

Contribuição dos polimorfismos no gene FMO3 na patologia e na farmacogenética Contribution of the FMO3 SNPs in the disease and pharmacogenetics

Ferreira F.¹, Almeida L.S.², Gaspar A.³, da Costa C.D.³, Janeiro P.³, Bandeira A.⁴, Martins E.⁴, Teles E.L.⁵, Garcia P.⁶, Azevedo L.⁷, Vilarinho L.^{1,2}

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

O Síndrome de odor a peixe ou trimetilaminúria (TMAu) é uma doença genética de transmissão autossômica recessiva que se manifesta por um forte odor corporal a peixe, devido à incapacidade de conversão do composto odorífero trimetilamina em N-óxido de trimetilamina (composto não odorífero), pela enzima flavina mono-oxigenase 3 (FMO3). Assim, os indivíduos afetados por esta patologia apresentam um odor a peixe em todos os fluidos corporais e, apesar desta doença estar classificada como benigna, os indivíduos afetados apresentam graves problemas psicossociais, afetivos e profissionais. Apesar de ser considerada uma doença rara, esta patologia poderá estar subestimada, pois é frequentemente estudada na criança, mas afeta também indivíduos em idade adulta. Outro fator relevante a considerar no estudo da trimetilaminúria, é não só a sua contribuição para o conhecimento do espectro mutacional de FMO3, mas salientar a importância que tem a variabilidade inter-individual e intra-individual da expressão da proteína, na metabolização hepática de uma grande maioria de fármacos.

Neste trabalho, pretendeu-se dar a conhecer o espectro mutacional para a TMAu em doentes Portugueses tendo sido estudados 52 doentes com fenótipo sugestivo de TMAu.

Nos 52 doentes estudados com fenótipo sugestivo de TMAu foi confirmada a presença de polimorfismos e/ou mutações patogénicas no gene FMO3, tendo-se observado 32 variantes. Verificou-se que a presença dos polimorfismos p.Glu158Lys e p.Glu308Gly, em combinação com outras variantes, originavam padrões diferentes no fenótipo, essencialmente em cis ou quando presentes em homozigotia.

Com os resultados obtidos correlacionou-se o genótipo da doença com o fenótipo, alertando-se para a necessidade do estudo desta patologia de uma forma integrada com a farmacogenética uma vez que o estudo mutacional deste gene poderá num futuro próximo ser encarado como uma possível ferramenta, na previsibilidade do sucesso de actuação de um determinado fármaco que sirva de substrato à enzima FMO3.

Deste estudo salientamos a necessidade de clarificar não só a patogénicidade das novas variantes encontradas, bem como dos seus efeitos na atividade enzimática de FMO3. Por outro lado, pretendemos também avaliar qual o papel que desempenham os polimorfismos mais comuns no binómio genótipo/fenótipo e/ou mecanismo protetor relativamente às drogas xenobióticas ou ambientais.

Palavras-chave: Trimetilaminúria, Síndrome de odor a peixe, Flavina mono-oxigenase 3, FMO3, Polimorfismos genéticos, Farmacogenética

ABSTRACT

“Fish odor syndrome” or Trimethylaminuria (TMAu) is an autosomal recessive genetic disorder characterized by the inability to convert malodorous dietary-derived trimethylamine (TMA) to odorless TMA N-oxide by the flavin containing monooxygenase 3 (FMO3). When the capacity to oxidize TMA to TMA N-oxide is diminished, in the liver, affected individuals exude a “fishy” body odor due to the secretion of TMA in their corporal fluids leading to a variety of psychosocial problems.

In this study, 52 Portuguese patients with phenotype suggestive of TMAu were evaluated for molecular screening of the FMO3 gene. Genomic DNA was automatically extracted from whole blood and the eight protein-coding exons and flanking intronic sequences of FMO3 gene (NM_006894.5) were directly sequenced after PCR amplification.

We found 32 variants in the FMO3 coding region. Whenever common variants (Glu158Lys, Glu308Gly) were considered in combination, a distinct pattern between the control population and patients was observed, mainly in what concerns the presence of Glu158Lys and Glu308Gly in homozygous state. Considering the overlapping substrate specificity of many of the FMOs, the contribution of interindividual variability in the expression of FMO3 gene may affect drug and foreign chemical metabolism in the liver and other tissues. Therefore, it is important to screen for common TMAu mutations but also extend the search to other genetic variants in order to correlate genotype and disease-associated phenotypes or the risk for an adverse effect from a drug or environmental toxicant. To fully understand the contribution of FMO3 variants and polymorphisms combination to pharmacogenetics, a larger sample analysis and more detailed investigation will be required. It is possible that individuals homozygous for potential allele will detoxify amines less efficiently and be at greater risk from an exaggerated clinical response or adverse drug reaction.

Further studies are necessary to clarify the pathogenicity of novel variants identified in this study, as well as the effect of the common single nucleotide polymorphisms, which may play an important role in disease presentation and/or protective mechanism to xenobiotics drugs or environment.

Keywords: Trimethylaminuria, Fish odour syndrome, flavina mono-oxigenase 3, FMO3, Genetic polymorphisms; Pharmacogenetics

¹Unidade de Rastreo Neonatal, Metabolismo e Genética - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

²Unidade de I&D, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

³Unidade de Doenças Metabólicas, Pediatria - CHLN EPE, Hospital de Santa Maria 1649-035 Lisboa

⁴Unidade de Doenças Metabólicas, Pediatria - Centro Hospitalar do Porto - CHP, 4099-001 Porto

⁵Unidade de Doenças Metabólicas, Pediatria - Centro Hospitalar de S. João, 4200-319 Porto

⁶Unidade de Doenças Metabólicas - Hospital Pediátrico - Centro Hospitalar de Coimbra, 3000-602 Coimbra

⁷IPATIMUP/FCUP- Instituto de Patologia e Imunologia Molecular, Universidade do Porto, 4200-465 Porto

Autor para correspondência: Laura Vilarinho, Unidade de Rastreo Neonatal, Metabolismo e Genética Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge - Rua Alexandre Herculano, N° 321, 4000-055. Telefone: (+351) 223401171; laura.vilarinho@insa.min-saude.pt.

Submetido/Submitted: 20 julho 2015 | Aceite/Accepted: 10 agosto 2015

INTRODUÇÃO

A Trimetilaminúria [TMAu; MIM 602079] também denominada Síndrome de odor a peixe podre, é uma doença genética de transmissão autossômica recessiva^{1,2,3,4} caracterizada por uma acumulação excessiva de trimetilamina (TMA) em resultado de uma deficiência na enzima flavina mono-oxigenase 3 (FMO3; EC 1.14.13.8). Esta enzima, NADPH-dependente pertence ao grupo das flavinas mono-oxigenases (FMO's), que a seguir ao Citocromo P450 (CYPs) são o grupo mais importante na oxidação de um vasto número de compostos químicos, incluindo fármacos, compostos alimentares e pesticidas^{5,6,7}. Apesar de só ter sido caracterizada em 1970⁸ as consequências da Trimetilaminúria já tinham sido reconhecidas por Shakespeare no monólogo de Trínculo (The Tempest, Act 2. Scene 2):

“What have we here? A man or a fish? Dead or alive? A fish: he smells like a fish; a very ancient and a fish-like smell; a kind of not of the newest Poor-John. A strange fish! (...)”

Dos cinco genes de FMO's funcionais que se conhecem, apenas o gene FMO3 é a forma mais importante no fígado do adulto⁹. Em condições normais, a TMA (composto volátil e odorífero) é metabolizada no fígado e convertida pela enzima FMO3 em N-óxido de TMA (TMAO; composto não volátil e não odorífero) (Figura 1).

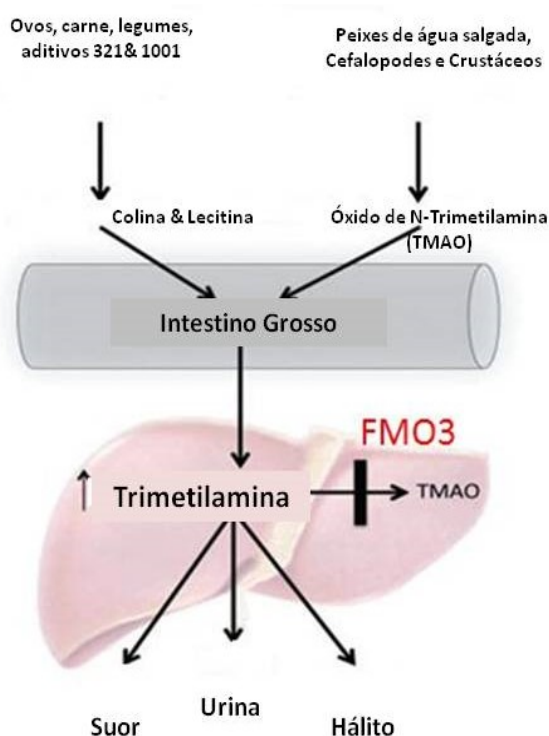


Figura 1. Via metabólica primária de TMAu

Desta forma, qualquer “erro” na regulação desta via metabólica, resultará em défices enzimáticos de FMO3, levando a um aumento de TMA, na urina, suor, hálito e outros fluídos corporais. Apesar da TMAu não estar associada a mortalidade ou morbidade, as consequências psicossociais desta patologia são devastadoras, podendo mesmo conduzir à depressão, isolamento e suicídio³.

A TMAu pode ser classificada em primária e secundária^{10,11}. A forma primária, resultante de alterações genéticas no gene codificante da enzima FMO3, causa regra geral, um decréscimo na atividade enzimática de FMO3. Em consequência da existência de mutações patogénicas que *per se* ou acompanhadas por polimorfismos no gene FMO3, irão reduzir ou inativar a atividade da enzima. A forma secundária, sem predisposição genética, resulta de uma sobrecarga em TMA ou dos seus precursores, em resultado de uma combinação de fatores (ex: alterações gastrointestinais, infeções bacterianas e virais ou mesmo por alterações hormonais). Para além destas duas formas, podemos ainda considerar as formas transitórias de TMAu, por exemplo, a prematuridade nos recém-nascidos à qual poderá estar associada à falta de maturação da enzima FMO3; bem como certos casos transitórios que podem ocorrer durante o período menstrual, devido à inibição da enzima FMO3 pelos estrogénios (originando um aumento de TMA)^{6,12,13,14,15}.

Laboratorialmente, a TMAu pode ser diagnosticada quer através da quantificação de TMA e TMAO na urina por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou mais comumente pelo estudo molecular do gene FMO3^{14,16,17}.

As variantes genéticas associadas com o gene FMO3, originam quer fenótipos leves quer fenótipos graves em situações de inativação total da enzima. Em qualquer das formas, é essencial o conhecimento dos polimorfismos da população, uma vez que a presença destes, pode potenciar o efeito das variantes genéticas e condicionar assim o fenótipo^{13,17,18}. De acordo com a literatura, a incidência de TMAu pode variar entre 1% a 10%, dependendo da população¹. Presentemente, estão descritas mais de 300 variantes no gene FMO3¹⁹, sendo que apenas 40 desses variantes estão associados com um fenótipo de TMAu. Para além das variações inter-individuais do gene FMO3, que contribuem para a caracterização do espectro mutacional da doença, temos ainda a considerar as interações sinérgicas epistáticas entre alguns SNP's que também contribuem para

um efeito deletério, levando a um agravamento do fenótipo, como é o caso dos polimorfismos mais comuns p.Glu158Lys e p.Glu308Gly que reduzem a atividade da enzima^{13,20,21}. Apesar da presença destes polimorfismos ser insuficiente para, na maioria dos casos, causar TMAu, em crianças podem ser a causa etiológica de perturbações nesta via metabólica, devido à baixa expressão deste FMO3 nesta fase de desenvolvimento.

Neste trabalho, pretendemos não só dar a conhecer o espectro molecular dos 52 doentes estudados com clínica sugestiva de TMAu, provenientes de diferentes regiões do nosso país, mas também sensibilizar para a necessidade de encarar esta patologia, que apesar de benigna, pode ter implicações sociais e de autoestima gravíssimas e que se identificada atempadamente poderá minimizar o impacto na vida comunitária da pessoa afetada. Estudou-se também a frequência na nossa população dos polimorfismos com efeito deletérios e pretendeu-se alertar para a possibilidade de indivíduos com determinados genótipos puderem metabolizar de forma diferente fármacos que sejam utilizados como substrato para a enzima FMO3 e que terão desta forma, respostas diferentes ao binómio droga/ clínica.

MATERIAL E MÉTODOS

Doentes estudados

Estudamos 52 doentes (29 do sexo masculino e 23 do sexo feminino) de origem portuguesa, enviados por diversos centros hospitalares, com fenótipo sugestivo de TMAu (odor a peixe). A faixa etária destes doentes, variou entre o primeiro ano de vida até aos 52 anos. Como população controlo, estudamos 100 indivíduos saudáveis (200 alelos), não consanguíneos, de faixa etária equivalente e de origem Portuguesa (Todos estes estudos foram realizados após consentimento).

Caracterização Molecular

O DNA genómico foi extraído a partir de sangue total por métodos automatizados (EZ1, QIAGEN). Os 8 exões e as respetivas regiões flanqueadoras do gene FMO3 (NM_006894.5) foram amplificadas por PCR seguida de sequenciação automática. A reacção de sequenciação, utilizando o método de Sanger foi preparada usando o kit “Big Dye Terminator sequencing” e seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram analisados num ABI PRISM™ 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Análise bioinformática

A conservação dos resíduos mutados foi obtida por comparação de 17 sequências ortólogas de FMO3. As sequências proteicas foram analisadas no programa Geneious v5.4 usando as definições standard²². As previsões in silico foram feitas recorrendo a ferramentas informáticas como Polyphen e Sift, respetivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização genética dos doentes com TMAu

Na Tabela 1 estão referidas as variantes encontradas no estudo molecular dos 52 doentes na região codificante do gene FMO3 e à exceção de p.Ser417Ser, p.Val283Val e p.Asn285Asn, todas são mutações missense ou non-sense não tendo sido detetadas nos 200 alelos da população controlo, o que sugere que terão um efeito patogénico e estarão associados à doença (Figura 2). Adicionalmente, o padrão de conservação destas variantes nos mamíferos vem reforçar o efeito putativo destas substituições.

Associação entre TMAu e os polimorfismos mais comuns p.Glu158Lys e p.Glu308Gly

Dos resultados obtidos observamos uma associação dos polimorfismos mais comuns, p.Glu158Lys e p.Glu308Gly, com algumas das

Tabela 1. Identificação das variantes encontradas no gene FMO3, nos 52 doentes estudados para TMAu

Genótipo	Referência
Gly38Trp	[23]
Ser147Ser	[16]
Pro153Leu	[24]
Glu158Lys	[20]
Glu180Val	[25]
Glu208Lys	Neste Estudo
Asp232Val	[23]
Arg238Gly	<i>Neste Estudo</i>
Val283Val	Neste Estudo
Asn285Asn	rs909530
Val257Met	[26]
Glu305Term	[27]

Tabela 1. Identificação das variantes encontradas no gene FMO3, nos 52 doentes estudados para TMAu (cont.)

Genótipo	Referência
Arg238Gly	Neste Estudo
Thr307Pro	[23]
Glu308Gly	[20]
Ser310Leu	[23]
Gln373Gln*11	[23]
Trp388Leu	rs199975586
Arg417Cys	rs149551557
Thr428Ser	rs147245760
Arg492Trp	[20]
c.627+10 C>G	[16]
Val283Val	Neste Estudo
Asn285Asn	rs909530
Val257Met	[26]
Glu305Term	[27]
Thr307Pro	[23]
Glu308Gly	[20]
Ser310Leu	[23]
Gln373Gln*11	[23]
Trp388Leu	rs199975586
Arg417Cys	rs149551557
Thr428Ser	rs147245760
Arg492Trp	[20]
c.627+10 C>G	[16]

variantes encontradas. De acordo com Zschocke e seus colaboradores²¹ os portadores destes polimorfismos apresentam uma diminuição na oxidação da trimetilamina em N-óxido de trimetilamina após prova oral de sobrecarga. Este facto foi também demonstrado em estudos funcionais *in vivo*, onde se verificou um aumento de TMA não metabolizada^{22,23,24} De salientar, que

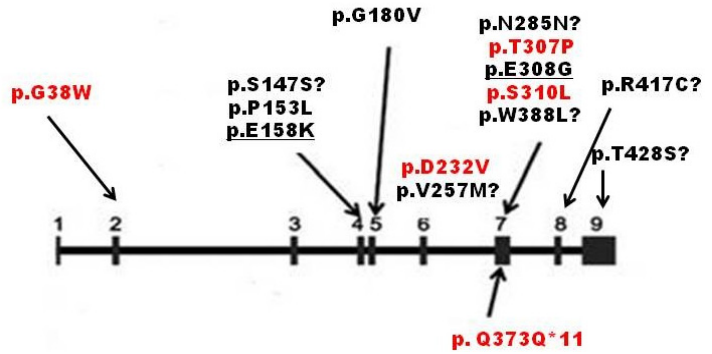


Figura 2. Variantes encontradas no gene FMO3, nos 52 doentes estudados e clinicamente suspeitos de TMAu. [Legenda: mutações que resultam numa proteína truncada (abaixo da representação esquemática do gene); mutações missense patogénicas (em cima da representação esquemática do gene); variantes sublinhadas (variantes que em *cis* afetam a atividade enzimática de FMO3); e variantes com um ponto de ? (variantes cuja função na actividade da enzima ainda não é totalmente conhecida)] (in FMO3 Allelic Variant Database at http://human-fmo3.biochem.ucl.ac.uk/Human_FMO3/)

em alguns casos, a presença destes polimorfismos poderá apenas aumentar a propensão para desencadear, em determinadas ocasiões, uma forma transitória de TMAu (ex: dieta, elevado consumo de precursores de TMA, alterações na flora do trato intestinal, dieta rica em vegetais do género Brassica, ou mesmo durante o período menstrual)^{32,33} Esta parece ser a explicação mais plausível, em crianças ou mesmo adultos, que sofrem de uma trimetilaminúria transitória, regra geral, de fenótipo leve e que acaba eventualmente por resolver-se com uma dieta moderada²⁵

Na Figura 3 podemos observar a distribuição haplotípica de p.Glu158Lys e p.Glu308Gly numa população controlo de indivíduos normais e nos doentes com TMAu referidos neste trabalho. É importante salientar que uma boa fração da população saudável, não é portadora nem de p.Glu158Lys ou p.Glu308Gly. Verifica-se que a frequência de indivíduos portadores de p.Glu158Lys em heterozigotia é semelhante em ambas as populações (59% no grupo de doentes versus 60% na população controlo) no entanto, em homozigotia, estes polimorfismos são mais frequentes entre os doentes (22% versus 2% na população controlo). Outra grande diferença observada, é na frequência de indivíduos portadores para ambas as variantes em homozigotia. Neste caso, a homozigotia para ambos os alelos não foi observada na população normal (Figura 3). Esta distribuição haplotípica

reflete o papel funcional destas duas variantes na condição de TMAu. É assim passível de se esperar, que a gravidade da proteína codificada por FMO3 afetada varie com a combinação entre

estas variantes. Desta forma, a presença das variantes mais comuns per se ou em combinação com outras, menos frequentes, terão um impacto elevado na atividade da enzima.

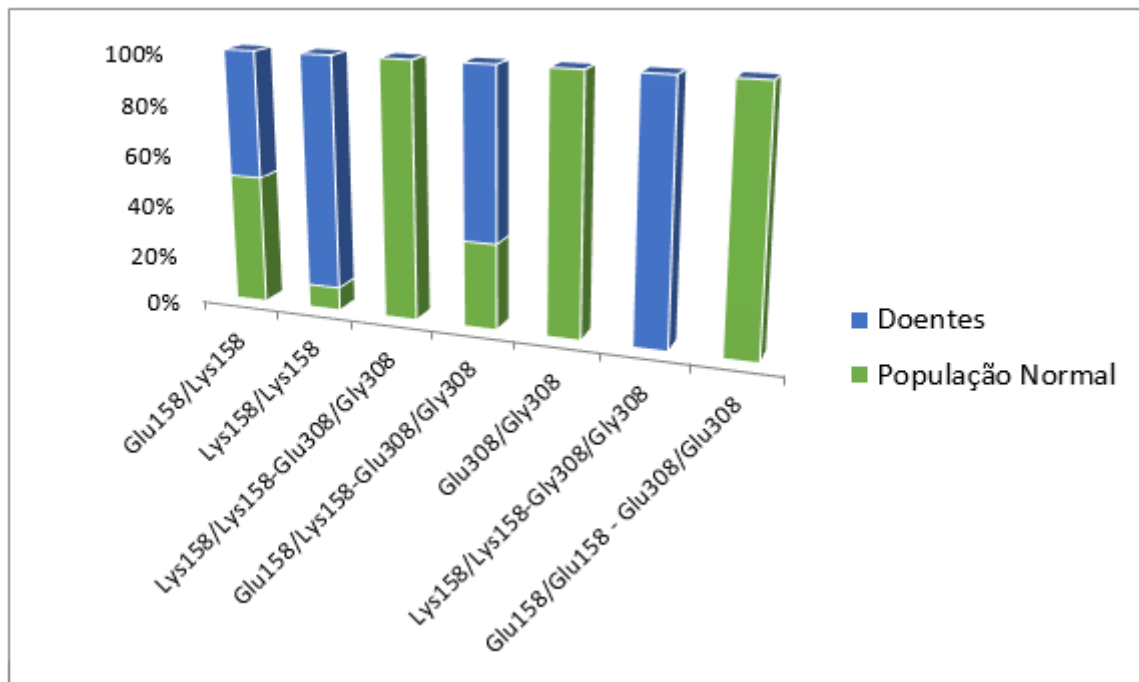


Figura 3. Distribuição dos polimorfismos mais frequentes – p.Glu158Lys e p.Glu308Gly, na população controlo e nos doentes estudados para o gene FMO3

Outro polimorfismo, bastante comum entre a população Caucasiana, e que se encontra ligado aos polimorfismos p.Glu158Lys e p.Glu308Gly, é o polimorfismo p.Val257Met¹². Dois dos doentes estudados, apresentaram este polimorfismo (um dos doentes apresenta também o p.Glu158Lys em heterozigotia). Em ambos os casos, os doentes exibiram um fenótipo moderado, o que está de acordo com o gráfico da Figura 3. Se as variantes p.Val257Met e p.Glu308Gly contribuem para uma diminuição na N-oxigenação^{26,27} então é possível que indivíduos homozigóticos para ambos os alelos, demonstrem uma capacidade de desintoxicação das aminas, menos eficiente, havendo o risco de uma resposta clínica mais grave, comparando com aqueles indivíduos que não possuam estes polimorfismos no gene FMO3¹². De acordo com Cashman e Zhan¹², outras três variantes de FMO3 (ex: p.Gly180Val, p.Ser147Ser e p.Phe239Phe) estão associadas com uma atividade normal ou reduzida de N-oxidação de TMA. Os polimorfismos; p.Glu158Lys, p.Val257Met e p.Glu308Gly parecem ter uma frequência mais elevada na população em geral, comparativamente com outros polimorfismos (p.Ser147Ser e p.Phe239Phe) que à exceção de p.Gly180Val, codificam substituições sinónimas. Convém realçar que nem sempre é fácil determinar o

papel que estes polimorfismos irão ter na atividade enzimática de FMO3, uma vez que para alguns doentes estudados, a presença destes foi inconclusiva e provavelmente o fenótipo observado, resultará de uma forma secundária, transitória, de trimetilaminúria.

Outro polimorfismo, bastante comum entre a população Caucasiana, e que se encontra ligado aos polimorfismos p.Glu158Lys e p.Glu308Gly, é o polimorfismo p.Val257Met¹². Dois dos doentes estudados, apresentaram este polimorfismo (um dos doentes apresenta também o p.Glu158Lys em heterozigotia). Em ambos os casos, os doentes exibiram um fenótipo moderado, o que está de acordo com o observado na Figura 3. Se as variantes p.Val257Met e p.Glu308Gly contribuem para uma diminuição na N-oxigenação^{26,27} então é possível que indivíduos homozigóticos para ambos os alelos, demonstrem uma capacidade de desintoxicação das aminas, menos eficiente, havendo o risco de uma resposta clínica mais grave, comparando com aqueles indivíduos que não possuam estes polimorfismos no gene FMO3¹². De acordo com Cashman e Zhan¹², outras três variantes de FMO3 (ex: p.Gly180Val, p.Ser147Ser e p.Phe239Phe) estão associadas com uma atividade normal ou reduzida de N-oxidação de TMA. Os polimorfismos; p.Glu158Lys,

p.Val257Met e p.Glu308Gly parecem ter uma frequência mais elevada na população em geral, comparativamente com outros polimorfismos (p.Ser147Ser e p.Phe239Phe) que à exceção de p.Gly180Val, codificam substituições sinónimas. Convém realçar que nem sempre é fácil determinar o papel que estes polimorfismos irão ter na atividade enzimática de FMO3, uma vez que para alguns doentes estudados, a presença destes foi inconclusiva e provavelmente o fenótipo observado, resultará de uma forma secundária, transitória, de trimetilaminúria.

CONCLUSÃO

Pretendemos com este estudo contribuir para o conhecimento do espectro mutacional de *FMO3* na população Portuguesa e alertar para a necessidade de um diagnóstico efetuado recorrendo ao estudo molecular do gene *FMO3*. A deficiência em *FMO3* deverá ser encarada como um problema grave, cujo diagnóstico da doença poderá conduzir à morte, não por incumprimento de uma dieta específica, mas pela vertente psico-social que a doença produz. Assim, do nosso ponto de vista, consideramos que a trimetilaminúria, não deverá ser apenas considerada uma doença rara autossómica recessiva, mas sim um espectro de fenótipos cuja manifestação mais evidente é o odor a peixe podre, e em que fatores como a exposição ambiental, xenobióticos e dieta apresentam um papel preponderante no despoletar e/ou agravamento da sintomatologia desta doença. Dos 52 doentes que estudamos neste trabalho, foram encontradas 32 variantes no gene *FMO3*. Através deste estudo, poderemos avaliar as implicações que as variantes encontradas e polimorfismos terão na determinação do genótipo e fenótipo da doença TMAu. A TMAu é talvez o exemplo mais visível e direto entre a presença de variantes no gene *FMO3*, a sua correlação genótipo-fenótipo, e o efeito na atividade catalítica de *FMO3*. No entanto, o estudo deste gene, estará muito mais para além do espectro da doença de TMAu. Adicionalmente, e face ao descrito na literatura pretendemos alertar também para o papel que estas variantes poderão desempenhar no metabolismo de compostos químicos e fármacos, que sirvam de substrato para a enzima codificada por este gene, e que condicionará a interação entre fármacos, droga-doença, ou poderá apenas funcionar como efeito protetor a determinados compostos (como no caso da utilização do anti-inflamatório, não esteroide; o sulindac). No entanto, serão necessários estudos adicionais para clarificar, não

só a patogenicidade das novas variantes encontradas bem como dos efeitos dos polimorfismos a elas associadas, e de que forma irão alterar a atividade catalítica da enzima *FMO3*. Esta doença pode não ser um erro inato do metabolismo como estamos habituados a considerar, mas os efeitos psicossociais e acima de tudo, muitas vezes a falha no diagnóstico, pode causar um impacto devastador no quotidiano do doente, levando ao isolamento e em última instância ao suicídio. O diagnóstico e/ou encaminhamento dos doentes para a consulta de Doenças Metabólicas de pediatria ou de adulto é extremamente importante^{44,45}. As principais medidas terapêuticas são importantes pois visam controlar o odor e prevenir as complicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cashman JR, Zhang J, Leushner J, Braun A. Population distribution of human flavin-containing monooxygenase Form 3: gene polymorphisms. *Drug Metab. Dispos.* 2001;29:11629-1637.
2. Mitchell CS, Smith RL. Trimethylaminuria (fish-odour syndrome) and oral malodour. *Oral Diseases* 2005;11:10-13.
3. Christodoulou J. Trimethylaminuria: an under-recognised and socially debilitating metabolic disorder. *Paediatr. Child Health* 2012;48:153-155. doi: 10.1111/j.1440-1754.2010.01978.x.
4. Elizabeth AS, Treacy EP, Ian RP. Clinical utility gene card for: Trimethylaminuria – update 2014. *European Journal of Human Genetics* 2014:e1-e5.
5. Cashman JR. Human flavin-containing monooxygenase (form 3): polymorphisms and variation in chemical metabolism. *Pharmacogenomics* 2002;3:325-339.
6. Shimizu M, Cashman JR, Yamazaki H. Transient trimethylaminuria related to menstruation. *BMC Med. Genet.* 2007;8:1-3.
7. Zhang AQ, Mitchell SC, Smith R. Exacerbation of symptoms of fish-odour syndrome during menstruation. *The Lancet* 1996;348:1740-1741.
8. Humbert JR, Hammond KB, Hathaway WE, Marcoux JO'Brien D. Trimethylaminuria: the fish-odour syndrome. *Lancet* 1970; 296:770-771.
9. Allerston CK, Shimizu M, Fujieda M, Shephard EA, Yamazaki H, Phillips IR.. Molecular evolution and balancing selection in the avin-containing monooxygenase 3 gene (*FMO3*). *Pharmacogenet. Genomics* 2007;17:827-839.
10. Motika MS, Zhang J, Cashman JR. Flavin-containing monooxygenase 3 and human disease. *Exp. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2007;3:931-845.

11. Mayatepek E, Kohlmu ID. Transient trimethylaminuria in childhood. *Acta. Paediatr.* 1998;87:1205-1207.
12. Cashman JR, Zhang J. Interindividual differences of human flavin-containing monooxygenase 3: genetic polymorphisms and functional variation. *Drug Metab. Dispos.* 2002;30:1043-1052.
13. Cashman JR, Camp K, Fakharzadeh SS, Fennessey PV, Hines RN, Mamer OA, et al. Biochemical and clinical aspects of the human flavin-containing monooxygenase form 3 (FMO3) related to Trimethylaminuria. *Curr. Drug Metab.* 2003;4:151-170.
14. Mitchell SC, Smith RL. Trimethylaminuria: the fish malodor syndrome. *Drug Metab. Dispos.* 2001;29:219-221.
15. Zhang J, Tran Q, Lattard V, Cashman JR. Deleterious mutations in the avincontaining monooxygenase 3 (FMO3) gene causing Trimethylaminuria. *Pharmacogenetics.* 2003;13:495-500.
16. Chalmers RA, Bain MD, Michelakakis H, Zschocke J, Iles RA. Diagnosis and management of trimethylaminuria (FMO3 deficiency) in children. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006;29, 162-172.
17. Phillips IR, Shephard EA. Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008;29:294-301.
18. Lambert DM, et al. In vivo variability of TMA oxidation is partially mediated by polymorphisms of the FMO3 gene. *Mol. Genet. Metab.* 2001;73:224-229.
19. Hernandez D, Addou S, Lee D, Orengo C, Shephard EA, Phillips IR.. Trimethylaminuria and a human FMO3 mutation database. *Hum. Mutat.* 2003;22:209-213.
20. Akerman BR, Lemass H, Chow LM, Lambert DM, Greenberg C, Bibeau C, Mamer OA, Treacy EP. Trimethylaminuria is caused by mutations of the FMO3 gene in a North American cohort. *Mol. Genet. Metab.* 1999;68 24-31.
21. Zschocke J, Kohlmüller D, Quak E, Meissner T, Hoffman GF, Mayatepek E. Mild trimethylaminuria caused by common variants in FMO3 gene. *Lancet.* 1999;354:834-835.
22. Drummond A, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, et al. 2011; Geneious v5.4, available from <http://www.geneious.com/>
23. Ferreira F, Esteves S, Almeida LS, Gaspar A, Dias da Costa C., Janeiro P, et al. Trimethylaminuria (fish odor syndrome): Genotype characterization among Portuguese patients. *Gene.* 2013;527:366-370.
24. Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA, Phillips IR. Missense mutation in avin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies sh-odour syndrome. *Nat. Genet.* 1997;17:491-494.
25. Dolphin CT, Azara J, Smith RL, Shephard EA, Phillips IR. Compound heterozygosity for missense mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene in patients with fish-odour syndrome. *Pharmacogenetics.* 2000;10:799-807.
26. Furnes B, Feng J, Sommer SS, Schlenk D. Identification of novel variants of the flavin-containing monooxygenase gene family in african Americans. *Drug Metab. Dispos.* 2003;31:187-193.
27. Treacy EP, Akerman BR, Chow LM, Youil R, Bibeau C, Lin J, et al. Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Hum. Mol. Genet.* 1998;7:839-845.
28. Cashman JR, Akerman BR, Forrest SM, Treacy E.P. Population-specific polymorphisms of the human FMO3 gene: significance for detoxication. *Drug Metab. Dispos.* 2000;28:169-173.
29. Dolan C, Shields DC, Stanton A, O'Brien E, Lambert DM, O'Brien JK. Treacy EP. Polymorphisms of the Flavin containing monooxygenase 3 (FMO3) gene do not predispose to essential hypertension in Caucasians. *BMC Med. Genet.* 2005;6:1-7.
30. Fujieda M, Yamazaki H, Togashi M, Saito T, Kamataki T. Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the FMO3 gene in Japanese. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2003;18:333-335.
31. Lambert DM, Mamer OA, Akerman BR, Choiniere L, Gaudet D, Hamet P, et al. In vivo variability of TMA oxidation is partially mediated by polymorphisms of the FMO3 gene. *Mol. Genet. Metab.* 2001;73:224-229.
32. Krueger SK, Williams DE.. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics.* 2005;106:357-387.
33. Poetsch M, Czerwinski M, Wingenfeld L, Vennemann M, Bajanowski T. A common FMO3 polymorphism may amplify the effect of nicotine exposure in sudden infant death syndrome (SIDS). *International J. of Legal Med.* 2010;124:301-306.
34. Sachse C, Ruschen S, Dettling M, Schley J, Bauer S, Müller-Oerlinghausen B, et al. Flavin monooxygenase 3 (FMO3) polymorphism in a white population: allele frequencies, mutation linkage, and functional effects on clozapine and caffeine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1999;66:431-438.

35. Hisamuddin IM, Wehbi MA, Chao A, Wyre HW, Hyland LM, Giardiello FM, et al. Genetic polymorphisms of human flavin monooxygenase 3 in sulindac-mediated primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:8357-8362.
36. Koukouritaki SB, Hines RN. Flavin-containing monooxygenase genetic polymorphism: impact on chemical metabolism and drug development. *Pharmacogenomics.* 2005;6:807-822.
37. Hisamuddin IM, et al. Genetic polymorphisms of Flavin Monooxygenase 3 in sulindac-induced regression of colorectal adenomas in familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005;14: 2366-2369.
38. Park CS, Kang JH, Chung WG, Yi HG, Pie JE, Park DK, et al. Ethnic differences in allelic frequency of two flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) polymorphisms: Linkage and effects on in vivo and in vitro FMO activities. *Pharmacogenetics.* 2002;12:77-80.
39. Hao D, Sun J, Furnes B, Schlenk D, MiaoXin Li, ShengLi Yang, et al. Allele and genotype frequencies of polymorphic FMO3 gene in two genetically distinct populations. *Cell Biochem. Funct.* 2007;25:443-453.
40. Lattard V, Zhang J, Tran Q, Furnes B, Schlenk D, Cashman JR. Two new polymorphisms of the FMO3 gene in Caucasian and African-American populations: comparative genetic and functional studies. *Drug. Metab. Dispos.* 2003;31:854-860.
41. Koukouritaki SB, Poch MT, Henderson MC, Siddens LK, Krueger SK, VanDyke JE, et al. Identification and functional analysis of common human flavin-containing monooxygenase 3 genetic variants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007;320:266-273.
42. Koukouritaki SB, Simpson P, Yeung CK, Rettie AE, Hines RN. Human hepatic flavin-containing monooxygenase 1 (FMO1) and 3 (FMO3) developmental expression. *Pediatric Res.* 2002;51:236-243.
43. Zhou J, Shepard EA. Mutation, polymorphism and perspectives for the future of human flavin-containing monooxygenase3. *Mutation Research.* 2006;612:165-171.
44. Yeung CK, Adman ET, Rettie AE. Functional characterization of genetic variants of human FMO3 associated with Trimethylaminuria. *Arch. Biochem. and Biophysics* 2007;464: 251-259.
45. Mackay RJ, McEntyre CJ, Henderson C, Lever M, George PM. Trimethylaminuria: Causes and Diagnosis of a Socially Distressing Condition. *Clin. Biochem. Rev.* 2011;32:33-43.

Web references

- <http://www.bis.med.jhmi.edu/bio/search/FILT/enzyme.html/> (Enzyme Commission; EC)
- <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A.S. Kondrashov, S.R. Sunyaev, *Nat Methods* 7(2010) 248-249)
- http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html (P. Kumar, S. Henikoff, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 4(2009) 1073-81.