

Trabalho Final do Mestrado Integrado em Medicina

Case Report

Diagnóstico diferencial de anemia ferropénica em gémeas: descrição de dois casos de IRIDA (Iron Refractory Iron Deficiency Anemia) e de uma nova mutação no gene *TMPRSS6*

Joana R. Santos Pinto

Orientador: Dr. João Madeira Lopes

Clínica Universitária de Medicina II.

Diretor: Prof. Rui M. M. Vitorino

CENTRO HOSPITALAR
LISBOA NORTE, EPE



2015/2016

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

Resumo

A IRIDA (Iron Refractory Iron Deficiency Anemia) é uma anemia hereditária, com expressão autossômica recessiva, do tipo ferropénico, cujo padrão microcítico e hipocrómico se associa a uma baixa saturação da transferrina, ferritina normal-alta e níveis inapropriadamente elevados da hormona hepcidina. Esta anemia é causada por variantes mutantes do gene *TMPRSS6* codificador da proteína matriptase II que influencia a expressão da hepcidina, uma proteína contrarreguladora do metabolismo do ferro.

Apresenta-se o caso de duas gémeas homozigóticas de 29 anos com anemia ferropénica, microcítica e hipocrómica com 20 anos de evolução e refratária tratamento com ferro oral. Este quadro sugeriu o diagnóstico de IRIDA, tendo-se identificado uma mutação do gene *TMPRSS6* nunca antes descrita localizada no intrão 11 (c.1396+4 A>T) e três polimorfismos do gene (D521D, V736A e Y739Y) já descritos como estando associados a um maior risco de desenvolvimento de anemia ferropénica.

Este caso vem corroborar a hipótese de que o síndrome clínico que acompanha a IRIDA poderá ser mais comum do que se pensava e a genética mais heterogénea que a descrita inicialmente.

Abstract

IRIDA (Iron Refractory Iron Deficiency Anemia) is an autosomal recessive ferropenic anemia. Its hypochromic microcytic pattern is associated with low transferrin saturation, normal-high ferritin and inappropriately high hepcidin. This anemia is caused by mutant variants of the *TMPRSS6* gene that encodes the protein matriptase II which influences hepcidin expression, an iron metabolism counter-regulatory protein.

We report the case study of two 29-year-old homozygous twins with ferropenic, hypochromic microcytic anemia with 20 years of evolution and refractory to oral iron therapy. This presentation suggested the IRIDA diagnosis and we identified a new, never before described, mutation of the *TMPRSS6* gene located in the intron 11 (c.1396+4 A>T) and three other polymorphisms (D521D, V736A e Y739Y) already associated with a higher risk of developing IDA (Iron Deficiency Anemia).

This case supports the hypothesis that the clinical syndrome that accompanies IRIDA might be more common than previously thought and its genetics more heterogeneous than initially described.

Introdução

A anemia ferropénica é uma entidade comum correspondendo mundialmente a cerca de 50% dos casos de anemia (1). Etiologicamente, é frequentemente relacionada com hemorragia ou malabsorção gastrointestinal (2). Contudo, o diagnóstico diferencial desta entidade tem vindo a sofrer alterações recentes. A descrição de entidades genéticas, de incidência conhecida crescente (1) obriga por vezes a considerar na marcha diagnóstica etiologias previamente tidas como raras.

A IRIDA (Iron Refractory Iron Deficiency Anemia) é uma anemia hereditária, com expressão autossómica recessiva, do tipo ferropénico, cujo padrão microcítico e hipocrómico se associa a uma baixa saturação da transferrina e níveis inapropriadamente elevados da hormona hepcidina. Porém, os níveis de ferritina encontram-se geralmente dentro do normal ou mesmo ligeiramente elevados após a terapêutica. A sua designação justifica-se por responder inadequadamente a terapêutica com formulações de ferro oral e apenas parcialmente a formulações parentéricas (3). A doença é causada por variantes mutantes do gene *TMPRSS6* que codifica a matriptase II, uma proteína transmembranar protease serina tipo II expressa maioritariamente nos hepatócitos e reguladora negativa da transcrição da hepcidina. Desta forma, a hepcidina encontra-se anormalmente elevada relativamente aos baixos níveis de ferro livre destes indivíduos (4).

Apresenta-se o caso de duas gémeas com IRIDA, com identificação de uma alteração intrónica nunca antes descrita localizada no intrão 11 (c.1396+4 A>T) que parece modular o *splicing* do gene pelas análises *in silico*. Adicionalmente foram encontrados três outros polimorfismos do gene já descritos como estando associados a um maior risco de desenvolvimento de anemia ferropénica (SNPs D521D, V736A e Y739Y) (5,6). A propósito do caso, apresenta-se igualmente a revisão bibliográfica desta entidade, com ênfase na sua integração na marcha diagnóstica de anemia ferropénica e identificação das estratégias terapêuticas mais adequadas à relação genótipo/fenótipo dos doentes com IRIDA.

Caso Clínico

Apresentam-se duas doentes do género feminino, gémeas homozigóticas, de 29 anos. Ambas tinham o diagnóstico de anemia crónica, com 20 anos de evolução, com níveis de hemoglobina sérica entre 8 e 10 g/dL. Cumpriram terapêutica marcial intermitente registando-se, após a mesma, níveis máximos de hemoglobina de 10 g/dL. Sem outros antecedentes pessoais ou familiares relevantes.

À anamnese referiam cansaço com cerca de 4 meses de evolução, menstruações regulares sem alterações de características ou quantidade, sem qualquer outro tipo de perdas hemáticas ou défices nutricionais. Ao exame objetivo, a salientar apenas mucosas descoradas.

Laboratorialmente, destacava-se anemia microcítica e hipocrómica, com o estudo do metabolismo do ferro compatível com anemia ferropénica em ambas. Sem outra alteração destacável. A evolução laboratorial de ambas ao longo da marcha diagnóstica encontra-se detalhada na tabela 1. O esfregaço de sangue periférico revelou anisopoiquilocitose e hipocromia. O estudo da auto-imunidade revelou-se negativo para a pesquisa de anticorpos anti-DS-DNA, ANA, anti-citoplasma MPO e PR3, assim como o estudo imunoquímico também negativo para anticorpos anti-gliadina (IgG e IgA) e anti-transglutaminase (IgA). Os anticorpos anti-*helicobacter pylori* eram negativos. Os doseamentos da hemoglobina A2 e F encontravam-se normais e não se encontraram eritroblastos periféricos. O estudo genético para a alfa e beta talassémias também se revelou negativo.

A endoscopia digestiva alta e colonoscopia não mostraram alterações macroscópicas. Os exames anatomopatológicos de biopsias cegas durante os respectivos exames endoscópicos revelaram uma arquitetura e população celulares em geral conservadas no duodeno, cólon descendente e reto. É descrito um ligeiro infiltrado linfocitário intraepitelial na mucosa duodenal sem atrofia vilositária associada. No cólon e reto também se relata um escasso infiltrado de células mononucleadas revelando-se estas alterações incharacterísticas.

Uma vez que a hepcidina e a transferrina não possuem doseamento disponível em Portugal e tendo em conta o alto nível de suspeição para a mutação do gene Tmprss6 requisitou-se, com o consentimento informado das doentes, o estudo deste ao Grupo de I&D em hemoglobinopatias, metabolismo do ferro e patologias

associadas da Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Este revelou uma variante de *splicing* correspondente a uma inversão (A>T) no intrão 11 (IVS 11+4 A>T). Esta alteração, nunca antes descrita, parece modular o *splicing* do gene nas análises *in silico* dando origem a um RNA que é degradado parcialmente, originando uma proteína matriptase II disfuncional. Para além desta nova mutação foram encontrados três polimorfismos do gene já descritos na literatura, os SNPs D521D, V736A e Y739Y (5,6)

Tendo em conta o quadro de ferropénia, foi-lhes instituída inicialmente terapêutica com sulfato ferroso 90 mg e ácido fólico 1 mg od. A reavaliação aos 6 meses após instituição da terapêutica revelou regressão do cansaço sem quaisquer outras queixas, objetivando-se uma subida de apenas 0,4 e 0,6 g/dL de hemoglobina. Um ano e meio após o início de terapêutica marcial observou-se uma subida de cerca de 1 g/dL de hemoglobina, com subida concomitante do volume globular médio e da hemoglobina globular média, acompanhada por elevação do ferro sérico e da ferritina.

	Apresentação		Follow-up (6 meses)		Follow-up (18 meses)	
	Gémea 1	Gémea 2	Gémea 1	Gémea 2	Gémea 1	Gémea 2
Hb (12.0-15.3 g/dL)	9,8	8,9	10,2	9,5	10,7	10,5
Htc (36.0-46.0 %)	31,6	29,2	32,2	30,0	34,9	33,9
VGM (80.0-97.0 fL)	68,1	64,7	68,0	66,3	75,4	73,2
HGM (27.0-33,0 pg)	21,1	19,7	21,7	20,9	23,2	22,7
CMHG (31.5-35.5 g/dL)	31,0	30,4	31,8	31,5	30,8	31,0
RDW (11.5-14.5 CV%)	18,1	18,5	17,2	17,2	16,4	16,42
Ferro (50-170 ug/dL)	19,2	11,2	-	-	16,4	-
CTFF (250-450 ug/dL)	430	395	-	-		-
Ferritina (10-291 ng/mL)	6,1	7,0	-	-	11,1	-
Vit B12 (210-910 pg/mL)	447	524	-	-	515	-
Folatos (> 5.4 ng/mL)	4,9	5,2	-	-	14,8	24,0
Reticulócitos (%)	2	0,9	-	-	-	-

Tabela 1: Estudo analítico à apresentação e *follow-up* das gémeas e valores de referência

Discussão

Finberg *et al.* associaram pela primeira vez em 2008 as mutações do gene *TMPRSS6* ao quadro clínico da anemia ferropénica que intitularam IRIDA (3). Desde então foram identificadas 51 famílias com 74 doentes de diferentes origens étnicas representando um total de 58 mutações diferentes do gene *TMPRSS6* (7) pensando-se que a prevalência de IRIDA seja inferior a 1:1000000 (5). No entanto, a correlação entre o genótipo e o fenótipo ainda não foi estabelecida nesta doença (3).

A hepcidina, uma hormona expressa pelo fígado e descrita em 2000, tem um papel central na manutenção da homeostase e regulação do metabolismo do ferro. A ação da hepcidina no metabolismo do ferro exerce-se primariamente através da sua ligação à ferroportina, uma molécula exportadora de ferro nos mamíferos expressa ao nível da membrana basolateral dos enterócitos e da membrana celular dos macrófagos. Quando presente, a hepcidina provoca internalização e degradação da ferroportina anulando a sua ação (8). Em condições fisiológicas, na presença de ferroportina, o ferro ligado à transferrina [Fe (III) - Tf] pode ser rapidamente transferido para o meio intracelular através do receptor da transferrina (TfR1) (2). A inativação da ferroportina limita a libertação de ferro dos enterócitos, das reservas nos hepatócitos e dos macrófagos do sistema reticulo-endotelial para o sangue (8).

A matriptase-2 (MT-2) é codificada pelo gene *TMPRSS6* (transmembrane protease serine 6) localizado no braço longo do cromossoma 22 (22q12-13). Em modelos animais demonstrou-se o papel da MT-2 na expressão da hepcidina, pela capacidade de clivar a hemojuvelina (HJV). A HJV é uma proteína que atua como coreceptor de uma BMP (bone morphogenic protein) motivando a transcrição do gene *hamp* (*hepcidin anti-microbial peptide*), o gene codificador da hepcidina (4). A matriptase-2 é uma proteína complexa sujeita a um processo de ativação pós síntese, o que lhe confere uma susceptibilidade aumentada a mutações e polimorfismos do gene que a codifica e que poderão afectar significativamente a sua função de clivagem da HJV (9). A não clivagem da HJV resultará na ativação dos mecanismos intracelulares de transcrição e sobre-expressão da hepcidina (10) e consequente diminuição da expressão da ferroportina que explica o desenvolvimento de ferropénia e falta de resposta ao ferro oral nos pacientes com IRIDA. Note-se que o ferro administrado parentericamente é processado e transportado pelos macrófagos, um transporte que

também é parcialmente dependente da ferroportina e que poderá justificar a resposta incompleta às formulações parentéricas (4).

O caso reportado corresponde a um caso de IRIDA no qual foi identificada uma nova mutação do gene *TMPRSS6* localizada no intrão 11 (c.1396+4 A>T) e 3 outros SNPs (Single Nucleotide Polimorfisms) já descritos como estando associados a maior risco de desenvolvimento de anemia ferropénica (D521D, V736A e Y739Y) (5,6). Apesar da IRIDA ter sido descrita como uma doença autossómica recessiva causada por duas mutações heterozigóticas ou uma mutação em homozigotia do gene *TMPRSS6* (11) têm sido descritos na literatura alguns casos em que este padrão genético não se verifica exatamente mas em que a clínica é a de IRIDA (7).

Comparativamente à IDA (Iron Deficiency Anemia), o diagnóstico de IRIDA é raro, com uma incidência estimada inferior a 1% do total das IDAs (12), a maioria dos casos reportados em crianças (2). Apesar das mutações serem raras, estudos recentes têm revelado uma incidência elevada de polimorfismos do gene *TMPRSS6* (SNPs) em populações com IDA comparativamente às populações sem IDA concluindo-se que os SNPs representam possíveis factores de risco para o seu desenvolvimento (5).

No presente caso, de acordo com a informação disponibilizada durante a codificação de RNA, a localização da mutação (c.1396+4 A>T) do gene *TMPRSS6* condiciona o *splicing* do mesmo, provocando introdução de um codão *stop* prematuro na transcrição do gene, originando um mRNA que é eliminado antes do processo de síntese proteica da MT-2. A presença adicional dos 3 SNPs, a clínica e a resposta fraca e lenta à terapêutica marcial assemelha-se a outros casos de IRIDA já descritos na literatura (5,7,13). Nai *et al.* demonstraram em modelos animais que ratinhos com apenas uma mutação do gene *TMPRSS6* tinham uma predisposição aumentada para o desenvolvimento de anemia comparativamente aos seus pares (14). Pellegrino *et al.* apresentaram um estudo familiar em que a combinação de uma mutação do gene *TMPRSS6* associada a 2 ou mais SNPs poderá apresentar-se clinicamente como IRIDA. Curiosamente, a presença de uma mutação ou de 2 ou mais polimorfismos separadamente condicionavam uma suscetibilidade aumentada para IDA mas em nenhum dos casos um quadro de IRIDA (13).

A anemia refratária ao ferro oral é definida como uma resposta fraca, lenta e incompleta à terapêutica, com uma melhoria inadequada dos parâmetros hematológicos (8). Apesar da maioria dos autores não o fazer, Camaschella *et al.*

definem-na como um aumento inferior a 1 g/dL de hemoglobina após 4 a 6 semanas de tratamento com o ferro oral equivalente a 100 mg/dia de ferro elementar (12,15). Tendo excluído outras causas de ferropénia, este achado analítico associado ao padrão ferropénico típico da IRIDA (baixa saturação da transferrina, ferritina normal-baixa ou normal e níveis inapropriadamente altos de hepcidina) e história familiar de IDA deve fazer apontar para esta entidade (4). Nas duas gémeas, após 18 meses de terapêutica com ferro oral, não se obtiveram aumentos significativos nos parâmetros hematológicos e manteve-se analiticamente o padrão de anemia (Hb 10,7 e 10,5 g/dL) e ferropénia, com siderémia baixa (16,4 ug/dL) e ferritina no limite inferior da normalidade (11,1 ng/mL) confirmando tratar-se de uma resposta incompleta ao tratamento típica dos pacientes com IRIDA.

Atualmente não estão definidos valores de referência para a hepcidina em indivíduos saudáveis. Bregman *et al.* reportaram que a resposta ao ferro oral em pacientes com IDA pode ser prevista pelos níveis basais de hepcidina e que níveis superiores a 20 ng/dL representavam uma probabilidade de 81,6% de ausência de resposta a ferro oral. Por sua vez, 2/3 destes doentes responderiam a ferro intravenoso (16). Presentemente, o doseamento da hepcidina não se encontra facilmente disponível na prática clínica. O doseamento dos níveis de hepcidina-25 no sangue ou na urina só é possível de forma fidedigna através do método ELISA. No entanto, o tamanho reduzido da molécula alvo (25 aminoácidos) e a dificuldade de obtenção de resposta imune nos modelos hospedeiros pela grande conservação genética entre as espécies constituem um obstáculo à obtenção do anticorpo e comercialização do teste (17). Serão necessários mais estudos para se obter um método padrão custo-eficaz de doseamento da hepcidina.

O diagnóstico de IRIDA só pode ser comprovado através da pesquisa da mutação do gene Tmprss6. No entanto, reconhece-se a possibilidade do doseamento padronizado da hepcidina orientar para uma potencial resistência à terapêutica marcial. Na prática clínica este achado é relevante na escolha da terapêutica mais adequada para um indivíduo com anemia ferropénica refratária evitando a terapêutica crónica com ferro oral assim como os *follow-ups* inerentes desnecessários.

Relativamente às opções terapêuticas para os pacientes com IRIDA, o ferro endovenoso é atualmente a opção mais viável. As novas formulações de ferro

parentérico (gluconato de ferro e óxido de ferro sacarosado) apresentam menos efeitos adversos e uma resposta mais rápida comparativamente ao ferro dextrano de alto peso molecular ao qual são frequentes reações de hipersensibilidade (12). Adicionalmente, o ferro parentérico tem a particularidade de ser transportado diretamente para os precursores eritropoiéticos através de transportadores como a transferrina fazendo um *bypass* ao sistema reticuloendotelial (18). Conclui-se que esta opção terapêutica deverá ser ponderada tendo em conta os benefícios e potenciais riscos em doentes com fraca resposta ao ferro oral.

Na impossibilidade de doseamento da hepcidina ou da realização do teste genético do gene *TMPRSS6*, a resposta à terapêutica parentérica com ferro poderá ser útil na distinção entre uma IDA inexplicada refratária ao ferro oral e uma IRIDA. Ao contrário da primeira, a IRIDA é apenas parcialmente responsiva ao ferro parentérico, esperando-se uma melhoria mais lenta dos parâmetros hematopoiéticos do que seria espectável num indivíduo com IDA, mas significativamente melhor que a obtida previamente com o ferro oral (19). Este método acrescenta à sua utilidade diagnóstica o benefício terapêutico.

Cau *et al.* apresentaram o caso de uma criança do sexo feminino com 5 meses de idade, com uma mutação em homozigotia do gene *TMPRSS6* sem resposta ao ferro oral e parcial ao ferro parentérico que respondeu ao ferro oral suplementado com ácido ascórbico (20). Embora seja necessária uma maior evidência da sua validade terapêutica, em pacientes em que a terapêutica com ferro parentérico é contraindicada, esta suplementação poderá estar indicada. Apesar dos resultados promissores da terapêutica com eritropoietina recombinante (rhEPO) em pacientes com anemia crónica refratária esta não se comprovou eficaz no aumento da hemoglobina ou da *clearance* da hepcidina em pacientes com IRIDA (21).

Atualmente, pela sua influência em múltiplas patologias, a hepcidina constitui um *target* terapêutico. Um anticorpo monoclonal anti-FPN1 desenvolvido para bloquear a ligação da hepcidina à porção FPN1 da ferroportina mostrou aumentar a *clearance* da hepcidina e diminuir os seus níveis séricos em macacos (22). Uma forma solúvel da HJV foi usada para competir com a HJV endógena e assim inibir a expressão da hepcidina em ratinhos (23). No entanto, não existe validação destas terapêuticas em humanos. Estas poderão ser potencialmente aplicadas em pacientes com IRIDA em que os elevados níveis de hepcidina constituem a causa inicial e de

perpetuação da anemia e da sua fraca resposta aos métodos terapêuticos tradicionais. Reconhece-se também a utilidade destas terapêuticas noutras anemias como a da doença renal crónica (24).

Este caso vem corroborar a hipótese de que o síndrome clínico que acompanha a IRIDA poderá ser mais comum do que se pensava e a genética mais heterogénea que a descrita inicialmente (25). Serão necessários mais estudos de *pedigree* e de relação genótipo/fenótipo como o realizado por De Falco *et al.* (2014) que comprovou que diferentes mutações têm impacto distinto na gravidade do fenótipo e resposta ao tratamento (3).

Até ao momento, o diagnóstico de IRIDA foi sempre realizado após uma fraca resposta ao ferro oral ou perante uma suspeita familiar protelando-se, na maioria das vezes, a instituição da terapêutica endovenosa. Esta realidade ilustra a necessidade de estabelecimento de critérios universalmente aceites que, independentemente da confirmação do diagnóstico de IRIDA, definam uma resposta inadequada ao ferro oral e a necessidade de administração de ferro endovenoso.

Futuramente, no que toca às perspetivas diagnósticas, assume-se que o doseamento da hepcidina poderá fazer parte do conjunto de exames complementares requisitados na abordagem dos doentes com anemia ferropénica. Para além de poder fazer suspeitar do diagnóstico de IRIDA, permite prever uma potencial fraca resposta à terapêutica com ferro oral, evitando o adiamento da resolução da anemia e melhoria do quadro clínico. Desta forma, impõe-se a necessidade de desenvolvimento de um método padrão custo-eficaz de doseamento da hepcidina e a possibilidade da sua requisição na prática clínica.

Apesar da terapêutica endovenosa resolver o quadro anémico na maioria dos casos, admite-se a possibilidade futura da utilização de terapêuticas alternativas a esta, nomeadamente as que têm como objectivo reduzir o efeito deletério dos níveis excessivamente elevados de hepcidina.

Tendo em conta a elevada prevalência da anemia ferropénica (1), os resultados obtidos nos pequenos e escassos estudos populacionais que a relacionaram com a heterogeneidade genética do gene *TMPRSS6* e o caso apresentado, assume-se que o diagnóstico de IRIDA deverá entrar no diagnóstico diferencial da mesma. Não obstante, apesar da relevância clínica do doseamento da hepcidina, o estudo genético do gene *TMPRSS6* assume uma importância crucial, permitindo o diagnóstico

definitivo da doença. Só desta forma será possível a obtenção dos dados que fundamentem novos e mais alargados estudos populacionais assim como uma estimativa realista da incidência da doença.

Agradecimentos

À *Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa*, ao *corpo docente*, *direção e administração* pelo seu mérito e ética e pelo ambiente desafiante que proporcionaram o substrato para a construção de um carácter pró-ativo e resiliente.

Ao *Dr. João Madeira Lopes* pela sua orientação, apoio e disponibilidade de transmissão de opiniões e críticas imprescindíveis à manutenção do rigor científico e académico do trabalho.

Ao *Dr. Gustavo Nobre de Jesus* pela sua amabilidade, dedicação e apoio na resolução dos problemas e desconstrução das dúvidas, sem o qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

À *Prof.^a Paula Faustino* pela sua receptividade e disponibilização de resultados e respostas às questões em que se baseou esta Tese.

Aos *meus amigos* pelo companheirismo, força e suporte nos momentos difíceis.

Aos *meus pais* por representarem o modelo de coragem e resiliência, pelo seu amor, dedicação, incentivo e apoio incondicional indispensáveis à superação dos obstáculos que surgiram ao longo desta caminhada.

Bibliografia

1. Benoist B., McLean E., Egli I. and Cogswell M. (2005) WHO. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. World Health Organization Global Database on Anaemia
2. De Falco L., Sanchez M., Silvestri L., Kannengiesser C., Muckenthaler M.U., Iolascon A., *et al.* (2013) Iron refractory iron deficiency anemia. *Haematologica* 98(6):845–53.
3. De Falco L., Silvestri L., Kannengiesser C., Morán E., Rausa M., Bruno M., *et al.* (2014) Functional and Clinical Impact of Novel Tmprss6 Variants in Iron-Refractory Iron-Deficiency Anemia Patients and Genotype–Phenotype Studies. *Human Genome Variation Society Journal* 2009:1–27.
4. Keskin E.Y. and Yenicesu İ. (2015) Iron-Refractory Iron Deficiency Anemia. *Turkish Journal of Hematology* 32(1):1–14.
5. Poggiali E., Andreozzi F., Nava I., Consonni D., Graziadei G., Cappellini M.D. (2015) The role of TMPRSS6 polymorphisms in iron deficiency anemia partially responsive to oral iron treatment. *American Journal of Hematology* 90(4): 306–309
6. Wang C-Y, Meynard D. and Lin H.Y. (2014) The role of TMPRSS6/matriptase-2 in iron regulation and anemia. *Frontiers in Pharmacology* 5(May):114
7. Xiong Y., Wu Z., Yang W., Zhao X., Peng G., Tang K., Tian Z., Xing H., Rao Q., Wang M., Wang J. and Zhang F. (2015) A novel splicing mutation of TMPRSS6 in a Chinese child with iron-refractory iron deficiency anaemia. *British Journal of Haematol.* 171:2012–4.
8. Heeney M. M. and Finberg K.E. (2014) Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Hematology/Oncology Clinics of North America* 28(4):637–52.
9. Zhao N., Zhang A. S. and Enns C. A. (2013) Iron Regulation By Heparin. *The Journal of Clinical Investigation* 123(6):2337–43.
10. Rishi G., Wallace D. F. and Subramaniam V.N. (2015) Heparin: regulation of the master iron regulator. *Bioscience Reports* 35(3):1–12.
11. Finberg K. E., Heeney M. M., Campagna D. R., Aydinok Y., Pearson H. A., Hartman K. R., *et al.* (2008) Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron

- deficiency anemia (IRIDA). *Nature Genetics*. 40(5):569–71.
12. Camaschella C. (2015) Iron-Deficiency Anemia. *New England Journal of Medicine* 372:1832–43.
 13. Pellegrino R. M., Coutinho M., D’Ascola D., Lopes A. M., Palmieri A., Carnuccio F., Costa M., Zecchina G., Saglio G., Costa E., Barbot J., Porto G., Pinto J. P. and Roetto A. (2012) Two novel mutations in the *tmprss6* gene associated with iron-refractory iron-deficiency anaemia (IRIDA) and partial expression in the heterozygous form. *British Journal of Haematology* 158:668–71.
 14. Nai A., Pagani A., Silvestri L. and Camaschella C. (2010) Increased susceptibility to iron deficiency of *Tmprss6*-haploinsufficient mice. *Blood* 116(5):851–2.
 15. Hershko C. and Camaschella C. (2014) How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. *Blood* 123(3):326–33.
 16. Bregman D.B., Morris D., Koch T. A., He A. and Goodnough L.T. (2013) Hepcidin levels predict nonresponsiveness to oral iron therapy in patients with iron deficiency anemia. *American Journal of Hematology* 88(2):97–101.
 17. Signorini L and Signorini L. (2015) Hepcidina: Um hormônio essencial à homeostase do ferro. *Revista NewsLab Jun-Jul/15:44-46*.
 18. Bregman D. B. and Goodnough L.T. (2014) Experience with intravenous ferric carboxymaltose in patients with iron deficiency anemia. *Therapeutic Advances in Hematology* 5(2):48–60.
 19. Akin M., Sarbay H., Guler S., Balci Y. I. and Polat A. (2016) Response to parenteral iron therapy distinguish unexplained refractory iron deficiency anemia from iron-refractory iron deficiency anemia. *International journal of laboratory hematology* 38(2):167–71.
 20. Cau M., Galanello R., Giagu N. and Melis M. A. (2012) Responsiveness to oral iron and ascorbic acid in a patient with IRIDA. *Blood Cells, Molecules, and Diseases journal* 48(2):121–3.
 21. Lehmborg K., Grosse R., Muckenthaler M.U., Altamura S., Nielsen P., Schmid H., *et al.* (2013) Administration of recombinant erythropoietin alone does not improve the phenotype in iron refractory iron deficiency anemia patients. *Annals of hematology* 92(3):387–94.

22. Xiao J. J., Krzyzanski W., Wang Y-M., Li H., Rose M. J., Ma M., *et al.* (2010) Pharmacokinetics of anti-hepcidin monoclonal antibody Ab 12B9m and hepcidin in cynomolgus monkeys. *The AAPS journal* 12(4):646–57.
23. Babitt J. L., Huang F. W., Xia Y., Sidis Y., Andrews N. C. and Lin H. Y. (2007) Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *The Journal of Clinical Investigation* 117(7):1933–9.
24. Tsuchiya K. and Nitta K. (2013) Heparin is a potential regulator of iron status in chronic kidney disease. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 17(1):1–8.
25. Roetto A. and Porto G. (2013) A novel mutation in the CUB sequence of matriptase-2 (TMPRSS6) is implicated in iron-resistant iron deficiency anaemia - response to Jaspers *et al.* *British Journal Haematology* 160(4):566-7.