram mais jovens do que os etilistas crônicos, com médias de idade de 45,5 *versus* 36,6 anos, um pouco mais jovens do que no Brasil.

As diferenças geográficas encontradas sugerem que fatores de risco incidem de maneira variada entre as regiões, ou as variadas metodologias empregadas nos estudos, alguns deles descrevendo a idade do diagnóstico da doença, enquanto que outros possuem pacientes já em seguimento ambulatorial há muitos anos, se refletiriam em idades mais avançadas, como ocorreu na investigação aqui realizada.

Verificou-se que a distribuição racial dos etilistas com e sem pancreatite diferiu da dos pacientes com pancreatite crônica idiopática. Entre os pacientes com pancreatite crônica alcoólica, 63,89% eram da raça branca, 12,96% da raça negra, 21,3% eram pardos e dois pacientes eram orientais. Entre os pacientes com pancreatite crônica idiopática, 84,21% e 15,79% eram pardos. No grupo B, composto por etilistas sem pancreatite, 53,93% eram da raça branca, 16,85% da raça negra, 28,09% eram pardos e um paciente era de origem indígena. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa, com valor de p de 0,011.

Tem sido descrita maior incidência de doença pancreática na raça negra, com risco duas a três vezes maior de desenvolver a doença do que na raça branca, independentemente dos fatores de risco ambientais, como o tabaco ou o cigarro, sendo que fatores genéticos ou dietéticos não identificados poderiam ser os responsáveis por esta diferença (14).

O presente estudo evidenciou que os caucasianos foram mais numerosos entre pacientes com pancreatite idiopática, contrariando o que foi anteriormente descrito na literatura. Este achado faz sugerir a interrogação se haveria diferença na disponibilidade de acesso aos serviços de saúde nas diferentes etnias. Interroga-se ainda, se o alcoolismo seria mais prevalente entre pardos e negros, já que foram mais numerosos entre pacientes com pancreatite alcoólica. Possivelmente, a menor escolaridade deste grupo com consequente menor nível socioeconômico estabeleceria condições para uma possível maior ingestão alcoólica. Estas suposições são corroboradas pelas informações contidas no Censo Demográfico brasileiro de 2010 (76), que detectou menor escolaridade entre pardos e negros que na população da raça branca. Além disso, Laranjeira et al. (74) encontraram dados que sugerem que a ingestão de etanol é mais volumosa em classes socioeconômicas menos favorecidas.

Em relação à escolaridade, dentre aqueles que não possuíam histórico de alcoolismo, 57,89% completaram o ensino médio e, destes, mais de 1/3 chegaram ao ensino superior. Dentre os pancreatopatas crônicos por álcool, 23,3% alcançaram o ensino médio e nos etilistas crônicos sem pancreatite o percentual chega a 37,28% ($p = 0,013$). Esta diferença corrobora a hipótese de que o alcoolismo incide com maior frequência em populações de menor escolaridade; no entanto, a escolaridade também menor nos pancreatopatas alcoólicos do que nos etilistas sem pancreatite faz supor que existem outras diferenças ambientais, possivelmente determinadas pelo nível socioeconômico, talvez dietéticas.

Na Índia (75), foi descrita a distribuição dos pacientes com pancreatite por nível socioeconômico, sendo que 8,1% pertenciam à classe alta, 58,1% à classe média e 33,8% à classe baixa, dados estes que não foram comparados aos da população geral ou, mesmo, entre os grupos de diferentes etiologias, não permitindo conclusões a este respeito.

Os hábitos e vícios investigados no presente trabalho foram o tabagismo e o alcoolismo.

Identificou-se que 91,36% dos pacientes com pancreatite crônica alcoólica eram fumantes, frequência esta maior do que a de 73,26% do grupo de etilistas sem pancreatite (valor de $p = 0,002$). A carga tabágica entre estes dois grupos não diferiu; quando comparados pacientes com pancreatite crônica idiopática e os doadores voluntários de sangue, a frequência de tabagismo foi semelhante, tendo sido verificada em 24% e em 22,77% respectivamente, sendo a carga tabágica maior entre os primeiros, com 26,17 anos-maço, versus 7,7 anos-maço nos últimos (valor de $p = 0,006$).

Em outros estudos (11, 75), o tabagismo foi também mais frequentemente relatado pelos pacientes com pancreatite de etiologia alcoólica do que por aqueles sem histórico de alcoolismo, o que poderia levantar a suspeita de que o fumo estaria associado ao alcoolismo, mas não à ocorrência da doença.

Descartando esta hipótese, e concordando com os nossos resultados, trabalhos anteriores realizados no Japão (77), na Europa (78) e nos EUA (79) identificaram o tabagismo como fator de risco independente para o desenvolvimento da pancreatite crônica, resultados estes posteriormente confirmados por metanálise publicada em 2010 que recomenda a interrupção do tabagismo nos portadores de tal doença (31).

Este foi o primeiro trabalho realizado no Brasil, de que temos conhecimento, que demonstra que o tabagismo é cofator de risco para o desenvolvimento de pancreatite crônica entre alcoólatras. No entanto, a diferença das cargas tabágicas encontradas entre pacientes com pancreatite idiopática e doadores voluntários de sangue poderia ser explicada pela média de idade mais jovem do segundo grupo, cálculo este diretamente dependente do tempo de consumo do tabaco; assim, o tabagismo não pôde ser considerado um cofator para o desenvolvimento da pancreatite idiopática, a partir dos dados obtidos na presente pesquisa.

Foram quantificados o volume e o tempo de ingestão de álcool consumido pelos etilistas, com e sem o diagnóstico de pancreatite crônica. Surpreendentemente, a quantidade de etanol ingerida pelo grupo controle, isto é, por etilistas sem a doença, foi maior do que entre os pancreatopatas por álcool, provavelmente ocorreu pela presença de sintomas entre os doentes, o que provocou consumo um pouco menor neste grupo. Já

a duração do consumo não diferiu. Esta informação demonstra que outros fatores de risco devem estar presentes para permitir o desenvolvimento da doença.

Na Índia (75) a quantidade média de ingestão de etanol foi de 148g/dia e o tempo médio de ingestão foi de 17,8 anos, menores que os reportados por este trabalho, onde a quantidade média de ingestão de etanol foi de 273g/dia e o tempo médio de duração da ingestão foi de 23,2 anos. Concordando com esta observação, Laranjeira et al. (74) relatam que o uso indevido do álcool é quatro vezes maior na América Latina do que a média mundial.

Os pacientes com pancreatite crônica foram questionados a respeito da presença de comorbidades e manifestações clínicas, sendo também coletados os resultados dos exames laboratoriais e de imagem mais recentes dos mesmos.

Verificou-se que a frequência de HAS foi maior entre os pacientes com pancreatite crônica alcoólica, chegando a 31,43%, do que entre os pacientes com pancreatite idiopática (18,18%) ou etilistas sem pancreatite (17,27%), com valor de $p = 0,039$; da mesma forma, a frequência de doença psiquiátrica também foi maior entre os pacientes com pancreatite crônica alcoólica (9,52%) do que entre aqueles com pancreatite idiopática (3,03%) e menor ainda entre etilistas sem pancreatite (0,91%), com valor de $p = 0,007$.

Os relatos de cardiopatia e de pneumopatia também foram maiores no grupo de pacientes com pancreatite crônica alcoólica, mas, no entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa. Já a doença neurológica não diferiu entre pacientes com pancreatite crônica por álcool, pacientes com pancreatite crônica idiopática e etilistas crônicos sem pancreatite.

Yadav et al. (11) estudaram a sobrevida de pacientes com pancreatite crônica e concluíram ser menor do que a da população sem a doença, principalmente naqueles de etiologia alcoólica. Em sua publicação, dos pacientes que foram a óbito, 23% apresentaram alguma neoplasia, sendo duas de pâncreas, 20% sofreram complicações cardiovasculares, 15% gastrointestinais, 12% pulmonares e 28% evoluíram para óbito por outras causas.

Frulloni et al. (8) reportaram comorbidades cardiovasculares em 24% e pulmonares em 26% de 893 pacientes com pancreatite crônica de diversas etiologias.

Estes resultados estão de acordo com os do presente trabalho que observou frequência de 31,43% de HAS, 11,43% de cardiopatia e 8,57% de pneumopatia entre pacientes com pancreatite de etiologia alcoólica.

Poder-se-ia supor que a maior frequência de tabagismo entre pacientes com pancreatite crônica alcoólica, como documentado pela presente pesquisa, possa ter contribuído para a maior frequência de doenças cardiovasculares e respiratórias nos pacientes com pancreatite crônica de etiologia alcoólica, porém, em relação a ocorrência de cardiopatia, a insuficiência, tanto endócrina, levando ao diabetes, como a insuficiência exócrina que provoca má-absorção de ácidos graxos essenciais, poderiam aumentar o risco de doença aterosclerótica.

Corroborando esta hipótese, Montalto et al. (80) demonstraram menores níveis de HDL colesterol, da apoproteína A1 e de lipoproteínas em pacientes portadores de pancreatite crônica alcoólica do que em etilistas sem pancreatite ou em doadores saudáveis.

É interessante observar que, no grupo de pacientes com pancreatite crônica idiopática, a ocorrência de cardiopatia foi maior (9,09%) do que no grupo de etilistas sem pancreatite (4,55%), apesar dos primeiros serem mais jovens e fumarem com frequência significativamente menor do que os segundos. Esta informação dá suporte à hipótese de que disfunções da glândula pancreática contribuem para o desenvolvimento de doença cardiovascular nos portadores da doença.

Também se encontrou maior frequência de doenças psiquiátricas em pacientes com pancreatite crônica, tanto alcoólica, como idiopática, do que entre etilistas sem pancreatite. Esta informação sugere que o etilismo tenha pouca interferência no despontar de manifestações psiquiátricas, apesar de praticamente a totalidade da casuística aqui estudada já estar em abstinência no momento da coleta dos dados. O tempo de abstinência de cada indivíduo não foi computado, mas sintomas incapacitantes e limitantes, como a dor de difícil controle, presentes nos pacientes com pancreatite crônica, podem ter contribuído para o maior relato de doenças psiquiátricas (2-4).

Realmente, percebe-se neste trabalho que a dor abdominal é a queixa mais frequente, tanto em pacientes com pancreatite crônica alcoólica, como idiopática, com frequência de 70,09% e 75,75%, respectivamente, não diferindo significativamente entre as diferentes etiologias.

Outras repercussões da doença, como a diarreia, o emagrecimento, o diabetes melito e a ocorrência de pseudocistos foram mais comuns nos pacientes com pancreatite crônica alcoólica do que nos doentes sem história prévia de alcoolismo, com percentuais de 54,21% X 24,24%, 56,07% X 24,24%, 57,94% X 36,36% e 31,17% X 15,15%, respectivamente, e valores de p menores que 0,05. A necessidade de cirurgia pancreática e a ocorrência de hemorragia digestiva também foram mais frequentes entre pacientes com pancreatite de etiologia alcoólica (11,21% x 0% e 31,17 x 15,15%), mas estas diferenças não alcançaram significância estatística. Um dos pacientes com pancreatite crônica alcoólica, em acompanhamento ambulatorial, foi a óbito por adenocarcinoma de pâncreas (0,93%).

No Brasil, Guarita et al. (3) publicaram estudo, também realizado no Ambulatório de Pâncreas do HCFMUSP, apresentando as características clínicas e complicações dos pacientes com pancreatite crônica. Naquela época, há 30 anos, a queixa mais frequente dos pacientes foi a dor abdominal em 93,6%, seguida de emagrecimento em 91,6%, diabetes melito em 37,8% e má absorção em 31,7%. As complicações apresentadas pelos pacientes foram os pseudocistos em 32,6%, a ascite ou o derrame pleural em 12,5%, a necrose pancreática em 11,2%, a hemorragia digestiva em 12,8% e os abscessos pancreáticos em 7,3%.

A observação de tal relato deste mesmo serviço, porém em épocas diferentes, sugere que a pancreatite crônica era mais sintomática e com maior frequência de algumas complicações. Pode-se supor que a mudança no perfil dos pacientes, que atualmente inclui maior número de pacientes sem etiologia alcoólica ou a aquisição de avanços tecnológicos que possibilitaram diagnóstico e tratamento mais precoce, evitaram a ocorrência de dor intensa, ascite, derrame pleural, necrose ou abscessos pancreáticos em alguns pacientes. No entanto, a frequência de pseudocistos pancreáticos não se modificou com o passar do tempo. Já a disfunção glandular, tanto exócrina como endócrina, é mais prevalente atualmente, o que sugere doença mais avançada, provavelmente por maior tempo de diagnóstico e seguimento.

Em outros países, os pacientes com pancreatite de etiologia alcoólica também apresentaram maior frequência de manifestações clínicas do que aqueles de etiologia idiopática, concordando com os resultados aqui mencionados.

Na Coreia, em 2005, Ryu et al. (7) estudaram 814 pacientes com pancreatite crônica e nos com pancreatite crônica alcoólica a frequência de diabetes melito (35%) e de pseudocistos de pâncreas (33,7%) foi maior do que nos pacientes sem antecedentes de alcoolismo (26% e 21,9% respectivamente). Os mesmos autores relataram uma incidência de câncer de pâncreas em 3,1% dos pacientes.

No Japão, a etiologia alcoólica também se caracterizou por determinar maior morbidade, provocando dor abdominal em 65% dos pacientes com pancreatite alcoólica, contra 53% das pancreatites não alcoólicas e diabetes melito em 44,8% dos pacientes com pancreatite alcoólica contra 31,4% das afecções do pâncreas não alcoólicas (18).

Estes resultados apontam que a evolução da pancreatite crônica alcoólica seria mais grave do que a das de outras etiologias. Isto ocorreria possivelmente, por maior risco de lesão isquêmica ou de necrose segmentar face ao maior estresse metabólico neste grupo, podendo se supor que a exposição crônica ao etanol modificaria o mecanismo de morte celular de apoptose para necrose (81, 82).

Foram registrados os resultados dos exames laboratoriais trazidos pelos pacientes no dia da consulta, informações estas úteis para excluir do grupo controle os etilistas que apresentassem sinais de doença hepática ou pancreática, não identificada à ultrassonografia abdominal realizada. Não foram excluídos os etilistas com hiperamilasemia por ser a mesma provavelmente relacionada a hipertrofia de glândulas parótidas e especialmente por estar associada a níveis séricos de lipase dentro da normalidade.

Além disso, estes resultados também apontam a mesma direção das observações anteriores, sugerindo que a pancreatite crônica alcoólica possui curso mais agressivo do que a pancreatite idiopática. A média dos valores de AST, ALT, GGT, FA, amilase e lipase encontrados nos pacientes com pancreatite crônica alcoólica foi superior à dos pacientes com pancreatite idiopática.

Os aspectos morfológicos do pâncreas são de grande importância para o diagnóstico da pancreatite crônica, em nosso meio, pela não disponibilidade rotineira de testes de função pancreática e por este motivo, foram selecionados como critérios de inclusão para o grupo A. Estas informações também foram computadas permitindo compará-las entre as diferentes etiologias da pancreatite crônica, podendo ser percebido que apesar

das características clínicas e das alterações laboratoriais terem se apresentado com maior gravidade nos pacientes com pancreatite de etiologia alcoólica, o aspecto morfológico do pâncreas destes pacientes não era mais comprometido do que o dos pacientes com pancreatite idiopática.

Entre os pacientes com pancreatite crônica alcoólica, 58,18% dos mesmos possuíam calcificações parenquimatosas, 42,73% apresentavam dilatação do ducto pancreático principal e 49,09% possuíam outras alterações. Quando investigada a ocorrência de alterações pancreáticas nos pacientes com pancreatite crônica idiopática, 59,45% possuíam calcificações parenquimatosas, 45,94% dilatações ductais e em 72,97% havia outras alterações, como atrofia parenquimatosa ou tortuosidade ductal, que foram mais frequentes entre pacientes com pancreatite idiopática ($p = 0,013$).

Frulloni et al. (8) verificaram que o consumo do etanol e de tabaco se associou a maior frequência de calcificações pancreáticas e Hirota et al. (18) também encontraram calcificações pancreáticas mais frequentemente em pacientes com pancreatite crônica de etiologia alcoólica (84%) do que naqueles com pancreatite idiopática (60,8%).

Na pesquisa aqui apresentada, os resultados não coincidiram neste aspecto com as anteriores porque alterações morfológicas pancreáticas foram adotadas como critérios de inclusão no estudo.

Ainda que o grupo de pacientes estudado, independente de etiologia, se apresentasse com sinais de doença pancreática morfollogicamente avançada, este fato não impediu que se demonstrasse que os alcoolistas realmente sofrem de uma doença pancreática caracterizada por repercussões clínicas mais graves do que os pancreatopatas sem histórico de alcoolismo.

Estas observações permitem concluir que as alterações morfológicas macroscópicas não são suficientes para determinar o curso clínico da doença e que aspectos que regem a microbiologia diferem em cada etiologia e determinam diferentes apresentações, prognósticos e, conseqüentemente, também diferentes necessidades terapêuticas e preventivas. Assim, não são em vão os esforços para esclarecer quais são os fatores etiológicos e os cofatores de risco para o desenvolvimento da doença pancreática crônica em cada indivíduo.

Com a perspectiva de conhecer melhor a interferência da genética no surgimento e na evolução da pancreatite crônica, a frequência das mutações N34S e P55S do gene

SPINK1 e da mutação R245W do gene CTSC nos pacientes com pancreatite crônica (grupo A) e nos grupos sem a doença (grupos B e C) também foi pesquisada.

A presença da mutação N34S do gene SPINK1 foi encontrada em três pacientes com pancreatite crônica alcoólica (2,73%) e em dois pacientes com pancreatite idiopática (5,26%), frequências maiores do que nos indivíduos sem a doença (0,49%). A diferença quando comparados casos (grupo A) e controles (grupos B e C) foi estatisticamente significativa ($p = 0,016$).

A mutação P55S foi encontrada em três pacientes com pancreatite crônica alcoólica (2,73%) e em dois doadores voluntários de sangue (0,67%), mas em nenhum paciente com pancreatite crônica idiopática ou em etilistas sem a doença. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos quanto a frequência da mutação P55S ($p = 0,120$).

Um dos pacientes com pancreatite crônica alcoólica possuía tanto a mutação N34S como a P55S.

Em todos os casos as mutações encontravam-se em heterozigose.

Quando pesquisados os resultados da literatura, a mutação mais encontrada no gene SPINK1 é a N34S.

Witt et al. (83) detectaram forte associação entre a mutação N34S do gene SPINK1 e o desenvolvimento de pancreatite crônica por álcool, em estudo no qual 5,8% dos pacientes portadores de pancreatite crônica alcoólica apresentavam a mutação, versus 0,8% dos controles sadios ($p = 0,001$).

Bhatia et al. (84) investigaram 66 pacientes com pancreatite tropical na Índia e verificaram que a mutação N34S estava presente em 44% destes em relação a 2,2% dos controles sem a doença ($p < 0,0001$).

Lempinen et al. (85) pesquisaram as mutações N34S e P55S do gene SPINK 1 em 116 pacientes com pancreatite crônica e em 459 indivíduos sadios; a mutação N34S estava presente em 12% dos pacientes e em 2,6% dos controles sadios ($p < 0,0001$), sendo a frequência da mutação N34S em pacientes com pancreatite de etiologia alcoólica de 10% e entre pacientes com pancreatite idiopática de 25%. No mesmo trabalho a frequência da mutação P55S não diferiu, quando comparados casos e controles (0,9% versus 1,3%).

Shimosegawa et al. (86) reportaram a mutação N34S ligada a variante IVS1–37T > C em 11 de 153 pacientes com pancreatite crônica, cinco destes com pancreatite familiar (41,7%), cinco com pancreatite idiopática (10,6%) e um paciente com pancreatite auto-imune. Nesta mesma investigação frequências entre pacientes com pancreatite familiar e idiopática foram significativamente maiores do que a de 0,6%, encontrada em controles sadios ($p < 0,0001$ e $p = 0,0024$).

Diaconu et al. (87) estudaram 80 pacientes com pancreatite crônica alcoólica, dez com pancreatite idiopática e 96 controles sadios, quanto a frequência da mutação N34S, sendo detectada a mutação em 5% dos portadores de pancreatite alcoólica e em 1% dos controles sadios, com a diferença entre os grupos não significativa ($p = 0,3$).

Gasiorowska et al. (88) incluíram em sua pesquisa 33 pacientes com pancreatite alcoólica, 14 pacientes com pancreatite idiopática e 46 controles sadios e verificaram a mutação N34S em 18% dos pacientes com pancreatite alcoólica, em 28,6% dos com pancreatite idiopática e em 6,5% dos controles sadios, sendo a diferença na frequência encontrada entre pacientes com pancreatite idiopática e controles significativa ($p < 0,05$).

Na Rússia, Kucheriavyĭ IA et al. (89) descreveram a ocorrência da mutação N34S em 14,6% de 83 pacientes com pancreatite crônica idiopática e em 2,9% de 103 controles sadios ($p < 0,05$).

Na França, Masson et al. (90) estudaram 253 pacientes com pancreatite idiopática, sendo que ,destes, 9,1% possuíam a mutação N34S e 1,2% possuíam a mutação P55S.

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho aqui relatado, à revisão acima apresentada, pode ser percebido que em nosso país, a mutação N34S também se associa à pancreatite crônica, associação esta, no entanto, menos frequente do que na maioria dos países em que foi pesquisada. Bernardino et al. (91), também no Brasil, não encontraram nenhum paciente ou mesmo controle com a mutação N34S, achados estes que questionam se haveria dificuldades na identificação da mutação em função da metodologia empregada naquele trabalho. No entanto, a nossa população possui características genéticas diversas e possivelmente mais complexas do que as de outras localidades, caracterizando-se como uma população composta por múltiplas etnias.

Já a frequência da mutação P55S, verificada no presente trabalho, é um pouco maior do que as descritas em outras populações, mas, como nas demais pesquisas, não se

associou à ocorrência da doença, tratando-se provavelmente de mutação incapaz de provocar disfunção da proteína ou repercussão clínica (59-61).

A pesquisa da mutação R254W do gene CTSC foi realizada pela primeira vez no Brasil e identificou a mutação em um paciente com pancreatite crônica alcoólica (0,91%), em nenhum portador de pancreatite idiopática (0%), em um etilista crônico sem pancreatite (0,91%) e em um doador voluntário de sangue (0,37%).

Rosendahl et al. (63), na Alemanha, e Chang et al. (64), na China, encontraram a mutação R245W em 2,3% dos pacientes com pancreatite alcoólica, frequência maior do que a observada no presente estudo.

No Japão, Masamune et al. (92) verificaram que a ocorrência da mutação R254W foi pequena e acometeu somente 0,19% de 506 pacientes com pancreatites crônicas de diversas etiologias.

No estudo aqui apresentado não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo de pacientes com os grupos controle. É possível que, se a casuística fosse maior, talvez pudesse ser observada diferença, mas certamente tal mutação não representa um fator de risco relevante em nosso meio.

Ainda na pesquisa aqui realizada, foi investigado se o hábito de fumar ou a presença da mutação N34S do gene SPINK1 poderiam interferir no curso da pancreatite crônica. Para esta finalidade, foram comparadas as frequências de dor abdominal, diarreia, emagrecimento, hemorragia digestiva, diabetes melito, pseudocisto, adenocarcinoma de pâncreas e alterações morfológicas da glândula, como a presença de calcificações pancreáticas, a dilatação do ducto pancreático principal ou de outras alterações entre pacientes com pancreatite crônica, tabagistas e não tabagistas, e entre aqueles que possuíam a mutação N34S e os que não a possuíam.

Estas comparações demonstraram que a mutação N34S não interferiu no curso da pancreatite crônica dos pacientes que a apresentaram.

Quando avaliados os pacientes portadores de pancreatite crônica, tabagistas e não tabagistas, a frequência de diabetes foi maior entre os fumantes (57,31%) que entre os não fumantes (37,50%) (valor de $p = 0,04$). Outras repercussões da pancreatite crônica não diferiram entre os grupos.

Frulloni et al. (93) pesquisaram se a presença de mutações nos genes SPINK1 e CFTR ou o tabagismo poderiam interferir na apresentação clínica e radiológica da

doença. Estes autores não discriminaram a mutação apresentada, de maneira que os pacientes com mutações foram comparados aos sem mutações, sendo detectada maior frequência de insuficiência exócrina e endócrina nos pacientes com mutações genéticas; além disso, entre aqueles que possuíam mutações genéticas, os tabagistas evoluíram com calcificações pancreáticas com mais frequência do que os não tabagistas.

No presente trabalho, os tabagistas apresentaram calcificações pancreáticas em 62,82% dos casos, contra 52,17% em não tabagistas, sendo que esta diferença não foi significativa.

Diaconu et al. (87) investigaram se a presença da mutação N34S poderia interferir na apresentação da pancreatite alcoólica em relação a presença de insuficiência da glândula, a complicações como pseudocistos ou a necessidade de tratamento cirúrgico, não sendo encontradas diferença entre os grupos.

Sandhu et al. (94) verificaram que dos 239 pacientes com pancreatite crônica estudados, 5,4% possuíam a mutação N34S do gene SPINK1. A presença desta mutação associou-se a apresentação da doença em idade mais precoce e a maior número de episódios de agudização no decorrer da doença.

Concordando com Sandhu et al. (94), Pfützer et al. (95) também identificaram associação das mutações do SPINK1 com início mais precoce da doença; já Threadgold et al. (96) não encontraram idades mais precoces ou maior gravidade da doença pancreática entre os portadores da mutação N34S.

O presente estudo concorda com a maioria dos trabalhos que não identificaram modificações no curso da pancreatite crônica em pacientes com a mutação N34S, mas, no entanto, deve ser considerado que a metodologia dos trabalhos é variável e que o número de pacientes com a mutação não é grande, o que dificulta o encontro de conclusões definitivas a este respeito.

A interferência do cigarro na evolução da pancreatite crônica é um tópico pouco estudado; a nicotina induz a diminuição do fluxo pancreático e o sequestro leucocitário no tecido pancreático, com consequente maior risco de isquemia e inflamação, especialmente quando se há associação com o etanol (97). Estes mecanismos de agressão sugerem que a evolução destes pacientes possa realmente ser mais grave do que nos demais e o achado de maior frequência de diabetes melito no grupo de tabagistas está de acordo com esta suposição, visto que a insuficiência pancreática endócrina

decorre da substituição do parênquima saudável por fibrose, resultado da atividade inflamatória ocorrida (98).

A presente pesquisa permitiu estudar a pancreatite crônica no que se refere às características de sua apresentação e à identificação de fatores de risco, tanto para a ocorrência da doença, quanto para a gravidade de apresentação.

O reconhecimento dos fatores envolvidos, tanto ambientais como genéticos, propicia maior entendimento da doença e cada resultado obtido traz melhor compreensão da suscetibilidade individual à doença pancreática crônica.

As informações trazidas pelo estudo aqui apresentado agregam conhecimento, desvendando mais um item a respeito do papel do tabagismo e das mutações N34S e P55S de gene SPINK1 e da mutação R245W do gene CTSC na predisposição à doença pancreática de nossa população.

Possivelmente, tais informações, associadas às da literatura, também permitirão que, no futuro, se proporcione tanto tratamento, quanto seguimento mais adequados para os portadores de doença pancreática crônica.

6. CONCLUSÕES:

Pela pesquisa da frequência de tabagismo e das mutações N34S e P55S do gene SPINK1 e da mutação R254W do gene CTSC em pacientes portadores de pancreatite crônica (grupo A), em etilistas crônicos sem pancreatite crônica (grupo B) e em controles sadios (grupo C), pode-se concluir que:

- A frequência de tabagismo foi significativamente maior em pacientes com pancreatite crônica alcoólica do que em etilistas sem pancreatite crônica, podendo ser considerado cofator de risco para o desenvolvimento da pancreatite crônica entre alcoolistas;
- A frequência da mutação N34S do gene SPINK1 em pacientes com pancreatite crônica foi de 3,38%, maior do que a frequência de 0,49% encontrada nos grupos B e C;
- A frequência de 2,03% da mutação P55S do gene SPINK1 e a frequência de 0,67% da mutação R254W do gene CTSC encontradas no grupo A não diferiram estatisticamente quando comparadas às frequências, de 0,49% de ambas mutações, encontradas nos grupos B e C.

REFERÊNCIAS:

1. Brock C, Nielsen LM, Lelic D, Drewes AM. Pathophysiology of chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2013;19(42):7231-40.
2. Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ. Chronic pancreatitis. *Lancet*. 2011;377(9772):1184-97.
3. Guarita DR, Coêlho ME, Mott CeB, Bettarello A. [Chronic pancreatitis: clinical characteristics, complications and association with other diseases]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1989;44(5):221-6.
4. Mullady DK, Yadav D, Amann ST, O'Connell MR, Barmada MM, Elta GH, et al. Type of pain, pain-associated complications, quality of life, disability and resource utilisation in chronic pancreatitis: a prospective cohort study. *Gut*. 2011;60(1):77-84.
5. Rasmussen HH, Irtun O, Olesen SS, Drewes AM, Holst M. Nutrition in chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2013;19(42):7267-75.
6. Rickels MR, Bellin M, Toledo FG, Robertson RP, Andersen DK, Chari ST, et al. Detection, evaluation and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis: recommendations from PancreasFest 2012. *Pancreatology*. 2013;13(4):336-42.
7. Ryu JK, Lee JK, Kim YT, Lee DK, Seo DW, Lee KT, et al. Clinical features of chronic pancreatitis in Korea: a multicenter nationwide study. *Digestion*. 2005;72(4):207-11.
8. Frulloni L, Gabbriellini A, Pezzilli R, Zerbi A, Cavestro GM, Marotta F, et al. Chronic pancreatitis: report from a multicenter Italian survey (PanCroInfAISP) on 893 patients. *Dig Liver Dis*. 2009;41(4):311-7.
9. Wang W, Guo Y, Liao Z, Zou DW, Jin ZD, Zou DJ, et al. Occurrence of and risk factors for diabetes mellitus in Chinese patients with chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2011;40(2):206-12.
10. Cunha RM, Mott CB, Guarita DR, Pedroso MR, Jukemura J, Bacchela T, et al. [Complications of chronic pancreatitis in São Paulo (Brazil)]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1997;52(6):306-15.
11. Yadav D, Timmons L, Benson JT, Dierkhising RA, Chari ST. Incidence, prevalence, and survival of chronic pancreatitis: a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(12):2192-9.

12. Bang UC, Benfield T, Hyldstrup L, Bendtsen F, Beck Jensen JE. Mortality, cancer, and comorbidities associated with chronic pancreatitis: a Danish nationwide matched-cohort study. *Gastroenterology*. 2014;146(4):989-94.
13. Jupp J, Fine D, Johnson CD. The epidemiology and socioeconomic impact of chronic pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24(3):219-31.
14. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1252-61.
15. Copenhagen pancreatitis study. An interim report from a prospective epidemiological multicentre study. *Scand J Gastroenterol*. 1981;16(2):305-12.
16. Lévy P, Barthet M, Mollard BR, Amouretti M, Marion-Audibert AM, Dyard F. Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications. *Gastroenterol Clin Biol*. 2006;30(6-7):838-44.
17. Lin Y, Tamakoshi A, Matsuno S, Takeda K, Hayakawa T, Kitagawa M, et al. Nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. *J Gastroenterol*. 2000;35(2):136-41.
- 18..
19. Garg PK, Tandon RK. Survey on chronic pancreatitis in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19(9):998-1004.
20. Friedreich N. Disease of the pancreas. *Cyclopoedia of the Practice of Medicine*. New York: William Wood; 1878.
21. Yadav D, Whitcomb DC. The role of alcohol and smoking in pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(3):131-45.
22. Dani R, Mott CB, Guarita DR, Nogueira CE. Epidemiology and etiology of chronic pancreatitis in Brazil: a tale of two cities. *Pancreas*. 1990;5(4):474-8.
23. Côté GA, Yadav D, Slivka A, Hawes RH, Anderson MA, Burton FR, et al. Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(3):266-73; quiz e27.
24. Yadav D, Papachristou GI, Whitcomb DC. Alcohol-associated pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2007;36(2):219-38, vii.
25. Whitcomb DC, Barmada MM. A systems biology approach to genetic studies of pancreatitis and other complex diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(14):1763-77.

26. Hayakawa T, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Jin CX, Kondo T. Clinical evidence of pathogenesis in chronic pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002;9(6):669-74.
27. Lucrezio L, Bassi M, Migliori M, Bastagli L, Gullo L. Alcoholic pancreatitis: new pathogenetic insights. *Minerva Med*. 2008;99(4):391-8.
28. Whitcomb DC. Gene-environment factors that contribute to alcoholic pancreatitis in humans. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21 Suppl 3:S52-5.
29. Pandol SJ, Raraty M. Pathobiology of alcoholic pancreatitis. *Pancreatology*. 2007;7(2-3):105-14.
30. Tolstrup JS, Kristiansen L, Becker U, Grønbaek M. Smoking and risk of acute and chronic pancreatitis among women and men: a population-based cohort study. *Arch Intern Med*. 2009;169(6):603-9.
31. Andriulli A, Botteri E, Almasio PL, Vantini I, Uomo G, Maisonneuve P, et al. Smoking as a cofactor for causation of chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas*. 2010;39(8):1205-10.
32. Chowdhury P, MacLeod S, Udupa KB, Rayford PL. Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(7):445-54.
33. Keller J, Layer P. Idiopathic chronic pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2008;22(1):105-13.
34. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*. 1996;14(2):141-5.
35. Chiari H. Ueber Selbstverdauung des menschlichen Pankreas. *Zeitschrift für Heilkunde*. 1896. p. 69-96.
36. Whitcomb DC. Genetic predispositions to acute and chronic pancreatitis. *Med Clin North Am*. 2000;84(3):531-47, vii.
37. Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, Férec C, Le Maréchal C, Hentic O, et al. The natural history of hereditary pancreatitis: a national series. *Gut*. 2009;58(1):97-103.
38. Rosendahl J, Bödeker H, Mössner J, Teich N. Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:1.

- 39.Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, Férec C, Maire F, Hammel P, et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(1):111-9.
- 40.Teich N, Mössner J. Hereditary chronic pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2008;22(1):115-30.
- 41.Gorry MC, Gabbai Z, Furey W, Gates LK, Preston RA, Aston CE, et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1997;113(4):1063-8.
- 42.Teich N, Mössner J, Keim V. Mutations of the cationic trypsinogen in hereditary pancreatitis. *Hum Mutat*. 1998;12(1):39-43.
- 43.Férec C, Raguénès O, Salomon R, Roche C, Bernard JP, Guillot M, et al. Mutations in the cationic trypsinogen gene and evidence for genetic heterogeneity in hereditary pancreatitis. *J Med Genet*. 1999;36(3):228-32.
- 44.Witt H, Luck W, Becker M. A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1999;117(1):7-10.
- 45.Le Maréchal C, Chen JM, Quéré I, Raguénès O, Férec C, Auroux J. Discrimination of three mutational events that result in a disruption of the R122 primary autolysis site of the human cationic trypsinogen (PRSS1) by denaturing high performance liquid chromatography. *BMC Genet*. 2001;2:19.
- 46.Pfützer R, Myers E, Applebaum-Shapiro S, Finch R, Ellis I, Neoptolemos J, et al. Novel cationic trypsinogen (PRSS1) N29T and R122C mutations cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Gut*. 2002;50(2):271-2.
- 47.Simon P, Weiss FU, Sahin-Toth M, Parry M, Nayler O, Lenfers B, et al. Hereditary pancreatitis caused by a novel PRSS1 mutation (Arg-122 --> Cys) that alters autoactivation and autodegradation of cationic trypsinogen. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5404-10.
- 48.Teich N, Le Maréchal C, Kukor Z, Caca K, Witzigmann H, Chen JM, et al. Interaction between trypsinogen isoforms in genetically determined pancreatitis: mutation E79K in cationic trypsin (PRSS1) causes increased transactivation of anionic trypsinogen (PRSS2). *Hum Mutat*. 2004;23(1):22-31.

49. Behrman SW, Fowler ES. Pathophysiology of chronic pancreatitis. *Surg Clin North Am.* 2007;87(6):1309-24, vii.
50. Whitcomb DC. Genetic predisposition to alcoholic chronic pancreatitis. *Pancreas.* 2003;27(4):321-6.
51. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology.* 2001;120(3):682-707.
52. Weiss FU, Simon P, Mayerle J, Kraft M, Lerch MM. Germline mutations and gene polymorphism associated with human pancreatitis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006;35(2):289-302, viii-ix.
53. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci.* 1986;31(3):314-21.
54. Da Costa AML. Pancreatite ligada ao gene SPINK1. In: Porto IdCnBddASUd, editor. *Dissertação | Artigo de Revisão Bibliográfica Mestrado Integrado em Medicina* 2011. p. 1 - 35.
55. Whitcomb DC. Value of genetic testing in the management of pancreatitis. *Gut.* 2004;53(11):1710-7.
56. Chen JM, Mercier B, Audrezet MP, Ferec C. Mutational analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene in hereditary and sporadic chronic pancreatitis. *J Med Genet.* 2000;37(1):67-9.
57. Aoun E, Chang CC, Greer JB, Papachristou GI, Barmada MM, Whitcomb DC. Pathways to injury in chronic pancreatitis: decoding the role of the high-risk SPINK1 N34S haplotype using meta-analysis. *PLoS One.* 2008;3(4):e2003.
58. Kaneko K, Nagasaki Y, Furukawa T, Mizutamari H, Sato A, Masamune A, et al. Analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene mutations in Japanese patients with chronic pancreatitis. *J Hum Genet.* 2001;46(5):293-7.
59. Drenth JP, te Morsche R, Jansen JB. Mutations in serine protease inhibitor Kazal type 1 are strongly associated with chronic pancreatitis. *Gut.* 2002;50(5):687-92.
60. Kalinin VN, Kaifi JT, Schwarzenbach H, Sergeyev AS, Link BC, Bogoevski D, et al. Association of rare SPINK1 gene mutation with another base substitution in chronic pancreatitis patients. *World J Gastroenterol.* 2006;12(33):5352-6.

61. Boulling A, Le Maréchal C, Trouvé P, Raguénès O, Chen JM, Férec C. Functional analysis of pancreatitis-associated missense mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) gene. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(9):936-42.
62. Zhou J, Sahin-Tóth M. Chymotrypsin C mutations in chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(8):1238-46.
63. Rosendahl J, Witt H, Szmola R, Bhatia E, Ozsvári B, Landt O, et al. Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2008;40(1):78-82.
64. Chang MC, Chang YT, Wei SC, Liang PC, Jan IS, Su YN, et al. Association of novel chymotrypsin C gene variations and haplotypes in patients with chronic pancreatitis in Chinese in Taiwan. *Pancreatol.* 2009;9(3):287-92.
65. Derikx MH, Drenth JP. Genetic factors in chronic pancreatitis; implications for diagnosis, management and prognosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;24(3):251-70.
66. da Costa MZ, Guarita DR, Ono-Nita SK, Nogueira JeA, Nita ME, Paranaguá-Vezozzo DC, et al. CFTR polymorphisms in patients with alcoholic chronic pancreatitis. *Pancreatol.* 2009;9(1-2):173-81.
67. Witt H, Becker M. Genetics of chronic pancreatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;34(2):125-36.
68. Bruce JJ, Yang X, Ferguson CJ, Elliott AC, Steward MC, Case RM, et al. Molecular and functional identification of a Ca²⁺ (polyvalent cation)-sensing receptor in rat pancreas. *J Biol Chem.* 1999;274(29):20561-8.
69. Muddana V, Lamb J, Greer JB, Elinoff B, Hawes RH, Cotton PB, et al. Association between calcium sensing receptor gene polymorphisms and chronic pancreatitis in a US population: role of serine protease inhibitor Kazal 1 type and alcohol. *World J Gastroenterol.* 2008;14(28):4486-91.
70. Whitcomb DC, LaRusch J, Krasinskas AM, Klei L, Smith JP, Brand RE, et al. Common genetic variants in the CLDN2 and PRSS1-PRSS2 loci alter risk for alcohol-related and sporadic pancreatitis. *Nat Genet.* 2012;44(12):1349-54.
71. da Costa MZ, Guarita DR, Ono-Nita SK, Paranaguá-Vezozzo DC, Felga GE, Pedroso MR, et al. Genetic risk for alcoholic chronic pancreatitis. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(7):2747-57.

- 72.Catalano MF, Sahai A, Levy M, Romagnuolo J, Wiersema M, Brugge W, et al. EUS-based criteria for the diagnosis of chronic pancreatitis: the Rosemont classification. *Gastrointest Endosc.* 2009;69(7):1251-61.
- 73.Ferreira CaS, Abreu RM, da Silva MC, Ferreira AS, Nasser PD, Carrilho FJ, et al. A fast and cost-effective method for identifying a polymorphism of interleukin 28B related to hepatitis C. *PLoS One.* 2013;8(10):e78142.
- 74.Laranjeira R. I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. In: Antidrogas SN, editor. online, site www.obid.senad.gov.br2007. p. 1-76.
- 75.Balakrishnan V, Unnikrishnan AG, Thomas V, Choudhuri G, Veeraraju P, Singh SP, et al. Chronic pancreatitis. A prospective nationwide study of 1,086 subjects from India. *JOP.* 2008;9(5):593-600.
- 76.Damacena ACP, H.M.M. Martins, L.F. Teixeira, L.C.C. Brasil - Censo demográfico, 2010. In: IBGE IBdGeE-, editor. Rio de Janeiro, RJ: Gerência de Editoração/Centro de Documentação e Disseminação de Informações - CDDI; 2013. p. 1-156.
- 77.Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y. Cigarette smoking as a risk factor for chronic pancreatitis: a case-control study in Japan. Research Committee on Intractable Pancreatic Diseases. *Pancreas.* 2000;21(2):109-14.
- 78.Talamini G, Bassi C, Falconi M, Frulloni L, Di Francesco V, Vaona B, et al. Cigarette smoking: an independent risk factor in alcoholic pancreatitis. *Pancreas.* 1996;12(2):131-7.
- 79.Yadav D, Hawes RH, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA, et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med.* 2009;169(11):1035-45.
- 80.Montalto G, Soresi M, Carroccio A, Scafidi E, Barbagallo CM, Ippolito S, et al. Lipoproteins and chronic pancreatitis. *Pancreas.* 1994;9(1):137-8.
- 81.Fortunato F, Deng X, Gates LK, McClain CJ, Bimmler D, Graf R, et al. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290(2):G232-41.
- 82.Wang YL, Hu R, Lugea A, Gukovsky I, Smoot D, Gukovskaya AS, et al. Ethanol feeding alters death signaling in the pancreas. *Pancreas.* 2006;32(4):351-9.

83. Witt H, Luck W, Becker M, Böhmig M, Kage A, Truninger K, et al. Mutation in the SPINK1 trypsin inhibitor gene, alcohol use, and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2001;285(21):2716-7.
84. Bhatia E, Choudhuri G, Sikora SS, Landt O, Kage A, Becker M, et al. Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1020-5.
85. Lempinen M, Paju A, Kempainen E, Smura T, Kylänpää ML, Nevanlinna H, et al. Mutations N34S and P55S of the SPINK1 gene in patients with chronic pancreatitis or pancreatic cancer and in healthy subjects: a report from Finland. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(2):225-30.
86. Shimosegawa T, Kume K, Masamune A. SPINK1 gene mutations and pancreatitis in Japan. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21 Suppl 3:S47-51.
87. Diaconu BL, Ciobanu L, Mocan T, Pfützer RH, Scafaru MP, Acalovschi M, et al. Investigation of the SPINK1 N34S mutation in Romanian patients with alcoholic chronic pancreatitis. A clinical analysis based on the criteria of the M-ANNHEIM classification. *J Gastrointest Liver Dis*. 2009;18(2):143-50.
88. Gasiorowska A, Talar-Wojnarowska R, Czupryniak L, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Kulig A, et al. 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*. 2011;56(3):894-901.
89. Kucheriavyi IA, Petrova NV, Tibilova ZF, Smirnov AV, Oganessian TS, Kaziulin AN, et al. [Pancreatic secretory trypsin inhibitor gene N34S mutation in patients with idiopathic chronic pancreatitis]. *Eksp Klin Gastroenterol*. 2011(7):7-12.
90. Masson E, Chen JM, Audrézet MP, Cooper DN, Férec C. A conservative assessment of the major genetic causes of idiopathic chronic pancreatitis: data from a comprehensive analysis of PRSS1, SPINK1, CTSC and CFTR genes in 253 young French patients. *PLoS One*. 2013;8(8):e73522.
91. Bernardino AL, Guarita DR, Mott CB, Pedrosa MR, Machado MC, Laudanna AA, et al. CFTR, PRSS1 and SPINK1 mutations in the development of pancreatitis in Brazilian patients. *JOP*. 2003;4(5):169-77.

- 92.Masamune A, Nakano E, Kume K, Kakuta Y, Ariga H, Shimosegawa T. Identification of novel missense CTSC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Gut*. 2013;62(4):653-4.
- 93.Frulloni L, Scattolini C, Graziani R, Cavestro GM, Pravadelli C, Amodio A, et al. Clinical and radiological outcome of patients suffering from chronic pancreatitis associated with gene mutations. *Pancreas*. 2008;37(4):371-6.
- 94.Sandhu B, Vitazka P, Ferreira-Gonzalez A, Pandya A, Vachhani R, Bouhaidar D, et al. Presence of SPINK-1 variant alters the course of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(6):965-9.
- 95.Pfützer RH, Barmada MM, Brunskill AP, Finch R, Hart PS, Neoptolemos J, et al. SPINK1/PSTI polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2000;119(3):615-23.
- 96.Threadgold J, Greenhalf W, Ellis I, Howes N, Lerch MM, Simon P, et al. The N34S mutation of SPINK1 (PSTI) is associated with a familial pattern of idiopathic chronic pancreatitis but does not cause the disease. *Gut*. 2002;50(5):675-81.
- 97.Hartwig W, Werner J, Ryschich E, Mayer H, Schmidt J, Gebhard MM, et al. Cigarette smoke enhances ethanol-induced pancreatic injury. *Pancreas*. 2000;21(3):272-8.
- 98.Choudhuri G, Lakshmi CP, Goel A. Pancreatic diabetes. *Trop Gastroenterol*. 2009;30(2):71-5.

Apêndice – Questionário

RGHC _____

Nome _____

Data de Nascimento ____/____/____

Telefone _____

Profissão _____

Escolaridade sem instrução Renda familiar: (_____) salários mínimos
 ensino fundamental
 ensino médio
 ensino superior

Naturalidade _____

Procedência _ Regionalização ☐ São Paulo região oeste
☐ São Paulo região leste
☐ São Paulo região sul
☐ São Paulo região norte
☐ Outra Cidade do Estado de São Paulo _____
☐ Outro Estado _____

Data de admissão no HC ____/____/____

Data de admissão no ambulatório de pâncreas ____/____/____

Sexo	feminino	Raça	branca	Estado civil	solteiro
	masculino		negra		casado
	outros		parda		separado
			amarela		viúvo
			outras		outros

Queixa principal:

Sim	Sint. M	Item	Descrição
		Dor abdominal	
		Diarréia	
		Constipação	
		Emagrecimento	
		Icterícia	
		Hemorragia digestiva	
		Aumento do volume abdominal	
		Massa abdominal palpável	
		Outro	

História da Doença Atual:

Diagnóstico:

Sim	Item	CID10	Class Diagn (Princ,1,2,3,4)	Descrição
	Pancreatite Crônica Alcoólica	K86-0		
	Pancreatite Idiopática	K86-8		
	Pancreatite Hereditária	K86-8		
	Pancreatite Auto Imune	K86-8		
	Pancreatite Aguda de Repetição	K85		
	Pancreatite por Hipertrigliceridemia	K86-8		
	Pancreatite por Hipercalcemia	K86-8		
	Pancreatite Aguda Biliar	K85		
	Pancreatite Aguda de causa não definida	K85		
	Fibrose Cística	E84		
	Pâncreas Divisium	Q45-3		
	Macroamilasemia	R74		
	Lesões Císticas do Pâncreas	K86-2		
	Pseudocisto Pancreático	K86-3		
	Neoplasia das Vias Biliares	C24		
	Neoplasia do Pâncreas	C25-3		
	Não Definido			
	Outros			

Antecedentes Pessoais:

Complicações de Doença Pancreática:

Sim	Item	Tempo de Aparecim	Descrição
	Diabete Melito		
	Icterícia		
	Derrame Cavitário		
	Pseudocisto de Pâncreas		
	Compressão do Trato Gastrointestinal		
	Fístulas		
	Necrose		
	Hemorragia digestiva		
	Outros		

Comorbidades

Sim	Item	Tempo de Aparecim	Descrição
	Asma		
	Cardiopatias		
	Cirrose Hepática		
	Colecistopatia Calculosa Crônica		
	Diabete Melito		
	DII		
	Dislipidemia		

	Dispepsia Funcional		
	Distúrbios Psiquiátricos		
	Doença Celíaca		
	Doenças Neurológicas		
	Doenças Reumatológicas		
	Doenças Tiroideanas		
	Doenças Vasculares		
	DPOC		
	HAS		
	Hepatopatia crônica por álcool		
	Hepatopatia crônica por vírus B		
	Hepatopatia crônica por vírus C		
	Hipertensão Portal		
	Insuficiência Renal Crônica		
	Neoplasias		
	Obesidade		
	Síndrome do Intestino Irritável		
	Tuberculose		
	Úlcera Duodenal		
	Úlcera Gástrica		
	Outros		

Cirúrgicos

Sim	Item	Tempo de Aparecim	Descrição
	Colecistectomia		
	Gastrectomia		
	Gastroplastia redutora		
	Cirurgia de Frey		
	Duodeno pancreatectomia		
	Derivação pancreatojejunal		
	Derivação biliodigestiva		
	Pancreatectomia		
	Esplenectomia		
	Outros		

Internações

Sim	Item	Descrição
	Data	
	Motivo da Internação	
	Descrição	

Uso de álcool

Sim	Item	Descrição
	Cerveja ml/dia	
	Vinho ml/dia	
	Aguardente ml/dia	
	Uísque ou Vódica ml/dia	
	Gramas de etanol ingeridas por dia	
	Tempo de uso (em anos)	
	Abstêmio há (em meses)	

Tabagismo

Sim	Item	Descrição
	Tempo de uso (em anos)	
	Quantidade (nº de cigarros por dia)	
	Anos / maço	
	Interrompeu há (em meses)	

Uso de drogas ilícitas

Sim	Item	Descrição
	Tempo de uso (em anos)	
	Qual droga	
	Interrompeu há (em meses)	

Medicação em uso

Sim	Item	Descrição
	IBP	
	Aine	
	Analgésicos	
	Enzimas Pancreáticas	
	Corticosteróides	
	Imunossupressores	
	Hipoglicemiantes orais	
	Insulina	
	Hipolipemiantes	
	Outros	

Antecedentes Familiares

Sim	Item	Descrição
	Pancreatite Aguda	
	Pancreatite Crônica	
	Adenocarcinoma de Pâncreas	
	Outras Neoplasias	
	Litíase Biliar	
	Outros	

Exame físico

Sim	Sint. M	Item	Descrição
		Ascite	
		Peso	
		Altura	
		IMC	
		Icterícia	
		Hepatomegalia	
		Esplenomegalia	
		Circulação Colateral	
		Massa abdominal palpável	
		Linfonodomegalias palpáveis	
		Outros	