



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Caracterización de mutaciones de los genes del tripsinógeno catiónico, inhibidor del tripsinógeno catiónico y de la fibrosis quística en pacientes mexicanos con pancreatitis crónica hereditaria e idiopática

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA
LIC. EN MED. MARIO CESAR PELÁEZ LUNA

Director de Tesis
Dr. Guillermo B. Robles Díaz
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Asesor
Dra. María Teresa Tuisé Luna

Ciudad Universitaria, Ciudad de México

Agosto 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Director
Dr. Guillermo B Robles Díaz

Asesor Dirección Médica
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas

Responsable de la entidad académica.
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas y Odontológicas y de la Salud.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Alumno

Lic. en Med. Mario César Peláez Luna
Departamento de Gastroenterología
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

ÍNDICE GENERAL

Índice General	3
Resumen	5
1. Antecedentes	7
1.1 Mecanismo de secreción de las enzimas pancreáticas	8
1.2 Protección y Activación de enzimas	9
1.3 Secreción de HCO ₃	
1.4 Pancreatitis	10
1.4.1 Pancreatitis aguda	10
1.4.2 Pancreatitis aguda recurrente	10
1.4.3 Pancreatitis crónica	11
1.4.4 Relación de Pancreatitis aguda recurrente y Pancreatitis crónica	12
1.4.5 Pancreatitis hereditaria	13
1.5 Genes relacionados con pancreatitis	14
1.5.1 <i>Tripsinógeno Catiónico o PRSS1</i>	14
1.5.2 <i>Inhibidor pancreático de tripsina o SPINK1</i>	15
1.5.3 Fisiopatología de las mutaciones en el <i>PRSS1</i> y <i>SPINK1</i>	16
1.5.4 <i>Gen del Regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística o CFTR</i>	18
1.5.5 Diferencias poblacionales	22
2 Planteamiento del problema	23
3 Justificación	23
4 Hipótesis	23
4.1 Nula	23
4.2 Alterna	24
5 Objetivos	24
5.1 Objetivos generales	24
5.2 Objetivos específicos	24
6 Métodos	25
6.1 Diseño del estudio	25
6.2 Definiciones	25
6.2.1 Pancreatitis crónica	25
6.2.2 Pancreatitis crónica hereditaria	26
6.2.3 Pancreatitis crónica idiopática	26
6.2.4 Pancreatitis aguda	26
6.2.5 Pancreatitis aguda recurrente idiopática	26
6.3 Búsqueda de mutaciones específicas	27
6.3.1 Aislamiento de ADN	27
6.3.2 Amplificación de alelos específicos mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
6.3.2.1 Gen <i>PRSS1</i>	28

6.3.2.2 Gen <i>SPINK1</i>	28
6.3.2.3 Gen <i>CFTR</i>	29
6.4 Secuenciación de ADN.....	29
7 Cálculo del tamaño de muestra.....	29
8 Análisis estadístico.....	30
9 Criterios de inclusión.....	30
10 Criterios de exclusión.....	30
11 Resultados	31
11.1 Estudio de familias (PH).....	31
11.1.1 Familia 1.....	31
11.1.2 Familia 2.....	32
11.2 Estudio de PC de inicio temprano y PA recurrente idiopática (sujetos no relacionados)	33
11.2.1 Gen <i>PRSS1</i>	33
11.2.2 Gen <i>SPINK1</i>	33
11.2.3 Gen <i>CFTR</i>	35
11.2.4 Controles.....	35
12 Discusión.....	35
12.1 Estudio de familias (PH).....	38
12.2 Estudio de PC de inicio temprano y PA recurrente idiopática (sujetos no relacionados).....	39
12.2.1 Gen <i>PRSS1</i>	39
12.2.2 Gen <i>SPINK1</i>	41
12.2.3 Gen <i>CFTR</i>	43
13 Conclusiones.....	44
14 Bibliografía.....	45

Resumen

Antecedentes: La patología benigna más común del páncreas es la pancreatitis, la cual puede ser aguda (PA) o crónica (PC). La causa más frecuente de PA es litiasis biliar. En el 15% de los casos no se encuentra causa evidente y se denomina PA idiopática (PAI). La PA puede presentarse como un episodio único o cuadros repetidos (PA recurrente); estos últimos suelen estar relacionados con la exposición persistente a un factor etiológico. La PC es un síndrome fibro-inflamatorio que afecta a personas expuestas o portadoras de diversos factores de riesgo, principalmente ambientales y genéticos que en presencia de estrés pancreático favorecen una respuesta patológica persistente. Aproximadamente 30% de los casos con PA desarrollarán PA recurrente (PAR) y de estos últimos, 30% desarrollará PC. Los pacientes con PAI < 25 años tienen un riesgo 2 veces mayor de desarrollar PAR y PC.

La identificación de factores de susceptibilidad genético-ambientales ha permitido explicar la evolución de PAR a PC. Los factores genéticos disminuyen el umbral de activación de los zimógenos pancreáticos y/o permiten una actividad prolongada de la tripsina activada favoreciendo eventos de pancreatitis recurrente. Se han identificado mutaciones en los genes que codifican para el *tripsinógeno catiónico (PRSS1)*, el *inhibidor del tripsinógeno catiónico (SPINK1)* y el *CFTR* en familias e individuos no relacionados con PAI, PAR y PC. La frecuencia y naturaleza de estas mutaciones es distinta entre poblaciones. Hasta la realización de este estudio, no existían estudios en pacientes adultos mexicanos.

Objetivo: Determinar y caracterizar la presencia de mutaciones en genes relacionados a PC en pacientes mexicanos con pancreatitis crónica hereditaria e idiopática.

Métodos: Se incluyeron pacientes con PC hereditaria (PH) e idiopática (PCI). Se extrajo ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica. Mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron selectivamente exones en los genes *PRSS1* (exónes 2 y 3), *SPINK1* (exón 3). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados. Para el gen *CFTR* se utilizó un kit comercial.

Resultados: En el estudio de familias con sospecha de PH no encontramos mutaciones en los genes *PRSS1* y *CFTR* en ninguno de los miembros. En una familia encontramos la mutación del gen *SPINK1* (*p.N34S*). En el estudio de PC de inicio temprano y PA recurrente idiopática (estudio de sujetos no relacionados) se incluyeron 19 sujetos con PC o PA recurrente idiopática. (14 hombres, mediana de edad 24; intervalo 13-40 años de edad). La secuenciación del gen *PRSS1* evidenció 2 mutaciones en el exón 2, no reportadas hasta el momento de el estudio: *p.V39A* y *p.N42S* mutación. En los casos restantes no se encontraron mutaciones en los exones secuenciados. La secuenciación del gen *SPINK1* identificó la mutación *p.N34S* en 2 casos y encontramos un sujeto heterocigoto para la mutación *p.V46D*. No se encontraron mutaciones en el gen *CFTR*. Adicionalmente se secuenciaron 100 cromosomas de 50 sujetos sanos y no se encontraron mutaciones en los exones estudiados de los genes *PRSS1*, *SPINK1* o *CFTR*.

Discusión: En consistencia con otros reportes, nuestros resultados sugieren que existen variaciones poblacionales en la frecuencia y tipo de mutaciones en los genes *PRSS1*, *SPINK1* y *CFTR*. Es recomendable realizar secuenciación completa de los genes asociados con PC. Los hallazgos permitirán: 1) mejorar nuestro entendimiento de los mecanismos patogénicos de PC, 2) conocer la prevalencia y comportamiento clínico de estas mutaciones en la población Mexicana, 3) establecer la asociación de estas mutaciones con diferentes desenlaces clínicos de la PC y 4) identificar grupos que se beneficien de maniobras terapéuticas y de escrutinio individualizadas.

Conclusiones: La población mexicana tienen mutaciones en los genes *PRSS1* y *SPINK1* similares a las reportadas en otras poblaciones. Existen 3 mutaciones que pudieran ser únicas de la población mexicana. La nueva mutación del *SPINK1* (*p.V46D*) podría ser un factor causal de PC.

1 ANTECEDENTES

La primera descripción del páncreas aparece en el antiguo Talmud Babilónico que lo designa como “el dedo del hígado”, sin embargo su nombre proviene del griego *pan*:todo y *kreas*:carne, basado en las descripciones de Rufus de Efeso (100DC) acerca de su falta de hueso y cartílago.

El páncreas es una glándula situada en el espacio retroperitoneal que se encuentra rodeada por el estómago, duodeno y bazo. Funcionalmente puede separarse en 1) *páncreas endocrino* (representa 2% de su volumen total) compuesto por los islotes de Langerhans que contienen diferentes tipos de células encargadas de secretar hormonas que regulan diversas funciones motoras, de síntesis y excreción del sistema gastrointestinal (ej. células beta que secretan insulina; otras células se encargan de secretar glucágon, somatostatina y polipéptido pancreático) y 2) *páncreas exocrino* (80-85% de su volumen) que participa en la digestión de alimentos. El 10-15% del volumen restante está compuesto por matriz extracelular.

El páncreas exocrino está compuesto por células acinares arregladas en unidades funcionales llamadas acinos, y por células centroacinares y ductales que forman un sistema ductal ramificado.

La estructura microscópica es similar a la de las glándulas salivales. Los acinos se agrupan formando lóbulos separados entre sí por septos de tejido conectivo que contiene terminaciones nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos. El producto de los acinos es depositado dentro del sistema ductal que drena hacia el interior del duodeno.

El páncreas exocrino tiene dos funciones primarias: a) *digestiva*, y b) *secretora*. La función digestiva está a cargo de las células acinares; estas sinteti-

zan enzimas digestivas que se encargan de hidrolizar macromoléculas alimenticias, facilitando su absorción intestinal. La función secretora la realizan las células ductales; estas producen una solución líquida, alcalina, rica en bicarbonato que neutraliza el ácido gástrico que ingresa al duodeno, evitando así la inactivación de las enzimas digestivas, que requieren de un pH alcalino para llevar a cabo su función.

1.1 Mecanismo de secreción de las enzimas pancreáticas

Los acinos pancreáticos sintetizan enzimas que digirán los carbohidratos, lípidos y proteínas que consumimos. La amilasa, lipasa y nucleasas son las únicas enzimas que se sintetizan y liberan en su forma activa, mientras que las proteasas son sintetizadas en forma de precursores inactivos (proenzimas o zimógenos). Esto es un mecanismo de protección en contra de la autodigestión pues evita la activación enzimática dentro del páncreas.

La síntesis de proenzimas digestivas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso de las células acinares desde donde son transportadas al aparato de Golgi donde sufren modificaciones post-traduccionales y son almacenadas en gránulos que contienen a los zimógenos. En respuesta a los diversos estímulos químicos, mecánicos y hormonales inducidos por la ingesta de alimentos, estos gránulos, mediante exocitosis, son depositados dentro de los conductos pancreáticos y transportados al interior del duodeno ¹.

1.2 Protección y Activación de enzimas

Además de la síntesis de proteasas en forma de zimógenos, otro factor de protección en contra de una activación prematura intrapancreática y/o persistente

de éstas, es el péptido inhibidor de tripsina (PSTI) o inhibidor de proteasa de serina Kazal tipo 1 (SPINK 1). Esta proteína se almacena en los gránulos secretorios junto con los zimógenos y su función es inactivar hasta 20% de la tripsina activada, uniéndose al sitio activo de esta última. En condiciones normales, el SPINK1 inicia la inactivación de la tripsina a nivel duodenal y con ello inicia la detención de la cascada de autoactivación enzimática ².

El tripsinógeno es el principal responsable de la activación de los zimógenos pancreáticos; está compuesto por 2 unidades: la tripsina y el péptido activador de tripsinógeno (PAT). Cuando la secreción pancreática alcanza el duodeno, el tripsinógeno es escindido por la enterocinasa, una enteropeptidasa localizada en el borde en cepillo del duodeno. Esta reacción enzimática produce PAT y tripsina activada. Esta última tiene la capacidad de escindir otras moléculas de tripsinógeno y al resto de los zimógenos produciendo más tripsina activada y transformando al quimiotripsinógeno, proelastasa, procarboxipeptidasa A y B, en sus formas activas: quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa A y B. A esto se le conoce como cascada de activación de zimógenos. Otra capacidad de la tripsina activada es la de escindir e inactivar a otras moléculas de tripsina activada ^{1,2}. **Figura 1**

1.3 Secreción de HCO₃

Simultáneo a la excreción enzimática y mediante la activación de canales de Cl⁻ localizados en la membrana apical, las células ductales producen una solución rica en bicarbonato (HCO₃⁻). Ésta último es secretado mediante un intercambiador de Cl⁻/HCO₃⁻ y es transportado por el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). Esta secreción evita la activa-

ción prematura de zimógenos al mantenerlos en un pH alcalino y evita la inactivación de las enzimas activas al neutralizar el ácido gástrico que llega al duodeno ^{1,2}.

1.4 Pancreatitis

La pancreatitis o inflamación del páncreas puede ser aguda (PA) o crónica (PC), y junto al cáncer de páncreas (CaP), son las patologías pancreáticas más frecuentes ³.

1.4.1 Pancreatitis aguda

La PA se manifiesta y diagnostica con la presencia de dos de las siguientes tres características: 1) Dolor abdominal típico (intenso, continuo, localizado en epigastrio y transfixivo), 2) Elevación de amilasa y/o lipasa 3 veces por arriba del límite normal y 3) Imagen (tomografía, ultrasonido, resonancia, etc.) compatible y/o con cambios sugerentes de inflamación aguda pancreática.

La gravedad de ésta depende del desarrollo de complicaciones locales (necrosis, colecciones líquidas, etc.) y/o sistémicas (ej. falla orgánica persistente).⁴

La causa más frecuente de PA es litiasis biliar, seguida de ingesta de alcohol. Otros factores menos frecuentes incluyen a la hipertrigliceridemia, hipercalcemia, toxinas y fármacos. En la mayoría de los casos (85%), después de una evaluación diagnóstica detallada se puede identificar el factor desencadenante y es solo en el 15% restante que no se encuentra causa evidente; a estos eventos de PA sin etiología precisada se les denomina PA idiopática (PAI) ⁵.

1.4.2 Pancreatitis aguda recurrente

La PA puede presentarse como un episodio único o cuadros repetidos (PA recurrente); estos últimos suelen estar relacionados con la exposición persistente a un factor etiológico. El diagnóstico de PA recurrente (PAR) requiere la pre-

sencia de al menos 2 episodios de PA al año o más de 3 episodios a lo largo de la vida de un individuo, sin que se presente pancreatitis crónica (PC). Estos episodios se caracterizan por: 1) resolución de los síntomas por completo y 1 mes sin dolor y/o 2) niveles normales de enzimas (amilasa/lipasa), resolución clínica y desaparición del dolor ⁶.

1.4.3 Pancreatitis crónica

La pancreatitis crónica (PC) es una enfermedad compleja que se define como un síndrome fibro-inflamatorio que afecta a personas expuestas o portadoras de diversos factores de riesgo, principalmente ambientales y genéticos que se combinan, y en respuesta a una lesión o estrés pancreático favorecen una respuesta patológica persistente en el parénquima caracterizada por el desarrollo de inflamación, fibrosis y eventual atrofia de la glándula ⁷.

La fisiopatología es compleja, pues uno o más componentes ambientales deben conjugarse o asociarse a alteraciones genéticas (mutaciones o polimorfismos) ^{8,9}.

El daño observado en la PC es producto de un proceso persistente y progresivo, y que clínicamente se divide en 2 etapas: 1) PC temprana caracterizada por episodios recurrentes (generalmente idiopáticos) de dolor abdominal y/o PA y 2) PC tardía, caracterizada por desaparición del dolor y aparición de insuficiencia exocrina (mala digestión), endócrina (diabetes mellitus) y alteraciones estructurales (atrofia del parénquima, estenosis y dilataciones ductales, calcificaciones, fibrosis, entre otras) ¹⁰.

Las diferentes causas de PC se agrupan en la clasificación TIGAR-O: **T**oxico-metabólicas (alcohol 70-80%, hipercalcemia, hipertrigliceridemia, etc),

Idiopática (inicio temprano < 35 años de edad, inicio tardío > 35 años de edad, tropical), **Genética** (mutaciones en genes de la fibrosis quística, tripsinógeno catiónico, etc), **Autoinmune** (asociada o no a enfermedad por IgG4), **Recurrente**, **Obstructiva** (neoplasias).

En México, al igual que en otros países occidentales la causa más frecuente de PC es el alcoholismo (70% de los casos): En otros como India, lo es la desnutrición, aunque esta última etiología no se ha identificado en los pacientes estudiados en nuestro medio ¹¹.

Causas menos frecuentes que explican 10 a 15% de los casos de PC son aquellas de tipo hereditario (mutaciones en el gen *PRSS1*), metabólico (hipercalcemia, dislipidemia), autoinmune, obstructiva, traumática y secundaria a malformaciones congénitas. Cada una de ellas tiene tratamiento, evolución y pronóstico diferentes (ej. la PH tiene un riesgo elevado para desarrollar cáncer de páncreas). Al igual que en PA, en 15% - 20% de los casos de PC no se identifica alguna etiología, grupo al que se le denomina PC idiopática (PCI) ¹².

1.4.4 Relación de Pancreatitis aguda recurrente y Pancreatitis crónica

Aproximadamente 30% de los pacientes con PA, especialmente aquellos de tipo idiopático desarrollarán PA recurrente (PAR) y de estos últimos, 30% desarrollará PC en los siguientes 10 años (riesgo estimado 4.6; IC95% 3.4 - 6.1). Los pacientes con PAI menores de 25 años comparados con pacientes mayores, tienen un riesgo 2 veces mayor de desarrollar PAR y PC de inicio temprano (antes de los 35 años) ^{13,14}.

La identificación de factores de susceptibilidad genético-ambientales ha permitido explicar la evolución de PAR a PC. Los factores genéticos disminuyen el

umbral de activación de los zimógenos pancreáticos y/o permiten una actividad prolongada de la tripsina activada, por lo que en respuesta a estímulos externos relacionados con daño pancreático (ej. alcohol, tabaco), los primeros favorecen y facilitan el desarrollo de eventos de inflamación tisular o pancreatitis recurrente. Esto induce y perpetua la activación de células estelares pancreáticas, que son las principales responsables de la producción de fibrosis.

Este conjunto de eventos genera depósitos de fibrosis y un estado inflamatorio persistente que ocasionan daños estructurales y funcionales al páncreas¹⁵.

El estudio de las bases genéticas de la pancreatitis fue impulsado por el reconocimiento de mutaciones en los genes que codifican para el tripsinógeno catiónico, el inhibidor del tripsinógeno catiónico y el CFTR en familias con numerosos miembros afectados por PAI, PAR y PC (especialmente de inicio temprano)¹⁶.

1.4.5 Pancreatitis hereditaria

La pancreatitis hereditaria (PH) es una entidad poco frecuente. El estudio genético de familias afectadas identificó genes que están implicados en el desarrollo de PC y que pueden explicar algunos casos considerados idiopáticos.

Algunas mutaciones incrementan el riesgo individual a desarrollar pancreatitis (ej. pancreatitis inducida por alcohol) y otras parecen actuar como moduladores de la enfermedad, modificando su presentación clínica y evolución.

La PH es una entidad monogénica. El gen responsable es el que codifica para el tripsinógeno catiónico (*PRSS1*). Tiene un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia de 80% y expresión variable.

Además de las mutaciones en el gen del *PRSS1* en miembros de familias afectadas, se han identificado mutaciones en otros genes, sin embargo la participación de éstas en la fisiopatología o evolución de la enfermedad es incierta. Estos hallazgos convierten a la PH en un modelo valioso de estudio para la identificación de genes relacionados al desarrollo de pancreatitis ¹⁷.

Clínicamente la PH se caracteriza por episodios recurrentes de dolor abdominal y/o PA en la infancia o adolescencia. Presenta 2 picos de mayor actividad, alrededor de los 5 y 17 años. La mayoría de los pacientes presenta cuadros leves de dolor abdominal pero la mayoría desarrolla cambios evidentes de PC como insuficiencia pancreática exocrina, diabetes mellitus y calcificaciones pancreáticas antes de los 35 años de edad ¹⁸.

1.5 Genes relacionados con pancreatitis

1.5.1 Tripsinógeno Catiónico o *PRSS1*

En 1996 Le Bodic¹⁹ y cols y Whitcomb y cols²⁰ identificaron al gen *PRSS1* (proteasa de serina-1 OMIM 276000) y lo relacionaron con PC de tipo hereditario. El gen se ubica en cromosoma 7q35. Éste es un *locus* que alberga un conglomerado de genes que codifican para distintas enzimas digestivas pancreáticas ²¹.

Este gen consta de 5 exones, comprende 3.6 kb y codifica para tripsinógeno, un zimógeno sintetizado en los acini pancreáticos que al ser activado se transforma en tripsina activada, cuya función es activar el resto de los zimógenos pancreáticos responsables de la digestión de las proteínas.

Se han descrito numerosas mutaciones de este gen (*p.R122H*, *p.N29I*, *p.K23R*, *p.D22G*, *-28 del TCC* y *p.A16V*). Las más frecuentemente encontradas en las familias estudiadas son la *p.R122H* (31%) y *p.N29I* (20%)²².

Mientras que las mutaciones *p.R122H* y *p.N29I* se han asociado exclusivamente a PH y no se han identificado en casos de PC con etiologías más comunes, la mutación *p.A16V* ha sido identificada en pacientes con PC no hereditaria, principalmente de origen alcohólico e idiopático,²³ aunque con una frecuencia menor, comparada con la frecuencia de las mutaciones en otros genes en estas mismas patologías.

Las mutaciones en el *PRSS1* se encuentran en aproximadamente 60% de los casos de PH y en menos del 20% de PI²⁴ lo que sugiere la participación de otros factores y/o genes en el desarrollo de pancreatitis.

1.5.2 Inhibidor pancreático de tripsina o *SPINK1*

El mecanismo de autorregulación o “autoprotección” limita o bloquea la cascada de activación zimógenos y evita que el páncreas se “autodigiera” cuando éstos se activan dentro del páncreas¹.

El inhibidor pancreático de tripsina es uno de los factores que participan en esta autorregulación. Éste es codificado por el gen *SPINK1* o *PSTI* (inhibidor pancreático de tripsina, inhibidor de proteasa de serina tipo Kazal 1 OMIM 167790).

El gen está compuesto por 7.5kb con 4 exones. Fue localizado y caracterizado en 1987 en el cromosoma 5q. Codifica para una proteína de 79 aminoácidos, que es un precursor proteico del péptido maduro de 56 aminoácidos, el cual actúa como un antagonista de tripsinógenos humanos. Esta proteína es sinteti-

zada en las células acinares y secretada al jugo pancreático.²⁵ Es considerada un sistema de seguridad de primera línea que al unirse al sitio activo de la tripsina activada evita que ésta continúe activando a los zimógenos pancreáticos. Se estima que la cantidad sintetizada de SPINK1 es capaz de inactivar aproximadamente 20% de la tripsina activada ²⁶.

Las mutaciones más frecuentes de este gen que han sido relacionadas con el desarrollo de PC son: *p.N34S*, *p.P55S* y *p.R67C* ¹¹. La mutación *p.N34S* se encuentra en aproximadamente 25% de los casos de PI; esta debe presentarse de forma homocigota o acompañarse de otros factores ambientales (ej. abuso de alcohol) ²⁷ o genéticos (mutaciones adicionales en el mismo gen u otros) para causar enfermedad.

El papel de las mutaciones del *SPINK1* como causal único y directo de pancreatitis es incierto, especialmente en las formas autosómicas-dominantes de PH donde los resultados son contradictorios, mientras que en el desarrollo de PI parece ser un modificador de la enfermedad ^{13,28}.

1.5.3 Fisiopatología de las mutaciones en el *PRSS1* y *SPINK1*

La asociación de pancreatitis con la presencia de mutaciones en estos genes ha permitido proponer diversas hipótesis sobre el o los mecanismo(s) fisiopatológico(s) de la PC.

En condiciones normales, dentro del páncreas pueden encontrarse cantidades pequeñas de tripsina activada y para evitar que ésta active a otros zimógenos, existen diferentes mecanismos de autoprotección. **Figura 1**

- a) Autoinactivación espontánea e irreversible de la tripsina.

- b) Activación de proteasas de serina como *mesotripsina* y *enzima Y* por tripsina. Estas enzimas hidrolizan a la tripsina activada, al tripsinógeno y otros cimógenos en forma irreversible.
- c) Unión irreversible del SPINK-1 a la tripsina, inhibiendo su actividad.

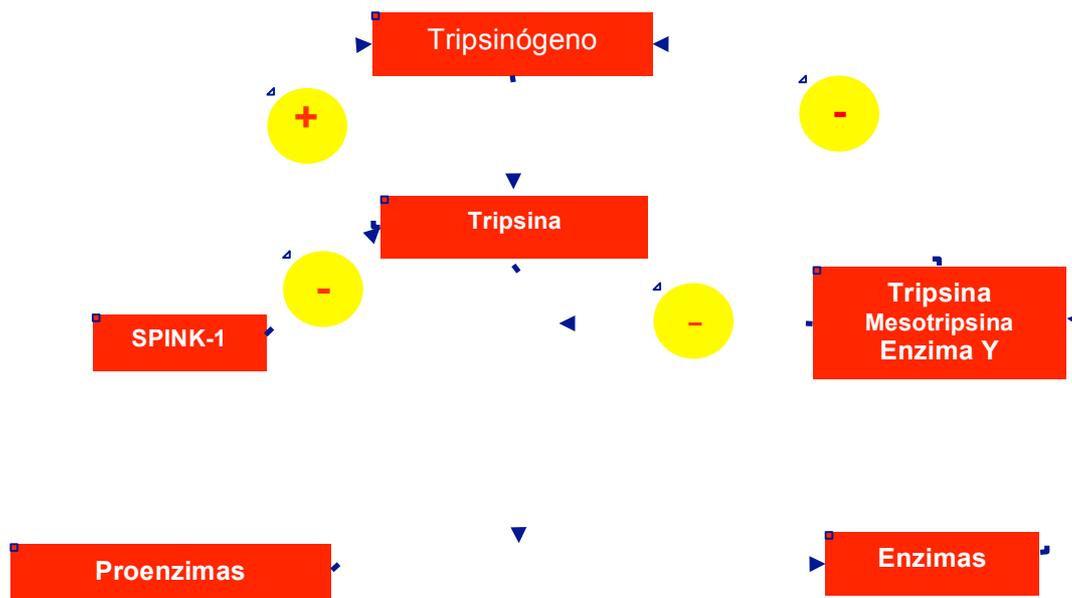


Figura 1. Cascada de activación de las enzimas pancreáticas.

Inicia con auto activación de pequeñas cantidades de tripsinógeno intrapancreático que se convierte en tripsina. La tripsina activa otras proenzimas (cimógenos). Este ciclo se perpetúa por acción de la tripsina, la cual continúa activando al tripsinógeno (círculo con signo +). Existen varios mecanismos de defensa que inhiben o bloquean esta cascada de activación enzimática (círculos con signos -). Uno de ellos se basan en autodigestión de la tripsina por tripsina, mesotripsina y enzima Y. Un segundo mecanismo es el mediado por inhibición directa de la tripsina, cuando ésta se une en forma irreversible al SPINK. De esta forma se evita la activación permanente de las enzimas pancreáticas, la autodigestión pancreática y el desarrollo de pancreatitis.

Las mutaciones del tripsinógeno catiónico (TC o *PRSS1*) afectan partes reguladoras críticas del producto del gen que suelen resultar en una ganancia en su función, permitiendo la activación prematura del tripsinógeno y/o que la tripsina activada sea resistente a la inactivación mediada por autólisis²⁹.

En base a la localización de la mutación *pR122H* del TC en la estructura tridimensional del complejo tripsinógeno-PSTI^{30,31} Withcomb DC et al¹⁸ propusieron un mecanismo fisiopatológico.

La estructura proteica de la tripsina consiste de 2 dominios globulares unidos por una cadena lateral, con un sitio enzimáticamente activo localizado en la interface entre ambos dominios.

La mutación *pR122H* (*p.R117H* utilizando la nomenclatura antigua) ocurre sobre la cara externa de la molécula de tripsinógeno en el lado opuesto al sitio de unión del substrato (sitio catalítico y sitio de unión al PSTI) lejos de la cadena lateral del péptido de activación del PAT¹⁸. Aunque parece improbable que la sustitución de arginina por histidina afecte la función de la tripsina, del PSTI o la activación del tripsinógeno, este cambio afecta la inactivación por autólisis, pues la tripsina activada reconoce los residuos de arginina y lisina dentro de las cadenas peptídicas como sitios de hidrólisis.

Normalmente la arginina de sitio 122 (R122) de la tripsina activada funciona como sitio inicial de hidrólisis mediada también por tripsina (autoinactivación). La sustitución por histidina en el sitio 122 elimina este sitio de hidrólisis inicial, confiriendo a la proteína resultante la capacidad de resistir la autólisis evitando su inactivación permanente. **Figura 2A**

De esta forma, la tripsina activada evita la hidrólisis y permanece activa indefinidamente, activando más tripsina y otros zimógenos, incrementando anormalmente su concentración. Cuando esto ocurre dentro del páncreas provoca autodigestión pancreática^{18,19}.

El mecanismo de daño asociado a la mutación *p.N29I* (*p.N21I*) es incierto, aunque se ha sugerido que esta puede favorecer la formación de un puente

entre el aminoácido del sitio 21 y el sitio 117 con lo que se evitaría la autólisis de tripsina. **Figura 2B**

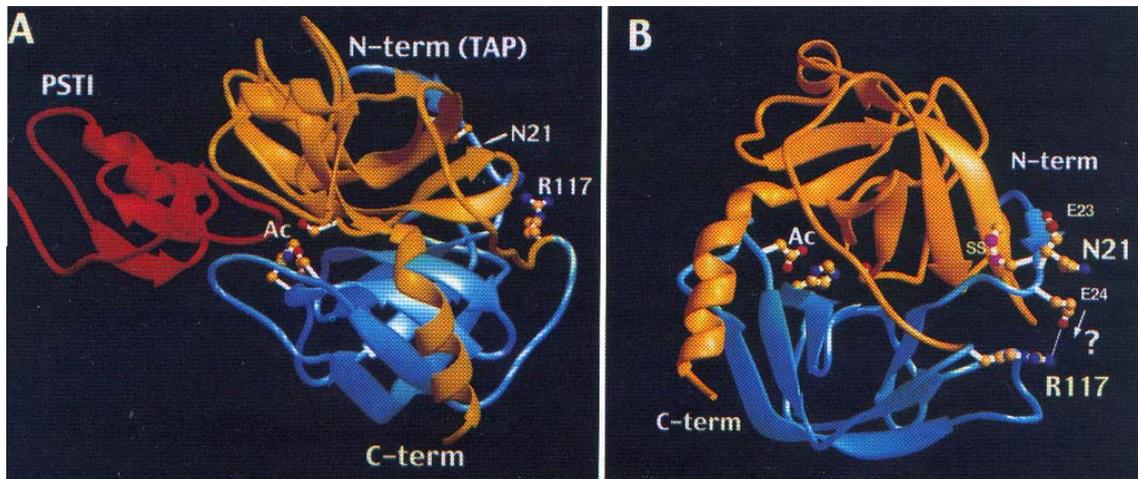


Figura 2. Estructura cristalográfica de la tripsina. ^[1]

A. Estructura del complejo tripsinógeno-PSTI. En azul y amarillo se observa la molécula del tripsinógeno compuesta por 2 dominios. Se observa la transición del dominio N-terminal (azul) hacia el C-terminal amarillo en el sitio R117 (R122) de la cadena flexible del segmento que conecta a los dominios. El péptido de activación del tripsinógeno (PAT) forma parte de la molécula y se ubica en el dominio N-terminal, pero no se observa por cristalografía. En rojo se muestra el PSTI interactuando con el sitio activo (Ac) del tripsinógeno. También se observa el sitio N21 en la molécula del tripsinógeno.

B. Muestra la estructura del TC humano compuesto por 2 dominios. Se observa la localización de los sitios N21, E24 y R117 (R122). La flecha y signo de ? indican el posible mecanismo de acción de la mutación N21I. Esta podría acercar E24 a R117 y formar un puente entre las cadenas laterales cargadas con signos opuestos evitando así a autólisis.

1.5.4 Gen del Regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística o CFTR

Las mutaciones en el gen de la fibrosis quística (FQ), específicamente aquellas que ocurren en la región que codifica para el regulador de conductancia de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)^{32,33,34} se asocian principalmente a PC de tipo idiopática (PCI).

Este gen se localiza en el cromosoma 7q31 y codifica para una proteína de 1480 amino ácidos que se expresa en la membrana apical de células epitelia-

[1] **Figura 2 obtenida de:** Withcomb DC. Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis. Gut 1999;45:317-322

[2] **Figura 3 modificada de** Elborn JS. Cystic fibrosis. Lancet 2016;388:2519-2531 y

les exocrinas ¹¹. De acuerdo a las consecuencias moleculares y función residual del CFTR, las mutaciones de este gen se consideran leves o graves (Figura 3). ^[2]

Figura 3. Consecuencias moleculares de las mutaciones del CFTR.



Estas mutaciones pueden encontrarse de forma heterocigota, homocigota o como mutaciones heterocigotas compuestas; cada una de ellas asociada a un porcentaje de función residual del CFTR y a un tipo específico de manifestaciones clínicas de la enfermedad.

La función residual del CFTR determinada por estas mutaciones es responsable de la función secretora pancreática resultante, además de predisponer al desarrollo de pancreatitis ya sea idiopática o por alcohol.³⁵ Aproximadamente 85% de los pacientes con FQ padecen algún grado de insuficiencia pancreática.

[2] **Figura 3 modificada** de Elborn JS. Cystic fibrosis. Lancet 2016;388:2519-2531 y

Wilschanski M, et al Correlation of sweat chloride concentration with classes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. J Pediatr 1995;127:705 710

ca. Aquellos con mayor pérdida de la función suelen ser portadores de 2 mutaciones graves mientras que aquellos con función residual del CFTR de entre 5-50% portan al menos una mutación leve. **Figura 3**

La penetrancia de estas mutaciones es muy baja e incompleta. Se estima que 13% a 18% de los pacientes con PI crónica o PI aguda recurrente portan al menos un alelo anormal o mutación común del gen *CFTR*^{21,22}. La frecuencia de afección pancreática en sujetos portadores de alguna mutación en el *CFTR*, sin manifestaciones evidentes de enfermedad pulmonar es de 1:700, lo que sugiere se requiere de otros factores (genéticos y/o ambientales) para producir pancreatitis. Estas mutaciones posiblemente incrementen la susceptibilidad individual a diversos factores de daño pancreático facilitando el desarrollo de pancreatitis con estímulos o exposición menor³⁶.

El mayor riesgo para padecer FQ y desarrollar pancreatitis e insuficiencia pancreática se asocia a genotipos heterocigotos compuestos (una mutación grave como F508 y una leve como *CFTR p.R117H* y/o del alelo 5T en distintos alelos).

Algunos genotipos de estas mutaciones en el *CFTR* están asociados a fenotipos de FQ no clásica o subclínica (manifestaciones pulmonares inexistentes o leves)²¹ por lo que algunos pacientes con PC catalogada inicialmente como idiopática pueden ser portadores de alguna combinación de estas mutaciones.

La coexistencia de mutaciones del *CFTR* y aquellas relacionadas con el TC incrementan el riesgo para desarrollar pancreatitis y modifican su curso clínico, al provocar la aparición de PC a edades tempranas. Incluso esta coexistencia puede ser responsable de casos de PC en pacientes homocigotos a mutaciones leves del gen *CFTR*^{21,24}.

1.5.5 Diferencias poblacionales

La identificación de mutaciones en distintos genes en familias con PH y el hallazgo de algunas de estas en casos con pancreatitis considerada idiopática, indican que la frecuencia y naturaleza de estas mutaciones difiere de una población a otra.

La frecuencia de mutaciones en el gen *PRSS1* en pacientes polacos con PC idiopática y alcohólica es de 21.4% y 33% respectivamente y de la mutación *p.N34S* del *SPINK1* de 28.6% y 18% en los mismos grupos de riesgo³⁷. En Alemania, la frecuencia de mutaciones en los genes *PRSS1* (*p.N29I*, *p.R122H*), *SPINK1* (*p.N34S*) y *CFTR* (36 mutaciones) en pacientes con PC e hiperparatiroidismo primario fue de 0%, 16% y 8% respectivamente, sin que se encontrase alguna de estas en controles sanos³⁸.

En China³⁹, las mutaciones más frecuentes del gen *PRSS1* (*p.R122H*, *p.N29I* y *p.A16V*, reportadas como las más frecuentes en Estados Unidos)^{30,40,41} no se encontraron en pacientes con PH y PC. Este estudio reportó las variantes *p.D162D* (*c.488C>T*) en 46% de los casos estudiados y la *p.A121T* en los 2 pacientes con PH. Esta última variante ha sido descrita en pacientes alemanes⁴².

Las mutaciones del *SPINK1* (*p.N34S* y *p.P55S*) y *CFTR* en pacientes Indios con PC alcohólica e idiopática es de 42% y 50% respectivamente, siendo significativamente mayor a la reportada en Estados Unidos de América^{43,44}. En América Latina, reportes de Brasil muestran esta misma variabilidad en la frecuencia y tipo de mutaciones⁴⁵.

Se ha observado que cerca de la mitad de los pacientes con PH no tienen mutaciones en ninguno de estos tres genes^{11,12,46}. A través de ligamiento genético

en familias con PH se identificó un cuarto *locus* génico para PH en el cromosoma 12, sin embargo aún no se ha identificado el gen responsable ⁴⁷.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pancreatitis es una entidad compleja, producto de la exposición simultánea y/o progresiva a diversos factores genéticos y ambientales.

La identificación de distintos genes relacionados a PH y PCI ha facilitado la comprensión de las bases fisiopatológicas de esta entidad y ha evidenciado la heterogeneidad genética existente entre las poblaciones.

3 JUSTIFICACION

Hasta la realización de este estudio, no existían estudios sobre la frecuencia y tipo de mutaciones genéticas en pacientes adultos mexicanos con PH y PCI.

La identificación y caracterización de las bases moleculares de la PH y PCI en pacientes mexicanos puede generar información valiosa sobre aspectos no conocidos de la fisiopatología de la enfermedad, validar y comparar los hallazgos en otras poblaciones, e identificar la participación de otros genes en el desarrollo y susceptibilidad de PC. Además, favorecerá el desarrollo e implementación de métodos diagnósticos, preventivos (determinación de sujetos en riesgo) y terapéuticos.

4 HIPÓTESIS

4.1 NULA

La prevalencia y naturaleza de las mutaciones en los genes asociados a pancreatitis en la población mexicana es similar a la reportada en la literatura en otras poblaciones.

4.2 ALTERNA

La prevalencia y naturaleza de las mutaciones en los genes asociados a pancreatitis en la población mexicana es diferente a la reportada en la literatura en otras poblaciones.

5 OBJETIVOS

5.1 GENERALES

1. Determinar y caracterizar la presencia de mutaciones en genes relacionados a PC en pacientes mexicanos con pancreatitis crónica hereditaria e idiopática.

5.2 ESPECIFICOS

5.2.1 Determinar la prevalencia de las mutaciones en el gen *PRSS1*, *SPINK1* y de *CFTR* en pacientes con PC hereditaria e idiopática.

5.2.2 Determinar si las mutaciones en el gen *PRSS1*, *SPINK1* y *CFTR* son similares a las reportadas en otras poblaciones.

5.2.3 Definir la presencia de posibles mutaciones nuevas en los genes *PRSS1*, *SPINK1* y de *CFTR* en pacientes con PC hereditaria e idiopática.

5.2.4 Búsqueda, captación y caracterización de familias mexicanas con PH para la posible identificación de nuevos loci relacionados a PH a través de ligamiento genético.

6 MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Estudio transversal, observacional.

6.2 DEFINICIONES

6.2.1 Pancreatitis crónica

El diagnóstico de pancreatitis crónica se considerará en aquellos casos que cumplan con los criterios diagnósticos del consenso de Marsella-Roma¹ y Cambridge⁴⁸ considerando la presencia de los siguientes cambios morfológicos, funcionales, clínicos y radiológicos:

a) Cambios morfológicos (Observados en aquellos casos en que se cuente con tejido obtenido mediante biopsia percutánea o cirugía): Esclerosis irregular con destrucción y pérdida de parénquima exócrino en forma focal, segmentaria o difusa y/o dilatación del sistema ductal asociado a estenosis o litos y/o infiltrado inflamatorio, fibrosis y calcificaciones que afectan acini y/o

b) Cambios funcionales: Pérdida progresiva o permanente de la función exocrina y/o endocrina manifestada por presencia de resultados de pruebas de función pancreática (excreción de pancreolauril) compatibles con insuficiencia pancreática exócrina y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y/o

c) Cambios clínicos: Presencia de dolor abdominal recurrente o persistente y/o evidencia malabsorción (esteatorrea, creatorrea, lentería) y/o mejoría de síntomas con administración de enzimas pancreáticas en forma enteral y/o

d) Cambios imagenológicos: Presencia de calcificaciones o litos en parénquima y/o conductos pancreáticos, dilatación irregular y/o defectos de llenado de los conductos pancreáticos, observados en placas simples de abdomen, ultraso-

nido, tomografía computada, resonancia magnética, colangio pancreatografía retrógrada endoscópica.

6.2.2 Pancreatitis crónica hereditaria

Aquellos casos que cumplan con los criterios diagnósticos de pancreatitis crónica sin evidencia de un factor causal, además de:

a) Presencia de un caso de PC o PA recidivante idiopática en uno o más familiares de primera línea.

6.2.3 Pancreatitis crónica idiopática

Aquellos casos que cumplan con los criterios diagnósticos de pancreatitis crónica y:

a) Ausencia de un factor etiológico directo, relacionado con el desarrollo pancreatitis crónica.

b) Ausencia de antecedentes familiares de pancreatitis aguda y/o crónica.

6.2.4 Pancreatitis aguda (PA)

Se definió como la presencia de dolor abdominal típico asociado a cualquiera de los siguientes: a) elevación de 3 veces por arriba del valor serico normal de amilasa y/o lipasa y/o b) evidencia imagenologica de PA.

6.2.5 Pancreatitis aguda recurrente idiopática

a) Sujetos con 2 o más episodios de PA y ausencia de un factor etiológico directo, después de una investigación detallada de la posible causa.

El estudio aprobado por el comité institucional de Investigación y ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se invitó a participar a todos los miembros de familias con sospecha de ser portadores de pancreatitis crónica hereditaria además, a aquellos pacientes con diagnóstico de pancreatitis crónica idiopática y/o PA recidivante idiopática, atendidos en los servicios de hospitalización y/o en la consulta externa de la Clínica de Páncreas del Instituto, así como a individuos sanos captados en la unidad de banco de sangre del mismo.

Se concertó una cita informativa sobre los métodos, confidencialidad, riesgos y beneficios del estudio, posterior a la cual y previa aceptación y firma de la carta informativa y del consentimiento informado se recabó información clínica a partir de interrogatorio directo y revisión del expediente clínico en relación con demografía, antropometría, evolución de la enfermedad, tipo y temporalidad en el desarrollo de complicaciones y se obtuvo una muestra de sangre total de 10 cc en presencia de EDTA, mediante punción de vena periférica.

6.3 Búsqueda de mutaciones específicas

6.3.1 Aislamiento de ADN

Se extrajo ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica mediante el método estándar de precipitación de sales.⁴⁹

6.3.2 Amplificación de alelos específicos mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron selectivamente los exones con mutaciones previamente descritas.

6.3.2.1 Gen *PRSS1*

El **exón 2** del gen *PRSS1* fue amplificado mediante PCR usando el siguiente par de oligonucleótidos reportados previamente por Nishimori y cols.²⁶ :

PRSS1F 5'-TTAGCAGAAAGCAATCACAG-3' y

PRSS1R 5'-ACCACCTCTCCCATCCATC-3'.

El **exón 3** del gen *PRSS1* fue amplificado mediante PCR usando el siguiente par de templates, de acuerdo al protocolo reportado por Pho-lam y cols⁴¹:

PRSS1F (5'-TCCATGAGCAGAGAGCTTGAGGAA-3') y

PRSS1R (5'-TGTGAGGATGGAGGGAAGTAGAAGGACT-3')⁵⁰

Los productos fueron generados mediante una PCR bajo las siguientes condiciones: 5 minutos iniciales de desnaturalización a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94 ° C durante 30 segundos, 56 ° C por 30seg, 72° C por 30 segundos y una fase de elongación final a 72 ° C por 7 minutos. Una alícuota de 10µl de la reacción fue cargada en un gel de agarosa 25g/L para verificar tamaño y cantidad del producto de PCR previo a la secuenciación.

6.3.2.2 Gen *SPINK1*

El **exón 3** del gen *SPINK1* fue amplificado mediante PCR de acuerdo al protocolo reportado por de Witt y colaboradores⁵¹, usando el siguiente par de oligonucleótidos:

SPINK1F (5'-CCAATCACAGTTATTCCCCAGAG-3') y

SPINK1R (5'-GTTTGCTTTTCTCGGGGTGAG-3')

Los productos fueron generados mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bajo las siguientes condiciones: 12 minutos iniciales de desnatu-

realización a 95°C, seguido de 36 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 56 °C por 30 segundos de templado, 72 °C por 30 segundos y una fase de elongación final a 72 °C por 2 minutos. Una alícuota de 10 µl de la reacción fue cargada en un gel de azarosa 25g/L para verificar tamaño y cantidad del producto de PCR previo a la secuenciación.

6.3.2.3 Gen *CFTR*

Se utilizó un kit comercial en busca de las mutaciones más comunes: $\Delta F508$, W1282X, R117H, 621+1(G→T), R334W, R347P, A455E, $\Delta I507$, 1717-1(G→A), G542X, S549N, G551D, R553X, R560T, N1303K, and 3849+10Kb(C→T).

6.4 Secuenciación de ADN

Los productos de PCR de todas las muestras fueron purificados usando el QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante.

La secuenciación se realizó utilizando el Applied Biosystems (ABI) Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction Kit y un secuenciador de ADN ABI Prism (PE applied Biosystems, Foster City, CA).

Todos los productos fueron secuenciados en ambas direcciones con los mismos primers F y R usados durante la PCR.

7 CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

Considerando que en México no existen estudios similares y que la incidencia, tipo de mutaciones y características clínicas varían de una población a otra y se asocian a gran heterogeneidad en cada región geográfica, como lo indican

los resultados de un grupo italiano⁵² y otro coreano⁵³ por dar un ejemplo, no es posible calcular con certeza un tamaño de muestra adecuado.

Para el estudio de PC hereditaria analizamos 4 familias ya identificadas como portadores de esta última; por otra parte, utilizamos información de 10 sujetos con PC idiopática y 50 controles (100 cromosomas) para la caracterización de mutaciones en nuestra población.

8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del análisis descriptivo de las poblaciones en estudio se expresan como media aritmética \pm 1 desviación estándar o como frecuencias absolutas y relativas según el tipo de variable. Para obtener y describir las asociaciones entre PC y mutaciones genéticas se utilizaron la prueba de X^2 y/o exacta de Fisher y se calculó el riesgo relativo e intervalo de confianza al 95% para cada una ellas. El valor de p se calculó a 2 colas, considerando un valor <0.05 como estadísticamente significativo.

9 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de PC hereditaria (PH) e idiopática (PCI) según las definiciones mencionadas y que después de haber sido informados aceptaron participar y firmaron la carta de consentimiento informado.

10 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluirán aquellos pacientes que no cumplan con los criterios diagnósticos descritos y que no deseen participar en el estudio o que no firmen la hoja de consentimiento.

11 RESULTADOS

11.1 Estudio de familias (PH)

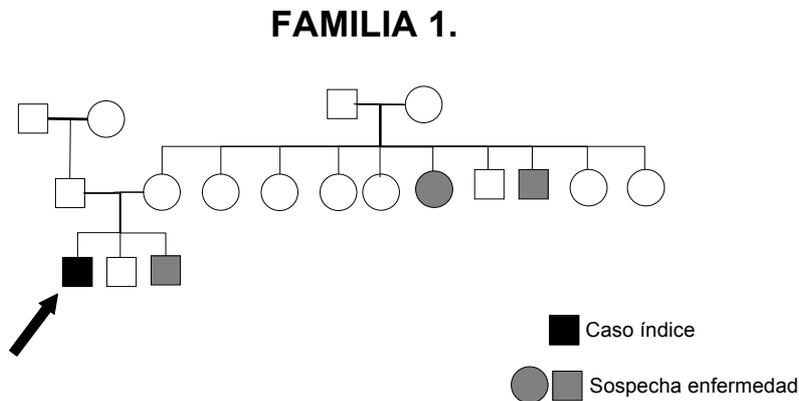
Se identificaron 5 familias con 2 o más miembros diagnosticados con PC y/o PA recidivante idiopática, pero sólo 2 familias dieron su consentimiento y aceptaron participar en el estudio.

11.1.1 Familia 1

Esta familia está compuesta por 30 miembros. Se recolectaron y secuenciaron muestras de 18 miembros que aceptaron participar y estuvieron disponibles para la extracción de sangre. **Figura 4**

En ninguno de los sujetos estudiados incluyendo el caso índice, se encontraron mutaciones en los exones secuenciados de los genes estudiados.

FIGURA 4.



Árbol genealógico de familia residente de la Ciudad de México con sospecha de Pancreatitis hereditaria.

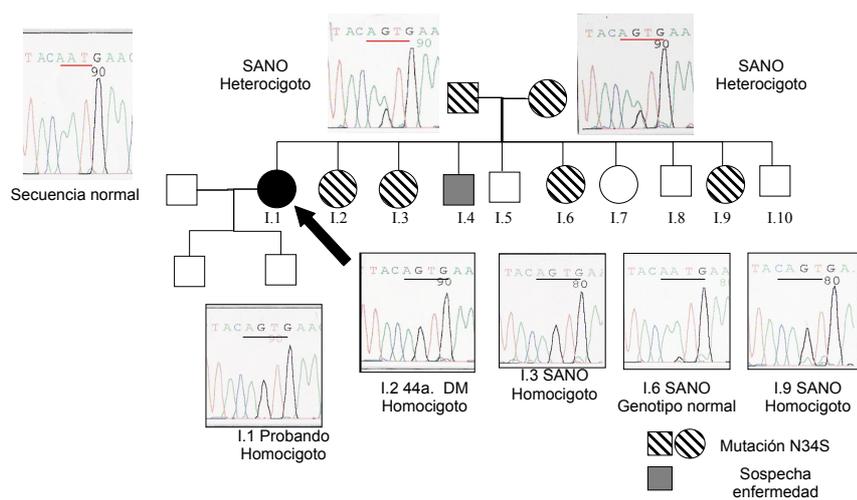
11.1.2 Familia 2

Esta familia está compuesta por 15 miembros, de los cuales solo 7 aceptaron participar y estuvieron disponibles para la extracción de sangre. **Figura 5**

No se encontraron mutaciones en los exones secuenciados de los genes *PRSS1* o *CFTR*. En 6 miembros, incluyendo el caso índice se encontró la mutación *p.N34S* del gen *SPINK1*.

Los padres del caso índice son portadores sanos heterocigotos de la mutación. Tres hermanos y el caso índice son homocigotos para la mutación. Dos de estos sujetos estaban sanos hasta el día del estudio, mientras que otro había desarrollado diabetes mellitus durante la adolescencia y el caso índice había sido diagnosticado con PC en la adolescencia. El sujeto restante se encontraba aparentemente sano y presentó un genotipo y fenotipo normales.

FIGURA 5. FAMILIA 2 CON SOSPECHA DE PANCRETITIS HEREDITARIA.



Árbol genealógico familia del Estado de Morelos. Se muestra el genotipo para la mutación N34S del gen *SPINK1*

11.2 Estudio de PC de inicio temprano y PA recurrente idiopática

(sujetos no relacionados)

Se identificaron y aceptaron participar en el estudio 19 sujetos con PC o PA recurrente idiopática. (14 hombres, mediana de edad 24; intervalo 13-40 años de edad). **Tabla 1**

11.2.1 Gen *PRSS1*

La secuenciación del gen *PRSS1* evidenció 2 mutaciones en el exón 2, no reportadas hasta el momento de el estudio: *p.V39A* y *p.N42S* mutación. **Tabla 1**

En los casos restantes, no se encontraron mutaciones en los exones secuenciados.

No fue posible realizar secuenciación de los familiares de los portadores de las mutaciones encontradas.

Tabla 1

Características clínicas y mutaciones de pacientes con PA recurrente y PC

Paciente	Genero	Edad actual (años)	Edad inicio síntomas	Manifestaciones Clínicas	Mutación
1	F	45	8	PA recurrente. Calcificaciones 15ª edad. Pestow a los 22 años	<i>p.V39A PRSS1</i>
2	M	35	20	PA recidivante	No
3	M	29	22	PA recurrente. Calcificaciones 16ª Peustow 27 años	No
4	M	47	10	Dolor abdominal y PA recurrente. Crecimiento cabeza páncreas. Whipple 40ª	No
5	M	48	ND	Dolor abdominal recurrente	No
6	M	26	20	PA recurrente. Calcificaciones 22 años	<i>p.N42S PRSS1</i>
7	M	38	29	PA recurrente. Dilatación Conducto Pancreático	No
8	F	26	26	PA recurrente. Calcificaciones y dilatación conducto pancreático	<i>p.N34S SPINK1</i>
9	M	42	ND	Dolor abdominal. PC por USE	No
10	M	34	30	PA recurrente. Calcificaciones en TAC a los 30ª	No
11	F	17	14	PA recurrente. Calcificaciones	No
12	F	24	23	Dolor abdominal. Calcificaciones en TAC. Peustow a los 24ª	No
13	M	18	12	PA recurrente. Litiasis ductal	No
14	M	34	33	Dolor Abdominal. Calcificaciones en TAC	No
15	M	20	16	Dolor, PA recurrente. Calcificaciones en TAC	<i>p.V46D SPINK1</i>
16	F	34	33	Dolor Abdominal. Calcificaciones	No
17	M	20	18	Dolor abdominal. Calcificaciones. Diabetes mellitus	No
18	M	38	30	PA recurrente	No
19	M	15	12	Dolor. Ictericia. Calcificaciones en TAC y USE	<i>p.N34S SPINK1</i>

11.2.3 Gen *CFTR*

No se encontraron mutaciones en el gen *CFTR*.

11.2.4 Controles

Se secuenciaron 100 cromosomas de 50 sujetos sanos y no se encontraron mutaciones en los exones estudiados de los genes *PRSS1*, *SPINK1* o *CFTR*.

12 DISCUSION

El reporte de un acúmulo de casos de PC en algunas familias en la década de los años 50 en el siglo pasado sugirió que la fisiopatología de ésta enfermedad podría tener una connotación genética o hereditaria. Fue hasta 1996 cuando se describió la presencia de mutaciones del gen del *tripsinógeno catiónico* (*PRSS1*) en familias con PC hereditaria, y posteriormente en sujetos no relacionados, con PC idiopática (PCI) ³⁰. Posteriormente se describieron mutaciones en los genes de la fibrosis quística (*CFTR*) y el *inhibidor de la tripsina* (*SPINK1*) en sujetos con PCI y de origen alcohólico.

A diferencia de las mutaciones del gen *PRSS1*, las que ocurren en los genes *CFTR* y *SPINK1* no cumplen con los criterios de causalidad y suelen requerir la participación de otros agentes etiológicos para provocar daño pancreático; es por eso que las mutaciones en estos 2 genes en particular se consideran modificadores de la enfermedad.

Aún y cuando estas mutaciones han sido descritas mundialmente, la frecuencia de cada una y el fenotipo resultante difiere entre poblaciones ^{8,54,55,56}.

Comparado con la población general, los portadores de estas mutaciones (específicamente aquellas relacionadas con PH) tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer de páncreas por lo que la detección y caracterización de estas

mutaciones en sujetos con PC ayudará a implementar modificaciones en estilo de vida y métodos de vigilancia específicos.

Resultado de distintas migraciones, los pobladores de Latinoamérica tienen ancestros amerindios, europeos y en algunos casos africanos y asiáticos. El mestizaje entre estas etnias es responsable de la diversidad genética particular observada en el continente americano ⁵⁷.

Un estudio mexicano⁵⁸ analizó la diversidad genética y patrones de desequilibrio de enlace en mestizos mexicanos de diversas regiones del país y la comparó con mapas de haplotipos (HapMap) de poblaciones del norte de Europa, África y este de Asia.

Los resultados indican que existen diferencias genéticas en las distintas regiones de México y que estas son secundarias a diferentes grados de contribución amerindia y europea. Los pobladores de la región central son genéticamente cercanos a la etnia zapoteca mientras que los de la región norte son genéticamente parecidos a los habitantes de Europa septentrional.

La contribución africana es baja (<10%) y se concentró en los estados de Guerrero y Veracruz. Los mestizos de Yucatán presentan características propias de los mayas, que son un grupo étnico específico y muy diferente a los otros grupos amerindios.

Otros estudios mediante polimorfismos del complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (*HLA-A,-B,-C*) y 2 (*HLA-DRB1,-DQB1*) ⁵⁹ y marcadores polimórficos (microsatélite) ⁶⁰, establecieron que la diversidad genética en población mexicana esta compuesta genes amerindios (56%), caucásicos (40%), y africanos (4%).

Las tendencias migratorias actuales indican que algunos de los principales destinos de las de las poblaciones hispanas son países Japón, Estados Unidos de América y Reino Unido ⁶¹. Aún y cuando la mayoría de los estudios genéticos en relación a pancreatitis han sido realizados en estos países, la información sobre la prevalencia de estas mutaciones en la población latinoamericana (cuyos números en los censos poblacionales de dichos países incrementan constantemente) es escasa.

Hasta la realización de la presente investigación solo existían estudios genéticos sobre pancreatitis realizados en población Brasileña ⁴⁵, por lo que nuestra investigación contribuye significativamente al conocimiento actual de estas mutaciones en población hispana.

El secuenciar solo exones específicos y no la totalidad de los genes estudiados y que nuestra muestra es relativamente pequeña, comparada con estudios previos puede interpretarse como una debilidad metodológica, sin embargo elegimos analizar los exones en que se ha reportado la mayor frecuencia de mutaciones con el objetivo de incrementar las posibilidades de encontrar mutaciones previamente descritas.

El éxito de esta estrategia se observa en nuestros resultados, que son similares a los reportados previamente ^{24,25,27,32,37,41,43,44,45}, además que reportamos el hallazgo de 3 mutaciones nuevas: 2 en el gen *PRSS1* y una en el *SPINK1*.

Las mutaciones del *PRSS1* generalmente resultan en la ganancia de función de la tripsina activada. Favorecen que esta permanezca activa por tiempo prolongado o bien que esta se active prematuramente.

Las mutaciones en el *SPINK1* suelen afectar la expresión o resultar en una pérdida de función de la proteína, disminuyendo afectando uno de los mecanismos de defensa que evitan la activación prematura y/o prolongada de la tripsina activada.

Las mutaciones que ocurren en el *CFTR* suelen provocar pérdida de la función tanto por una síntesis defectuosa o por ausencia total de la proteína, lo que produce una secreción pancreática ácida y viscosa.

12.1 Estudio de familias (PH)

En ninguno de los miembros de las familias estudiadas encontramos mutaciones en los exones secuenciados de los genes *PRSS1* y *CFTR*.

En una familia encontramos la mutación del gen *SPINK1* que con mayor frecuencia ha sido reportada en diversas poblaciones (*p.N34S*). El patrón de segregación de esta mutación como se observa en árbol genealógico (Figura 5) muestra que independientemente del genotipo (homocigotos o heterocigotos), la mayoría de los individuos no presenta datos clínicos evidentes de enfermedad pancreática. Esto concuerda con observaciones previas e indica que con seguridad se requiere de uno o más factores genéticos y/o ambientales adicionales a la mutación para que el individuo portador desarrolle enfermedad.

Tanto el caso índice como los familiares portadores negaron antecedentes de exposición a factores asociados a daño pancreático y prácticamente han vivido en el mismo sitio durante toda su vida junto con el resto de la familia, por lo que el papel del ambiente agregado a esta mutación como responsables del desarrollo de la enfermedad, aunque desconocido es poco probable. Es posible

que el caso índice a diferencia de los otros portadores aparentemente sanos tenga mutaciones adicionales en los exones no secuenciados o en otros genes que se han asociado al desarrollo de PC a una edad temprana.

Esto apoya que las mutaciones en el gen *SPINK1* actúan como modificadoras de la enfermedad. Aunque uno de los portadores homocigotos fue diagnosticado con diabetes mellitus a temprana edad, con la información disponible no podemos establecer una relación causal directa entre la alteración en el metabolismo de la glucosa y la presencia de la mutación.

12.2 PC Y PA idiopática recurrente de inicio temprano (Sujetos no relacionados)

12.2.1 Gen *PRSS1*

En 2 sujetos encontramos mutaciones en el exón 2 del gen del *tripsinógeno catiónico* (*p.V39A* y *p.N42S*) que hasta el momento de haber realizado el estudio no habían sido reportadas.

La primera representa la sustitución de un aminoácido no polar hidrofóbico por otro no polar también hidrofóbico, mientras que la segunda mutación consiste en la sustitución de un aminoácido hidrofílico polar por un aminoácido hidrofílico con carga negativa.

Aunque estos hallazgos indican que las mutaciones en el gen *PRSS1* suelen ser suficientes para generar enfermedad, desconocemos si en los sujetos estudiados existen mutaciones adicionales en los exones no secuenciados o en otros genes que pudieran contribuir al desarrollo de la enfermedad.

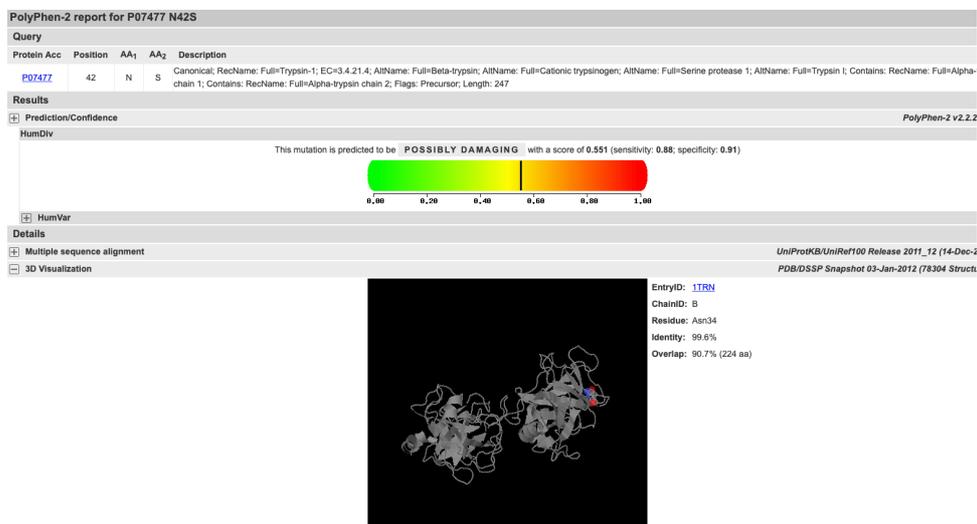
Los aminoácidos intercambiados en estas 2 mutaciones conservan la misma polaridad y solubilidad de los originales por lo que los efectos fisiológicos so-

bre el funcionamiento del tripsinógeno catiónico y/o tripsina pudieran ser mínimos o nulos.

Simulaciones computacionales utilizando la herramienta en línea Poly Phen 2 (Polymorphism Phenotyping v2) de la Universidad de Harvard (*sitio web <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>*) que otorga información sobre polimorfismos no sinónimos al predecir los posibles efectos de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína, sugieren que la mutación *p.N42S* tiene una predicción de daño de 55.1% (sensibilidad 88% y especificidad 91%) (**Figura 7**) mientras que la predicción de daño de la mutación *p.V39A* es de 82.8% (sensibilidad 84%, especificidad 93%). **Figura 8**

Figura 7.

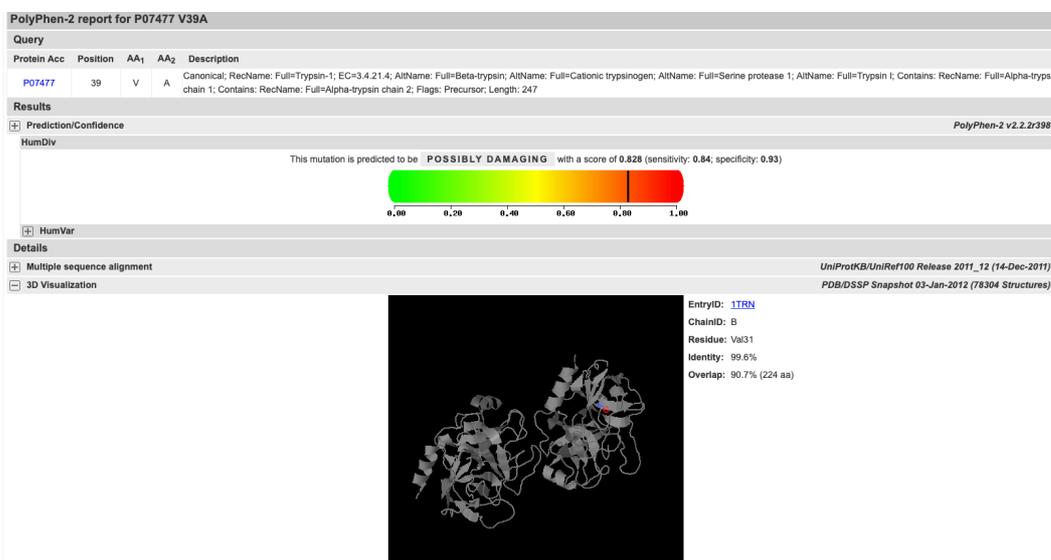
Imagen de la simulación de la mutación *p.N42S* del gen PRSS1 obtenida en línea con la herramienta PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2) ^[3]



[3] Figuras 7, 8 Obtenidas de la herramienta en línea Poly Phen 2 (Polymorphism Phenotyping v2) <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>

Figura 8.

Imagen de la simulación de la mutación *p.V39A* del gen *PRSS1* obtenida en línea con la herramienta PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2)^[3]



12.2.2 Gen *SPINK1*

En 2 casos sin historia previa de exposición a sustancias asociadas a toxicidad pancreática encontramos mutaciones únicamente en el gen *SPINK1*.

Uno de los casos presentaba la mutación *p.N34S* descrita en otras poblaciones y considerada un factor modulador de la enfermedad. Las mutaciones en este gen le confieren a los individuos portadores un umbral más bajo para presentar pancreatitis al ser expuestos a factores de riesgo de PA, un riesgo incrementado a desarrollar PAR, fibrosis, calcificaciones y PC a etapas o edades más tempranas comparados con aquellos sin mutaciones.

Considerando que ninguno de los familiares del portador de la mutación *p.V46D* la presentaba, esta podría ser una mutación *de novo*.

En esta mutación ocurre la sustitución de un aminoácido no polar por uno polar. De acuerdo a simulaciones computacionales de la herramienta PolyPhen 2 la predicción de daño es de 99.9% (sensibilidad 14% especificidad 99%) y no

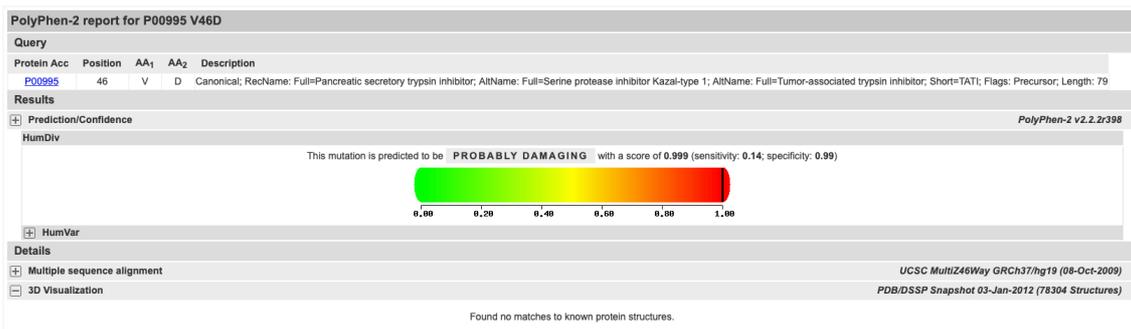
se encontraron estructuras protéicas conocidas, por lo que teóricamente esta mutación resulta en la ausencia o deficiencia total de inhibidor de tripsina. **Figura 9**

Mientras que las mutaciones descritas hasta ahora en el *SPINK1* en diferentes poblaciones parecen solo disminuir su capacidad inhibitoria sobre la tripsina activada, esta nueva mutación (*p.V46D*) al impedir la producción de SPINK1 podría ser suficiente para producir enfermedad, emulando los efectos de las mutaciones en el gen *PRSS1*.

Nuevamente, debido a que secuenciamos un limitado número de genes y exones, desconocemos si existen mutaciones adicionales que pudieran contribuir en la expresión y desarrollo de enfermedad pancreática. Por otra parte, estudios de paternidad (no realizados) ayudarían a determinar con certeza si esta es realmente una mutación *de novo*.

Figura 9

Imagen de la simulación de la mutación *p.V46D del gen SPINK1* obtenida en línea con la herramienta PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2) [4]



[4] Figura 9 Obtenida de la herramienta en línea Poly Phen 2 (Polymorphism Phenotyping v2) <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>

12.2.3 Gen *CFTR*

No encontramos mutaciones en el *CFTR* en los sujetos que estudiamos. Como las manifestaciones clínicas asociadas dependen del tipo de mutación, estas pueden causar pancreatitis con o sin manifestaciones típicas de fibrosis quística; se ha reportado que hasta 40% de sujetos con PCI tienen una mutación en este gen, por lo que es posible que ninguno de los sujetos estudiados presentara las mutaciones clásicas o más frecuentes.

Se han descrito cerca de 2000 variantes de mutaciones en el *CFTR* y algunas de ellas como las denominadas variantes de defectos en bicarbonato (Bicarbonate-defective variants) que provocan defectos selectivos en la secreción de bicarbonato (ej. *CFTR p.R75Q*) no se asocian con manifestaciones pulmonares.

Aún y cuando 99% de los portadores heterocigotos de estas permanecen aparentemente sanos, tienen un riesgo 3 a 4 veces mayor que la población general a desarrollar PC. Aquellos que desarrollan PAR o PC suelen tener mutaciones adicionales en el gen *SPINK1* y/o del quimiotripsinógeno catiónico C (*CTRC*)^{62,63}.

Durante y posterior a la realización del presente trabajo se reportaron mutaciones en otros genes regulados por la tripsina (gen del receptor sensor de calcio - *CaSR*, gen común del quimiotripsinógeno - *CTRC*) y gen claudina 2 - *CLDN2*). Las mutaciones en estos genes confieren un riesgo independiente bajo de pancreatitis, pero en combinación con otros factores se comportan como modificadores de la enfermedad^{64,65,66,67,68}.

En consistencia con otros reportes, nuestros resultados sugieren que existen variaciones poblacionales en la frecuencia, naturaleza y tipo de mutaciones en los genes *PRSS1*, *SPINK1* y *CFTR*.

Es necesario y recomendable realizar secuenciación completa de los genes asociados a PC. Los hallazgos permitirán: 1) mejorar nuestro entendimiento de los mecanismos patogénicos de la pancreatitis, 2) conocer la prevalencia y comportamiento clínico de estas mutaciones en la población Mexicana, 3) comparar y establecer la asociación de estas mutaciones con diferentes desenlaces clínicos de la PC a corto y largo plazo en sujetos con y sin ellas, y 4) identificar grupos que se beneficien de maniobras terapéuticas y de escrutinio individualizadas y oportunas.

13 CONCLUSIONES

La población mexicana con PC y/o PA idiopática recurrente de inicio temprano tienen mutaciones en los genes *PRSS1* y *SPINK1* similares a las reportadas en otras poblaciones.

Existen 3 mutaciones (2 *PRSS1* y 1 *SPINK1*) que pudieran ser únicas de la población mexicana.

La nueva mutación del *SPINK1* (p.V46D) podría ser un factor causal de PC, sin embargo esto requiere ser validado por otros estudios y descartar la presencia de otros factores ambientales y/o genéticos asociados.

14 Citas bibliográficas

¹ Petersen OH. Physiology of acinar cell secretion. Chapter 6 pp71-77. En Berger, Warshaw, Buchler, Kozarek, Lerch, Neoptolemos, Shiratori, Withcomb. The Pancreas An integrated textbook of basic science medicine and surgery. Blackwell 2008, 2nd edition.

² Quintanar M, Palacios A, Peláez-Luna M. Fisiología se la secreción pancreática y biliar. En Alexanderson., Aguilar Salinas C Estradas Trujillo JA. Fisiología de los sistemas Endocrino y Digestivo. Manual Moderno 2018 ISBN 9786074487367

³ Modlin, et al. History of pancreas. Chapter 2 pp 9-42. En Berger, Warshaw, Buchler, Kozarek, Lerch, Neoptolemos, Shiratori, Withcomb. The Pancreas An integrated textbook of basic science medicine and surgery. Blackwell 2008, 2nd

⁴ Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. Classification of acute pancreatitis 2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. Gut 2013;62:102-111.

⁵ Forsmark CE, Swaroop V, Wilcox CM. Acute pancreatitis. N Eng J Med 2016;375:1972-1981

⁶ Cavestro GM, Zuppardo RA, Bertolini S, *et al.* Connections between genetics and clinical data: Role of MCP-1, CFTR, and SPINK-1 in the setting of acute, acute recurrent, and chronic pancreatitis. Am J Gastroenterol 2010,105:199-206.

⁷ Whitcomb D, Frulloni L, Garg P, et al. Chronic pancreatitis: An international draft consensus proposal for a new mechanistic definition. Pancreatology 2016;16: 218-224

-
- ⁸ Sarles H, Adler G, Danir R, et.al The pancreatitis classification of Marseilles-Rome 1988. *Scand J Gastroenterol* 1989;24:641-642
- ⁹ Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001;120:682-707
- ¹⁰ Ammann RW. A clinically based classification system for alcoholic chronic pancreatitis: summary of an international workshop on chronic pancreatitis. *Pancreas* 1997;14:215-221.
- ¹¹ Robles-Diaz G, Vargas F, Uscanga L, et.al. Chronic Pancreatitis in Mexico City. *Pancreas* 1990;5:479-483
- ¹² Owyang C. Chronic pancreatitis. In Yamada T, Alpers D, Laine L, et.al *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia USA. Lippincot-Wilkins. 1999:2151.
- ¹³ Yadav D, Lowengels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2013; 144:1252-1261
- ¹⁴ Yadav D, O'Connell M, Papachristou GI. Natural History following the first attack of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1096-1103
- ¹⁵ Whitcomb DC. Genetics of alcoholic and nonalcoholic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28:501-506
- ¹⁶ Whitcomb DC Genetic Risk Factors for pancreatic disorders. *Gastroenterology* 2013 ;144:1292-1302
- ¹⁷ Withcomb D. Hereditary chronic pancreatitis. Beger H, Warshaw A, Buchler M, Kozarek R, Lerch M, Neoptolemos J, Shiratori K, Withcomb D, eds. in *The pancreas*. Massachusetts. Blackwell Publishing 2008:403-411
- ¹⁸ Howes N, Lerch M, Greenhalf W, et al. Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:252-261

-
- ¹⁹ Le Bodic L, Bignon JD, Ragueneas O, et.al The hereditary pancreatitis gene map to long arm of chromosome 7. *Hum Mol Genet* 1996;5:549-554
- ²⁰ Withcomb D, Peterson RA, Aston CE, et.al A gene for hereditary pancreatitis map to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 1996;110:1975-1980
- ²¹ Perrault J. Hereditary pancreatitis. Historical perspectives. *Med Clin N Am.* May 2000; 84(3):519-529
- ²² Teich N, Ockenga J, Keim V, et.al. Genetic risk factors in chronic pancreatitis. *J Gastroenterol* 2002;37:1-9
- ²³ Howes N, Greenhalf W, Rutherford S, et.al. A new polymorphism for the *R122H* mutation in hereditary pancreatitis. *Gut* 2001;48:247-250
- ²⁴ Pfützer RH, Barmada MM, Brunskill APJ, et.al *SPINK1/PST1* Polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2000;119:615-623
- ²⁵ Pfützer RH, Whitcomb DC. Trypsinogen mutations in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1999;117:1508-1509
- ²⁶ Shimosegawa T. Do point mutations in the *PSTI (SPINK1)* gene truly contribute to the pathogenesis of chronic pancreatitis? *J Gastroenterol* 2001;36:645-647
- ²⁷ Kuwata K, Hirota M, Sugita H, et.al Genetic mutations in exons 3 and 4 of the pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with pancreatitis. *J Gastroenterol* 2001;36:612-18
- ²⁸ Chen JM, Mercier B, Auderezet MP, Ferec C. Mutational analysis of the *human pancreatic secretory trypsin inhibitor PSTI* gene in hereditary and sporadic chronic pancreatitis. *J Med Genet* 2000;37:67-69

-
- ²⁹ Withcomb DC. Hereditary pancreatitis: new insights into acute and chronic pancreatitis. *Gut* 1999;45:317-322
- ³⁰ Withcomb DC, Gorry MC, Preston RA et.al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 1996;14:141-145
- ³¹ Bolognesi M, Gatti G, Menegatti E, et.al. Three dimensional structure of the complex between pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal type 1) and trypsinogen at 1.8 A resolution. Structure solution, crystallographic refinement and preliminary structural interpretation. *J Mol Biol* 1982;162:839-868
- ³² Noone P, Zhaoqing Z, Silverman L, et.al. Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: Relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. *Gastroenterology* 2001;121:1310-1319
- ³³ Sharer N, Schwarz M, Malone G, et.al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Eng J Med* 1998;339:645-652
- ³⁴ Cohn J, Friedman K, Noone P, et.al. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Eng J Med* 1998;339:653-658
- ³⁵ Freedman SD, Blanco P, Shea JC, et.al Mechanism to explain pancreatic dysfunction in cystic fibrosis. *Med Clin N Am* 2000;184:57-64
- ³⁶ Ockenga J,Stuhrmann M, Ballmann M, et.al Mutations of cystic fibrosis gene, but not cationic trypsinogen gene are associated with recurrent or chronic idiopathic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2061-7
- ³⁷ Gasiorowska A, Talar-Wojnarowska R, Czupryniak L, 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;56:894-901.

-
- ³⁸ Felderbauer P, Karakas E, Fendrich V, et al. Pancreatitis risk in primary hyperparathyroidism: relation to mutations in the *SPINK1 trypsin inhibitor N34S* and the cystic fibrosis gene. *Am J Gastroenterol* 2008;103:368-374
- ³⁹ Liu QC, Gao F, Ou QS et al. Novel mutation and polymorphism of *PRSS1* gene in the Chinese patients with hereditary pancreatitis and chronic pancreatitis. *Chin Med J* 2008;121:108-11
- ⁴⁰ Teich N, Mosner J, Keim V. Mutations of the *cationic trypsinogen* in hereditary pancreatitis. *Hum Mut* 1998;12:39-43
- ⁴¹ Gorry MC, Ghabbaizedeh D, Furey W, et al. Mutations in the *cationic trypsinogen* gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1063-1068
- ⁴² Feldebauer P, Schnekenburger J, Lebert R, et al. A novel *A121T* mutation in human cationic trypsinogen associated with hereditary pancreatitis: functional data indicating a loss of function mutation influencing the *R122H* trypsin cleavage site. *J Med Genet* 2008;45:507-512
- ⁴³ Midha S, Khajuria R, Shastri S, et al. Idiopathic chronic pancreatitis in India: phenotypic characterization and strong genetic susceptibility due to *SPINK1* and *CFTR* gene mutations. *Gut* 2010;59:800-807
- ⁴⁴ Schneider A, Pfutzer RH, Bramada RH, et al. Limited contribution of the *SPINK1 N34S* mutation to the risk and severity of alcoholic chronic pancreatitis: a report from the United States. *Dig Dis Sci* 2003;48:1110-1115
- ⁴⁵ Bernardino AL, Guarita DR, Mott CB et al. *CFTR*, *PRSS1* and *SPINK1* mutations in the development of pancreatitis in Brazilian patients. *JOP* 2003; 4:169-177

-
- ⁴⁶ Nishimori I, Kamakura M, Fujikawa-Adachi K, et.al. Mutations in exons 2 and 3 of the *cationic trypsinogen* gene in Japanese families with hereditary pancreatitis. *Gut* 1999;44:259-263
- ⁴⁷ Whitcomb DC. Genetic predispositions to acute and chronic pancreatitis. *Med Clin N Am* 2000;84(3):531-547.
- ⁴⁸ Sarner M, Cotton PB. Classification of pancreatitis. *Gut* 1984;25:756-759
- ⁴⁹ Debomoy K, Lahiria, , Steve Byea, John I. Nurnberger, Jr, et al. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1992; 25: 193-205
- ⁵⁰ Pho-lam T, Thongnoppakhun W, Yenchitsomanus PT, Limwongse C. A Thai family with hereditary pancreatitis and increased cancer risk due to a mutation in *PRSS1* gene. *World J Gastro* 2005;11:1634-1638.
- ⁵¹ Witt H, Luck W, Hennies HC, et al. Mutations in the gene encoding the *serine protease inhibitor Kazal type 1* are associated with chronic pancreatitis. *Nature Genet* 2000;25:213-216)
- ⁵² Cavestro M, Frulloni L, Fontana F, et al Association of *Spink-1 (N34S)* and *PRSS-1 (N29I and R122H)* gene mutations and chronic pancreatitis in Italy. *Gastroenterology* 2003; 124 (4) suppl 1: A-585
- ⁵³ Yoo B, Kim M, Lee S et.al Prevalence of *SPINK 1 (N34S)* mutation in pancreatitis in Korean *Gastroenterology* 2003; 124 (4) suppl 1: A585.
- ⁵⁴ Applebaum-Shapiro SE, Finch R, Pfützer RH, et al. Hereditary pancreatitis in North America: the Pittsburgh-Midwest Multi center Pancreatic Study Group Study. *Pancreatology* 2001;1:439-443

-
- ⁵⁵ Sibert, JR. Hereditary pancreatitis in England and Wales. *J Med Genet* 1978;15:189-201
- ⁵⁶ Guarner L, Molero X, Subirana L et al Low incidence of *PRSS1* and *SPINK1* mutations in patients with chronic pancreatitis in Spain. *Gastroenterology* 2003; 124 (4) suppl 1: A584
- ⁵⁷ Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, et al. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science* 2014;344:1280-1285
- ⁵⁸ Silva-Zolezzi I, Hidlago-Miranda A, Estrada-Gil J, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:8611-8616
- ⁵⁹ Zuñiga J, Yu N, Barquera R, et al. HLA class I and Class II conserved extended haplotypes and their fragments or blocks in Mexicans: implications for the study of genetic diversity in admixed populations. *PLOS one* 2013;8:e74442
- ⁶⁰ Juárez-Cedillo T, Zuñiga J, Acuña-Alonzo V, et al. Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci Int Genet* 2008;2:e37-e39
- ⁶¹ Pizarro JM, Villa M. International migration in Latin America and the Caribbean: A summary view of trends and patterns. UN Expert Group Meeting on International Migration and Development. Population Division. Department of Economic and Social Affairs. United Nations Secretariat, New York July 2005.
- ⁶² Rosendahl J, Landt O, Bernadova J, et al *CFTR*, *SPINK1*, *CTRC* and *PRSS1* variants in chronic pancreatitis: is the role of mutated *CFTR* overestimated? *Gut*. 2013;62:582-92.

-
- ⁶³ Cohn J. Reduced CFTR function and the pathobiology of idiopathic pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:s70-s77
- ⁶⁴ Tfelt-Hansen J, Brown EM. The calcium sensing receptor in normal physiology and pathophysiology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005; 42:35-70
- ⁶⁵ Hofer AM, Curci S, Doble MA, et al. Intracellular communication mediated by the extracellular calcium sensing receptor. *Nat Cell Biol* 2000; 2:392-398.
- ⁶⁶ Szmola R, Sahin Toth M. Pancreatitis associated *chymotrypsinogen C* (*CTRC*) mutant elicits endoplasmic reticulum stress in pancreatic acinar cells. *Gut* 2010;59:365-372
- ⁶⁷ Rosendahl J, Witt H, Szmola R, et al. *Chymotrypsin C* (*CTRC*) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet* 2008;40:78-82
- ⁶⁸ Whitcomb DC, LaRusch J, Devlin B, et al. Common genetic variants in the *CLDN2* and *PRSS1-PRSS2* loci alter risk for alcohol related and sporadic pancreatitis. *Nat Genet* 2012;44:1349-1354