



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**Impacto clínico dos polimorfismos do gene
TMPRSS6
Uma revisão sistemática e *case report***

Miguel Ferreira de Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Lina Maria Jesus Ferreira Cardoso Ramos

Covilhã, Março de 2018

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Lina Maria Jesus Ferreira Cardoso Ramos, pela sua orientação neste trabalho, pela curiosidade que me incutiu pela Genética Clínica desde a primeira aula, pelo estágio que me permitiu desenvolver as minhas capacidades nesta área e pelo gosto e paixão pela genética que me transmitiu em cada conversa.

Ao Dr. Henrique Coelho, do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, pelo estágio extracurricular que me permitiu realizar no seu serviço de Hematologia, por ter feito todos os possíveis por levar as minhas capacidades a novos limites, pela confiança depositada em mim, por toda a sua disponibilidade e dedicação. A passagem por este estágio e o caso que me deu para investigar e apresentar, foram a origem deste trabalho.

A toda a equipa de Genética Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra por me terem recebido no seu serviço no meu estágio opcional de 5º ano. Os conhecimentos adquiridos nesse período foram fulcrais na minha formação e influência central nos meus objetivos pessoais a nível profissional.

Aos meus amigos e colegas de curso, por todos os momentos de partilha de conhecimentos, frustrações e alegrias, que em muito facilitaram esta etapa.

À minha irmã, Raquel Ferreira de Oliveira, uma das pessoas mais brilhantes que conheço, por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho e por todas as suas sugestões, que em muito valorizaram este trabalho.

À minha namorada e amiga, Ana Patrícia Oliveira Gomes, por ter sido um porto de abrigo e fonte de apoio incondicional, sem quem este trabalho e este curso jamais teriam sido concluídos. Não tenho palavras que possam descrever o quão determinante foi em todo este percurso académico nem o quão essencial é para mim.

Aos meus pais, Élia e Nuno Oliveira... Por tudo, estarei eternamente agradecido.

Resumo

O objetivo desta revisão foi avaliar o impacto clínico dos polimorfismos de base única do gene *TMPRSS6* nos parâmetros eritrocitários e no metabolismo do ferro e ir para além destas áreas e estudar os seus efeitos noutras patologias como a hemocromatose hereditária, fígado gordo não alcoólico, síndrome de pica, talassemias não dependentes de transfusão sanguínea, poliendocrinopatias autoimunes, doença de Parkinson, anemia da doença renal crónica, neoplasias e diabetes mellitus tipo 2. Foi efetuada uma revisão sistemática da bibliografia utilizando as bases de dados *PubMed* e *PMC*, tendo a pesquisa obtido 177 e 530 artigos, respetivamente. Destes, 36 foram incluídos na revisão.

Foi obtido um número de estudos significativo sobre os efeitos dos polimorfismos nos parâmetros eritrocitários e no metabolismo do ferro, o que levou a uma proposta de modificação do algoritmo de diagnóstico e tratamento da anemia ferropénica. Nas restantes patologias, embora o número de estudos para cada uma fosse reduzido, identificaram-se efeitos relevantes destes polimorfismos, com forte influência no prognóstico, principalmente no caso da hemocromatose hereditária e neoplasia da mama. Investigação adicional é necessária para clarificar estes efeitos.

É também apresentado um *case report* de um caso de anemia ferropénica que espelha a importância desta temática na prática clínica.

Palavras-chave

TMPRSS6; Ferro; Matriptase-2; Anemia; Polimorfismo.

Abstract

The aim of this review was to assess the clinical impact of *TMPRSS6* single nucleotide polymorphisms on blood and iron parameters and go beyond these areas and evaluate their effects on other pathologies such as hereditary hemochromatosis, non-alcoholic fatty liver disease, Pica syndrome, non-transfusion dependent thalassemias, polyendocrine autoimmune syndromes, Parkinson's disease, anemia of chronic kidney disease, cancer and type 2 diabetes mellitus. A systematic review was conducted using the PubMed and PMC databases which yielded 177 and 530 articles respectively. Of these, 36 were included in the review. Sufficient studies addressing the effects on blood and iron parameters were included to warrant a suggestion of iron deficiency anemia diagnostic and treatment algorithm change. On other pathologies, although the studies were few for each pathology and not all had a large number of participants, they show relevant effects of these variants, with strong prognostic effect on hereditary hemochromatosis and breast cancer mainly. Additional research is needed to clarify the role of these polymorphisms.

A case report of a patient with iron deficiency anemia is also included to provide an example of how relevant this matter can be in clinical practice.

Keywords

TMPRSS6; Ferro; Matriptase-2; Anemia; Polimorfismo.

Índice

Introdução	1
Métodos	2
Desenvolvimento	3
1. Parâmetros eritrocitários e metabolismo do ferro	3
2. <i>Case Report</i>	6
3. Outras Patologias	7
Conclusão	10
Bibliografia	13
Anexos	17

Lista de Figuras

Figura 1. - Algoritmo proposto para o tratamento da anemia ferropénica

11

Lista de Acrónimos

<i>TMPRSS6</i>	Gene <i>Transmembrane Protease, Serine 6</i>
	Online Mendelian Inheritance in Man. Base de dados atualizada constantemente que visa catalogar genes e patologias genéticas, com foco na relação genótipo-fenótipo. O uso do símbolo * antes de um número indica um gene. O símbolo # indica que se trata de uma descrição não associada a um gene ou <i>locus</i> . O símbolo % indica que se trata de uma descrição de um fenótipo mendeliano confirmado ou um <i>locus</i> associado a um fenótipo, mas sem mecanismo molecular conhecido
<i>OMIM</i>	
<i>BMP</i>	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
<i>HJV</i>	Hemojuvelina
<i>SMAD</i>	<i>Sons of Mothers Against Decapentaplegic homologs</i>
<i>mRNA</i>	Ácido Ribonucleico Mensageiro
<i>IRIDA</i>	<i>Iron Refractory Iron Deficiency Anemia</i>
<i>VGM</i>	Volume Globular Médio
<i>ST</i>	Saturação de Tranferrina
<i>GWAS</i>	<i>Genome Wide Association Studies</i>
<i>SNP</i>	Single Nucleotide Polymorphism
<i>MAF</i>	<i>Minor allelic frequency</i>
<i>VarSome</i>	Motor de busca de variantes genómicas
<i>dbSNP</i>	Base de dados de <i>SNPs</i>
<i>ClinVar</i>	Base de dados de relações entre variantes genómicas e a saúde humana
<i>HGVS</i>	<i>Human Genome Variation Society</i>
<i>Hb</i>	Hemoglobina
<i>RDW</i>	<i>Red cell Distribution Width</i> /dispersão do volume eritrocitários
<i>CHCM</i>	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
<i>FS</i>	Ferro Sérico
<i>HCM</i>	Hemoglobina Corpuscular Média
<i>TF</i>	Gene da Transferrina
<i>HFE</i>	Gene <i>HFE</i>
<i>AF</i>	Anemia Ferropénica
<i>HH</i>	Hemocromatose Hereditária
<i>FGNA</i>	Fígado Gordo Não Alcoólico
<i>TNM</i>	Sistema de notação utilizado na classificação de tumores em que a letra T representa o tamanho do tumor, a letra N representa os gânglios linfáticos com invasão tumoral e a letra M representa a presença de metástases

Introdução

O gene *TMPRSS6* (OMIM *609862), localizado no braço longo do cromossoma 22, na posição 12.3, codifica a protease de serina transmembranar tipo II matriptase-2.¹ A matriptase-2 é o regulador negativo da produção de hepcidina - hormona chave na regulação do metabolismo do ferro.² Em resposta a excesso de ferro no organismo, a hepcidina é *up-regulated* através da via *bone morphogenic protein (BMP)-hemojuvelin (HJV)-sons of mothers against decapentaplegic homologs (SMAD)*. A matriptase-2 cliva a hemojuvelina³, inibindo, por conseguinte, a produção de hepcidina. A expressão de *mRNA TMPRSS6* é *up-regulated* em condições de hipoxia e pela eritropoietina e é suprimida por condições de inflamação.³ A matriptase-2 também tem a capacidade de degradar determinados componentes da matriz extracelular, tais como a fibronectina, colagénio tipo I e fibrinogénio.²

A inativação do gene *TMPRSS6* é responsável pela entidade patológica conhecida como anemia ferropénica refratária ao ferro/*iron refractory iron deficiency anemia (IRIDA, OMIM #206200, ORPHA209981)*. A *IRIDA* é caracterizada por anemia microcítica e hipocrómica congénita, volume globular médio (VGM) muito baixo, saturação de transferrina (ST) reduzida e anormal absorção de ferro caracterizada por ausência de melhoria hematológica após tratamento com ferro oral e resposta incompleta ao ferro parentérico.⁴ Vários *Genome Wide Association Studies (GWAS)* identificaram uma associação entre *Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)* no gene *TMPRSS6* e parâmetros eritrocitários e do metabolismo do ferro⁵⁻¹¹ e estudos subsequentes encontraram associação também com os valores séricos de hepcidina³ e excreção urinária de hepcidina.¹² Estas associações variam com a população em estudo. *Minor allelic frequencies (MAF)* de cada *SNP* são significativamente diferentes entre as várias etnias. Existe também pouca informação relativamente aos efeitos da presença de mais do que um *SNP* concomitantemente num indivíduo. É apresentado um caso que, para além de espelhar os efeitos destes *SNPs* nos parâmetros eritrocitários e no metabolismo do ferro, aborda este último ponto.

Estudos recentes, indicam que os *SNPs* do gene *TMPRSS6* têm um papel relevante em doenças de sobrecarga de ferro como a hemocromatose hereditária¹³ e as talassemias não dependentes de transfusões sanguíneas¹⁴, na anemia da doença renal crónica em pacientes em hemodiálise¹⁵, no prognóstico do fígado gordo não alcoólico¹⁶ e na fisiopatologia da síndrome de pica.^{17,18} Também parece haver uma associação com as poliendocrinopatias autoimunes¹⁹ e com o risco de desenvolver doença de Parkinson²⁰ assim como com a diabetes mellitus tipo 2²¹ e os níveis de hemoglobina glicada.²²

À semelhança da matriptase-1, relativamente à qual foi demonstrado um importante papel em várias neoplasias, a matriptase-2 foi implicada na carcinogénese e progressão tumoral em neoplasias da mama e próstata. Embora ainda existam poucos estudos, os *SNPs* do gene *TMPRSS6* parecem ter um papel bastante importante.²³⁻²⁵

O objetivo desta revisão é esclarecer os efeitos dos *SNPs* do gene *TMPRSS6* nos parâmetros eritrocitários e no metabolismo do ferro identificados nos *GWAS* e estudos subsequentes,

abrangendo as várias etnias, e ir além destes efeitos já conhecidos e identificar o seu impacto clínico noutras patologias e identificar áreas onde estudos adicionais são necessários.

Métodos

Modo de pesquisa

Foi realizada uma pesquisa eletrónica da literatura utilizando as bases de dados *PubMed* e *PMC*. Utilizou-se unicamente o termo “*TMPRSS6*”, de modo a obter o maior número de artigos possível. Os estudos foram selecionados inicialmente com base no título e leitura rápida do *abstract*. Posteriormente, os *abstracts* foram analisados pormenorizadamente e os critérios de elegibilidade foram aplicados.

Crítérios de elegibilidade

Só foram considerados artigos publicados até junho de 2017. O primeiro passo na seleção dos artigos foi a exclusão de duplicados e análise dos títulos e *abstracts*, seguidamente. Os artigos foram considerados quando eram trabalhos de pesquisa originais (incluindo *case reports*), restritos à espécie humana e referentes a *SNPs* no gene *TMPRSS6* e seu papel nos parâmetros eritrocitários e no metabolismo do ferro ou que fossem referentes a efeitos noutros parâmetros ou em determinada patologia. Artigos exclusivamente referentes a *IRIDA* foram excluídos. Apenas artigos disponíveis na sua totalidade e de acesso livre foram incluídos. Os artigos elegíveis foram lidos integralmente e toda a informação e dados relevantes foram extraídos. Os *SNPs* encontrados nos estudos foram pesquisados nas bases de dados *VarSome*, *dbSNP* e *ClinVar* para identificação do número da *Human Genome Variation Society* (HGVS) e para verificação das alterações da cadeia de DNA e sequência de aminoácidos. *SNPs* não presentes nas bases de dados foram excluídos.

Resultados

Utilizando o referido termo de pesquisa, foram obtidos 177 artigos na base de dados *PubMed* e 530 na *PMC*. Destes, foram excluídos 650 por não apresentarem relação com o tema ou não cumprirem os critérios de elegibilidade após leitura breve do *abstract*. Dos 57 selecionados, após aplicação dos critérios de elegibilidade, foram incluídos 36 na revisão. A informação relativamente aos *SNPs* abordados na revisão é apresentada no Anexo 1.

Case Report

Os dados presentes no *case report* foram obtidos por consulta do processo clínico e em discussão com o seu médico assistente. A paciente assinou um consentimento informado para utilização dos seus dados, se devidamente anonimizados. A análise do *case report* foi baseada nos artigos constantes da revisão efetuada. Foi feita uma pesquisa adicional utilizando o motor de busca *Google* e o termo de pesquisa *TMPRSS6*, restringindo a pesquisa a artigos

provenientes de Portugal. Como critérios de elegibilidade foram utilizados os mesmos expressos anteriormente para a revisão e considerando artigos referentes apenas à população portuguesa. Foi utilizado apenas um trabalho não presente na revisão.

Desenvolvimento

1. Parâmetros eritrocitários e metabolismo do ferro

Os GWAS foram os primeiros a identificar uma relação entre os parâmetros eritrocitários e metabolismo do ferro e o gene *TMPRSS6*. Tanaka et al.⁵ encontraram uma forte associação entre os SNPs rs855791 e rs4820268 ($P=4.16 \times 10^{-8}$ e $P=5.12 \times 10^{-9}$ respetivamente) e as concentrações de ferro. O SNP rs5756504 mostrou apenas associação moderada. Cada variante do gene *TMPRSS6* é responsável por 1% da variabilidade da concentração do ferro. Neste mesmo estudo, embora não tenha sido encontrada uma associação entre os SNPs do gene *TMPRSS6* e a prevalência de anemia, estes revelaram-se associados a menores valores de VGM e de hemoglobina (Hb) e a valores aumentados do *Red cell distribution width*/dispersão do volume eritrocitário (RDW). Os resultados deste estudo dizem respeito a populações da Europa e da Índia. Noutros GWAS, verificou-se associação entre o SNP rs855791 e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)⁶, ferro sérico (FS) e ST^{7,10} e hemoglobina corpuscular média (HCM)^{6,7,9} e a associação com os valores de VGM^{6,7,9} e Hb⁸ foi replicada. Também foi verificada uma associação entre os SNPs rs2413450 e rs5756506 com os valores de VGM e HCM respetivamente.⁶

Num estudo de Chambers et. al⁷ realizado em populações europeias e indianas, o SNP rs855791 foi o que revelou associação mais forte com os níveis de Hb ($P=4.3 \times 10^{-7}$ para europeus e $P=1.4 \times 10^{-11}$ para indianos). A proporção da variação dos valores de Hb nas populações explicada pelo rs855791 foi de 0.25% para europeus e 0.31% para indianos. O alelo que condiciona menores valores de Hb foi mais prevalente em indianos do que em europeus neste estudo (0.52% vs 0.43%). Indivíduos com o SNP em homozigotia apresentaram concentrações de hemoglobina em média 0.2 g/dL mais baixas comparativamente a indivíduos sem o SNP. Neste estudo, o SNP rs228918 verificou-se independentemente associado a menores valores de Hb em ambas as populações ($P=1.2 \times 10^{-8}$ em europeus e $P=7.6 \times 10^{-4}$ em indianos). Contrariamente a estes dados, o SNP rs5756506 foi o único SNP significativamente relacionado com os valores de Hb ($P=3.4 \times 10^{-8}$) no estudo de Soranzo et al.⁸, embora estes autores aleguem que o *design* do seu estudo possa ter introduzido algum viés. Benyamin et. al¹⁰, numa população composta por adultos e adolescentes australianos, encontraram associação significativa entre SNPs do gene *TMPRSS6* e valores de FS ($P=1.6 \times 10^{-11}$ em adolescentes e $P=9.9 \times 10^{-11}$ em adultos) e de ST ($P=9.7 \times 10^{-13}$ em adolescentes e $P=1.8 \times 10^{-11}$ em adultos), sendo esta associação mais significativa com o SNP rs855791. Os valores de FS e ST diminuíam 0.18 e 0.20 desvios padrão da média, respetivamente, em ambas as coortes,

por cada alelo com o *SNP*. Na população adolescente, o *SNP* rs855791 afetava significativamente os valores de Hb ($P=2.3 \times 10^{-6}$) e VGM ($P=1.3 \times 10^{-5}$), reduzindo-os em 0.15 e 0.14 desvios padrão da média, respetivamente. Não foram encontradas diferenças entre géneros em nenhum dos resultados reportados. Um único *GWAS* não encontrou qualquer associação estatisticamente significativa entre *SNPs* do gene *TMPRSS6* e valores do metabolismo do ferro.¹¹

Desde que os *GWAS* foram publicados, vários outros estudos e *case reports* foram realizados, revelando nova informação relevante e, por vezes, contrastante com os dados acima apresentados.

Dos vários *SNPs*, é sobre o rs855791 que existe mais informação. Localizado no exão 17, o domínio tipo serina protease, esta variante *missense*²⁶ foi relacionada com alterações no FS, ST, VGM, CHCM, HCM e Hb. Estes efeitos verificaram-se tanto em adolescentes como em adultos, conforme o estudo de Benyamin et al.¹⁰ Crianças portadoras de *SNPs* no gene *TMPRSS6* são mais susceptíveis a desenvolver ferropenia, à semelhança do que acontece com o fenótipo mais severo provocado por mutações causadoras de *IRIDA* no gene *TMPRSS6* em crianças comparativamente a adultos, segundo Kloss-Brandstätter et al.¹² Um estudo de grande escala dinamarquês, usando dados de doadores de sangue, realizado por Sørensen et al.,²⁷ identificou uma associação entre o *SNP* rs855791 e níveis reduzidos de ferritina em indivíduos do sexo masculino. No entanto, não foi detetado risco aumentado de desenvolver ferropenia. Nos indivíduos do sexo feminino, o *SNP* não pareceu causar qualquer efeito. Poggiali et al.²⁶ associaram o *SNP* rs855791 a níveis mais baixos de Hb, VGM e HCM. Este polimorfismo também se revelou variavelmente associado a outros *SNPs*, verificando-se uma *agreement percentage* mais elevada com o rs4820268 (88.9%) e rs2235321 (64.8%). Valenti et al.¹⁶ encontraram uma associação com menores valores de VGM e de ferritina, enquanto Pelusi et al.¹⁵ não encontraram qualquer relação com níveis de Hb ou valores do metabolismo do ferro. Delbini et al.²⁸ verificaram que a prevalência do rs855791 estava significativamente aumentada num grupo de indivíduos com AF. Para além destes efeitos, Nai et al.³ associaram o *SNP* a níveis séricos de hepcidina reduzidos.

Relativamente aos efeitos do *SNP* rs855791 nos parâmetros eritrocitários e no metabolismo do ferro na população de ascendência europeia, os estudos não são consistentes nos seus achados e nem todos replicam os dados dos *GWAS*. Isto pode estar relacionado com o *design* dos diversos estudos ou com o número de participantes nestes. Além disso, outros fatores não considerados podem ter um papel modificador na expressão dos efeitos dos *SNPs*. Também não podemos deixar de considerar a potencial interação de *SNPs* noutros genes reguladores do metabolismo ferro, como o *TF* ou o *HFE*, embora isto esteja para além do objetivo desta revisão. De qualquer das formas, com base nestes dados, o *SNP* rs855791 atuará como variante de suscetibilidade, razão pela qual os resultados apresentam esta variabilidade.

O *SNP* rs4820268, uma mutação sinónima localizada no domínio tipo recetor-LDL classe A no exão 13⁵, embora não resulte em alteração da sequência de aminoácidos, pode causar tradução ineficiente do codão e levar a uma matriptase-2 com estrutura alterada.²⁹ Kloss-

Brandstätter et al.¹² associaram este *SNP* a menores concentrações de FS, níveis reduzidos de Hb, menor VGM, RDW aumentado e valores reduzidos de hepcidina na urina. Não encontraram, também, um efeito epistático entre rs4820268 e rs855791. Ji et al.²⁹, numa coorte australiana de doadores de sangue, encontraram uma forte associação deste *SNP* com níveis baixos de ferritina. Em heterozigotia, triplicava o risco de níveis reduzidos de ferritina (P=0.01). Delbini et al.²⁸ associaram significativamente os *SNPs* rs4820268, rs11704654 e rs2543519 (P<0.0001) a anemia refratária à terapêutica com ferro.

Beutler et al.³⁰ referem a presença de um *SNP* incomum, rs117576908, em ligeiro excesso na população anémica do seu estudo. Quando em *trans* com uma mutação causadora de *IRIDA*, contribui para a AF. No estudo de Poggiali et al.²⁶ são descritos dois pacientes com o incomum *SNP* rs139105452 que necessitaram de terapêutica com ferro parentérico e outra paciente, com 10 anos de idade, portadora do *SNP* rs146767495, que necessitou de suplementação com ferro parentericamente desde os 5 anos de idade.

Nas populações asiáticas, os dados disponíveis apontam para efeitos semelhantes. An et al.³¹ estudaram os efeitos dos *SNPs* rs855791 e rs4820268 numa coorte composta por várias etnias chinesas. Ambos se revelaram fortes fatores de risco para a AF (P=8.43x10⁻⁹ e P=6.49x10⁻⁸ respetivamente). O risco foi mais elevado para anemia ferropénica (AF) do que para ferropenia ou anemia isoladamente. Também mostraram relação com menores valores de FS, Hb, VGM, ST e valores mais altos de protoporfirina eritrocitária livre. Na população chinesa de etnia Han, no estudo de Gan et al.²¹, os *SNPs* rs855791 e rs4820268 estavam significativamente associados a menores valores de Hb (P=0.0006 e P=0.0013 respetivamente) e menores concentrações plasmáticas de ferritina (P=0.0015 e P=0.0058 respetivamente). Interessantemente, a equipa demonstrou que a associação de cada *SNP* com os valores estudados perdia significância estatística quando considerados isoladamente e que um haplótipo contendo ambos os *SNPs* mantinha associação com os valores de Hb e ferritina. Os dois *SNPs* também se mostraram associados a um menor risco de desenvolver sobrecarga de ferro (P=0.0016 e P=0.0068) mas não alteraram o risco de desenvolver anemia. Pei et al.,³² num estudo em mulheres taiwanesas com menorrágia, demonstraram um aumento de prevalência de anemia na presença do *SNP* rs855791, tanto em hétero como em homozigotia. Não foi encontrada qualquer diferença nos restantes parâmetros eritrocitários nem nos níveis de ferritina. Na ausência do *SNP*, não se verificou diferença na prevalência de anemia nem no grupo de mulheres com menorrágia nem no grupo de controlo de mulheres saudáveis. Athiyarath et al.³³ estudaram o impacto do *SNP* rs855791 na resposta à suplementação com ferro oral numa coorte de grávidas indianas. O estudo revelou que a variante se associou significativamente a uma resposta reduzida à suplementação com ferro.

Ao considerar os efeitos dos *SNPs* do gene *TMPRSS6* nas populações africanas, é necessário ter em conta outros fatores. A anemia e a ferropenia são altamente prevalentes. Malnutrição e um leque de infeções parasitárias estão entre as principais causas.³⁴ Estudos em afroamericanos revelaram que estes têm níveis mais baixos de Hb e ST e níveis mais elevados de ferritina quando comparados com indivíduos de ascendência europeia.³⁵ Danquah et al.³⁶

estudaram os efeitos do *SNP* rs855791 em crianças do Ruanda. O *SNP* foi observado em 17.8% dos participantes com uma *MAF* de 0,096. A *MAF* em pacientes europeus e asiáticos é de 0.4 e 0.5 respetivamente. Não foi encontrada nenhuma associação do *SNP* com os níveis de ferritina ou com anemia. No entanto, os autores referem que o número reduzido de participantes (545) e a elevada prevalência de complicações infecciosas pode ter influenciado os resultados. Gichohi-Wainaina et al.³⁵ num estudo em 3 populações africanas (Quenianos, Tanzanianos e Sul Africanos) encontraram associação entre os *SNPs* rs2413450 e rs4820268 com níveis mais baixos de Hb (P=0.02 e P=0.01 respetivamente) à semelhança dos resultados encontrados noutros estudos em populações europeias e asiáticas. Estes autores reportam as *MAF* de vários *SNPs*, que diferem significativamente das encontradas das populações europeias. Por exemplo, a *MAF* do *SNP* rs4820268 nas 3 populações foi de 0.27, 0.22 e 0.18 respetivamente, enquanto em populações europeias, a frequência deste *SNP* é de 0.41. Noutro estudo deste mesmo autor,³⁷ numa coorte de mulheres sul africanas, não foi encontrada qualquer associação entre o *SNP* rs855791 e anemia ou ST. A *MAF* encontrada foi de 0.09. Uma combinação de dois alelos, rs228918 e rs228921, revelou-se associada a menores níveis de recetor de transferrina. Estes dois *SNPs* estão associados a níveis mais elevados de Hb, noutros estudos.

O *SNP* rs855791 (p.Val736Ala) tem uma *MAF* bastante menor na população africana comparativamente à europeia e asiática. Também não parece ter um papel muito relevante nos parâmetros eritrocitários e no metabolismo do ferro nesta população, ao contrário do que é reportado nas outras. Análise comparativa mostra que o aminoácido alanina é o conservado entre espécies, sendo, por conseguinte, o ancestral. Isto sugere que o aminoácido valina, resultante do *SNP*, é resultado de uma variação evolucionária recente.^{3,26} Isto pode aplicar-se também a outros *SNPs*.

2. Case Report

Uma mulher portuguesa de 72 anos de idade apresentou-se na consulta com AF, com um valor de Hb de 7.5g/dL, que não respondia à terapêutica com ferro oral. Os índices celulares revelaram uma eritropoiese microcítica e hipocrómica. A hemoglobina reticulocitária e a ferritina estavam diminuídas. A investigação do trato gastrointestinal superior e inferior revelou uma pequena hérnia do hiato e um único pólipó, respetivamente. A endoscopia por videocápsula e ressonância magnética do intestino delgado não revelaram quaisquer achados. Não foi identificada colonização por *Helicobacter pylori*. O estudo genético para variantes no gene *TMPRSS6* não detetou variantes patogénicas causadoras de *IRIDA*, mas detetou 3 *SNPs* em heterozigotia: rs2235324, rs4820268 e rs855791.

Foi iniciado tratamento com ferro intravenoso (carboximaltose férrica) que normalizou o valor de Hb e repôs as reservas de ferro. A paciente reporta também melhoria da qualidade de vida. Presentemente, é necessária suplementação a cada 3 meses para manutenção de valores normais de Hb.

Com base nos dados presentes nesta revisão, verifica-se que o *SNP* rs855791 está associado a menores valores de FS, ST, VGM, Hb, HCM, CHCM e ferritina, e o *SNP* rs4820268 a menores valores de Hb, FS, VGM e RDW aumentado em populações europeias. O *SNP* rs2235324, embora não tenha sido associado a alterações em parâmetros eritrocitários, resulta numa substituição não-sinónima no exão 7, onde se localiza o domínio CUB. Em pacientes com *IRIDA*, variantes patogénicas nesta região alteram a interação entre a matriptase-2 e a HJV, resultando num aumento de hepcidina. Este *SNP* poderá afetar esta interação de forma similar, embora com menos gravidade.³⁸ Na população portuguesa, Gonçalves et al.³⁹ identificaram todos estes *SNPs* numa coorte de 114 mulheres. Associaram também o *SNP* rs855791 a menores valores de Hb, FS e ST (P=0.0362; P=0.0091 e P=0.0154 respetivamente). Este estudo revela que os dados de outras populações europeias provavelmente são aplicáveis à nossa população. Não obstante, são necessários estudos de maior escala para confirmar esta hipótese e para avaliar o impacto deste *SNPs* na saúde pública. De qualquer das formas, os *SNPs* afetam os parâmetros eritrocitários e o metabolismo do ferro por mecanismos distintos e, no caso apresentado, a sua presença explica a AF refratária à terapêutica com ferro oral e que responde temporariamente a suplementação com ferro intravenoso.

3. Outras Patologias

Recentemente, os *SNPs* do gene *TMPRSS6*, principalmente o *SNP* rs855791, têm sido associados a várias outras patologias. Um grupo de patologias onde esta associação não é surpreendente, é nas patologias associadas a sobrecarga de ferro. A hemocromatose hereditária (HH, OMIM #235200) é uma doença autossómica recessiva do metabolismo do ferro na qual o corpo acumula este elemento em excesso. O excesso de ferro deposita-se em vários órgãos, levando à sua falência, resultando numa variedade de estados graves, incluindo cirrose hepática. A variante mais frequente é a p.Cys282Tyr no gene *HFE*.⁴⁰ Num estudo de Valenti et al.¹³ o *SNP* rs855791 revelou-se significativamente sub-representado em pacientes com HH (P=0.0023), tanto em homocigóticos para a variante p.Cys282Tyr como para outros genótipos do gene *HFE*. A equipa demonstrou que o *SNP* se associa negativamente com o fenótipo HH, independentemente da idade ou género. Este efeito foi mais forte em indivíduos do sexo feminino. Nesta população, o *SNP* rs855791 associou-se a um risco quatro vezes inferior de desenvolver cirrose hepática (OR=3.93, P=0.026) e com o aumento no número de alelos com o *SNP*, verificou-se uma redução na incidência cumulativa de carcinoma hepatocelular (P=0.050). Estes dados sugerem que o *SNP* atua como um modificador genético da HH. Devido ao número reduzido de participantes neste estudo, outros de maior escala são necessários antes de ser possível extrapolar os dados para a prática clínica.

O fígado gordo não alcoólico e a síndrome metabólica são caracterizados por *up-regulation* da hepcidina.¹⁶ O FGNA (OMIM %613282) é o resultado da acumulação excessiva de triglicédeos no fígado devido à obesidade, insulinoresistência, diabetes e outras condições menos comuns. Esta acumulação, denominada esteatose hepática, em indivíduos suscetíveis, leva a esteatohepatite que pode progredir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.⁴¹ No

seguimento do estudo anterior, Valenti et al.¹⁶ estudaram o impacto do *SNP* rs855791 na acumulação hepática de ferro no fígado gordo não alcoólico, pois esta acumulação agrava o prognóstico da doença. O *SNP* na forma homozigótica foi associado a uma menor prevalência de reservas hepáticas de ferro detetáveis ($P=0.01$). Neste grupo de doentes, os níveis de hepcidina estavam elevados, apesar dos níveis baixos de ferro, e aumentavam com o número de alelos com o *SNP* ($P=0.028$). Após análise adicional, o *SNP* rs855791, foi associado independente e negativamente com as reservas hepáticas de ferro. ($OR=0.59$ por alelo com o *SNP*). Pacientes com esta variante apresentaram menor prevalência de *balooning* hepatocelular após análise histológica para um mesmo grau de esteatose e fibrose ($P=0.05$). Em pacientes *HFE* positivos, o *SNP* estava associado a níveis mais elevados de ferritina, sem alterar os depósitos hepáticos de ferro, enquanto nos indivíduos *HFE* negativos havia uma menor prevalência de hiperferritinemia.

Em linha com estes estudos sobre os efeitos do *SNP* rs855791 na deposição hepática de ferro, num estudo de pequena escala, a variante influenciou a acumulação de ferro no fígado em pacientes com talassemias não dependentes de transfusão ($P=6.0 \times 10^{-3}$).¹⁴

Pelusi et al.¹⁵ estudaram os efeitos do *SNP* rs855791 em pacientes com doença renal terminal. Pacientes com doença renal crónica em hemodiálise comumente desenvolvem uma anemia multifatorial relacionada com o estado de inflamação crónica, perda de sangue e défice de eritropoietina. Na doença renal crónica, há um aumento também multifatorial dos níveis de hepcidina. Tal como acontece no fígado gordo não alcoólico, parece haver interação entre alelos do gene *HFE* e o *SNP* rs855791 no gene *TMPRSS6*. Pacientes *HFE* negativos sem o *SNP*, apresentavam níveis mais elevados de hepcidina-25 do que pacientes *HFE* positivos sem o *SNP*. Em pacientes com variantes no gene *HFE*, o *SNP* rs855791 condicionou um nível mais elevado de hepcidina-25 do que em pacientes *HFE* positivos sem o *SNP* ($P=0.017$). Ademais, em pacientes com o *SNP* rs855791, condicionando níveis mais elevados de hepcidina, foram necessários níveis mais elevados de eritropoietina recombinante para controlo da anemia ($P=0.027$), independentemente da inflamação ou das reservas de ferro.

A síndrome de pica, um sintoma frequentemente ligado a AF, ainda não tem uma fisiopatologia definida. Define-se como uma compulsão para ingerir substâncias não nutritivas.¹⁷ Barton et al.¹⁷ não encontraram qualquer associação entre a síndrome de pica e a prevalência de anemia, ferropenia ou AF. Pacientes com síndrome de pica apresentaram menores valores de Hb e VGM, enquanto as mulheres, particularmente, também tinham uma prevalência de trombocitose e anisocitose aumentada. A etnia pareceu contribuir para os achados. Este estudo mostra evidência para uma base genética para a síndrome de pica, embora não avaliem o gene *TMPRSS6* e suas variantes. Lee et al.¹⁸ colocam por hipótese que os *SNPs* do gene *TMPRSS6* estejam relacionados com este sintoma, visto que a matriptase-2 é expressa na nasofaringe. Com esse intuito, estudaram a associação dos *SNPs* rs2235324, rs855791 e rs2235321 com o metabolismo do ferro, parâmetros eritrocitários e síndrome de pica em mulheres com défice ou depleção de ferro. O *SNP* rs2235321 tinha prevalência mais elevada em mulheres com ST inferior a 10% e estas apresentavam um valor médio de ST

inferior ao grupo de controlo ($P=0.0021$). A prevalência do *SNP* rs2235324 foi mais elevada em mulheres com valores de ST superiores a 10%. Os autores não encontraram outras associações com nenhum dos parâmetros em estudo, incluindo a síndrome de pica. Embora estes estudos forneçam alguma evidência para a influências genéticas na origem da síndrome de pica, o seu número reduzido de participantes (262 e 48, respetivamente) obriga a cautela na interpretação dos seus resultados. Não obstante, o gene *TMPRSS6* parece ser um potencial candidato e estudos com maior potência estatística são necessários para esclarecer esta questão.

Para além das patologias com sobrecarga de ferro ou patologias com elevação da hepcidina, outras parecem estar relacionadas com as variantes do gene *TMPRSS6*. Canavese et al.¹⁹ reportam uma frequência bastante elevada de variações neste gene, em pacientes com poliendocrinopatias autoimunes com AF. Estes autores especulam que os *SNPs* poderão estar ligados a alterações adquiridas em moléculas e peptídeos gastrointestinais, tornando-os mais passíveis de serem alvos em patologia autoimune.

Pichler et al.²⁰, baseados em estudos que identificaram níveis aumentados de ferro na *substantia nigra* e *globus pallidus* lateral em pacientes com doença de Parkinson, procuraram associação entre *SNPs* do gene *TMPRSS6* e o risco de desenvolver esta patologia. Um risco significativo entre o *SNP* rs855791 e o risco de desenvolver doença de Parkinson foi encontrado ($OR=0.97$, $P=0.034$ por alelo com o *SNP*).

Gan et al.²¹ estudaram a associação entre os *SNPs* rs855791 e rs4820268 e os valores de ferritina e Hb e o risco de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 numa população chinesa de etnia Han. Estes autores identificaram previamente uma associação entre valores baixos de concentração plasmática de ferritina e um risco reduzido de desenvolver diabetes mellitus tipo 2. Neste estudo, encontraram uma associação significativa entre os dois *SNPs* estudados e o risco de desenvolver diabetes mellitus ($P=0.0314$ para rs855791, $P=0.0311$ para rs4820268 e $P=0.0277$ para um haplótipo contendo os dois *SNPs*). No entanto, após ajuste para a concentração de ferritina, esta associação foi eliminada, significando que a redução do risco será mediada pelos menores valores de ferritina. Não obstante, os autores referem que isto é um achado preliminar a necessitar de confirmação em estudos posteriores de larga escala. Os *SNPs* do gene *TMPRSS6* também parecem influenciar os valores de hemoglobina glicada (HbA1c), dado que o *SNP* rs855791 foi associado a valores mais elevados deste parâmetro. No entanto, este *SNP* e outros noutros *loci* são responsáveis por uma variação muito ligeira apenas dos valores de HbA1c e têm um efeito mínimo no diagnóstico da diabetes mellitus utilizando este parâmetro. Apesar disto, este achado implica que outras variantes associadas com os valores de HbA1c neste gene ou noutros devem ser identificadas e a sua implicação no controlo da diabetes mellitus avaliado em estudos posteriores.²² Alfred et. al.⁴² determinaram uma associação entre o *SNP* rs4820268 e menor peso corporal e índice de massa corporal ($P=0.02$ e $P=0.01$, respetivamente).

Na área da oncologia, os *SNPs* do gene *TMPRSS6* parecem ter um papel importante. Hartikainen et al.²³ inicialmente identificaram o locus 22q12-q13 como estando associado a

neoplasia da mama. Encontraram uma forte associação entre o *SNP* rs733655 na sequência intrónica do gene *TMPRSS6* e o cancro da mama, numa população da região oriental da Finlândia. O *SNP* em heterozigotia verificou-se ser o genótipo de risco. Num estudo posterior por Tuhkanen et al.²⁴ o *SNP* rs2543519 foi associado com o risco de desenvolver neoplasia mamária, também em heterozigotia (OR 1.382). Os *SNPs* 2235321 (P=0.44), rs2543519 (P=0.017), rs2235324 (P=0.038), rs855788 (P=0.018), rs1421312 (P=0.044) e rs733655 (P=0.021) relacionaram-se com mau prognóstico nesta neoplasia. O prognóstico mostrou-se pior com o aumento do número destes alelos e o número de alelos relacionados com mau prognóstico foi identificado como sendo o segundo fator prognóstico mais forte a seguir ao estado ganglionar (P=0.006). A matriptase-2 é expressa no tecido mamário normal. Foi demonstrado que níveis elevados desta enzima no tecido tumoral correlacionam-se com bom prognóstico e que o estágio tumoral, estadiamento TNM e *Nottingham Prognostic Index* agravam à medida que os níveis de matriptase-2 diminuem. Estudos em linhas celulares revelaram que a presença de matriptase-2 suprime significativamente a invasão e migração tumoral em células de cancro da mama. A expressão reduzida de matriptase-2 à medida que o tumor progride, relaciona-se com tumores ductais e lobulares mal diferenciados e níveis baixos de expressão génica estão associados a tumores triplo negativos da mama segundo estes autores. Segundo Parr et al.²⁵ a matriptase-2 também está associada com invasão tumoral e metastização no cancro da próstata, pelo que não é improvável que *SNPs* do gene *TMPRSS6* também estejam envolvidos no risco e prognóstico neste tipo de neoplasmas.

Conclusões Finais

Com base na revisão efetuada, os *SNPs* do gene *TMPRSS6* têm um papel na AF, parâmetros eritrocitários e metabolismo do ferro. No entanto, dúvidas permanecem relativamente à dimensão deste papel. Embora seja necessária mais informação para esclarecer qual o mecanismo que leva a que um polimorfismo cause apenas uma variação ligeira num parâmetro, enquanto outro leva o indivíduo a necessitar de suplementação com ferro intravenoso, podemos assumir que estes *SNPs* atuam como variantes de suscetibilidade. Esta hipótese explica o porquê de os vários estudos não obterem os mesmos resultados, pois as características intrínsecas, tanto genéticas como ambientais, das populações participantes modulam o efeito destas variantes. O facto de as variantes mais comuns, como o rs855791, causarem um efeito ligeiro nos parâmetros estudados e as mais raras poderem levar a necessidade de terapêutica intravenosa é também lógica de um ponto de vista evolutivo, pois seria altamente improvável que uma variante com elevada prevalência causasse um efeito adverso significativo. Não obstante, ainda carecemos de informação relativamente à interação de vários *SNPs* no mesmo indivíduo. O caso apresentado procura revelar o impacto clínico desta interação. Como os *SNPs* do gene *TMPRSS6* afetam o tratamento da AF, a sua identificação deveria ocorrer mais cedo na investigação da falência da terapêutica com ferro

oral e não serem apenas um achado incidental aquando de uma hipótese diagnóstica de *IRIDA*. Posto isto, é proposto na figura 1, uma alteração ao algoritmo de diagnóstico/tratamento da AF.

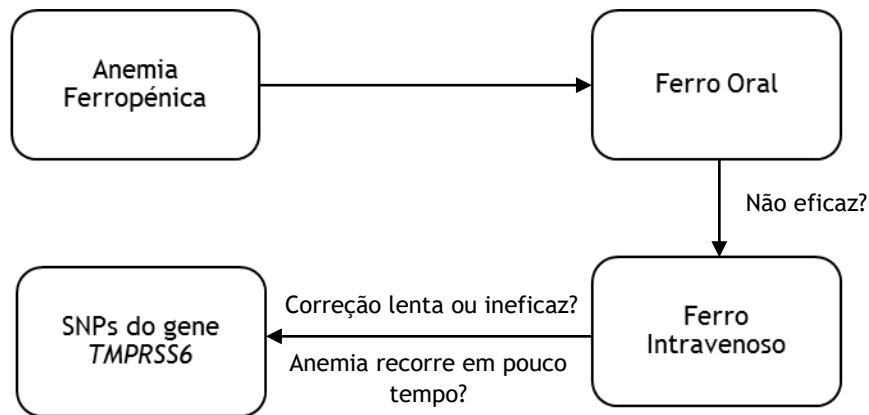


Figura 1- Algoritmo proposto para o tratamento da anemia ferropénica.

Após confirmação da AF, o tratamento é iniciado com ferro oral. O tratamento ineficaz com esta modalidade deve ser seguido de confirmação da *compliance* do paciente, procura de outras causas para a anemia e terapêutica com ferro intravenoso se apropriado. Se esta terapêutica falhar, a correção da anemia for mais lenta que o esperado ou a anemia recorrer num curto espaço de tempo e outras causas tiverem sido excluídas (perda de sangue, tumores, má absorção ou aporte, fármacos, entre outras), deve iniciar-se a pesquisa para *SNPs* do gene *TMPRSS6*. Dependendo dos custos, a sequenciação do gene poderá ficar mais barata que identificar um determinado número de variantes, pelo que nesse caso a *IRIDA* também poderá ser excluída, embora este seja um diagnóstico raro e outras causas deverão ser ponderadas primeiro.

O papel multissistémico dos *SNPs* do gene *TMPRSS6*, principalmente do *SNP* rs855791, em áreas como a hemocromatose hereditária e outras patologias de sobrecarga de ferro é lógico do ponto de vista fisiopatológico e de grande importância. Embora o seu impacto tenha sido avaliado apenas num estudo para cada patologia, o seu impacto no prognóstico da hemocromatose hereditária e do fígado gordo não alcoólico parece ser extremamente relevante, pelo que se torna premente a replicação destes resultados em estudos de grande escala, pois pode alterar de forma relevante o diagnóstico e *follow-up* destes pacientes.

Na área da oncogenética, os *SNPs* do gene *TMPRSS6* revelaram um papel surpreendente e parecem influenciar não só o risco, mas também o prognóstico de pacientes com neoplasia da mama, ficando apenas atrás do estado ganglionar, como fator preditivo de sobrevivência. Se os achados deste estudo forem replicados noutros com maior número de participantes, abrem-se novas portas para o tratamento do cancro da mama, visto que estão a ser desenvolvidos vários fármacos que têm a via da hepcidina como alvo.

Relativamente a outras patologias, os *SNPs* do gene *TMPRSS6*, parecem ser fator de risco para doença de Parkinson e poliendocrinopatias autoimunes.

Para além das áreas abordadas nesta revisão, os *SNPs* do gene *TMPRSS6* podem ter impacto noutras. A ferropenia aumenta não só a absorção de ferro no intestino delgado, como também de outros metais pesados como o cádmio.⁴³ Embora não existam estudos que associem estas variantes a toxicidade por metais pesados à data da pesquisa para esta revisão, esta hipótese, a verificar-se verdadeira, poderia identificar indivíduos com risco acrescido de desenvolver este tipo de toxicidade após exposições, como trabalhadores de certas indústrias e habitantes de determinadas regiões do planeta. Estão também a ser desenvolvidos estudos noutras áreas, como a leucemia linfoblástica aguda.

À medida que aumenta o interesse e investigação nesta área, os *SNPs* do gene *TMPRSS6* seguramente serão associados a outras patologias. Torna-se também premente estudar a sua interação com outros genes reguladores da homeostasia do ferro, como o *HFE*.

Bibliografia

1. National Library of Medicine (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; July 25, 2017. TMPRSS6; [reviewed July 2014; cited 2017 Jul 30]; [about 6 screens]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TMPRSS6>
2. Wang C-Y, Meynard D, Lin HY. The role of TMPRSS6/matriptase-2 in iron regulation and anemia. *Frontiers in Pharmacology*. 2014;5(114).
3. Nai A, Pagani A, Silvestri L, Campostrini N, Corbella M, Girelli D, et al. TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood*. 2011;118(16):4459-62.
4. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {#206200}: {05/27/2016}: . World Wide Web URL: <https://omim.org/>
5. Tanaka T, Roy CN, Yao W, Matteini A, Semba RD, Arking D, et al. A genome-wide association analysis of serum iron concentrations. *Blood*. 2010;115(1):94-6.
6. Kullo IJ, Ding K, Jouni H, Smith CY, Chute CG. A Genome-Wide Association Study of Red Blood Cell Traits Using the Electronic Medical Record. *PLoS ONE*. 2010;5(9):e13011.
7. Chambers JC, Zhang W, Li Y, Sehmi J, Wass MN, Zabaneh D, et al. Genome-wide association study identifies variants in TMPRSS6 associated with hemoglobin levels. *Nature genetics*. 2009;41(11):1170-2.
8. Soranzo N, Spector TD, Mangino M, Kühnel B, Rendon A, Teumer A, et al. A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. *Nature genetics*. 2009;41(11):1182-90.
9. Li J, Glessner JT, Zhang H, Hou C, Wei Z, Bradfield JP, et al. GWAS of blood cell traits identifies novel associated loci and epistatic interactions in Caucasian and African-American children. *Human Molecular Genetics*. 2013;22(7):1457-64.
10. Benyamin B, Ferreira MAR, Willemsen G, Gordon S, Middelberg RPS, McEvoy BP, et al. Common variants in TMPRSS6 are associated with iron status and erythrocyte volume. *Nature genetics*. 2009;41(11):1173-5.
11. McLaren CE, Garner CP, Constantine CC, McLachlan S, Vulpe CD, Snively BM, et al. Genome-Wide Association Study Identifies Genetic Loci Associated with Iron Deficiency. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e17390.
12. Kloss-Brandstätter A, Erhart G, Lamina C, Meister B, Haun M, Coassin S, et al. Candidate Gene Sequencing of SLC11A2 and TMPRSS6 in a Family with Severe Anaemia: Common SNPs, Rare Haplotypes, No Causative Mutation. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35015.

13. Valenti L, Fracanzani AL, Rametta R, Fraquelli M, Soverini G, Pelusi S, et al. Effect of the A736V TMPRSS6 polymorphism on the penetrance and clinical expression of hereditary hemochromatosis. *J Hepatol.* 2012;57(6):1319-25.
14. Cau M, Danjou F, Chessa R, Serrenti M, Addis M, Barella S, et al. The V736A TMPRSS6 polymorphism influences liver iron concentration in nontransfusion-dependent thalassemias. *American Journal of Hematology.* 2015;90(12):E225-E6.
15. Pelusi S, Girelli D, Rametta R, Campostrini N, Alfieri C, Traglia M, et al. The A736V TMPRSS6 polymorphism influences hepcidin and iron metabolism in chronic hemodialysis patients: TMPRSS6 and hepcidin in hemodialysis. *BMC Nephrology.* 2013;14(1):48.
16. Valenti L, Rametta R, Dongiovanni P, Motta BM, Canavesi E, Pelusi S, et al. The A736V TMPRSS6 Polymorphism Influences Hepatic Iron Overload in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e48804.
17. Barton JC, Barton JC, Bertoli LF. Pica associated with iron deficiency or depletion: clinical and laboratory correlates in 262 non-pregnant adult outpatients. *BMC Blood Disorders.* 2010;10:9-.
18. Lee PL, Barton JC, Khaw PL, Bhattacharjee SY, Barton JC. Common TMPRSS6 mutations and iron, erythrocyte, and pica phenotypes in 48 women with iron deficiency or depletion. *Blood cells, molecules & diseases.* 2012;48(2):124-7.
19. Canavese C, Quaglia M, Izzo C, Nava I, Duca L, Cappellini MD, et al. Very high frequency of TMPRSS6 gene variations in iron deficiency anaemia of patients with polyendocrine autoimmune syndromes: more than a casual association? *British Journal of Haematology.* 2013;161(1):147-50.
20. Pichler I, Del Greco M F, Gögele M, Lill CM, Bertram L, Do CB, et al. Serum Iron Levels and the Risk of Parkinson Disease: A Mendelian Randomization Study. *PLoS Medicine.* 2013;10(6):e1001462.
21. Gan W, Guan Y, Wu Q, An P, Zhu J, Lu L, et al. Association of TMPRSS6 polymorphisms with ferritin, hemoglobin, and type 2 diabetes risk in a Chinese Han population. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2012;95(3):626-32.
22. Soranzo N, Sanna S, Wheeler E, Gieger C, Radke D, Dupuis J, et al. Common Variants at 10 Genomic Loci Influence Hemoglobin A(1C) Levels via Glycemic and Nonglycemic Pathways. *Diabetes.* 2010;59(12):3229-39.
23. Hartikainen JM, Tuhkanen H, Kataja V, Eskelinen M, Uusitupa M, Kosma V-M, et al. Refinement of the 22q12-q13 Breast Cancer-Associated Region: Evidence of TMPRSS6 as a Candidate Gene in an Eastern Finnish Population. *Clinical Cancer Research.* 2006;12(5):1454-62.

24. Tuhkanen H, Hartikainen JM, Soini Y, Velasco G, Sironen R, Nykopp TK, et al. Matriptase-2 gene (TMPRSS6) variants associate with breast cancer survival, and reduced expression is related to triple-negative breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2013;133(10):2334-40.
25. Parr C, Sanders AJ, Davies G, Martin T, Lane J, Mason MD, et al. Matriptase-2 Inhibits Breast Tumor Growth and Invasion and Correlates with Favorable Prognosis for Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(12):3568-76.
26. Sørensen E, Rigas AS, Thørner LW, Burgdorf KS, Pedersen OB, Petersen MS, et al. Genetic factors influencing ferritin levels in 14,126 blood donors: results from the Danish Blood Donor Study. *Transfusion*. 2016;56(3):622-7.
27. Beutler E, Van Geet C, te Loo D, Gelbart T, Crain K, Truksa J, et al. Polymorphisms and Mutations of Human TMPRSS6 in Iron Deficiency Anemia. *Blood cells, molecules & diseases*. 2010;44(1):16.
28. Delbini P, Vaja V, Graziadei G, Duca L, Nava I, Refaldi C, et al. Genetic variability of TMPRSS6 and its association with iron deficiency anaemia. *British Journal of Haematology*. 2010;151(3):281-4.
29. Poggiali E, Andreozzi F, Nava I, Consonni D, Graziadei G, Cappellini MD. The role of TMPRSS6 polymorphisms in iron deficiency anemia partially responsive to oral iron treatment. *American Journal of Hematology*. 2015;90(4):306-9.
30. Pei S-N, Ma M-C, You H-L, Fu H-C, Kuo C-Y, Rau K-M, et al. TMPRSS6 rs855791 Polymorphism Influences the Susceptibility to Iron Deficiency Anemia in Women at Reproductive Age. *International Journal of Medical Sciences*. 2014;11(6):614-9.
31. Ji Y, Flower R, Hyland C, Saiepour N, Faddy H. Genetic factors associated with iron storage in Australian blood donors. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2016:1-7.
32. An P, Wu Q, Wang H, Guan Y, Mu M, Liao Y, et al. TMPRSS6, but not TF, TFR2 or BMP2 variants are associated with increased risk of iron-deficiency anemia. *Human Molecular Genetics*. 2012;21(9):2124-31.
33. Athiyarath R, Shaktivel K, Abraham V, Singh D, Bondu JD, Chapla A, et al. Association of genetic variants with response to iron supplements in pregnancy. *Genes & Nutrition*. 2015;10(4):25.
34. Miller JL. Iron Deficiency Anemia: A Common and Curable Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(7):10.1101/cshperspect.a011866 a.
35. Gichohi-Wainaina WN, Tanaka T, Towers GW, Verhoef H, Veenemans J, Talsma EF, et al. Associations between Common Variants in Iron-Related Genes with Haematological Traits in Populations of African Ancestry. *PLoS ONE*. 2016;11(6):e0157996.
36. Danquah I, Gahutu J-B, Zeile I, Musemakweri A, Mockenhaupt FP. Anaemia, iron deficiency and a common polymorphism of iron-regulation, TMPRSS6 rs855791, in Rwandan children. *Tropical Medicine & International Health*. 2014;19(1):117-22.

37. Gichohi-Wainaina WN, Melse-Boonstra A, Swinkels DW, Zimmermann MB, Feskens EJ, Towers GW. Common Variants and Haplotypes in the TF, TNF- α , and Tmprss6 Genes Are Associated with Iron Status in a Female Black South African Population¹⁻³. *The Journal of Nutrition*. 2015;145(5):945-53.
38. Silvestri L, Guillem F, Pagani A, Nai A, Oudin C, Silva M, et al. Molecular mechanisms of the defective hepcidin inhibition in Tmprss6 mutations associated with iron-refractory iron deficiency anemia. *Blood*. 2009;113(22):5605-8.
39. Gonçalves L, Nobre de Jesus G, Afonso C, Vieira A, Maia R, Correia L, et al. The role of Tmprss6 gene variants in different types of iron deficiency anaemia - from the rare severe hereditary IRIDA to the common mild acquired IDA. 18^a reunião da Sociedade Portuguesa de Genética Humana; 18-21 November; Lisbon. <http://hdl.handle.net/10400.18/2511>; ; 2014.
40. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®]. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {#235200}: {09/07/2016}: World Wide Web URL: <https://omim.org/>
41. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®]. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: {%613282}: {12/20/2016}: World Wide Web URL: <https://omim.org/>
42. Alfred T, Ben-Shlomo Y, Cooper R, Hardy R, Deary IJ, Elliott J, et al. Genetic Variants Influencing Biomarkers of Nutrition Are Not Associated with Cognitive Capability in Middle-Aged and Older Adults. *The Journal of Nutrition*. 2013;143(5):606-12.
43. Rentschler G, Kippler M, Axmon A, Raqib R, Ekström E-C, Skerfving S, et al. Polymorphisms in Iron Homeostasis Genes and Urinary Cadmium Concentrations among Nonsmoking Women in Argentina and Bangladesh. *Environmental Health Perspectives*. 2013;121(4):467-72.

Anexo 1 - Informação sobre os SNPs abordados

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.757A>G (p.Lys253Glu) [rs2235324]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.1563C>T (p.Asp521=) [rs4820268]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.2207T>C (p.Val736Ala) [rs855791]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.1583-198G>A [rs5756504]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.1468+426A>G [rs2413450]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.1583-320C>T [rs5756506]

NM_001289001.1(*TMPRSS6*):c.-1303A>G [rs228918]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.2217C>T [rs2235321]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.99G>A [rs11704654]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.1223+66T>C [rs2543519]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.1336C>T (p.Arg446Trp) [rs117576908]

NM_153609.3 (*TMPRSS6*):c.2155G>A (p.Ala719Thr) [rs146767495]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.2383G>A (p.Val795Ile) [rs139105452]

NM_001289001.1(*TMPRSS6*):c.-1499T>C [rs228921]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.1224-2759C>T [rs855788]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.659-1988T>C [rs1421312]

NM_153609.3(*TMPRSS6*):c.230-462A>G [rs733655]