



**Universidade de
Aveiro**
2011

Departamento de Biologia

**Mariana Gomes de
Paiva**

**Espectro Mutacional da Trimetilaminúria na
População Portuguesa**



**Universidade de
Aveiro**

2011

Departamento de Biologia

**Mariana Gomes de
Paiva**

**Espectro Mutacional da Trimetilaminúria na
População Portuguesa**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Laura Vilarinho, Investigadora Auxiliar do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e co-orientação da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogal
Arguente

Doutora Luísa Cristina da Costa Azevedo
Investigadora do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP)

Vogal
Orientadora

Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogal
Co-orientadora

Doutora Laura Ferreira Teixeira Vilarinho
Investigadora Auxiliar do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

agradecimentos

Mais uma etapa da minha caminhada a chegar ao fim, e por isso não podia deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que isso fosse possível.

À Dr^a Laura Vilarinho, por ter-se sempre disponibilizado em me apoiar na realização deste trabalho, pela orientação e essencialmente me ter recebido de braços abertos, o meu muito obrigado por tudo.

À Dr^a M^a Lourdes Pereira por me receber na co-orientação deste trabalho, o meu maior carinho.

O meu maior carinho a todos aqueles que me acompanharam nesta etapa, que me apoiaram nos momentos bons e nos menos bons e que contribuíram para que este projeto se tornasse realidade.

palavras-chave

Trimetilaminúria, odor a peixe, metabolização, trimetilamina, *FMO3*, mutações, espectro mutacional, população portuguesa.

resumo

A Trimetilaminúria também conhecida como síndrome do odor a peixe, é uma doença hereditária autossómica recessiva que se manifesta pelo intenso odor corporal a peixe em putrefação que os seus portadores emanam. Esta patologia está associada a uma deficiência na metabolização de alimentos derivados da trimetilamina. A sua causa genética está relacionada com mutações ao nível do gene flavina mono-oxigenase 3 - *FMO3*.

É considerada uma doença rara e a principal manifestação clínica consiste no persistente odor a peixe.

Diversos autores têm-se debruçado no estudo desta patologia, a fim de compreenderem o mecanismo de acção de *FMO3*. Contudo, foram relatadas diversas mutações no gene consoante a etnia.

O presente trabalho propõe-se divulgar o espectro mutacional da trimetilaminúria na população portuguesa.

Contou com o apoio do Centro de Genética Médica do Porto, de onde provieram todos os dados.

Este estudo contou com uma pesquisa bibliográfica da referida patologia assim como com o auxílio de programas bio-informáticos para a projecção de dados relativos às mutações encontradas.

Mediante projecções bio-informáticas, os estudos sugerem que das mutações “novas” encontradas em doentes portugueses três delas aparentemente não manifestam consequências graves no funcionamento da enzima. No enquanto, as restantes seis são potenciais de causar um impacto negativo na actividade enzimática.

keywords

Trimethylaminuria, smell of fish, metabolism, trimethylamine, *FMO3* mutations, mutational spectrum, Portuguese population.

abstract

The Trimethylaminuria also known as fish odor syndrome is an recessive autosomal inherited disease that manifests by the body smell of putrefying fish emanating from the patients. This pathology is associated with a deficiency in the metabolism of foods derived from trimethylamine. The cause is related to genetic mutations at the level of *FMO3* gene.

It is considered a rare disease and the main clinical manifestation is the persistent smell of fish.

Several authors have focused on the study of this pathology in order to understand the mechanism of action of *FMO3*. However, several mutations have been reported in the gene according to ethnicity.

This paper proposes to disclose the mutational spectrum of Trimethylaminuria in the Portuguese population.

Got support from Center of Genetic Medicine of Porto, where all data were derived.

This study included a literature search of this condition and with the aid of bio-informatics programs for projection of the data mutations were found.

By the bio-informatics projections, the studies suggest that from the “new” mutations found in Portuguese patients apparently three of them do not manifest serious consequences in the functioning of the enzyme, while the remaining six are potential to cause a negative impact on the enzyme function.

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. – Antes de Cristo

Af – *Aspergillus fumigatus*

DNA – ácido desoxirribonucleico

FMO – Monooxigenases contendo flavina

HTML – HyperText Markup Language

N – azoto

P – fósforo

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase

RNA – ácido ribonucleico

S – enxofre

SNP – Polimorfismos de nucleotídeo único

TMA – Trimetilamina

TMAO – Trimetilamina N-óxido

TMAuria – Trimetilaminuria

UEP – Unidade de Período Evolutivo

WWW – World Wide Web

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO	11
TRIMETILAMINÚRIA	12
História.....	13
As enzimas <i>FMO</i> e respectivos genes	14
<i>FMO1</i>	18
<i>FMO2</i>	19
<i>FMO3</i>	20
<i>FMO4</i>	22
<i>FMO5</i>	22
Ciclo de N-oxidação da TMA no ser humano.....	23
Apresentação clínica	25
Diagnóstico e Prognóstico.....	28
Tratamento	30
Mutações de <i>FMO3</i> descritas na literatura.....	32
OBJECTIVOS DO ESTUDO	41
MATERIAL E MÉTODOS	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES.....	52
Perspectivas futuras.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Variações genéticas e substituições de aminoácidos da <i>FMO3</i> Humana (adaptado de Cashman e Zhang, 2002).....	35
Tabela 2 Mutações encontradas em doentes portugueses	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas de TMA (A) e TMAO (B) (Adaptado de Mackay, 2011).	12
Figura 2 - Representação simplificada de parte da estrutura de <i>FMO</i> (Adaptado de Allerston et al., 2009).	15
Figura 3 - Ciclo catalítico das <i>FMO</i> dos mamíferos (Adaptado de Phillips e Shephard, 2007).	17
Figura 4 - Esquema representativo do cromossoma 1. A seta indica o local de <i>FMO</i> 1, 2, 3 e 4.	18
Figura 5 - Metabolismo dos precursores dietéticos da TMA (Adaptado de Arseculeratne et al., 2007).	25
Figura 6 - <i>Primers</i> usados na amplificação e sequenciação do gene <i>FMO3</i> (Adaptado de Kubota et al., 2002).	33
Figura 7 – Gráfico obtido através do programa <i>Pymol</i> ®, da qualidade do alinhamento do modelo de <i>FMO3</i> bacteriano com a sequência de <i>FMO3</i> humano - 21%.	45
Figura 8 - Estudo da variante S310L obtido através do programa PolyPhen.	45
Figura 9 - Estudo da variante R417C obtido através do programa PolyPhen.	46
Figura 10 - Estudo da variante T428S obtido através do programa PolyPhen.	47
Figura 11 - Estudo da variante G38T obtido através do programa PolyPhen.	47
Figura 12 - Estudo da variante W388L obtido através do programa PolyPhen.	48

INTRODUÇÃO

A trimetilaminúria (TMAuria), também conhecida por síndrome do odor de peixe, é transmitida de forma autossómica recessiva. Os indivíduos afectados são incapazes de metabolizar alimentos derivados de trimetilamina (TMA) para o seu produto oxidado, que é inodoro, sendo esta reacção catalisada por flavina mono-oxigenase 3 - *FMO3*. Consequentemente, estes indivíduos excretam a amina livre, conferindo um odor corporal semelhante ao de peixe em putrefacção. Sofrem muitas vezes e exibem uma variedade de reacções psicológicas e anti-sociais devido à sua condição, incluindo ansiedade, depressão crónica e tentativa de suicídio.

A TMAuria é considerada uma doença rara e por isso a sua incidência em Portugal é desconhecida. Por este facto surgiu a oportunidade de estudar um pouco mais esta patologia, a nível global, e relacioná-la com dados disponíveis da população portuguesa para, se possível, divulgá-la aos profissionais de saúde e da população em geral, dado que poderão existir muitas mais pessoas a sofrer desta alteração metabólica sem serem diagnosticadas e, principalmente, acompanhadas correctamente.

O presente trabalho compreende uma revisão bibliográfica quer ao nível de diagnóstico quer do prognóstico, e de tratamentos adequados, atendendo que se trata de uma doença crónica e um melhor conhecimento pode contribuir para melhorar a qualidade de vida dos seus portadores. Compreende ainda a análise das mutações de doentes de origem portuguesa e do seu impacto no diagnóstico individual, tendo em conta as pesquisas bibliográficas efectuadas, não se encontrou nenhuma publicação relativa à trimetilaminúria na população portuguesa.

TRIMETILAMINÚRIA

A trimetilaminúria (TMAúria) também conhecida como síndrome do odor de peixe, é uma doença autossômica recessiva, que em termos bioquímicos, caracteriza-se pela excreção excessiva de trimetilamina (TMA) não metabolizada, em todos os fluidos corporais, incluindo urina, ar expirado (hálito) e suor (Dolan et al., 2005; Yamazaki et al., 2006).

A TMA é um composto volátil à temperatura do corpo e possui um odor forte e desagradável em concentrações que excedam o limite olfativo; em baixas concentrações pode ser descrita como um cheiro semelhante a lixo, conferindo um odor pungente ao indivíduo.

O metabolismo de precursores alimentares de TMA, como a colina, lecitina e carnitina, podem levar ainda à produção de uma amina terciária volátil. Os doentes com trimetilaminúria excretam quantidades excessivas da amina livre como resultado de defeitos hepáticos na N-oxidação da TMA. Por exemplo, algumas espécies de galinhas produzem ovos com odor de TMA, como resultado de defeito na oxidação. Nos humanos, a variação étnica na capacidade de oxidar N-TMA é reconhecida (Arseculeratne et al., 2007), como veremos mais adiante. Assim, a quantidade excessiva de TMA resulta de um erro inato do metabolismo de oxidação da TMA em trimetilamina N-óxido (TMAO) inodora (Figura 1). É de salientar que esta incapacidade metabólica pode ser parcial ou total. A enzima responsável pela N-oxidação da TMA é a flavina mono-oxigenase 3 – *FMO3* (Cashman et al., 2003).

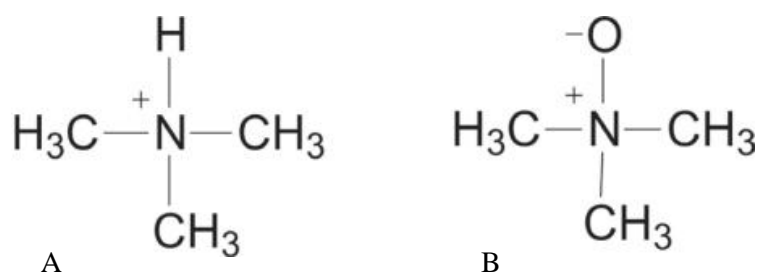


Figura 1 - Estruturas de TMA (A) e TMAO (B) (Adaptado de Mackay, 2011).

Esta enzima também está associada ao metabolismo de fármacos comuns. Assim, a TMAuria para além de ser altamente lesiva para a vida pessoal e profissional das pessoas afectadas, também pode acarretar consequências em termos de acção de medicamentos, e mesmo de outros químicos dependentes da acção da *FMO3*.

Em algumas partes do mundo, especialmente nos trópicos, parece haver uma elevada incidência de TMAuria (Zhou e Shephard, 2006).

História

Existem relatos antigos da observação da existência de indivíduos com um odor activo no corpo, semelhante ao do peixe em putrefacção. Exemplos desses mesmos relatos podem ser encontrados no épico indiano “Mahabharata” (compilado em torno de 400 a.C.), folclore tailandês do período Sukhothai (1250 a.C.) e no “Tempest” de William Shakespeare (1564-1616) (Cashman et al., 2003), sem contudo estarem associados a uma patologia.

A descrição de natureza científica é referida pela primeira vez na obra de John Arbuthnot (1667-1735), bem como em dois artigos publicados no início da publicação da revista *The Lancet*, referindo essa condição (Cashman et al., 2003).

No entanto, a primeira descrição de um caso clínico foi atribuído a Humbert et al. em 1970. O seu doente era uma criança de seis anos de idade, com cheiro fétido a peixe, e que estava sob investigação por uma doença presumivelmente relacionada com uma imunodeficiência, cuja mãe apresentava também, periodicamente, esse mesmo cheiro. Humbert e seus colaboradores documentaram então que a TMA não era metabolizada acumulando-se nas secreções corporais sustentando essa afirmação através da uma colheita de urina. Estes autores comprovaram que o doente aumentava a sua taxa de TMA urinário em 67% após a administração de 15mg/Kg de TMA oral, em contraste com a excreção de três indivíduos de controlo. As biópsias hepáticas subsequentes deste doente, confirmaram, e tal como previsto, a cinética enzimática anormal na conversão de TMA (Mackay et al.,

2011).

Desde esse tempo, foram numerosas as contribuições para o esclarecimento desta patologia, com destaque para diversos estudos sobre as mutações genéticas. Actualmente, são conhecidas algumas das causas genéticas primárias e também de algumas adquiridas, e embora a incidência da doença não seja conhecida, mais de 200 casos já foram descritos, sendo considerada uma entidade nosológica rara (Mackay et al., 2011).

As enzimas FMO e respectivos genes

As *FMO* (CE 1.14.13.8) (Figura 2) constituem uma família de enzimas microsossomais dependentes do FAD, NADPH e O₂ que catalisam a oxidação de um grande número de compostos, incluindo drogas, pesticidas e produtos químicos industriais contendo um nucleófilo (potencial dador de electrões). A *FMO* oxigena muitos xenobióticos nucleofílicos produzindo mais substâncias polares como um passo para a excreção, sendo considerada como um catalisador de desintoxicação. No metabolismo, as aminas terciárias são tipicamente excelentes substratos e são convertidas em N-óxido; por outro lado, as aminas secundárias são metabolizadas em hidroxilaminas e nitronas; e as aminas primárias as oximas e hidrazina em hidrazona (Krueger et al, 2002).

Em alguns casos, demonstrou-se que as *FMO* catalisam a formação de metabolitos reactivos capazes de se ligarem a macromoléculas celulares. Vários compostos endógenos, tais como trimetilamina, tiramina ou cisteamina foram identificados como substratos para as *FMO* (Lattard et al., 2003, p. 854; Treacy et al., 1998).

As *FMO* parecem estar também envolvidas na biossíntese de produtos naturais como os minerais *sideroph* de que muitos microrganismos patogénicos dependem para a captação e armazenamento de ferro nutricionalmente essencial e sem os qual podem perder a sua virulência. Consequentemente, estas *FMO* têm sido propostas como alvos de drogas promissoras particularmente contra os fungos patogénicos cujo tratamento clínico é extremamente difícil – *Aspergillus fumigatus* (Af). As *FMO* desempenham também um

papel-chave na biossíntese da hormona vegetal primária auxina, essencial para impor e controlar o crescimento das plantas, embora seja incerto de que modo isso é alcançado nos níveis de transcrição das proteínas (Frederick et al., 2011).

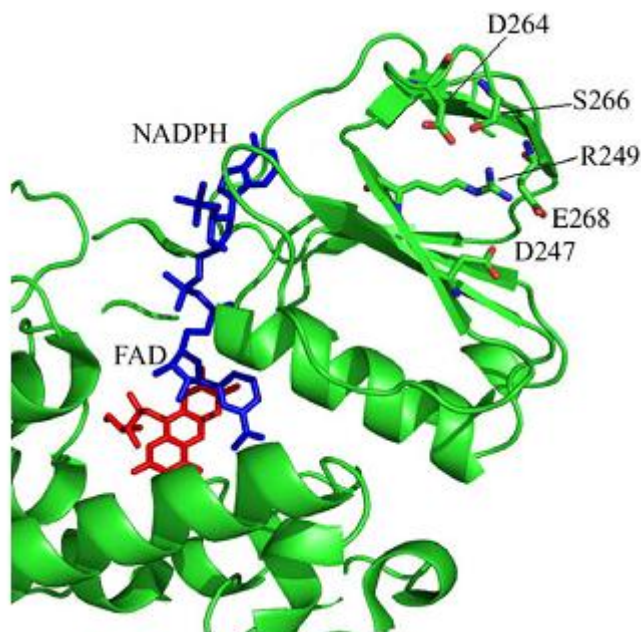


Figura 2 - Representação simplificada de parte da estrutura de *FMO* (Adaptado de Allerston et al., 2009).

Actualmente são conhecidas seis formas de *FMO*. Contudo, a evidência aponta para a existência de somente cinco formas funcionais de *FMO* humana. As *FMO* homólogas partilham 52 a 57% da identidade da sequência de aminoácidos, duplicados de um gene ancestral (Lattard et al., 2003; Furnes et al., 2003).

Pensa-se que a divergência genética nos mamíferos terá ocorrido há cerca de 85 milhões de anos, e para a *FMO* o tempo necessário para estabelecer uma diferença de 1% na sequência de aminoácidos - a unidade de período evolutivo (UEP) - é de cerca de 6 mil anos. Esta taxa aparente de evolução é consideravelmente mais lenta do que o de outra classe importante de monooxigenases de ampla especificidade de substrato envolvidas no metabolismo de substâncias, como por exemplo os citocromos P450, que têm uma UEP

média de cerca de 3 mil anos. Assim, a partir do cálculo da taxa de evolução da *FMO*, aponta-se para que os membros conhecidos desta família de genes surgiram a partir de um gene ancestral comum, por meio de eventos de duplicação de genes que teve lugar há cerca de 250-300 milhões de anos, muito antes da diferenciação dos mamíferos (Phillips et al., 1995).

Os valores estimados de p*H* da *FMO*₂, *3*, *4* e *5* estão todos na gama básica, entre os 8.3 e 9.1. Contudo, o de *FMO*₁ é mais neutro (6.9). Os locais de ligação FAD-pirofosfato (Gly-Xaa-Xaa-Gly-Gly-Xaa) e NADPH-pirofosfato característicos, estão presentes em posições idênticas em cada um dos *FMO* humanos; um local que se supõe de ligação com FAD situa-se entre os resíduos 9-14 e um local de ligação com NADPH entre os resíduos 191-196. Além disso, na região das ligações FAD principais, as sequências de todas as cinco formas de *FMO* contêm uma “impressão digital” de que faz parte uma estrutura secundária $\beta\alpha\beta$ - o “Rossmann fold” conhecida por estar envolvida com o dinucleotídeo vinculativo. Em 29% das posições, os resíduos de aminoácidos estão absolutamente conservados em todas as cinco *FMO* humanas (Phillips et al., 1995).

No entanto, o grau de identidade da sequência entre essas proteínas não é uniforme em toda a cadeia polipeptídica. Cerca de 85% dos resíduos conservados são encontrados dentro de quatro regiões, localizadas nas posições de 1 a 230, ~320, ~340 a ~370 e ~455 a ~500, que juntos compõem apenas 57% do tamanho total do polipeptídeo. Esta concentração de resíduos conservados sugere importantes papéis estruturais e/ou funcionais para estas regiões, um dos quais (entre resíduos 1-230) contêm os locais de ligação com FAD e NADPH (Figura 3). Verificou-se ainda que os perfis de hidrofília das *FMO* humanas, determinadas pelo método de Kyte e Doolittle (codificação utilizando a escala de hidrofobicidade) são muito semelhantes, mesmo em regiões menos conservadas das proteínas. No caso da *FMO*₄, a região hidrofóbica situada na COOH-terminal é seguida por 25 resíduos hidrofílicos por natureza. (Phillips et al., 1995).

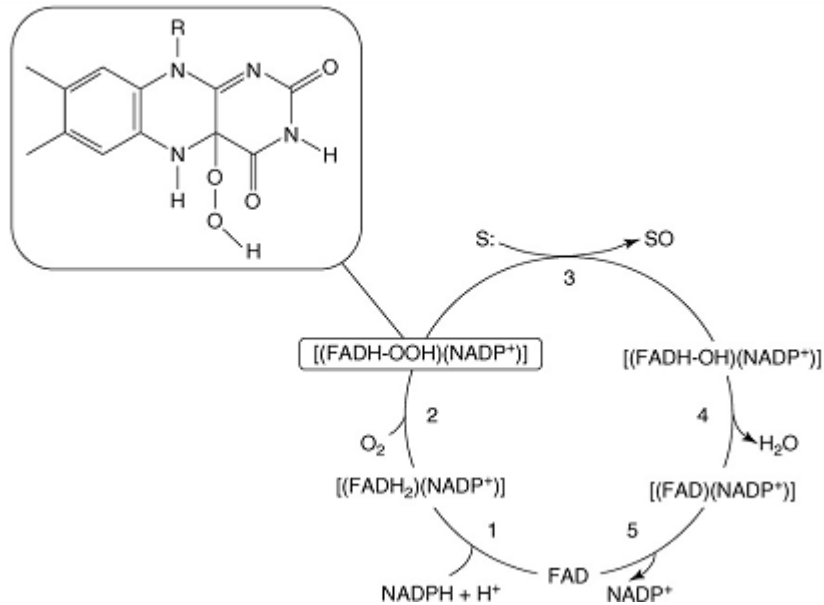


Figura 3 - Ciclo catalítico das *FMO* dos mamíferos (Adaptado de Phillips e Shephard, 2007).

Além disso, cada proteína contém três ou quatro segmentos internos hidrofóbicos. A região hidrofóbica, na terminação NH_2 das proteínas tem algumas semelhanças com uma sequência de péptido sinal. Apesar do facto de *FMO* apresentar uma sequência de pouca identidade, a sua natureza hidrofóbica tem sido bem conservada e, portanto, essa região parece ser boa candidata para um domínio que ligue *FMO* às membranas do retículo endoplasmático. No entanto, a remoção desta sequência, aparentemente, não impede a proteína de se ligar às membranas do retículo endoplasmático (Phillips et al., 1995).

No ser humano, *FMO* 1, 2, 3 e 4 estão localizados num único “cluster 257” no cromossoma 1q23-25 (Figura 4); a *FMO5* humana localiza-se em 1q21. Também foi identificado um *FMO6* como parte do projecto do genoma humano (AL021026). Contudo, estudos recentes sugerem que este gene não codifica uma *FMO* funcional devido a múltiplas vias alternativas de processamento (Cashman et al., 2003).

Um segundo *cluster* de genes *FMO*, composto por cinco pseudogenes (*FMO7P* para *FMO11P*) está presente em 1q24.2 (Phillips e Shephard, 2008).

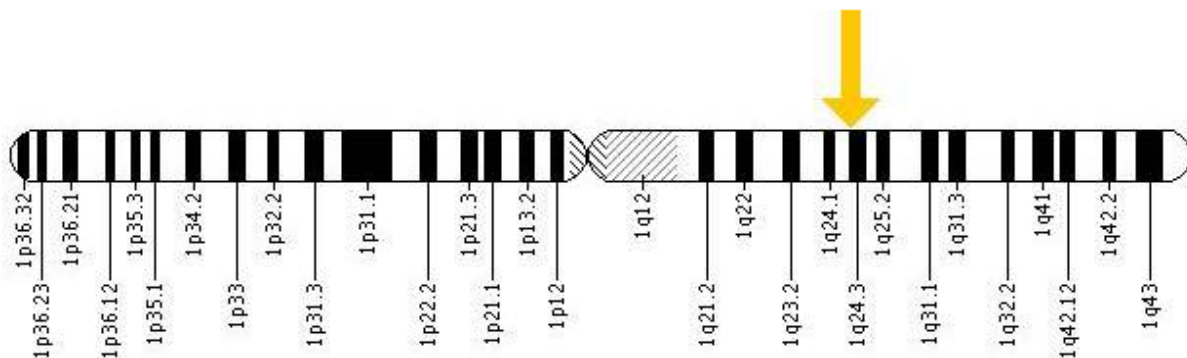


Figura 4 - Esquema representativo do cromossoma 1. A seta indica o local de *FMO1*, 2, 3 e 4.

Será ainda de destacar, que na espécie humana, há variabilidade inter-individual considerável nos níveis de *FMO* (Cashman e Zhang, 2002). Esta família de genes, monooxigenase contendo flavina, catalisa a monooxigenação de numerosos xenobióticos contendo azoto (N), fósforo (P) e enxofre (S). Através deste processo, os xenobióticos são transformados em compostos mais solúveis que são prontamente excretados, ou ainda metabolizados pelas enzimas da fase II. Salienta-se ainda que a *FMO1* também pode catalisar a formação de metabólitos reactivos (Cashman e Zhang, 2002).

FMO1

Em 1971, Ziegler identificou a *FMO1* – uma amina oxidase de função mista em microsomas hepáticos de suínos cujos substratos contêm compostos incluindo azoto e enxofre. Foi isolado um c.DNA para a proteína em humanos em 1991, e a enzima é agora conhecida por *FMO1*, tendo sido mapeada no braço longo do cromossoma 1 codificando um polipeptídeo de 532 aminoácidos, com 60kD de massa molecular. No ser humano nem o mRNA de *FMO1* nem a proteína está presente no fígado adulto, o que contrasta com todos os outros mamíferos estudados em que *FMO1* constitui uma das principais formas da enzima no fígado adulto (Phillips et al., 2007). Contudo, o gene *FMO1* expressa-se no fígado humano fetal. A expressão é maior no primeiro trimestre ($7,8 \pm 5,3$ pmol proteína/mg microsomas), então diminui durante o desenvolvimento fetal, e cerca de três

dias após o nascimento é completamente extinta. A *FMO1* também se expressa no rim fetal humano mas neste caso a expressão no tecido é aumentada após o nascimento (Phillips et al., 2007).

No adulto, o local principal de expressão de *FMO1* é o rim. O gene também se expressa em células do intestino delgado e do estômago, e em várias glândulas endócrinas, incluindo pâncreas, córtex e medula adrenal, tireóide, timo e testículo. A quantidade de *FMO1* no rim humano adulto (47 ± 9 pmol/mg de proteína microsomal) não é significativamente menor que a observada no fígado para os principais citocromos hepáticos P450 (CYP), CYP3A4 (96 ± 51 pmol de proteína/mg microsomais), sendo maior do que o conteúdo total de CYPs no rim adulto humano. Assim, no adulto da espécie humana, é provável que a *FMO1* participe de forma importante no metabolismo e depuração renal de drogas terapêuticas (Phillips et al., 2007).

Embora tenham sido relatadas diferenças inter-individuais na expressão da *FMO1*, variações na expressão no fígado fetal variam de 0 a 20 vezes, dependendo da idade gestacional. O gene humano *FMO1* tem 10 exões. O codão de iniciação está localizado no exão 2 e a sequência da codificação da proteína está contida dentro dos exões 2-9. Os exões 0 e 1 são exões não codificantes (Phillips et al., 2007).

O gene *FMO1* tem três promotores alternativos P0, P1, e P2. No fígado fetal apenas o P0 mais a montante é usado. As razões para o silenciamento do gene *FMO1* no fígado humano adulto não são conhecidas. A expressão continuada do gene em tecidos adultos extra-hepáticos pode ser explicada, em parte, pelo uso de promotores alternativos para a expressão directa no intestino e rins (Phillips et al., 2007).

FMO2

O principal local de expressão de *FMO2* é o pulmão. Nos seres humanos o gene expressa-se também no músculo-esquelético, rins, próstata e vasos sanguíneos. A *FMO2* apresenta uma maior restrição no tamanho dos seus substratos do que os outros *FMO*, tendo uma acentuada preferência por substratos com uma cadeia lateral longa. Isto sugere que o local

activo de *FMO2* fica mais distante da superfície da enzima do que as outras *FMO* e que será acedido por um canal relativamente estreito. Além disso, a *FMO2* é menos sensível à inactivação pela temperatura elevada e detergentes aniónicos (Phillips et al., 2007).

FMO3

O cDNA para a *FMO3* humana foi identificado em 1992 por Lomri e colaboradores. O gene da *FMO3* foi mapeado no braço longo do cromossoma 1. É composto por 9 exões, dos quais o exão 1 não é codificante. Codifica um polipeptídeo de 532 aminoácidos e a sua massa molecular é de 60.047kD. A distribuição da *FMO3* é predominante no fígado, no adulto humano. O mRNA de *FMO3* foi também detectado no pulmão, rim (córTEX e medula adrenal), pâncreas, tiróide, intestino e cérebro. Das espécies estudadas, a expressão de *FMO3* só foi detectada após o nascimento, na espécie humana e em algumas outras espécies, como por exemplo o rato. No entanto, pequenas quantidades da enzima *FMO3* foram detectadas no fígado embrionário humano, mas não no fígado fetal (Phillips et al., 2007).

Os dados indicam que o nascimento é necessário mas não suficiente para o início da expressão de *FMO3* no fígado humano. A idade em que a expressão de *FMO3* se inicia varia desde o nascimento até aos 2 anos de idade. No entanto, pelos 10 meses de idade, a maioria dos indivíduos já estão a expressar *FMO3*, o que contrasta com a extinção da *FMO1* no fígado humano, que está intimamente ligada ao processo de nascimento, que ocorre alguns dias após o parto, sem relação aparente com a idade gestacional. Consequentemente, durante o primeiro ano de vida, muitos indivíduos podem apresentar pequenas quantidades das enzimas *FMO* para metabolização de drogas no fígado. Este facto tem importância para o metabolismo de eventuais drogas terapêuticas administradas, que funcionam como substratos destas enzimas. Têm sido relatadas variações inter-individuais de 10 a 20 vezes na expressão de *FMO3* (Phillips et al., 2007).

Os estudos com microsomas hepáticos humanos mostraram considerável variabilidade inter-individual na actividade funcional da *FMO3*. A variação alélica altera a actividade

catalítica e especificidade de substrato, ou pode tornar certas populações ou indivíduos mais ou menos susceptíveis aos efeitos de xenobióticos ambientais. A *FMO3* humana poderá assim constituir o exemplo de um “gene ambiental” que protege os indivíduos dos desafios ambientais e químicos. É possível que, evolutivamente, embora não haja estudos demonstrativos deste facto, a variação alélica conservada de *FMO3* humana prevalente em determinadas zonas, como locais que possuem toxinas de plantas, tenham produzido uma selecção de indivíduos mais sujeitos a essa exposição. Aliás, visto que a *FMO3* metaboliza também muitos materiais e substâncias não tóxicas que poderiam inactivar P450, e porque *FMO* e P450 estão localizadas na mesma região do fígado, tem sido postulado que a desintoxicação pela *FMO* representa uma estratégia quimiopreventiva (Cashman e Zhang, 2002).

Porém, a variação inter-individual da *FMO3* humana pode ser um factor que contribui para a susceptibilidade dos seres humanos para respostas clínicas exageradas ou possíveis reacções adversas a produtos químicos ou drogas.

Até à data foram detectadas mais de 300 variantes ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que foram registados no gene, incluindo mais de 20 variantes que têm sido associadas à trimetilaminúria. Algumas dessas variantes foram identificadas como mutações patogénicas que, essencialmente, suprimem a actividade da *FMO3* causando a trimetilaminúria primária. Como a trimetilaminúria é transmitida de forma autossómica recessiva, os heterozigotos ou portadores de apenas um gene *FMO3* com mutação são assintomáticos. A incidência de portadores sintomáticos varia entre etnias, que vão de 0,5-1% em populações brancas britânicas para cerca de 11% da população da Nova Guiné (Mackay et al., 2011).

As mutações *nonsense* causam a introdução de um codão stop prematuro resultando em mutações *frameshift*. A primeira mutação a ser identificada num doente com TMAuria é uma das mutações mais comumente identificadas até ao momento c.458C>T (p.P153L). Uma outra mutação muito comum é a mutação *nonsense* c.913C>T (p.E305X) (Mackay et al., 2011). Além disso, um número considerável dessas variantes não causam a trimetilaminúria primária, mas podem conduzir a um fenótipo mais leve ou transitório. Por exemplo, num estado homozigótico ou quando c.472C>T (p.Glu158Lys) e c.23A>G

(p.E308K) estão no mesmo cromossoma (em cis), há uma diminuição moderada na actividade enzimática, causando trimetilaminúria leve ou transitória, particularmente em lactentes e crianças jovens que têm baixa expressão de *FMO3*. O único SNP que foi notificado, que resulta num aumento da actividade da enzima é o c.1079T>C (p.L360P) (Mackay et al., 2011).

Nas mais de 20 mutações causadoras de trimetilaminúria identificadas, algumas evitam a ligação do FAD e assim prejudicam a formação da holoenzima, enquanto outras afectam a competência cinética. Quem sofre de trimetilaminúria tem falta de *FMO3* funcional. Por esta razão, a sua capacidade de metabolizar os substratos de drogas, tais como a *benzidamina* e drogas anti-inflamatórias não-esteroides, está diminuída (Phillips e Shephard, 2008). Contudo, as mutações de *FMO3* serão descritas mais adiante.

FMO4

Quando o cDNA para a *FMO4* humana foi isolado pela primeira vez, a isoforma foi designada por *FMO2*. A nomenclatura foi posteriormente alterada para *FMO4*. Este tem 558 de aminoácidos de comprimento e uma massa molecular de 63.338 kD. O gene foi mapeado no braço longo do cromossoma humano 1 e contém dez exões, dos quais oito são de codificação. Em contraste com outros mRNAs, o de *FMO4* contém sequências derivadas de 10 e não 9 exões, dois dos quais são inteiramente não codificantes. A *FMO4* expressa-se em quantidades relativamente baixas em vários órgãos, sendo os principais locais o fígado e o rim. Além disso, a expressão da proteína numa forma estável em sistemas heterólogos revelou-se difícil e, conseqüentemente pouco se sabe sobre a especificidade do substrato de *FMO4*. No entanto foi demonstrado que a *FMO4* é capaz de oxidar metimazol, Lmetionina e S-alil-L-cisteína (Phillips et al., 2007).

FMO5

O cDNA para a *FMO5* foi isolado em 1995. O gene *FMO5* não é parte do cluster do gene

FMO no cromossoma humano 1q24.3, embora esteja localizado mais perto do centrómero em 1q21.1. Contudo, a organização interna do gene é semelhante à de outros genes *FMO*: compreende nove exões, o primeiro dos quais é de não-codificação, e codifica um polipeptídeo de 533 aminoácidos com uma massa molecular de 60.225 kD. A *FMO5* é expressa em vários tecidos, quer fetais quer de adultos. Contudo, no ser humano, o seu principal local de expressão é o fígado adulto, onde juntamente com a *FMO3* é uma das principais formas da enzima presente. É também a *FMO* mais abundantemente expressa no intestino delgado e na pele (Phillips et al., 2007).

A *FMO5* apresenta pouca actividade catalítica para compostos como o metimazol que são bons substratos para outras *FMO*, embora não catalisem a N-oxidação de aminas alifáticas primárias de cadeia curta, tais como *N-octylamina*. As aminas alifáticas primárias são substratos de *FMO2*. Esta enzima tem uma preferência marcada por moléculas com cadeias mais longas. Contudo, recentemente tem sido referido que a *FMO5* catalisa a oxidação de outros compostos, como por exemplo tioéteres com ácidos carboxílicos primários que não são utilizados como substratos para outros *FMO*. Por exemplo, *esonarimod*, um medicamento anti-reumático é convertido para o metabolito activo *S-metil esonarimod* por *FMO5*. Assim, no que diz respeito à especificidade do substrato, a *FMO5* é considerada como uma *FMO* atípica e apesar do seu alto nível de expressão no fígado humano adulto, pensa-se que a enzima não desempenhe um papel importante no metabolismo de drogas, com a excepção do *esonarimod* (Phillips et al., 2007).

Têm sido relatadas variações inter-individuais de até 10 vezes na quantidade de *FMO5* no fígado humano adulto (3,5-34 pmol/mg proteína microsomal) (Phillips et al., 2007). Apesar de não terem sido identificados polimorfismos que afectem a actividade catalítica de *FMO5*, é possível que as variantes no promotor existam, e influenciem a quantidade de *FMO5* produzido (Phillips et al., 2007).

Ciclo de N-oxidação da TMA no ser humano

Os peixes marinhos contêm grandes quantidades de TMAO, o qual desempenha um papel importante na osmo-regulação, permitindo aos peixes marinhos viverem num ambiente salino. A actividade bacteriana no peixe em putrefacção reduz o TMAO a TMA, de que resulta o cheiro característico, e a capacidade humana de detectar esse odor tão prontamente, levou alguns autores a pensar que isso pode ter um papel na prevenção da ingestão de peixe podre pelo Homem (Mackay et al., 2011).

Na dieta humana a TMAO ingerida através de peixes marinhos é reduzida a TMA pela microflora do cólon e absorvida por difusão passiva através das membranas celulares. Entra na circulação entero-hepática e é removida pelo fígado. Nas células do fígado normal, a TMA é oxidada e volta a TMAO inodoro através da *FMO3*. O TMAO assim formado é hidrossolúvel, e por isso no indivíduo normal é excretado principalmente na urina (Mackay et al., 2011).

Existem vários precursores da trimetilamina, como a colina, a lecitina, a carnitina, entre outros.

A colina ($C_5H_{14}NO^+$) está presente na dieta, tanto como colina, como componente da lecitina (mistura de glicolípidos, triglicerídeos e fosfolípidos) provenientes de alguns alimentos tais como ervilhas, feijões, carne e gema de ovo. A ingestão total diária de colina livre é de cerca de 9 mg, pelo que os 2,1 g de colina necessários para que ocorra um aumento da excreção de TMA são bem superiores. A colina é absorvida no intestino delgado, e quando em excesso é metabolizada a metilamina (CH_5N) no intestino grosso pelas bactérias coloniais. A fracção absorvida de colina é usada tanto directamente, por exemplo como componente das membranas celulares, ou pode ainda ser metabolizada em glicinbetaína ($C_5H_{10}NO_2$) no fígado de mamíferos. As bactérias da flora intestinal podem produzir metilaminas a partir de lecitina, embora necessite de uma grande ingestão oral (Mackay et al., 2011).

A carnitina ($C_7H_{15}NO_3$) é produzida tanto naturalmente em tecidos humanos, como absorvida activa e passivamente a partir da dieta. Ao contrário da colina, a L-carnitina presente na carne não é metabolizada directamente a metilaminas. É usada clinicamente como um suplemento na oxidação de ácidos gordos e nas alterações de ácidos orgânicos,

podendo também ser convertida para TMA através da flora bacteriana do cólon, de tal forma que elevadas doses podem causar um odor a peixe em alguns indivíduos susceptíveis (Mackay et al., 2011).

Quanto à glicinabetaína, não há evidências de que esta é convertida em TMA. Contudo, as bactérias do cólon podem converter glicinabetaína em metilaminas, e grandes doses administradas terapêuticamente, como em casos de homocistinúria, têm sido indicadas como causadoras do odor a peixe (Mackay et al., 2011).

O metabolismo dos precursores dietéticos de TMA está representado na Figura 5.

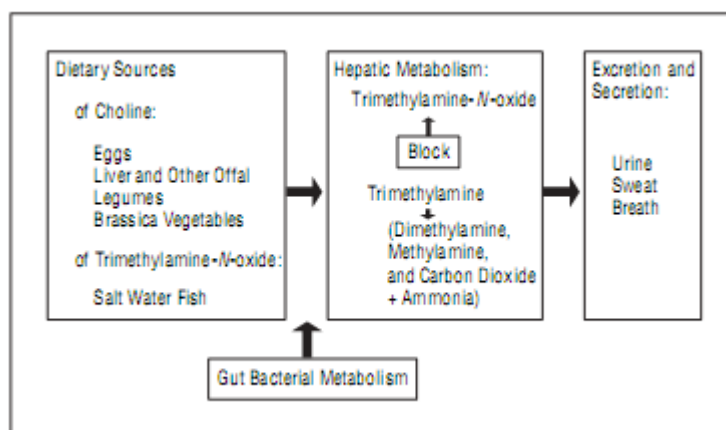


Figura 5 - Metabolismo dos precursores dietéticos da TMA (Adaptado de Arseculeratne et al., 2007).

Apresentação clínica

Os doentes recorrem frequentemente ao médico ainda na infância ou início da idade adulta, referindo um odor corporal e/ou halitose. Nestes casos, são recolhidas amostras, encaminhadas para o laboratório, por clínicos gerais, pediatras, endocrinologistas, dermatologias ou outros (Mackay et al., 2011).

Este odor a peixe podre, que motiva a consulta, tem origem no defeito do metabolismo de TMA. Assim, nos indivíduos com TMAuria, existe uma disparidade entre a quantidade de

TMA ingerida na dieta e que requer oxidação, bem como da capacidade do sistema de enzimas hepáticas microssomais para oxidar este excesso. Assim, a TMA em excesso acumula-se e é excretada na urina, mas também surge no suor e outras secreções corporais, podendo ser detectada no hálito exalado (Cashman et al., 2003).

À medida que foram surgindo casos desta doença, tornou-se evidente que existem vários subtipos diferentes, mas que recaem em duas categorias principais (Cashman et al., 2003). Assim, a TMAuria pode ser classificada em primária e secundária, consoante a causa que está subjacente à sua manifestação:

- **TMAuria primária:** a forma primária da doença genética constitui a maioria dos casos relatados, e os sintomas clínicos confirmaram geneticamente que as mutações patogénicas (inactivadoras) e os polimorfismos menos graves no gene *FMO3* foram descritos a partir de populações nos EUA (incluindo caucasianos, afro-americanos, hispânicos e asiáticos). As mutações patogénicas causam mau cheiro grave e persistente; e os polimorfismos menos graves, aparentemente benignos podem diminuir o limiar substrato para o desenvolvimento dos sintomas (Mackay et al., 2011);
- **TMAuria secundária (adquirida):** têm sido descritos casos em que não havia predisposição genética, ou, pelo menos no que respeita as mutações totalmente inactivadoras do gene *FMO3*, e onde uma combinação do metabolismo, dieta, e expressão da enzima hormonal podem ter sido factores predisponentes (Mackay et al., 2011).

Têm também sido descritas várias causas de TMAuria transitória, que importa referir:

- **Casos transitórios na infância:** recém-nascidos prematuros e crianças mais velhas têm apresentado os primeiros casos após a alimentação com fórmulas contendo colina, o que poderá estar relacionado com os baixos níveis da enzima na infância e a sobrecarga do substrato (Mackay et al., 2011). Além disso, foram descritos outros casos em pediatria, nos quais as análises moleculares revelaram uma “predisposição” nesses indivíduos, sendo uma situação que pode ser mais comum

do que previamente reconhecida e que pode condicionar o aparecimento de casos transitórios (Cashman et al., 2003).

- **Casos transitórios no período menstrual:** um estudo mostrou que as mulheres mostram aumentos notáveis na excreção de TMA no período peri-menstrual (Mackay et al., 2011). Há evidências na literatura da influência de hormonas esteroides sobre a actividade da *FMO*, o que se conforma com os relatos de alguns doentes sobre a ocorrência ou aumento destes problemas durante a puberdade, ou exacerbaram-se nessa altura (Cashman et al., 2003).
- **Infecções víricas:** foram descritos três casos, nos quais a condição parece ter surgido na vida adulta após um episódio de hepatite vírica (Mackay et al., 2011);
- **Sobrecarga do precursor da dieta:** alguns casos terão ocorrido após a administração de terapêutica de colina 20-80 g/dia com o intuito de tratar a doença de Huntington e a doença de Alzheimer (Mackay et al., 2011);
- **Flora intestinal e doença hepática porta-sistémica:** como a função hepatocelular está gravemente alterada poderá aparecer TMAuria, provavelmente devido à diminuição da depuração da carga de TMA absorvida, e insuficiente oxidação. Um aumento do crescimento bacteriano no intestino delgado pode aumentar a produção de TMA e esse facto pode contribuir para o odor associado à uremia (Mackay et al., 2011). Em doentes urémicos o crescimento anormal de bactérias no intestino delgado aumenta a libertação de TMA a partir de precursores dietéticos. Este evento, composto por depuração renal reduzida, leva a um aumento das concentrações de amina no sistema circulatório e à sua excreção através da respiração e suor (Cashman et al., 2003);
- **Bioquímica da TMA:** a TMA sendo uma amina terciária muito volátil à temperatura ambiente, é prontamente detectada pelo sistema olfactivo humano sendo os homens mais sensíveis do que as mulheres (Mackay et al., 2011).

A incidência de TMAuria devido à deficiência de *FMO3* não é precisamente conhecida, mas tem sido sugerido que pode variar na população de 1/100 ou de 1/1000. Contudo, muitas pessoas permanecem sem diagnóstico por longos períodos de tempo (Christodoulou, 2011).

Em indivíduos com uma história característica da doença, a urina pode ser facilmente analisada para TMA e TMAO. Os resultados expressos em $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de creatinina, também podem ser expressos como uma relação de oxidantes $\text{TMAO}/(\text{TMAO} + \text{TMA}) \times 100\%$. Torna-se essencial que a capacidade de oxidação da enzima seja suficientemente testada com carga de substrato. Caso contrário, uma deficiência da capacidade de oxidação pode não ser descoberta. No entanto, não existem normas quanto ao que constitui a excreção adequada do produto total (Mackay et al., 2011).

Em casos de dúvida, um controlo oral com TMA pode ser utilizado, especialmente para identificar portadores heterozigóticos. É, no entanto, um método insatisfatório para a investigação em crianças (Chalmers et al., 2006).

Nos casos de controlo oral, o método mais prático para garantir um substrato suficiente é o da ingestão de 300 g de farinha de peixe marinho, seguido de uma colheita de urina aleatória, entre as 2 e as 12 horas após a refeição. Em alternativa, o protocolo de Nijmegen recomenda cronometrar a colheita de urina por 6-8 horas pós-prandial. Considerando que a situação pode ser leve e/ou intermitente, pode ser necessário fazer mais do que um teste durante os períodos em que o odor é acentuado, antes que se estabeleça um diagnóstico definitivo (Mackay et al., 2011).

De ressaltar que, por razões que não são conhecidas, alguns testes de sobrecarga falham de vez em quando, e isso pode ser causado por factores como a natureza da colonização do intestino, o tempo de trânsito intestinal e esvaziamento gástrico retardado (Mackay et al., 2011).

A biópsia hepática para estabelecer o diagnóstico não é considerada justificável

(Mayatepek e Kohlmüller, 1998).

Para além das queixas relativas ao odor desagradável, existem aspectos mais “silenciosos” a serem considerados. Assim, alguns investigadores sugerem que a TMAuria pode afectar a pressão arterial, dado que a *FMO3* pode desempenhar um papel na inactivação das catecolaminas (Mackay et al., 2011). Contudo, Dolan e colaboradores (2005) verificaram que nenhum dos haplótipos de TMAuria foram estatisticamente associados a pressão arterial sistólica significativa, apontando a hipótese de que os polimorfismos de baixa penetrância de *FMO3* por si só, não afectam de forma independente a homeostasia da pressão arterial. Para estes autores, outros genes comuns de *FMO* podem ser potenciais candidatos à hipertensão.

Para além desse facto, é comum que os doentes vivenciem transtornos do humor, de gravidade e frequência variável. Contudo, não está claro se isso é devido à natureza social da condição de isolamento, ou se existe realmente um componente bioquímico associado. É ainda de salientar que algumas das aminas endógenas presentes no cérebro, tais como a tiramina, constituem substratos para a *FMO3* (Mackay et al., 2011).

Além disso, e tal como foi já mencionado, o substrato de *FMO3* é, tal como sucede com outras oxidases de função mista. É bastante amplo, pelo que a *FMO3* tem actividade sobre determinados medicamentos como a cimetidina, ranitidina, clorpromazina, tamoxifeno, sulindaco, cetoconazol, propranolol, morfina e tiramina. Deste modo, já foram relatadas reacções adversas a medicamentos em situações de TMAuria (Mackay et al., 2011).

Clinicamente, seja na criança ou no adulto, a TMAuria não pode ser considerada uma situação de carácter benigno, quer sobre o ponto de vista clínico ou “social”. Os problemas de desenvolvimento da criança em idade escolar surgem precocemente, com a consequente baixa da auto-estima, exclusão social e isolamento, o que conduz a ansiedade e depressão. Ao longo da vida, estes doentes apresentam dificuldades de integração na sociedade, o que aumenta o seu isolamento social e predispõe à depressão. Esta situação pode ser agravada pela ocorrência de formas exacerbadas e intermitentes de TMAuria durante os períodos de transpiração excessiva, exercício e stress, e nos indivíduos do sexo feminino, um pouco antes e durante a menstruação (Chalmers et al., 2006).

Arseculeratne e colaboradores (2007) referem ainda que a TMAuria tem sido relatada em associação com outras entidades clínicas, tais como a síndrome de Prader-Willi, convulsões e distúrbios comportamentais. São frequentes, o isolamento social, a limpeza pessoal obsessiva, a depressão, a escolaridade interrompida, a desarmonia conjugal e a intenção suicida.

Tratamento

No que concerne ao tratamento, a gestão otimizada de TMAuria deve integrar uma abordagem multifacetada (Christodoulou, 2011).

Os doentes com TMAuria são geralmente aconselhados a restringir na dieta os alimentos com alta percentagem de TMAO ou com alto conteúdo de colina, bem como o uso de sabonetes com valor de pH de 5,5-6,5 na higiene, a fim de remover qualquer vestígio de TMA livre da pele (Chalmers et al., 2006; Mackay et al., 2011; Fraser-Andrews et al., 2003).

Assim, os peixes marinhos (mar ou água salgada), cefalópodes e crustáceos devem ser especialmente evitados, particularmente os peixes de profundidade. Para além destes, os alimentos com conteúdo relativamente alto de colina devem ser restringidos, o que inclui os ovos, fígado, rim e outras vísceras, ervilhas, feijões, amendoim, produtos de soja e outras leguminosas (Chalmers et al., 2006).

Por outro lado, foi relatado que o consumo de couve-de-bruxelas inibia a N-oxidação de TMA in vivo (Yamazaki et al., 2004). A couve-de-bruxelas é uma fonte rica da substância progoitrina o que reduz a capacidade de oxidação da TMA em galinhas. Assim, tem sido sugerido que a redução da ingestão de legumes da família *Brassicaceae* (ex: couve, repolho e nabo) pode ser benéfica para doentes com TMAuria (Arseculeratne et al., 2007).

Num estudo, Cashman e colaboradores (1999) desenvolveram uma relação entre o consumo de couve-de-bruxelas e a oxidação de TMA (Cashman et al., 1999). Estes autores concluíram que a ingestão destes alimentos induz a redução de TMA N-óxido, ou seja, que

fortes inibidores selectivos estão presentes ou são formados a partir da dieta com este tipo de alimento. Concluíram que este tratamento poderá diminuir a actividade de *FMO3* humana. Além disso, e porque não há alteração na função hepática, observou-se nos indivíduos examinados, ao longo de todo o estudo, que a perda da actividade humana de *FMO3* não foi uma consequência da morte generalizada de células hepáticas, mas sim, uma perda selectiva de actividade funcional da *FMO3*, como consequência do tratamento com a couves-de-bruxelas. Este facto é preocupante, na medida em que está demonstrado que estes legumes previnem o cancro, e uma dieta que restrinja a sua ingestão, impede os indivíduos de beneficiarem das suas propriedades anti-cancerígenas (Cashman et al., 1999).

O reconhecimento da produção de TMA por enterobactérias intestinais levou à sugestão do uso de antibióticos (metronidazol, neomicina e amoxicilina) como uma forma de tratamento para doentes com TMAuria, coadjuvado com a lactulose, a fim de avaliar se as bactérias estão ou não em excesso. A neomicina foi o mais eficaz na redução da produção de TMA da colina, e a amoxicilina é bastante mais eficaz do que o metronidazol (Chalmers et al., 2006; Fraser-Andrews et al., 2003).

Está demonstrado que o uso desses antibióticos não inibe ou produz significativas reduções no grau de degradação bacteriana, a nível do cólon, de colina para TMA. Contudo, poderá reduzir o processo durante um período prolongado, aliviando, moderadamente, os cheiros produzidos. Deste modo, os antibióticos devem ser considerados como adjuvantes da dieta, nos doentes com deficiência de *FMO3* (TMAuria primária). Poderão ser úteis em períodos de stress excessivo, exercício, infecções, distúrbios emocionais e durante a menstruação, quando a produção de TMA parece aumentar, ou quando a restrição da dieta precisa de ser diminuída por qualquer motivo (Chalmers et al., 2006; Mackay et al., 2011).

Os antibióticos também são úteis em doentes com TMA secundária associada a síndromes de sobre-crescimento bacteriano. A possibilidade de desenvolvimento de resistência ao metronidazol pode ser superada pela alternância bi-semanal de terapia de antibióticos diferentes (Chalmers et al., 2006), embora esta prática poderá levar à múltipla resistência a antibioterapia.

A modulação da produção de TMA pelas enterobactérias e de TMA livre pelo uso do complexo de clorofilina de cobre administrada por via oral, também tem sido sugerida como terapia adjuvante (Chalmers et al., 2006).

Verificou-se também que o tratamento de 10 dias com carvão activado diminuiu as concentrações urinárias de TMA em doentes afectados com TMAuria. O mecanismo responsável pelos efeitos do carvão activado na TMA parece ser devido à intervenção na absorção. No entanto, os efeitos benéficos da clorofilina cúprica (corante natural obtido da hidrólise de clorofila, seguida por purificação e introdução de cobre) faziam prolongar esse efeito por mais tempo após a cessação do seu uso relativamente ao carvão activado. Os efeitos da clorofilina de cobre duraram várias semanas após o término da administração (Yamazaki et al., 2004).

Mutações de FMO3 descritas na literatura

Tal como foi referido anteriormente, mutações no gene *FMO3* provocam TMAuria (MIM # 136132) que é uma patologia associada a uma hereditariedade autossómica recessiva.

Inicialmente, a codificação de cDNA da *FMO3* humana foi isolada de uma biblioteca de cDNA de fígado humano, dada a sua semelhança na sequência do cDNA de *FMO* de um fígado de suíno (Hernandez et al., 2003). Posteriormente, o gene *FMO3* foi mapeado no cromossoma humano 1q23-25, dentro de um *cluster* que também contém os genes para *FMO1*, *FMO2*, *FMO4*, e *FMO6*. O gene *FMO3* contém 9 exões que variam em tamanho de 73-356 pares de bases (pb) (Hernandez et al., 2003).

A sequência do gene *FMO3* está representada na Figura 6:

Primer	Primer sequence (5' to 3')
Ex1-S	ATCCATCACAGAGGGTTGGC
Ex1-AS	GCACACTACGCCTGGCTAAT
Ex2-S	ACAGGCGTGAGCTACCATAC
Ex2-AS	GATCTATCAAGGGAGAACTGTA
Ex3-S	GAACCAGCCCTGACCTGATC
Ex3-AS	GTTGACAAATTAGAAAGGGAAAC
Ex4-S	TCATACTGTATCTGCGAAAACCA
Ex4-AS	TAGATGCGGTCACAATAATGTG
Ex5-S	GCAGGTTAAATTACATATACTTC
Ex5-AS	CCCCACATTTCATATCACACCT
Ex6-S	GCTGGGGTAATAGATCCATTG
Ex6-AS	TGGGCTTACAGGACATTAAGG
Ex7-S	ATAAGAGGGAAATATTACACTTCC
Ex7-AS	CAAAGTTATTGTCCTGGCATTG
Ex8-S	GGGAAAATTACAGGCTGGTCC
Ex8-AS	GGGCTAAACTGTCTATGTAATG
Ex9-S	CTACACAGAGTTTGGGTATCC
Ex9-AS	CCCTGTCTGGGTATTGTGTCAG

Figura 6 - *Primers* usados na amplificação e sequenciação do gene *FMO3* (Adaptado de Kubota et al., 2002).

Foi criado um banco de dados de mutações humanas de *FMO3*, usando o *Mustar* (www.hgu.mrc.ac.uk/Softdata/Mustar/), um sistema de banco de dados de *locus* específico para a manutenção de dados sobre variantes alélicas e divulgar esses dados através da World Wide Web (WWW) (Hernandez et al., 2003).

As mutações são denominadas de duas maneiras diferentes: sistemática e trivial. O nome **sistemático** é baseado na sequência do cDNA de *FMO3* (número de acesso Z47552) e segue a convenção de numeração do A do ATG. Não há nucleotídeo 0, e o nucleotídeo imediatamente a montante de 1 é designado -1. O nome **trivial** refere-se à mudança ao nível de aminoácidos. Para mutações em intrões, a sequência de referência é a do clone PAC 798A17 (numero de adesão AL031274), o sistema de numeração também é baseado num nucleotídeo e é o A do ATG (Hernandez et al., 2003).

O banco de dados está acessível na WWW através da URL http://human-FMO3.biochem.ucl.ac.uk/Human_FMO3. O banco de dados também contém uma tabela que detalha todas as variantes alélicas, mutações de substituição, inserção e deleção

(Hernandez et al., 2003).

As novas mutações podem ser incluídas no banco de dados através de um formulário Web ou entrando em contacto com o administrador via e-mail (curatorFMO3database@biochem.ucl.ac.uk) (Hernandez et al., 2003).

Em 2002, Cashman e Zhang (2002) relataram que até essa data haviam sido observadas 24 variantes de *FMO3* humana (Tabela 1). As mutações **E158K**, **V257M**, **E308G**, **G180V**, **S147S** e **F239F** foram associadas a actividade de N-oxidação da TMA normal ou levemente reduzida. As três primeiras variantes são polimorfismos comuns, e as últimas três são um pouco mais raras. É de notar, a possibilidade de que dois ou mais polimorfismos comuns quando presentes no gene *FMO3* do mesmo indivíduo contribuam ainda mais para uma diminuição marcada da actividade da *FMO3* humana.

Em relação à TMAuria grave ou moderada, segundo Cashman e Zhang (2002), foi observado outro grupo de mutações a partir da análise de DNA (isto é **M66I**, **P153L**, **E305X**, **R492W**, **G148X**, **A52T**, **E314X**, **R387L**, **M82T**, **I199N**, **G475D**, **N61S** e **M434I**).

Finalmente as restantes cinco variantes (**D132H**, **V277A**, **E362Q**, **I486M** e **M661I**) ou não tinham sido conclusivamente associadas a um fenótipo de trimetilaminúria grave ou as alterações não eram susceptíveis de alterar o fenótipo (Cashman e Zhang, 2002).

Tabela 1. Variações genéticas e substituições de aminoácidos da *FMO3* Humana (adaptado de Cashman e Zhang, 2002).

Amino Acid Substitution	Nucleotide Change	Reference
E158K	A > G	Cashman et al., 1997
M66I	G > T	Cashman et al., 1997
P153L	C > T	Cashman et al., 1997; Dolphin et al., 1997a
V257M	G > A	Treacy et al., 1998; Dolphin et al., 2000; Cashman et al., 2000
E305X	G > G	Treacy et al., 1998
E308G	A > G	Treacy et al., 1998; Kang et al., 2000
R492W	C > T	Akerman et al., 1999a
G148X	G > T	Park et al., 1999
A52T	G > T	Akerman et al., 1999b
E314X	G > T	Akerman et al., 1999b
R387L	G > T	Akerman et al., 1999b
M82T	T > C	Murphy et al., 2000
N61S	A > G	Dolphin et al., 2000
G180V	G > T	Dolphin et al., 2000
M434I	G > A	Dolphin et al., 2000
D132H	G > C	Furnes et al., 2002
S147S	C > T	Cashman, 2002b
I199N	T > C	Cashman, 2002b
F239F	T > C	Cashman, 2002b
V277A	TG > CC	Cashman, 2002b
E362Q	G > T	Cashman, 2002b
G475D	G > A	Zschocke et al., 1999
I486M	A > G	Cashman, 2002b
M661I	Not Available	Mitchell and Smith, 2001

Atendendo que grande parte dos estudos têm procurado investigar estas novas mutações, caracterizando-as de acordo com os grupos étnicos, Lattard e colaboradores (2003) analisaram o gene *FMO3* de Afro-americanos não hispânicos e caucasianos não hispânicos. A partir dessas populações, foram caracterizadas a distribuição de cinco variantes (ou seja **E158K**, **V257M**, **E308G**, **D132H** e **L360P**).

As variantes comuns alélicas: **E158K**, e **V257M** e **E308G** foram encontradas em ambos os grupos étnicos, mas constatou-se a presença de uma grande diferença étnica na distribuição

de frequência de **V257M** e **E308G**, as quais foram mais frequentes em caucasianos do que em Afro-Americanos.

Em contrapartida, **D132H** e **L360P**, foram encontradas apenas em Afro-Americanos e não em caucasianos (Lattard et al., 2003).

Em relação ao efeito das mutações, ainda no mesmo estudo, os autores constataram efeitos moderados a graves na eficiência catalítica com: **K158E** e **E308G**, assim como com a variante composta **K158E** com **E308G**.

No que concerne à actividade da *FMO* em relação aos substratos ranitidina e tiobenzamida, as variantes, **K158E**, **E308G** em homozigotia e **K158E** com **E308G** mostraram uma redução significativa quando ambas as variações de aminoácidos ocorrem em cis. Assim, é possível que o efeito da variação no codão 158 e 308 na actividade da *FMO* seja substrato-dependente.

A variante **D132H** leva a um *FMO3* menos eficiente, isto é, ocorre uma variante de um ácido aspártico (contendo um grupo de carga negativa) para uma substituição de histidina (contendo um grupo de carga positiva). Esta mudança pode levar a uma conformação diferente da *FMO3*, que resulta numa perda limitada da eficiência catalítica (30, 60, e 6% com metimazol, TMA e 5-DPT (vacina) respectivamente) (Lattard et al., 2003). Assim, será compreensível que dois indivíduos Afro-Americanos que foram identificados como possuindo a variante **D132H** não se tenham queixado de TMAuria., porque aparentemente, a **D132H** diminui, mas não revoga a função da *FMO3* humana (Lattard et al., 2003).

A **L360P** mostrou-se de igual modo capaz de oxidar metimazol, TMA e 5-DPT, sendo três, cinco e duas vezes mais eficiente, respectivamente, comparativamente com o tipo selvagem de *FMO3* (Lattard et al., 2003).

A leucina na posição 360 da sequência de aminoácidos *FMO3* não é um resíduo conservado entre *FMO3* de diferentes espécies e entre as isoformas *FMO*, apesar da região (aminoácidos 352-363) ser bastante conservada. Para todos os substratos analisados, **L360P** apresenta valores Km semelhantes aos obtidos para a do tipo selvagem de *FMO3*, embora os valores Vmax observados fossem sempre superiores (isto é, 3-, 5-, e duas vezes

para metimazol, TMA e 5-DPT, respectivamente). Uma interpretação para este facto deve-se ao domínio do substrato *FMO3* vinculativo poder ser distinto e funcionalmente diferente da região catalítica. Assim, a primeira variante de *FMO3* que demonstrou ter melhorado significativamente a eficiência catalítica foi a **L360P** (Lattard et al., 2003). Portanto, com o estudo de Lattard e colaboradores (2003) chegou-se à conclusão de que os afro-americanos possuem um novo fenótipo de actividade enzimática aumentada (ou seja, **L360P**) e um fenótipo de actividade enzimática reduzida (ou seja **D132H**), ausente nos caucasianos.

Chalmers e colaboradores (2006) demonstraram que a mutação **P153L** mostrou uma perda total da capacidade residual oxidativa de TMAO, consistente com uma enzima não funcional ou ausente de *FMO3*. Em contraste, a mutação M82T mostrou alguma capacidade residual oxidativa. Estes autores debruçaram-se ainda sobre duas novas mutações: **G193E** e **R483T**, e mencionaram que a heterozigotia composta para as mesmas, mostrou considerável capacidade N-oxidante residual. Na verdade, os doentes heterozigóticos para estas duas novas variações, na sequência do gene *FMO3*, revelaram consistentemente mau cheiro e índices de TMA/TMAO urinária elevados, em condições basais, e uma resposta negativa tanto para a colina como para refeições contendo elevada percentagem de peixes marinhos. Para além disso, a comparação dos efeitos da administração de antibióticos (metronidazol, amoxicilina, neomicina) sobre a produção de bactérias do intestino revelou uma reduzida produção de TMA, numa extensão limitada, sendo a neomicina mais eficaz (Chalmers et al., 2006).

Phillips e colaboradores (2007) fizeram uma síntese das mutações mais significativas até à data, de que resultaram dados importantes:

- ✓ g.15167G>A (**E158K**), foi a primeira mutação a ser identificada e distribui-se pela população (dbSNP126) do seguinte modo: 40-45% em africanos, 35-45% em Europeus e 20-25% em asiáticos;

Embora muitos estudos tenham investigado o efeito desta variante comum sobre a actividade catalítica, tanto *in vitro* como *in vivo*, os resultados são contraditórios. Enquanto alguns relatórios indicam que a variante E158K tem uma menor actividade catalítica para alguns substratos, outros indicam não haver qualquer

efeito, nem mesmo substrato-dependente (Phillips et al., 2007);

- ✓ g.21443A>G (**E308G**) é relativamente comum em asiáticos e europeus (com frequências alélicas de 15-25%) mas é rara em africanos (frequência de 1 a 2%). Em asiáticos e europeus, as variantes E158K e E308G estão muitas vezes ligadas, ocorrendo no mesmo haplótipo. Os resultados de vários estudos indicam que o efeito sobre a actividade da enzima é maior quando ambas as mutações estão presentes do que quando se apresentam isoladas (Phillips et al., 2007). Os homozigóticos para as variantes ligadas E158K e E308G podem apresentar sintomas de trimetilaminúria “suave” ou transitória;
- ✓ g.18281G>A (**V257M**) é relativamente comum em asiáticos (frequência do alelo de 16 a 28%), embora nem tanto em africanos (0-4%) ou europeus (4-7%). A V257M tem pouco efeito sobre a actividade da enzima;
- ✓ g.21350T>C (**V277A**) é relativamente comum, ocorrendo numa frequência de 13% em africanos e aproximadamente 20% em asiáticos, mas está ausente nos europeus;
- ✓ g.11177C>A (**N61K**) está presente em africanos e europeus em frequências de 3,5 e 5% respectivamente;
- ✓ **G180V**, **K416N** e **E24D** têm pouco ou nenhum efeito sobre a actividade catalítica, e ocorrem em baixa frequência (<4% em alguns casos <1%) e estão confinados a um único grupo populacional;
- ✓ O efeito da **D132H** sugere ser dependente do substrato, diminuindo a N-oxidação de TMA e S-oxidação de metimazol, mas não a N-oxigenação de 5'DPT.
- ✓ **R205C** tem um efeito moderado sobre a actividade enzimática e, curiosamente, apresenta um substrato-inibição de sulfato de sulindaco (na forma de fármaco a sua acção é anti-inflamatória) por S-oxidação;
- ✓ **L360P**, e tal como já foi mencionado, causa 2-5 vezes maior actividade catalítica, e aumentando substancialmente a actividade enzimática. Como tal, poderia aumentar

a taxa de metabolismo de drogas com conseqüente diminuição na eficácia. No entanto, foi detectado apenas na população africana e com baixa frequência (2-4%). Conseqüentemente, é de importância limitada para a população em geral (Phillips et al., 2007).

Quanto ao polimorfismo **V257M**, os indivíduos homocigóticos ou heterocigóticos podem ser predispostos a tolerância variável de tiramina, biogênicos ou outras amins. (Forrest et al., 2001).

Num estudo desenvolvido por Yamazaki e Shimizu (2007) com doentes japoneses, a mutação de *FMO3* **V257M**, e em consonância com o que foi acima referido, não apresentou alterações significativas da N-oxidação da trimetilamina. Porém, estes investigadores constataram que esta mutação poderia diminuir a S-oxidação de alguns xenobióticos. O mesmo facto foi constatado com a **R205C**, encontrada em japoneses, que teve efeitos na oxidação N e S mediado por *FMO3*.

Com o passar dos anos, avolumaram-se as investigações sobre as mutações do gene *FMO3*. Em 2009, Motika e colaboradores descreveram mais de 300 SNPs de *FMO3* humano (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), sendo que mais de 40 desses polimorfismos haviam sido associados a TMAuria devido à diminuição ou abolição da capacidade de oxidação da TMAO. Estes autores salientam ainda que a incidência e gravidade da doença varia, e que por si só as variantes polimórficas comuns não diminuem significativamente a actividade da N-oxidação da TMA. Contudo, em combinação com outros SNPs podem ter um impacto mais prejudicial (por exemplo os SNPs comuns **E158K** e **E308G**). Sobre estes SNPs, os autores relatam o caso de uma mulher de 33 anos de idade, na qual, além dos polimorfismos comuns **E158K** e **E308G**, foi observado um SNP na posição 187 (ou seja, **V187A**) que não havia sido descritos até ao momento, bem como a mutação **E305X**, descrita anteriormente. Para as amostras examinadas da mulher, o **V187A**, que é a nova mutação, em combinação com os dois polimorfismos comuns **E158K** e **E308G** foram causadores da diminuição do metabolismo da TMA, e a TMAuria grave resultante foi confirmada por estudos de fenotipagem (Motika et al., 2009). Assim, apesar da subtilidade da mutação **V187A** em combinação com os polimorfismos **E158K** e **E308G**, foi observado um impacto importante sobre a actividade funcional da enzima, que levou a

uma diminuição significativa desta actividade. A mutação **V187A** diminuiu a eficiência catalítica da enzima para 5-DPT e 8-DPT, e o duplo mutante **V187A/E158K** diminuiu mais significativamente a actividade enzimática para todos os substratos testados (Motika et al., 2009).

Zschocke e colaboradores (1999) por sua vez, já haviam demonstrado que esta variante do alelo - **V187A/E158K** - é muito comum em populações de raça branca, tendo determinado uma frequência de 20% e 6% nos controles alemães e turcos, respectivamente. Deste modo, mesmo as mutações que previamente foram relatadas como não tendo um impacto significativo na actividade específica da *FMO3*, em combinação com outros SNPs já diminuem, significativamente, a sua actividade de oxidação (Motika et al., 2009).

Fazendo a correlação entre TMAuria secundária e alguns tipos de mutações, ainda que de fenótipo caracteristicamente leve, Yamazaki e Shimizu (2007), referiram que a *FMO3* “anormal” pode ser causada pela menstruação, particularmente na presença da forma homozigótica de variantes genéticas leves como **E158K**; **E308G**, que causam uma diminuição da função de *FMO3*.

Também Akerman e colaboradores (1999) referiram que **E308G** e **E158K** em associação com o mutante **A52T** resulta num fenótipo de TMAuria grave.

Num estudo de Koukouritaki e colaboradores (2007) a variante **E24D** teve um efeito moderado sobre a actividade da enzima de *FMO3*. Os resultados observados com a variante **K416N** de *FMO3* eram muito mais inequívocos e envolvendo reacções substrato-dependentes. Em contraste, a variante **N61K** exibiu uma completa perda de actividade catalítica quer para trimetilamina quer para etilenotiureia e 30 a 40 vezes de diminuição na eficiência catalítica com metamizol e sulindaco.

A variante **N61K** não foi observada na população hispânica, e ocorreu numa frequência alelica de 5.2 e 2.5%. Foram inferidos 25 e 17 haplotipos na população branca não latina e afro-americana, respectivamente (Koukouritaki et al., 2007).

OBJECTIVOS DO ESTUDO

O presente estudo foi planeado, tendo como objectivo principal, a investigação da trimetilaminúria, caracterizada como uma doença genética rara.

A presente dissertação foi baseada num estudo prospectivo, e teve ainda os seguintes objectivos específicos:

- Efectuar uma revisão bibliográfica sobre a doença;
- Analisar quais as mutações já descritas e identificadas no gene *FMO3*;
- Estudar as mutações encontradas na população portuguesa e procurar estabelecer correlações genótipo/fenótipo;
- Avaliar a incidência da doença;
- Promover a divulgação deste estudo neste processo patológico, principalmente no meio clínico;
- Avaliar a patogenicidade de novas mutações através de programas bio-informáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo contou com a parceria do Centro de Genética Médica do Porto, de onde provieram todos os dados analisados nesta tese. O estudo desenvolveu-se durante o segundo semestre de 2011 e envolveu no total 17 doentes, que traduz uma amostragem ao nível nacional, pelo facto do Centro de Genética Médica do Porto ser o único a realizar o diagnóstico de Trimetilaminúria em Portugal. Relativamente à população estudada, e devido à sua baixa dimensão, conclui-se que não existe uma relação quanto ao sexo, embora 58,8% sejam do sexo masculino e 41,2% do sexo feminino. Em relação à idade 94,2% das amostras são de crianças e apenas 5,8% de adultos, sendo que também não é

possível estabelecer relações neste parâmetro.

Nenhum dos doentes apresentava qualquer dado clínico relevante para a pesquisa de trimetilaminúria, tratando-se de indivíduos aparentemente saudáveis, sem outras patologias associadas ou factores de risco, assim como, neurologicamente não apresentavam quaisquer sinais de relevância.

O sintoma dos indivíduos em estudo era somente o desagradável odor que exalavam, não havendo referência a outros sintomas indicativos de outras patologias.

Tal como se referiu acima, utilizaram-se amostras de sangue total com EDTA para o estudo de trimetilaminúria. De seguida, efectuou-se a extracção de DNA através de técnicas convencionais, seguido de PCR e sequenciação automática do gene *FMO3*. Após a sequenciação procedeu-se à análise da mesma e identificação de todas as alterações. A partir desta etapa surge o presente estudo, que consiste na análise das alterações encontradas na sequenciação de *FMO3* para análise individual, essencialmente através de programas bio-informáticos a fim de avaliar o impacto das variantes identificadas na expressão da doença, objectivo principal da realização deste trabalho.

Foram usados dois programas bio-informáticos, dos quais o *Pymol* e o *PolyPhen*, com vista à obtenção de resultados das alterações encontradas na sequenciação.

O *Pymol* é um sistema de visualização molecular criado por Warren Lyford DeLano, que permite produzir imagens de alta qualidade em 3D, de moléculas pequenas e macromoléculas biológicas, tais como proteínas. Permite ainda criar modelos de estruturas tendo como base uma sequência e um modelo experimentalmente determinado, disponível em base de dados.

O *PolyPhen* é uma ferramenta que prevê o possível impacto, da substituição de um aminoácido, na estrutura e função de uma proteína humana, usando considerações físicas e comparativas simples.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tratando-se de uma doença rara e tendo em conta que, segundo pesquisas bibliográficas efectuadas, não se encontrou nenhuma publicação referente à trimetilaminúria na população portuguesa, surgiu então a necessidade de avaliar esta patologia.

Os dados obtidos para a população estudada (n=17) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Mutações encontradas em doentes portugueses.

Doente (nº)	Idade (anos)	Sexo	Genótipo (proteína)	Exão afectado	Referência
1	6	M	-	-	-
2	8	M	p.S147S/- p.E158K/- p.N285N/-	4 4 7	Chalmers 2006 Akerman 1999 rs909530
3	3	F	p.E158K/p.E158K p.N285N/p.N285N p.E308G/p.E308G	4 7 7	Akerman 1999 rs909530 Akerman 1999
4	5	M	p.E158K/- p.Q373QfsX11/-	4 7	Akerman 1999 Em estudo
5	4	F	p.G180V/- p.N285N/-	5 7	Philips 2007 rs909530
6	3	M	p.S147S/- p.E158K/- p.N285N/p.285N p.S310L/-	4 4 7 7	Chalmers 2006 Akerman 1999 rs909530 Em estudo
7	4	F	p.E158K/-	4	Akerman 1999
8	4	F	p.S147S/p.S147S p.G180V/- p.N285N/-	4 5 7	Chalmers 2006 Philips 2007 rs909530
9	4	F	p.E158K/p.E158K p.E308G/- p.R417C/- p.T428S/-	4 7 8 9	Akerman 1999 Akerman 1999 Em estudo Em estudo
10	-	M	p.E158K/- p.V257M/-	4 6	Akerman 1999 Furnes 2003
11	3	F	p.E158K/p.E158K p.N285N/ p.N285N p.E308G/p.E308G	4 7 7	Akerman 1999 rs909530 Akerman 1999
12	50	F	p.P153L/- p.E158K/- p.R417C/- p.T428S/-	4 4 8 9	Dolphin 1997 Akerman 1999 Em estudo Em estudo
13	6	F	p.E158K/-	4	Akerman 1999
14	3	F	p.V257M/-	6	Furnes 2003
15	2	M	p.E158K/-	4	Akerman 1999

			p.E308G/-	7	Akerman 1999
16	2	M	p.G38T/-	2	Em estudo
			p.E158K/p.E158K	4	Akerman 1999
			p.W388L/-	7	Em estudo
17	6	F	p.P153L/-	4	Dolphin 1997
			p.E158K/-	4	Akerman 1999

É importante salientar que, relativamente à mutação N285N, em homozigotia para os doentes 3, 6 e 11, e em heterozigotia para os doentes 2, 5 e 8, consiste numa mutação silenciosa, onde ocorre a alteração de uma base, mas que codifica para o mesmo aminoácido, não havendo alteração da proteína. Por este facto não apresenta significado relevante para o funcionamento enzimático, não estando associada a nenhuma referência literária.

A modelação da FMO3 humana com a FMO3 bacteriana....” por: **“A comparação da sequência da FMO3 humana com a homóloga bacteriana revelou apenas 21% de identidade entre as duas proteínas”** (nota: estou a assumir que é isto que quer dizer)

O programa *Pymol* permite efectuar modelos de determinada sequência em comparação com um modelo previamente conhecido em base de dados. No caso da *FMO3* o modelo disponível em base de dados é o bacteriano (PDB ID: 2VQ7). Dependendo do grau de similaridade entre a sequência da proteína humana com a bacteriana é efectuado um “comparative homology modeling” para se obter a estrutura normal. A comparação da sequência da *FMO3* humana com a homóloga bacteriana revelou apenas 21% de identidade entre as das proteínas. Assim sendo, nesta situação não é possível fazer-se modelos para prever o impacto das mutações, dado que não é possível obter-se um modelo com qualidade satisfatória (Figuras 7). Por este facto, o estudo realizado através do programa *Pymol* não nos permite retirar conclusões sólidas, não podendo ser aplicado, por enquanto, ao *FMO3* humano.

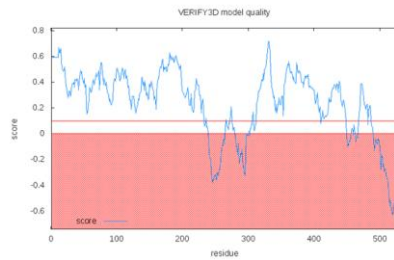


Figura 7 – Gráfico obtido através do programa *Pymol*®, da qualidade do alinhamento do modelo de *FMO3* bacteriano com a sequência de *FMO3* humano - 21%.

Através do programa *PolyPhen* foi possível obter, para cada mutação em estudo, uma previsão do seu impacto na estrutura.

Relativamente às 6 variantes novas encontradas, foram obtidos os seguintes resultados, que passamos a analisar:

Para a variante **S310L**, presente no doente 6, a substituição de uma serina conservada por uma leucina, na posição 310, muito provavelmente terá um impacto negativo no funcionamento da enzima. Os aminoácidos serina e leucina têm propriedades bioquímicas muito distintas. A serina é um aminoácido pequeno e polar, ao passo que a leucina é um aminoácido de dimensões maiores, hidrofóbico e anfipático (Figura 8).

Por este facto poder-se-á afirmar que estamos na presença de uma mutação provavelmente patogénica, que contribui para o fenótipo de TMAuria do doente.

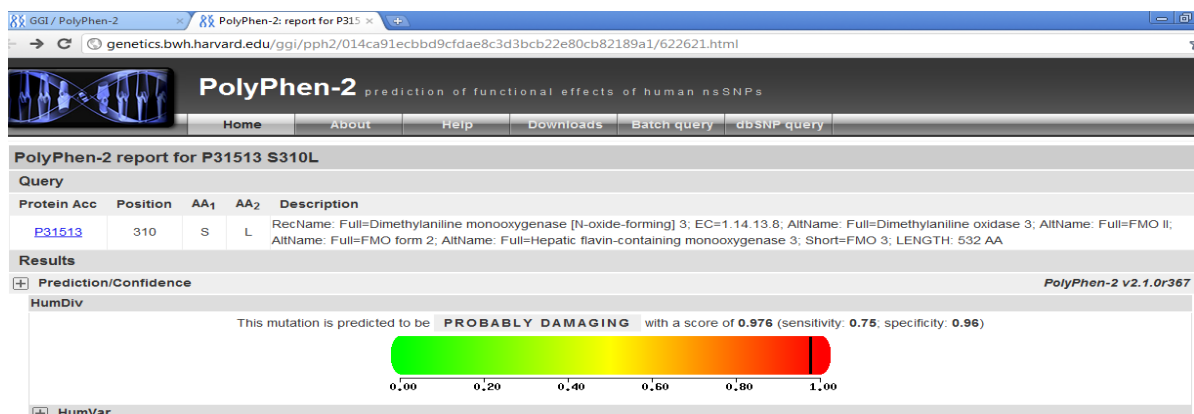


Figura 8 - Estudo da variante S310L obtido através do programa PolyPhen.

Para a variante **R417C**, encontrado nos doentes 9 e 12, a substituição de uma Arginina por uma Cisteína, como prevê o *PolyPhen*, não terá consequências graves para o funcionamento da enzima, dado que esta posição 417 não é muito conservada e no alinhamento encontram-se vários resíduos neste local como Leucina, Fenilalanina e Arginina. Assim, pode-se concluir que esta posição não é essencial para o funcionamento enzimático, embora altere o aminoácido. Contudo, sendo de um local pouco conservado esta alteração não deverá ser patogénica tratando-se assim de um polimorfismo (Figura 9).

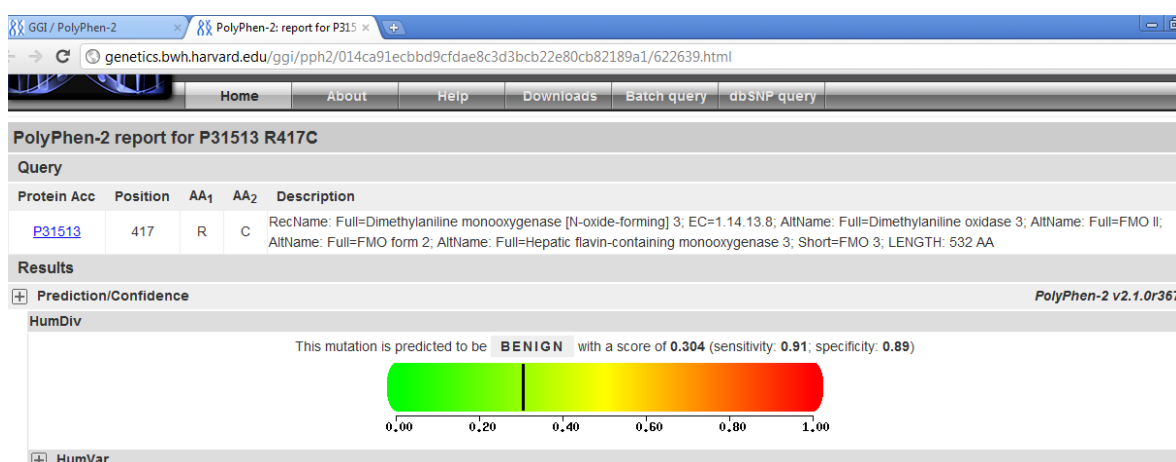


Figura 9 - Estudo da variante R417C obtido através do programa PolyPhen.

Para a variante **T428S**, presente nos doentes 9 e 12, apesar desta posição ser relativamente conservada, a substituição de uma Treonina por uma Serina não terá consequências negativas no funcionamento enzimático, dado que são ambos aminoácidos pequenos e ligeiramente polares, com propriedades bioquímicas muito semelhantes (Figura 10).

Tal como acima referido, esta alteração do aminoácido num local pouco conservado não causará patogenicidade ao doente, tratando-se de um polimorfismo.

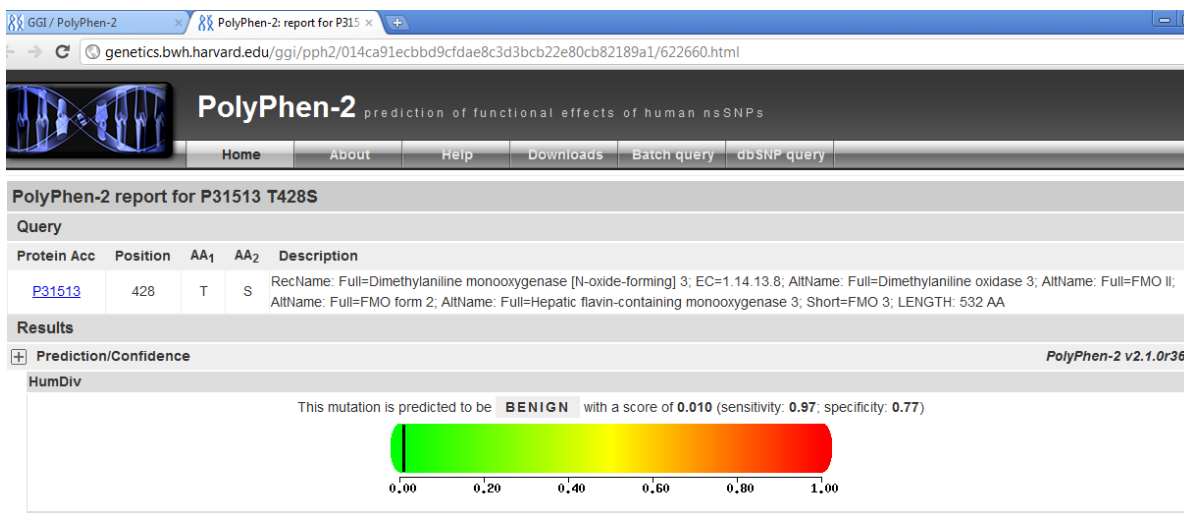


Figura 10 - Estudo da variante T428S obtido através do programa PolyPhen.

No doente 16, foram encontradas duas “novas” variantes (G38T e N388L), até ao momento não descritas na literatura. Para a variante **G38T**, a substituição da Glicina 38 altamente conservada, por uma Treonina, muito possivelmente terá consequências graves dado que a glicina 38 é um resíduo altamente conservado, indicando assim a sua importância no funcionamento enzimático (Figura 11).

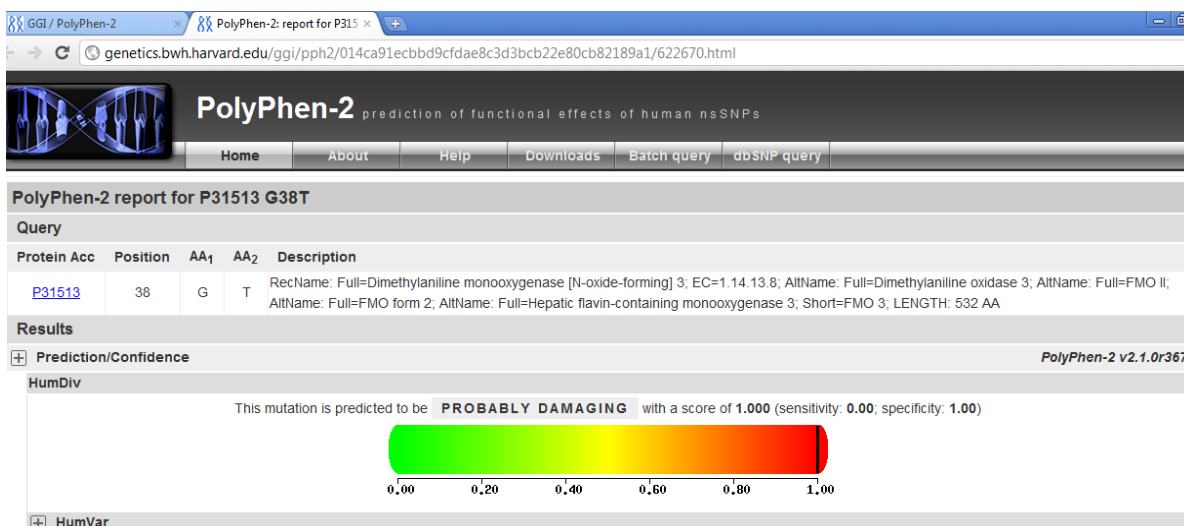


Figura 11 - Estudo da variante G38T obtido através do programa PolyPhen.

E finalmente para a variante **W388L**, a substituição de um Triptofano, um aminoácido com anéis aromáticos, por uma Leucina, possivelmente terá impactos negativos no funcionamento da enzima (Figura 12).

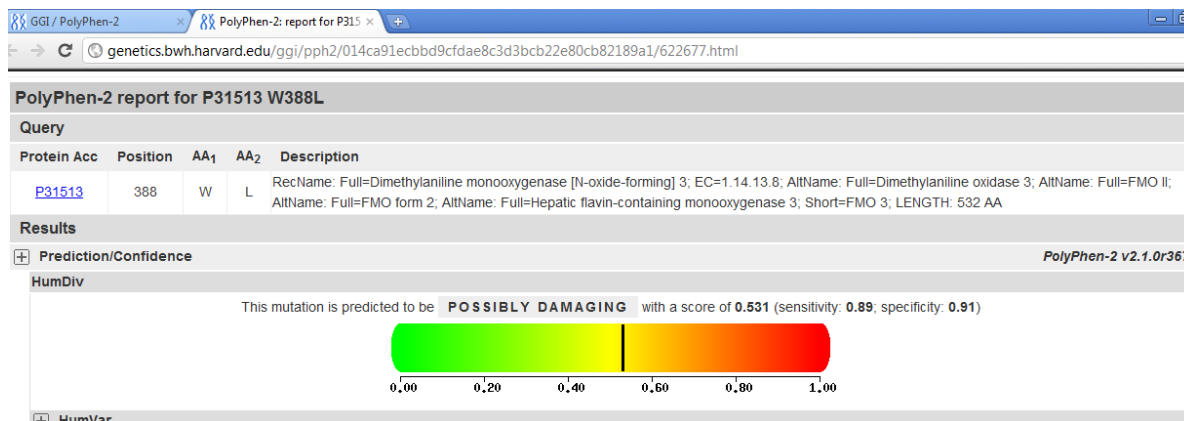


Figura 12 - Estudo da variante W388L obtido através do programa PolyPhen.

Relativamente ao doente 4 foi encontrada a mutação frameshift Q373QfsX11/N. Devido à inserção de uma alanina (c.1118_1119insA) na posição 373 conduz à paragem da síntese proteica 11 codões à frente. Para além desta mutação este doente tem ainda outra variação associada, a E158K. Por este facto, poder-se-á afirmar que as mutações presentes no doente estão associadas a um fenótipo de TMAuria grave, sendo que a mutação Q373QfsX11 é certamente patogénica.

Deste modo, mediante os resultados obtidos através do programa *PolyPhen*, concluiu-se que as mutações S310L, G38T e W388L têm impactos negativos, comprometendo, deste modo, o funcionamento enzimático. Relativamente as restantes mutações, R417C e T428S, pode-se concluir que a substituição dos aminoácidos envolvidos não comprometem o funcionamento normal enzimático. Em síntese, das 6 variantes novas detectadas neste estudo, 4 são patogénicas e 2 benignas.

Numa análise individual de cada paciente retiraram-se as seguintes conclusões:

Para os doentes 6, 9, 12 e 16 foram encontradas mutações já descritas na literatura e outras ainda não descritas. Através dos resultados acima mencionados quanto as “novas”

mutações, relativamente às mutações R417C e T428S, como não comprometem o funcionamento enzimático normal, pode concluir-se que serão as outras mutações envolvidas a causar a patologia ou pelo facto de estarem associadas, como é o caso do paciente 9 que apresenta o composto E158K com E308G e no caso do paciente 12 que para além dos polimorfismos R417C e T428S apresenta ainda a mutação P153L e a variante E158K. O presente estudo revelou ainda que as mutações S310L, G38T e W388L acarretam consequências graves, comprometendo a actividade enzimática. Assim, conclui-se que para os doentes 6 e 16 as mutações “novas” são indicativas de causarem a patologia. Contudo, estes doentes também apresentam outras mutações associadas, significativas para o diagnóstico de Trimetilaminúria grave.

Para os restantes doentes é importante referir que, para o doente 12 as “novas” mutações não estão directamente relacionadas com a manifestação da patologia mas como este indivíduo manifesta ainda a mutação P153L, que como já foi referido anteriormente e segundo Chalmers e colaboradores, esta mutação implica perda total no funcionamento enzimático. Assim sendo, fenotipicamente o indivíduo é diagnosticado como portador de TMAuria grave, o mesmo acontece com o doente 9, onde as mutações “novas” não estão directamente envolvidas com a patologia mas em conjunto com a variante E158/E308 o efeito da actividade enzimática fica comprometido.

Nesta perspectiva, tendo em conta as mutações encontradas em cada indivíduo, pode-se afirmar que uma mutação poderá não ter impacto quando isolada. Contudo, quando associada a outra mutação poderá predispor o indivíduo para a patologia, como já foi referido por vários autores.

É relevante referir que mediante a população estudada e tratando-se de indivíduos europeus, a variante E158K foi a mais prevalente, sendo que 12 dos 17 doentes tinham presente a mutação. Este dado vai de encontro ao estudo de Phillips e colaboradores (2007) que referiram que a incidência desta mutação está presente em 35-45% na população europeia.

Na população em estudo, relativamente aos doentes 2, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15 e 17, as mutações encontradas estão descritas na literatura e são susceptíveis de manifestarem a

patologia, aquando isoladas ou em conjunto com outras mutações e/ou polimorfismos, como será confirmado de seguida.

Numa análise individual destes doentes foram retiradas as seguintes ilações:

- Para as mutações: S147S com E158K encontradas no doente 2 e S147S com G180V presentes no doente 8, pode-se concluir que a associação da mutação S147 com a variante E158K e com a mutação G180V, revela susceptibilidade para manifestações acentuadas nos sintomas devido ao facto da actividade enzimática ficar potencialmente reduzida. Segundo Cashman e Zhang (2002), S147S trata-se de uma variante rara, associada à actividade de N-oxidação da TMA normal ou levemente reduzida. Contudo, a possibilidade de dois ou mais polimorfismos/mutações quando presentes no gene *FMO3* do mesmo indivíduo contribuem ainda mais para a diminuição marcada da actividade de *FMO3* humana.

- Em alguns doentes foi encontrado apenas uma mutação ou polimorfismo, como é o caso do doente 5 para a mutação G180V, os doentes 7 e 13 com a variante E158K e o doente 14 com o polimorfismo V257M. Estes doentes manifestam sintomas de trimetilaminúria, o que podemos concluir que estas alterações na sequenciação, mesmo causando actividade N-oxidação de *FMO3* levemente reduzida e estando em heterozigotia não são passíveis de causar TMAuria segundo factores genéticos. Contudo, quando associadas a outros factores, como por exemplo hábitos alimentares contendo precursores de trimetilamina, alterações hormonais, stress, doenças hepáticas ou aumento do crescimento bacteriano no intestino delgado, pode aumentar a produção de TMA, conduzindo a um fenótipo típico de trimetilaminúria sendo assim classificado como trimetilaminúria secundária ou transitória (Mackay e colaboradores, 2011). Fazendo a correlação entre TMAuria secundária e alguns tipos de mutações, ainda que de fenótipo caracteristicamente leve, Yamazaki e Shimizu (2007) referiram que a *FMO3* “anormal” pode ser causada pela menstruação, particularmente na presença homozigótica de variantes genéticas leves como E158K e E308G, que causam uma diminuição da função de *FMO3*.

- Na população em estudo, relativamente a variante E308G foi possível observar, através dos doentes 3, 11 e 15, que esta variante, quando se manifestava, encontrava-se

associada ao polimorfismo E158K. Segundo alguns autores, nomeadamente Phillips e colaboradores, estas variantes estão muitas vezes ligadas e o seu efeito sobre a actividade da enzima é maior quando ambas as mutações estão presentes do que quando isoladas. No mesmo estudo, Phillips e colaboradores (2007) referiram que os homocigóticos para as variantes ligadas E158K e E308G podem apresentar sintomas de trimetilaminúria “suaves” ou transitórios. Também Lattard e colaboradores, em 2003 já haviam constatado efeitos moderados a graves na eficiência catalítica da variante composta E158K e E308G.

- No caso do doente 10, que apresenta a associação das variantes E158K e V257M pode-se concluir que o indivíduo tem predisposição genética para manifestar a doença porque a actividade enzimática fica potencialmente reduzida com a associação destes dois polimorfismos. E segundo Forrest e colaboradores (2001), os indivíduos que apresentem o polimorfismo V257M podem ser predispostos à tolerância variável de tiramina, biogénicos ou outras aminas.

- Finalmente para o doente 17, a sequenciação revelou que para além da presença da variante E158K o indivíduo apresenta ainda a mutação P153L. Segundo um estudo de Chalmers e colaboradores (2006) a mutação P153L revelou perda total da capacidade residual de TMAO, consistente com uma enzima não funcional ou ausente de *FMO3*. Por este facto, o indivíduo apresenta um fenótipo de TMAúria.

Para o doente 1 não foi possível estabelecer um diagnóstico genético que confirmasse a patologia, uma vez que na sequenciação de *FMO3* não se encontrou nenhuma mutação. Para este doente poder-se-á afirmar que a sua condição não se deve a alterações no gene *FMO3*. No entanto, de acordo com alguns autores, outras isoformas de *FMO* também podem estar envolvidas na produção de odores corporais desagradáveis (Phillips e colaboradores, 2007). Contudo, pode-se concluir que os sintomas apresentados não estão directamente relacionados com uma causa genética tratando-se de um caso de trimetilaminúria secundária ou transitória.

CONCLUSÕES

A trimetilaminúria é uma doença complicada de gerir nos indivíduos portadores, dado que está associada a uma forte componente emocional. O que podemos concluir é que muitas pessoas não recorrem aos clínicos com receio de não serem compreendidas. O receio de se exporem a situações embaraçosas, resulta num estado psicológico, que leva a comportamentos causadores de distúrbios sociais. Em situações extremas pode mesmo levar ao suicídio.

É uma doença crónica, mas existem alternativas para melhorar a qualidade de vida dos portadores, nomeadamente cuidados alimentares, antibioterapia para controlo da flora intestinal e terapia de apoio para que os indivíduos aprendam a viver com a sua condição.

Este estudo cumpriu todos os objectivos inicialmente propostos e relativamente ao espectro mutacional da população portuguesa concluiu-se que relativamente a esta patologia nem sempre podemos associá-la a um diagnóstico genético. Por vezes poderão existir outros factores que, associados ou não a mutações no gene, sem significado a nível enzimático, são igualmente susceptíveis de causar a patologia. Por este facto, cada doente deve ser estudado individualmente com objectivo de avaliar todas as alterações ao nível genético. Contudo, dever-se-á ter sempre em atenção outros factores susceptíveis de potencializar a redução na actividade enzimática, sendo necessário relacionar vários factores para um diagnóstico mais correcto.

Este estudo compreendeu uma análise de 17 doentes, sendo que 11 deles apresentavam mutações e/ou polimorfismos já descritos na literatura e um dos pacientes não revelou qualquer alteração na sequenciação de *FMO3*, o que indica que o seu quadro clínico aponta para a possibilidade de trimetilaminúria transitória ou envolve outras isoformas de *FMO* que não *FMO3*. Os restantes 5 doentes manifestaram variantes não descritas na literatura.

O espectro mutacional da população portuguesa relativamente à patologia Trimetilaminúria compreende:

- A variante E158K, cuja incidência foi de $\approx 70,5\%$;
- A associação da variante E158K com E308G, com uma incidência de $\approx 23,5\%$;
- $\approx 17,6\%$ da população estudada apresentou a mutação S147S;
- Foram encontradas ainda as mutações / polimorfismos: G180V, V257M e P153L, com uma incidência pouco relevante.
- Das variantes encontradas de “novo”, 4 são indicativas de causar patologia (mutações patogénicas – S310L, G38T, W388L e Q373QfsX11) devido à actividade enzimática ficar comprometida. Relativamente as outras variantes encontradas, R417C e T428S, tratam-se de polimorfismos benignos.
- De todos os doentes estudados, o doente 16 foi o único que apresentou um composto heterozigótico para duas mutações patogénicas.

A afirmação destes resultados foi fundamentada com o auxílio do programa bio-informático *PolyPhen*.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados do presente trabalho apontam para a necessidade de proceder ao estudo do polimorfismo E158K, na população em geral. Este estudo permitirá avaliar se este polimorfismo se encontra na população portuguesa assintomática, em grande ou pequena percentagem de incidência. Estes dados poderão avaliar se o polimorfismo é ou não causador de doença, ou se apenas quando estiver associado a outra mutação. Poderá acontecer que doença causada seja apenas transitória.

Poder-se-ão também desenvolver estudos genealógicos dos doentes a fim de se avaliar se as alterações encontradas em *FMO3* são características transmitidas ou de “novo”.

BIBLIOGRAFIA

Allerston, C.K.; Vetti, H. H.; Houge, G.; Phillips, I. R.; Shephard, E. A. (2009) *A novel mutation in the flavin-containing monooxygenase 3 gene (FMO3) of a Norwegian family causes trimethylaminuria*. *Molecular genetics and metabolism*, 98(1-2): 198-202.

Akerman, B.R.; Lemass, H.; Cgow, L. M.; Lambert, D.M.; Greenberg, C.; Bibeau, C.; Mamer, O. A.; Treacy, E. P. (1999) *Trimethylaminuria is caused by mutations of the FMO3 Gene in a North American Cohort*. *Molecular genetics and metabolism*, 68(1): 24-31.

Arseculeratne, G.; Wong, A. K.; Goudie, D. R.; Ferguson, J. (2007) *Trimethylaminuria (Fish-odor Syndrome) : a case report*. *Archives of dermatology*, 143(1): 81- 84.

Cashman, J. R.; Zhang, J. (2002) *Interindividual differences of human flavin-containing monooxygenase 3: genetic polymorphisms and functional variation*. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 30(10): 1043-52.

Cashman, J. R. ; Camp, K. ; Fakharzadeh, S. S. ; Fennessey, P. V. ; Hines, R. N. ; Mamer, O. A. ; Mitchell, S. C.; Nguyen, G. P.; Schelenk, D.; Smith, R. L.; Tioa, S. S.; Williams, D. E.; Yannucelli, S. (2003) *Biochemical and Clinical Aspects of the Human Flavin-Containing Monooxygenase Form 3 (FMO3) Related to Trimethylaminuria*. *Current Drug Metabolism*, 4(2): 151- 170.

Chalmers, R. A. ; Bain, M. D. ; Michelakakis, H. ; Zschocke, J. ; Iles, R. A. (2006) *Diagnosis and management of Trimethylaminuria (FMO3 deficiency) in children*. Journal of inherited metabolic disease, 29(1):162-72.

Christodoulou, J. (2011) *Trimethylaminuria: an under-recognised and socially debilitating metabolic disorder*. Journal of paediatrics and child health, Jan 2011, 47: 60/107.

Dolan, C.; Shields, D. C.; Stanton, A.; O'Brien, E.; Lambert, D. M.; O'Brien, J. K.; Treacy, E. P. (2005) *Polymorphisms of the Flavin containing monooxygenase 3 (FMO3) gene do not predispose to essential hypertension in Caucasians*. BMC Medical Genetics, 6:41.

Forrest, S. M. ; Knight, M. ; Akerman, B. R. ; Cashman, J. R.; Treacy, E. P. (2001) *A novel deletion in the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) in a greek patient with trimethylaminuria*. Pharmacogenetics, 11(2): 169-74.

Fraser-Andrews, E. A. ; Manning, N. J. ; Ashton, G. H. ; Eldridge, P.; McGrath, J.; Menagé Hdu, P. (2003) *Fish odour syndrome with features of both primary and secondary trimethylaminuria*. Clinical and experimental dermatology, 28(2): 203-5.

Frederick, R. E.; Mayfield, J. A.; DuBois, J. L. (2011) *Regulated O₂ Activation in Flavin-Dependent Monooxygenases*. Journal of the American Chemical Society, 133(32): 12338-41.

Furnes, B.; Feng, J.; Sommer, S. S. ; Schlenk, D. (2003) *Identification of novel variants of*

the flavin-containing Monooxygenase gene family in African Americans. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 31(2): 187-93.

Hernandez, D.; Addou, S.; Lee, D.; Orengo, C.; Shephard, E. A.; Phillips, I. R. (2003) *Trimethylaminuria and a Human FMO3 Mutation Database. Human mutation*, 22 (3): 209-13.

Koukouritaki, S. B.; Poch, M. T. ; Henderson, M. C.; Siddens, L. K.; Krueger, S. K.; VanDyke, J. E.; Williams, D. E.; Pajewski, N. M.; Wang, T.; Hines, R. N. (2007) *Identification and Functional Analysis of Common Human Flavin-Containing Monooxygenase 3 Genetic Variants. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320 (1): 266-73.

Krueger, S. K.; Williams, D. E.; Yueh, M. F.; Martin, S. R.; Hines R. N.; Raucy J. L.; Dolphin, C. T.; Shephard, E. A.; Phillips, I. R. (2002) *Genetic Polymorphisms of Flavin-containing monooxygenase (FMO). Drug metabolism reviews*, 34(3): 523-32.

Kubota, M.; Nakamoto, Y.; Nakayama, K.; Ujjin, P.; Satarug, S.; Mushiroda, T.; Yokoi, T.; Funayama, M.; Kmataki, T. (2002) *A Mutation in the Flavin-Containing Monooxygenase 3 Gene and its Effects on Catalytic Activity for N-Oxidation of trimethylamine In Vitro. Drug metabolism and pharmacokinetics*, 17(3): 207-13.

Lattard, V.; Zhang, J.; Tran, Q.; Furnes, B.; Schlenk, D.; Cashman, J. R. (2003) *Two new polymorphisms of the FMO3 gene in Caucasian and African-American Populations: comparative genetic and functional studies. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 31(7): 854-60.

Mackay, R. J.; MacEntyre, C. J.; Henderson, C.; Lever, M.; George, P. M. (2011) *Trimethylaminuria: Causes and Diagnosis of a Socially Distressing Condition*. The Clinical biochemists reviews/Australian Association of clinical biochemists, 32(1): 33-43.

Mayatepek, E.; Kohlmüller, D. (1998) *Transient trimethylaminuria in childhood*. Acta paediatrica, 87(11): 1205-7.

Motika, M. S.; Zhang, J.; Zheng, X.; Cashman, J. R. (2009) *Novel Variants of the Human Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3) Gene Associated with Trimethylaminuria*. Molecular genetics and metabolism, 97(2): 128-35.

Phillips, I. R. ; Dolphin, C. T. ; Clair, P. ; Hadley, M. R.; Hutt, A. J.; McCombie, R. R.; Smith, R. L.; Shephard, E. A. (1995) *The molecular biology of the flavin-containing monooxygenases of man*. Chemico-biological interactions, 96(1): 17-32.

Phillips, I. R.; Francois, A. A.; Shephard, E. A. (2007) *The flavin-containing Monooxygenases (FMOs): Genetic Variation and its consequences for the metabolism of therapeutic drugs*. Bentham Science Publishers, 5 (4): 292-313.

Phillips, I. R.; Shephard, E. A. (2008) *Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response*. Trends in pharmacological sciences, 29(6): 294-301.

Treacy, E. P.; Akerman, B. R.; Chow, L. M.; Youil, R.; Bibeau, C.; Lin, J.; Bruce, A. G.; Knight, M.; Danks, D. M.; Cashman, J. R.; Forrest, S. M. (1998) *Mutations of the flavin-*

containing monoxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. Human molecular genetics, 7(5): 839-45

Yamazaki, H.; Fujita, H.; Gunji, T.; Zhang, J.; Kmataki, T.; Cashman, J. R.; Shimizu, M. (2006) *Stop codon mutations in the flavin-containing monoxygenase 3 (FMO3) gene responsible for trimethylaminuria in a Japanese population. Molecular genetics and metabolism, 90(1): 58-63.*

Yamazaki, H.; Shimizu, M. (2007) *Genetic Polymorphism of the Flavin-Containing Monoxygenase 3 (FMO3) Associated with Trimethylaminuria (Fish Odor Syndrome): Observations from Japanese Patient. Current drug metabolism, 8(5): 487-91.*

Zhou, J.; Shephard, E. A. (2006) *Mutation, polymorphism and perspectives for the future of human flavin-containing monoxygenase 3. Mutation Research, 612(3): 165-71.*