

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL

NICOLE TOZZI

Transtorno de ansiedade generalizada: aspectos genéticos e bioquímicos da
proteína transportadora de serotonina

Ituiutaba - MG

2023

NICOLE TOZZI

Transtorno de ansiedade generalizada: aspectos genéticos e bioquímicos da
proteína transportadora de serotonina

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da
Universidade Federal de Uberlândia, como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de
Rezende

Ituiutaba – MG

2023

NICOLE TOZZI

Transtorno de ansiedade generalizada: aspectos genéticos e bioquímicos da
proteína transportadora de serotonina

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da
Universidade Federal de Uberlândia, como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas.

Ituiutaba, 29 de novembro de 2023

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Azenha Alves de Rezende (UFU)

Profa. Dra. Luciana Karen Calábria (UFU)

Ms. Gustavo Siconello dos Santos (Hospital Amaral Carvalho)

Dedico este trabalho ao meu herói Marcio Tozzi (*in
memorian*) que sempre me incentivou a sonhar e a
conquistar o mundo. Não poderia ter tido um pai
melhor. Eu te amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças durante essa caminhada. A minha mãe Rosana Francisco Tozzi que foi meu porto seguro durante essa jornada, que sempre me aconselhou e me deu colo. Eu tenho muito orgulho da mulher guerreira que você é.

Aos moradores e agregados da Gatomia, vocês fizeram minha graduação se tornar muito mais leve. Obrigada pelas conversas e pelos passeios de carro, vocês são incríveis e sou eternamente grata por ter conhecido vocês.

A minha dupla dinâmica Vitória Rodrigues, obrigada por todas as aventuras que vivemos durante esses cinco anos, por sempre estar ao meu lado me apoiando e brigando comigo quando necessário. Você é uma pessoa incrível e foi uma das melhores pessoas que conheci nessa graduação. Ao Júlio Carvalho, obrigada pelas conversas e por surtar junto comigo durante essa jornada. Eu tenho certeza que você vai se tornar um biólogo incrível.

À Luciana Karen Calábria que me ensinou muita coisa durante a execução do projeto de extensão. Ao meu orientador Alexandre Azenha Alves de Rezende, pelas conversas e risadas, pelos conselhos, por ter aceitado essa loucura de ser meu orientador e especialmente por ter se tornado um grande amigo.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas que fizeram parte da minha formação acadêmica e a todos os amigos que fiz durante o curso.

Ao Gustavo Siconello, que se tornou meu melhor amigo e psicólogo nas horas vagas, sou eternamente grata pelas nossas conversas e cafés. Você foi uma pessoa muito importante durante a minha graduação, sempre me aconselhando e apoiando. Obrigada por aceitar o convite de fazer parte da banca, você é incrível.

Aos meus amigos e familiares que sempre estiveram torcendo por mim, muito obrigada!

“Se vi mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes”

(Sir Isaac Newton)

RESUMO

Introdução. A ansiedade é uma resposta do cérebro ao perigo. Porém, quando se torna frequente, persistente e impede o indivíduo de realizar suas atividades, é considerada patológica. O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é considerado um dos transtornos psiquiátricos mais antigos, apresentando diversos sintomas, como excessiva ansiedade e apreensão, e dificuldade em controlar a preocupação. **Objetivo.** Analisar, a partir de ferramentas de biologia computacional, as características genéticas do gene *SLC6A4* (codificador da proteína transportadora de serotonina – SERT) e bioquímicas da SERT, revelando suas características em *Homo sapiens*, uma vez que a serotonina possui papel primordial na regulação do humor. **Metodologia.** Estudo exploratório e descritivo utilizando revisão bibliográfica, consulta em bancos de dados, plataformas e ferramentas de biologia computacional de livre acesso. **Resultados.** *SLC6A4* é responsável pela síntese da SERT. Este gene é encontrado na região 17q11.2 e possui 15 éxons. De acordo com os resultados obtidos foram encontradas alterações na região promotora além de SNPs em regiões codificantes e alterações pós-traducionais na proteína. A predição de alterações na SERT demonstraram severa instabilidade. As alterações descritas no presente trabalho sugerem que o indivíduo portador de TAG seja tolerante a medicamentos utilizados no tratamento da ansiedade, principalmente aos que são de primeira escolha dos médicos. **Conclusão.** O manejo do TAG geralmente é medicamentoso e o entendimento das alterações genéticas e bioquímicas de genes e proteínas que desempenham papel fundamental na sinalização das vias podem sugerir biomarcadores para o diagnóstico preciso, melhorando a eficácia do tratamento e da qualidade de vida.

Palavras-chave: Inibidores seletivos de receptação de serotonina; 5-hidroxitriptamina; Sistema Nervoso Central.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	METODOLOGIA.....	11
3	RESULTADOS.....	12
4	DISCUSSÃO.....	18
5	CONCLUSÃO.....	21
	REFERÊNCIAS.....	22
	APÊNDICE.....	24

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade é uma resposta do cérebro ao perigo, porém quando se torna frequente e persistente, impedindo o indivíduo de realizar suas atividades, é considerada patológica. O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é considerado um dos transtornos psiquiátricos mais antigos e, a partir de 1980 foi introduzido na terceira edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. De acordo com a quinta edição deste manual, o TAG apresenta diversos sintomas, como excessiva ansiedade e apreensão, e dificuldade de controlar a preocupação. Além disso, deve abranger três ou mais sintomas físicos ou cognitivos, como inquietação, tensão, dificuldade na concentração, irritabilidade, distúrbios do sono e tensão muscular¹.

Os indivíduos com TAG apresentam um padrão excessivo de preocupação e intolerância ao desconhecido e requerem tratamento, geralmente de longo prazo². Além disso, a predisposição ao desenvolvimento de TAG está fortemente ligada à infância, pois é nessa fase que ocorre o desenvolvimento cerebral³.

De acordo com o *Global Burden of Disease*, em 2020 os diagnósticos de TAG aumentaram em 25,6% em decorrência da Pandemia de COVID-19 e, mulheres e jovens (20 a 24 anos) foram os mais afetados⁴.

O tratamento farmacológico recomendado para ansiedade consiste no uso medicamentos de primeira linha, como os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS), Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina e Noradrenalina (ISRSN) e a Pregabalina, além dos de segunda linha, os benzodiazepínicos⁵.

A resistência ao tratamento está associada à diversos fatores, e entre eles as características intrínsecas da doença, como a gravidade e frequência dos sintomas, uso e abuso de drogas, histórico familiar e infantil. Ainda, influenciam na eficácia do tratamento os parâmetros sociais, como baixa renda, além de fatores biológicos, como sexo e fatores genéticos².

A proteína transportadora de serotonina (SERT) faz parte da família dos neurotransmissores simportadores de sódio⁶. A SERT está localizada no neurônio pré-sináptico, sendo responsável por transportar a serotonina (5-HT) até a fenda sináptica, além de realizar a recaptação deste neurotransmissor⁷.

A 5-HT é um neurotransmissor sintetizado a partir do aminoácido triptofano e atua nos sistemas nervosos central (SNC) e periférico, regulando o humor, percepção, apetite,

agressividade, cognição, memória, aprendizagem, atenção, ritmo circadiano, além da formação de sinapses. Alterações na síntese e receptação de 5-HT podem ter efeitos negativos no SNC, como o aparecimento do TAG⁸.

Estudos de associação genômica ampla identificaram variantes alélicas do gene *SLC6A4* (do inglês, *solute carrier family 6 member 4*), codificante da proteína SERT, com a predisposição aos transtornos de ansiedade. Assim, identificar essas variantes é primordial para entender a natureza desses transtornos. Até o presente momento, a maioria das variantes identificadas localiza-se em regiões não codificantes, afetando a expressão gênica e proteica⁹.

Conhecer os aspectos genéticos e bioquímicos dos genes e proteínas que atuam na sinalização e no mecanismo de ação da 5-HT pode contribuir na criação de estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento de TAG. Considerando a importância do mecanismo de ação que controla os níveis de 5-HT no SNC e sua relação com a ansiedade, este estudo teve como objetivo analisar, a partir de ferramentas de biologia computacional, as características genéticas do *SLC6A4* e bioquímicas da SERT em *Homo sapiens*.

2 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado baseando-se em revisão bibliográfica e no uso de ferramentas de biologia computacional para obtenção de dados genéticos e bioquímicos sobre o gene *SLC6A4* e sobre a proteína SERT. Para tanto, a revisão da literatura foi realizada utilizando-se as bases de dados *Google Scholar*, SciELO, PubMed e Periódicos CAPES. Para a busca nas plataformas foram utilizados os descritores: “serotonina”, “ansiedade”, “polimorfismo” e “transportador de serotonina”, e seus respectivos termos em inglês.

A localização cromossômica de *SLC6A4* de *H. sapiens*, assim como a sequência de nucleotídeos no formato FASTA, foram obtidas a partir do banco de dados *National Center of Biotechnology Information* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A sequência de resíduos de aminoácidos no formato FASTA da proteína SERT também foi obtida por meio do NCBI e confirmada por meio do UniProt *Knowledgebase* (UniProtKB - <https://www.uniprot.org/>). O banco de dados *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) foi utilizado para obter os níveis de expressão do RNAm de *SLC6A4* e da proteína SERT nas diferentes regiões do SNC.

A frequência dos aminoácidos da SERT foi obtida empregando o ProtParam (<https://www.web.expasy.org/protparam/>). A estrutura terciária foi predita a partir do SwissModel, (<https://swissmodel.expasy.org/>). As regiões transmembranas, domínios citoplasmático e não citoplasmático, além da predição de sítios de *N*-glicosilação foram obtidas pelo Protter (<https://wlab.ethz.ch/protter/>). Os sítios de fosforilação e glicosilação foram inicialmente levantados no ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite>) e validados no NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) e NetNGlyc (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>), respectivamente.

O banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG - <https://www.genome.jp/kegg/>) foi utilizado para ilustrar a participação da SERT na sinapse serotoninérgica.

3 RESULTADOS

O gene *SLC6A4* está localizado no cromossomo 17q11.2 (Figura 1), possui 15 éxons e seu código de entrada no NCBI é 6532.

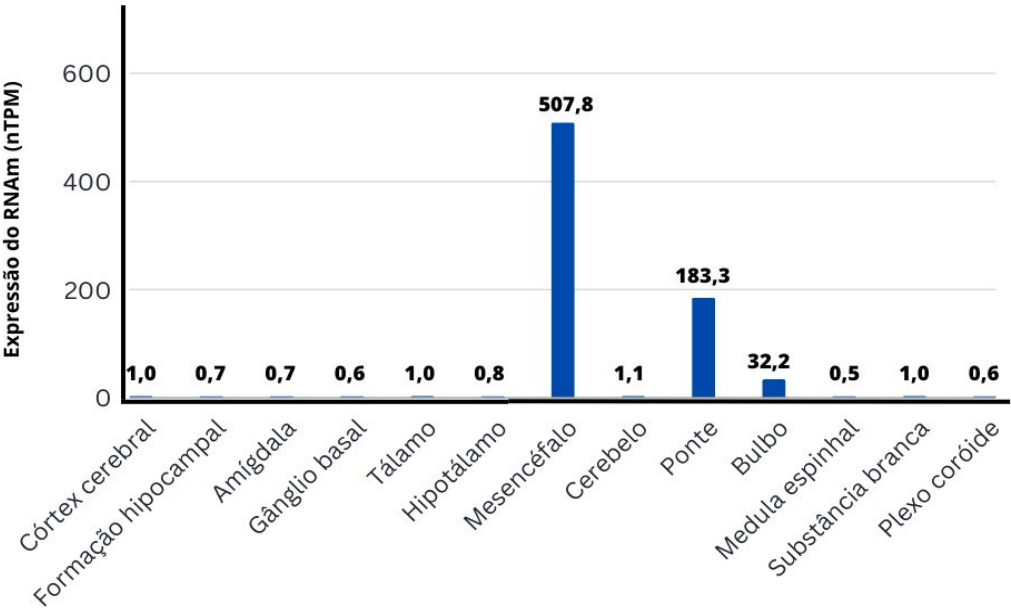
Figura 1. Localização cromossômica do gene *SLC6A4* (em destaque pela barra vermelha) em *H. sapiens*



Fonte: Adaptado de NCBI¹⁰ (2023).

As regiões do SNC que apresentam maior expressão do RNAm do gene *SLC6A4* são mesencéfalo, ponte e bulbo (Figura 2).

Figura 2. Expressão de RNAm nas regiões do SNC



Fonte: Adaptado do *The Human Protein Atlas*¹¹ (2023).

A proteína codificada pelo gene *SLC6A4* é a SERT (do inglês, *Sodium-dependent serotonin transporter*), com sequência primária de 630 resíduos de aminoácidos (Tabela 1).

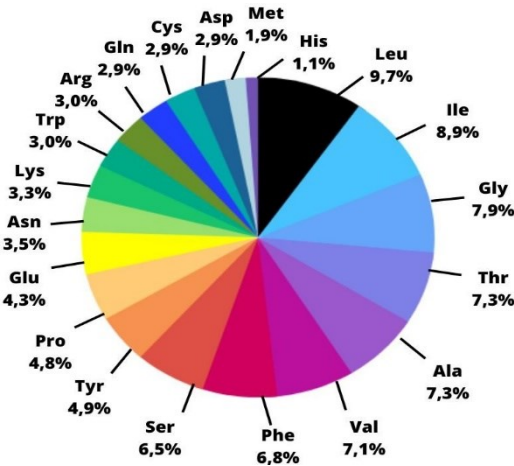
Tabela 1. Códigos de acesso e sequência de aminoácidos da SERT de *H. sapiens* no formato FASTA

Códigos de acesso	Sequência de aminoácidos
NCBI: NP_001036.1	>NP_001036.1 sodium-dependent serotonin transporter [Homo sapiens] METTPLNSQKQLSACEDGEDCQENGVLQKVVPTPGDKVESGQISN GYSVPSPGAGDDTRHSIPATTTTLVAELHQGERETWGKKVDFLL SVIGYAVDLGNVWRFYPICYQNGGGAFLLPYTIMAIFGGIPLFYME LALGQYHRNGCISIWRKICPIFKGIGYAICIIAFYIASYNTIMAWAL YYLISSFTDQLPWTSCKNSWNTGNCTNYFSEDNITWTLHSTSPAEE FYTRHVLQIHRSKGLQDLGGISWQLALCIMLIFTVIYFSIWKGVKTS GKVWVWTATFPYIILSVLLVRGATLPGAWRGVLFYLPKNWQKLE TGVIDAAAQIFFSLGPGFGVLLAFASYNKFNNNCYQDALVTSV NCMTSFVSGFVIFTVLGYMAEMRNEDVSEVAKDAGPSLLFITYAE AIANMPASTFFAIFFLMLITLGLDSTFAGLEGVITAVLDEFPHVWA KRRERFVLAVVITCFFGSLVTLTFGGAYVVKLLEEYATGPAVLTV ALIEAVAVSWFYGITQFCRDVKEMLGFSPGWFWRICWVAISPLFLL FIICSFLMSPPQLRLFQYNYPYWSIILGYCIGTSSFICIPTYIAYRLIITP GTFKERIISITPETPTEIPCGDIRLNAV
Uniprot: P31645	

Fonte: NCBI¹⁰ e UNIPROT¹² (2023).

Em sua composição é possível observar que a leucina é o aminoácido majoritário, enquanto a histidina é o menos frequente (Figura 3).

Figura 3. Frequência dos aminoácidos da SERT de *H. sapiens*



Fonte: Adaptado do ProtParam¹³ (2023).

A estrutura tridimensional, obtida por predição no Swiss-Model, revela a presença de arranjos alfa-hélice, conformação-beta e dobra-beta (Figura 4).

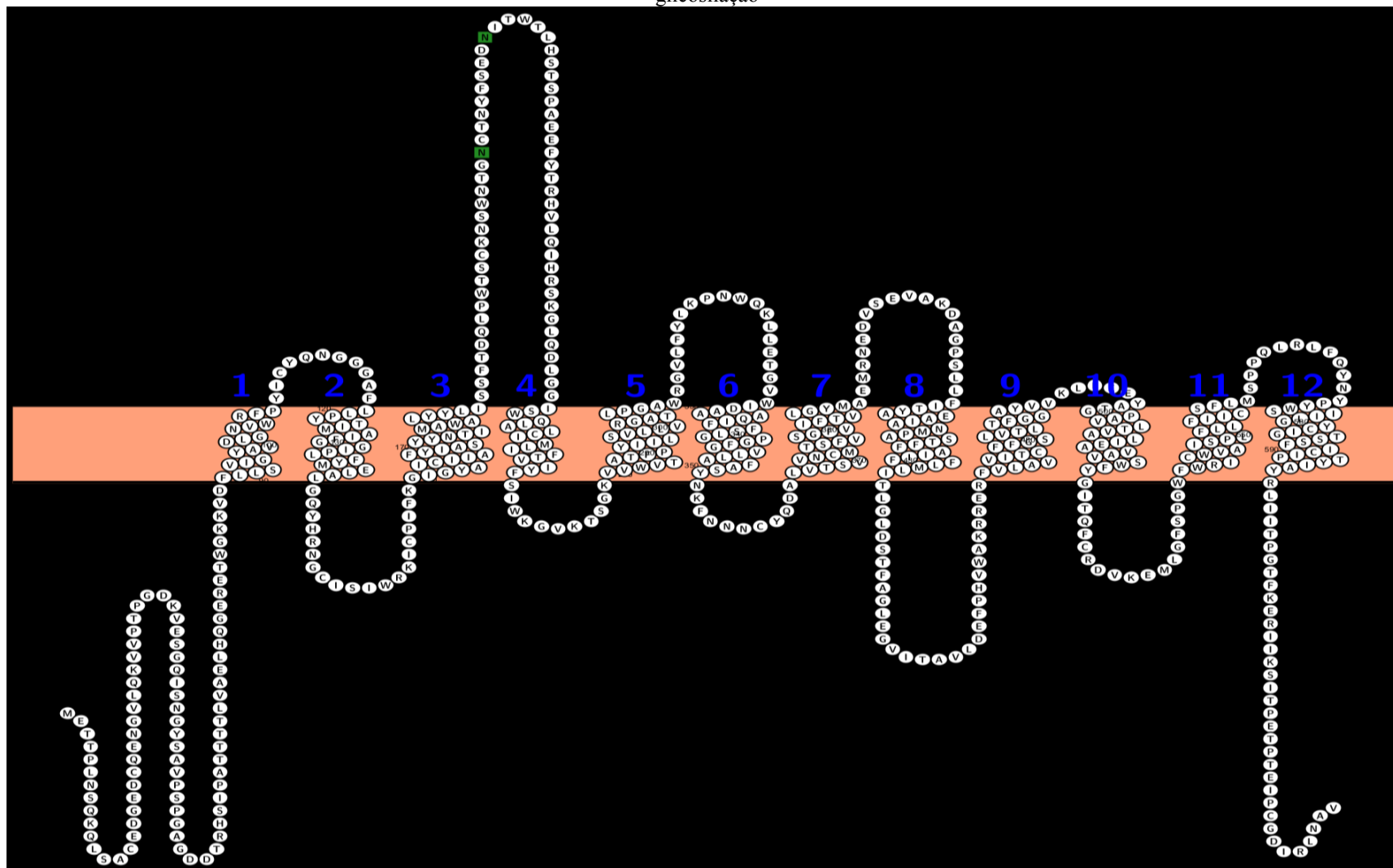
Figura 4. Estrutura terciária da SERT de *H. sapiens*



Fonte: SwissModel¹⁴ (2023).

Em nível subcelular, a SERT é majoritariamente expressa na membrana plasmática¹⁵. A localização foi validada por meio do Protter a partir da sequência dos resíduos de aminoácidos no formato FASTA. Na figura 5 é possível visualizar a presença de sítios de glicosilação nos resíduos Asn208 e Asn217 da SERT, aos quais foram validados (Tabela 2).

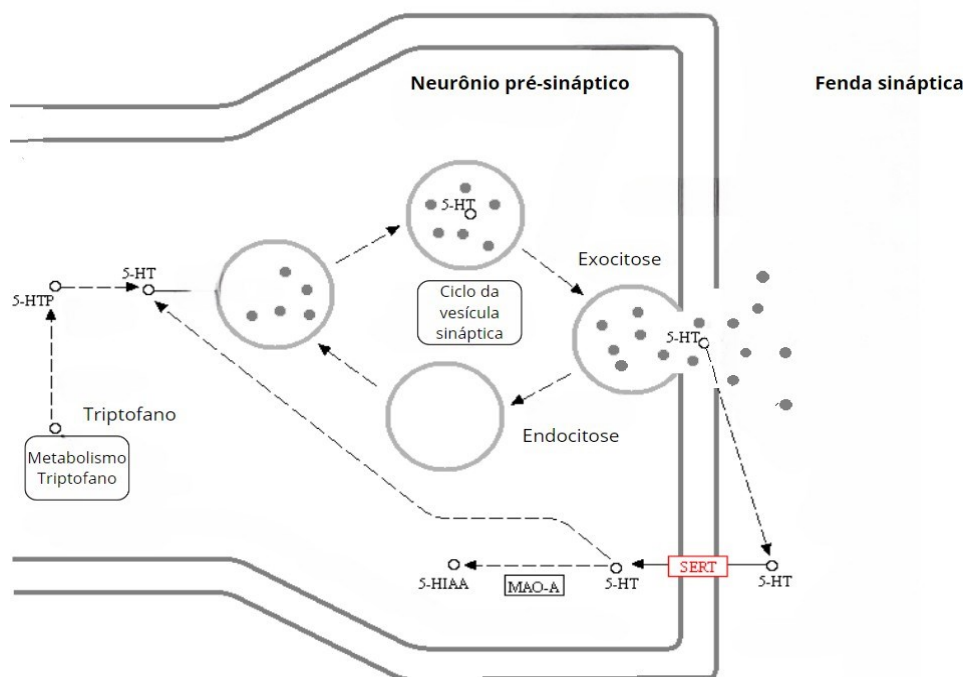
Figura 5. Predição da localização dos domínios transmembranas, citoplasmático e não citoplasmático, da SERT de *H. sapiens* com destaque (em verde) para os sítios de *N*-glicosilação



Fonte: Protter¹⁶ (2023).

Ainda de acordo com o *The Human Protein Atlas*, a SERT possui maior expressão no mesencéfalo e córtex cerebral. Durante a sinapse serotoninérgica (Figura 6), a SERT não participa somente do transporte da 5-HT do neurônio pré-sináptico para a fenda sináptica, mas também como um receptor desse neurotransmissor.

Figura 6. Sinapse serotoninérgica



Fonte: Adaptado de Kegg¹⁷ (2023).

Sítios de fosforilação pela proteína quinase C (PKC) e caseína quinase-II (CK2) foram revelados e validados na sequência primária da SERT, assim como outros sítios fosforilados por outras quinases (Tabela 2).

Tabela 2. Sítios de glicosilação presentes na proteína SERT de *H. sapiens*

Sítios	ScanPrositate	Netphos	NetNGlyc
<i>Fosforilação</i> Proteína quinase C (PKC)	Ser8 Ser199 Ser277 Thr603	PKC (escore 0,535) - PKC (escore 0,794) PKC (escore 0,857)	
<i>Fosforilação</i> Caseína quinase II (CK2)	Ser13 Thr33 Ser190 Ser226 Thr409 Thr603 Thr616	CK2 (escore 0,565) - Unsp (escore 0,866) CK2 (escore 0,618) CK2 (escore 0,526) PKC (escore 0,857) -	
<i>N</i> -glicosilação	Asn208 Asn217		Asn208 (escore 0,641) Asn217 (escore 0,730)

Fonte: Autoria própria. Dados extraídos das plataformas ScanPrositate, Netphos e NetNGlyc.

4 DISCUSSÃO

O gene *SLC6A4* está localizado no cromossomo 17q11.2 e possui 15 éxons, enquanto a proteína SERT é composta por 630 resíduos de aminoácidos. Analisando a composição bioquímica da SERT, identifica-se a prevalência de leucina e isoleucina, 9,7% e 8,9%, respectivamente. A leucina favorece o aparecimento de arranjos do tipo alfa-hélice¹⁸ conforme evidenciado na estrutura tridimensional. A SERT é uma proteína simportadora e está ancorada na membrana plasmática e os arranjos alfa-hélice encontrados em sua estrutura garantem a adesão e estabilidade para a execução de sua função¹⁹.

A proteína SERT pertence à família dos neurotransmissores simportadores dependentes de sódio, os quais são transportadores ativos secundários que aproveitam o gradiente de sódio preexistente para translocar neurotransmissores da fenda sináptica para o neurônio pré-sináptico subsequentes à ativação do receptor pós-sináptico²⁰. Essa família possui 12 domínios transmembranas preditos²¹ e essa informação foi validada pelo Protter, sendo possível visualizar os domínios transmembranas citoplasmáticos e não citoplasmáticos.

Além da SERT, outros simportadores clinicamente relevantes são da dopamina, noradrenalina, ácido γ -aminobutírico e glicina, e também são alvos de uma ampla gama de compostos psicotrópicos, incluindo antidepressivos^{6,22}. Estas proteínas transportadoras de alta afinidade são encontradas na membrana plasmática e são responsáveis pela remoção de neurotransmissores do espaço extracelular, encerrando assim suas ações²³.

Os ISRS pertencem a uma classe de antidepressivos amplamente prescritos para o tratamento de transtornos psiquiátricos. Seu mecanismo de ação consiste em aumentar os níveis de 5-HT na fenda sináptica, bloqueando a SERT²⁴. Como exemplo de ISRS temos fluoxetina, citalopram e paroxetina, além de drogas sintéticas como a cocaína²⁵. As alterações no gene e proteína causam tolerância aos ISRSs e uma maneira de amenizar este problema é a utilização de medicamentos que agem em diferentes transportadores, como os ISRSN (venlafaxina)⁷.

Na sinapse serotoninérgica, a SERT é responsável por controlar o tempo de permanência da 5-HT na fenda sináptica, por meio do *feedback* negativo, além de realizar a reciclagem desse neurotransmissor por meio da sua recaptção²⁶.

Alterações pós-traducionais podem alterar a função e a expressão da SERT. De acordo com os resultados obtidos, diversos sítios de fosforilação foram preditos e uma das enzimas relacionadas é a PKC, sendo que as funções de transporte e expressão na superfície da membrana da SERT, são reduzidas quando fosforiladas pela PKC²⁷. Outros sítios de

fosforilação são apontados pelo NetPhos, sendo alvos de outras proteínas quinases e com escores acima dos indicados para PKC e CKII. Entretanto, esses sítios não foram descritos aqui, porque o NetPhos foi utilizado neste trabalho apenas como ferramenta de validação dos alvos já levantados pelo ScanProsite. Quanto aos sítios de glicosilação, apesar do NetNGlyc indicar a existência de outros dois possíveis aminoácidos alvos de *N*-glicosilação com alto escore, apenas Asn208 e Asn217 estão localizados em uma posição de sequência favorável com Asn-XAA-Ser/Thr.

A *N*-glicosilação e *O*-glicosilação é outro tipo de modificação pós-traducional possível e identificada em dois sítios na sequência primária da SERT. Os dois tipos principais da glicosilação têm papéis importantes na manutenção da conformação e atividade das proteínas²⁸ e em muitos processos biológicos importantes, como adesão celular, ligação célula-célula e célula-interações de matriz, tráfego molecular, ativação de receptores, efeitos de solubilidade de proteínas, dobramento de proteínas e sinal transdução, degradação de proteínas e tráfego e secreção intracelular de proteínas²⁹⁻³⁰. Além disso, o defeito neste processo tem um efeito significativo sobre o desenvolvimento de várias doenças³⁰.

Alterações genéticas também estão relacionadas com a expressão e funcionalidade da SERT. O polimorfismo 5-HTTLPR está associado à região promotora do gene *SLC6A4*, possui inserção/deleção de 44 pb e influência na expressão da SERT, aumentando a resposta da amígdala aos estímulos emocionais, predispondo ao desenvolvimento de ansiedade e transtornos do humor. Esse polimorfismo vem sendo alvo de estudos genéticos pois está fortemente associado a transtornos psiquiátricos³¹, como esquizofrenia, ansiedade, autismo, depressão, suicídio e transtorno obsessivo compulsivo³².

Este polimorfismo resulta na produção de dois alelos, o alelo longo (L), associado a elevados níveis transcricionais e traducionais da SERT, além do aumento na taxa de recaptação da 5-HT; e o alelo curto (S) relacionado a baixos níveis transcricionais, relacionado a uma baixa resposta aos antidepressivos da classe dos ISRS³³.

Além de alterações na região promotora, resultando nos alelos L e S, já foi relatada a existência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). O rs25531 (A>G) associado ao alelo L, origina os alelos La e Lg. O primeiro (La), quando comparado ao Lg e também ao S, está relacionado a maiores expressões de SERT (tanto em RNAm quanto de proteína). Os estudos sobre os polimorfismos e a utilização dos ISRSs ainda não são claros devido aos transtornos estudados, etnia, critério de inclusão e exclusão, entre outras variantes³⁴. O rs25532 (C>T) também está associado com a diminuição na expressão da SERT³². Este polimorfismo foi descrito como um modulador de expressão gênica e atua em conjunto com o

5-HTTLPR e rs25531, porém ainda não existem estudos mostrando a tolerabilidade aos ISRS³⁴.

Alterações na funcionalidade da SERT podem causar prejuízos ao indivíduo. A 5-HT está presente no SNC e controla processos fisiológicos como apetite, termorregulação, comportamento sexual, motilidade intestinal, sono/vigília, memória, aprendizagem, humor além de atuar no controle do sistema nervoso simpático e parassimpático. Os neurônios serotoninérgicos estão presentes no núcleo dorsal da rafe, medula espinhal, hipocampo e córtex³⁵.

A estrutura e a função das proteínas está intimamente relacionada à composição dos aminoácidos e sua forma estrutural. Assim, possíveis modificações (sejam mutações ou oriundas de variantes alélicas) podem alterar sua estrutura e consequentemente sua função³⁶. Diante desta perspectiva e utilizando o SIFT (do inglês, *Sorting Intolerant From Tolerant*), foram avaliadas as possíveis alterações dos aminoácidos na composição da SERT. Substituições com escore de 0 até 0,05 são consideradas deletérias e acima de 0,05 até 1 são consideradas tolerantes. A partir da sequência primária foram analisadas todas as possibilidades de substituições dos 630 aminoácidos em cada posição e foi possível observar que a maioria das alterações são deletérias (Anexo 1).

5 CONCLUSÃO

A SERT é uma proteína expressa pelo gene *SLC6A4*, essencial para que a 5-HT possa desempenhar o seu papel fisiológico no SNC. Alterações na região promotora (5-HTTLPR), além de SNPs (rs25531 e rs25532) em regiões codificantes e alterações pós-traducionais, como fosforilação e glicosilação, podem alterar a funcionalidade da SERT.

Existem vários antidepressivos que podem ser usados no tratamento do TAG, porém as alterações na SERT podem contribuir para que o indivíduo não apresente resposta adequada à medicação. Estudar de forma aprofundada esse possível biomarcador pode ajudar na precisão do diagnóstico e na eficácia do tratamento do TAG, além de outros transtornos psiquiátricos.

REFERÊNCIAS

1. Showraki M, Showraki T, Brown K. Generalized Anxiety Disorder: Revisited. *Psychiatr Q* 2020;91(3):905-14. <https://doi.org/10.1007/s1126-020-09747-0>
2. Giacobbe P, Flint A. Diagnosis and Management of Anxiety Disorders. *Behavioral Neurology and Psychiatry* 2018;24(3):893-919. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000607>
3. Beesdo K, Knappe S, Pine DS. Anxiety and Anxiety Disorders in Children and Adolescents: Developmental Issues and Implications for DSM-V. *Psychiatr Clin North Am* 2011;32(3):483-524. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.06.002>
4. World Health Organization – WHO. Mental Health and COVID-19: Early evidence of the pandemic's impact: Scientific brief (endereço na internet). (Acessado em: 25/10/2023). Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Sci_Brief_Mental_health-2022.1
5. Maron E, Nutt D. Biological markers of generalized anxiety disorder. *Dialogues Clin Neurosci* 2017;19(2):147-58. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/dnutt>
6. Rudnick G, Sandtner W. Serotonin transport in the 21st century. *J Gen Physiol* 2019; 151(4):1248-64. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812066>
7. Ahn H, Park K, Kim D, Chi SG, Choi KH, Han SJ, *et al.* Implications for Combination Therapy of Selective Monoamine Reuptake Inhibitors on Dopamine Transporters. *Biomedicines* 2023;11(10). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102846>
8. Pourhamzeh M, Moravej FG, Arabi M, Shahriari E, Mehrabi S, Ward R. The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. *Cell Mol Neurobiol* 2022;42(6):1671-1692. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01064-9>
9. Koskinen MK, Hovatta I. Genetic insights into the neurobiology of anxiety. *Trends Neurosci* 2023;46(4):318-331. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.01.007>
10. NCBI, National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
11. HPA, The Human Protein Atlas. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/>
12. UniProt, Universal Protein. Disponível em: <https://www.uniprot.org/>
13. ProtParam, ExPASy. Disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>
14. Swiss-Model, SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/>
15. PSORT, Protein Subcellular Localization Prediction Tool. Disponível em: <https://psort.hgc.jp/>
16. Protter, Interactive Protein Feature Visualization and Integration With Experimental Proteomic Data. Disponível em: <https://wlab.ethz.ch/protter/start/>
17. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg/>
18. Chou PY, Fasman GD. Structural and Functional Role of Leucine Residues in Proteins. *J Mol Biol* 1973;74(3):263-81. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90372-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90372-0)
19. Zhang Y, Liu Y, Liu Y, Zuo P, Miao S, Hu B, *et al.* α -Helix-Mediated Protein Adhesion. *J Am Chem Soc* 2023;145(31):17125-35. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c03581>
20. Navrtina V, Gouaux E. Insights into the mechanism and pharmacology of neurotransmitter sodium symporters. *Curr Opin Struct Biol* 2019; 54:161-170. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812066>
21. Ravna AW, Sylte I, Dahl SG. Molecular mechanism of citalopram and cocaine interactions with neurotransmitter transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307(1):34-41. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.054593>

22. Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, *et al.* SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. *Pharmacol Rev* 2011;63(3):585-640. <https://doi.org/10.1124/pr.108.000869>
23. Attwell D, Bouvier M. Cloners quick on the uptake. *Curr Biol* 1992; 2(10):541-3. [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(92\)90024-5](https://doi.org/10.1016/0960-9822(92)90024-5).
24. Kroeze Y, Zhou H, Homberg JR. The genetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 2012;136(3):375-400. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.015>
25. Singh I, Seth A, Billesbølle CB, Braz J, Rodriguiz RM, Roy K, *et al.* Structure-based discovery of conformationally selective inhibitors of the serotonin transporter. *Cell* 2023;186(10):2160-75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.04.010>
26. Ramamoorthy S, Samuvel DJ, Buck ER, Rudnick G, Jayanthu LD. Phosphorylation of threonine residue 276 is required for acute regulation of serotonin transporter by cyclic GMP. *J Biol Chem* 2007;282(16):11639-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611353200>
27. Ito T, Hiramatsu Y, Mouri A, Yoshigai T, Takahashi A, Yoshimi A, *et al.* Involvement of PKC β I-SERT activity in stress vulnerability of mice exposed to twice-swim stress. *Neurosci Res* 2021;171:83-91. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2021.01.002>
28. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993;3(2):97-130. <https://doi.org/10.1093/glycob/3.2.97>
29. Haltiwanger RS, Lowe JB. Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 2004;73:491-537. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074043>
30. Karve TM, Cheema AK. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids* 2011;2011:207691. <https://doi.org/10.4061/2011/207691>
31. Porcelli S, Fabbri C, Serretti A. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with antidepressant efficacy. *Eur Neuropsychopharmacol* 2012;22(4):239-58. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.10.003>
32. Botton MR, Yang Y, Scott ER, Desnick RJ, Scott SA. Phased Haplotype Resolution of the *SLC6A4* Promoter Using Long-Read Single Molecule Real-Time (SMRT) Sequencing. *Genes (Basel)* 2020;11(11). <https://doi.org/10.3390/genes11111333>
33. Minelli A, Bonvicini C, Scassellati C, Sartori R, Gennarelli M. The influence of psychiatric screening in healthy populations selection: a new study and meta-analysis of functional 5-HTTLPR and rs25531 polymorphisms and anxiety-related personality traits. *BMC Psychiatry* 2011;11(50). <https://doi.org/10.1186/1471-244X-11-50>
34. Zhu J, Klein-Fedyshin M, Stevenson JM. Serotonin Transporter Gene Polymorphisms and Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Tolerability: Review of Pharmacogenetic Evidence. *Pharmacotherapy* 2017; 37(9):1089-1104. <https://doi.org/10.1002/phar.1978>
35. David DJ, Gardier AM. Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique: application à la réponse antidépressive. *L'Encéphale* 2016;42(3):255-63. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2016.03.012>
36. Contessoto VG, Oliveira Junior AB, Chahine J, Oliveira RJ, Leite VBP. Introdução ao problema de enovelamento de proteínas: uma abordagem utilizando modelos computacionais simplificados. *Rev Bras Ensino Fís* 2018;40(4). <https://doi.org/10.1590/1806-9126-RBEF-2018-0068>

APÊNDICE – Informações obtidas pelo SIFT sobre a estabilidade da proteína SERT caso ocorra substituição dos aminoácidos na estrutura da proteína.

Probabilities

Each row corresponds to a position in the reference protein. Below each position is the fraction of sequences that contain one of the bas:
Each column corresponds to one of the twenty amino acids.
Each entry contains the score at a particular position (row) for an amino acid substitution (column). Substitutions predicted to be into:

pos	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
1M 0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2E 0.03	0.07	0.00	0.00	0.14	0.00	0.01	0.04	0.02	0.01	0.57	0.03	0.01	0.04	0.04	0.09	0.08	0.05	0.04	0.02	0.00
3T 0.03	0.36	0.04	0.47	0.00	0.04	0.17	0.07	0.09	0.31	0.12	0.05	0.22	0.17	0.27	0.16	0.46	0.83	0.16	0.02	0.05
4T 0.03	0.17	0.03	0.10	0.10	0.02	0.07	0.03	0.05	0.12	0.06	0.03	0.13	0.08	0.56	0.07	0.01	0.00	0.08	0.01	0.02
5P 0.03	0.79	0.10	0.14	0.21	0.23	0.37	0.07	0.43	0.25	0.10	0.30	0.13	0.32	0.16	0.19	0.42	0.34	0.51	0.04	0.10
6L 0.03	0.02	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.08	0.01	0.00	0.51	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.05	0.01	0.01
7N 0.03	0.35	0.07	0.21	0.18	0.08	0.16	0.08	0.15	0.24	0.20	0.08	0.29	0.16	0.16	0.16	0.78	0.00	0.24	0.03	0.09
8S 0.03	0.08	0.01	0.16	0.06	0.01	0.13	0.04	0.01	0.06	0.02	0.01	0.70	0.04	0.04	0.04	0.01	0.00	0.15	0.02	0.01
9Q 0.03	0.04	0.00	0.03	0.07	0.01	0.03	0.03	0.01	0.63	0.03	0.01	0.04	0.03	0.01	0.00	0.15	0.03	0.04	0.02	0.00
10K 0.03	0.08	0.00	0.13	0.77	0.01	0.04	0.04	0.03	0.02	0.00	0.03	0.01	0.05	0.05	0.10	0.12	0.06	0.05	0.03	0.00
11Q 0.04	0.79	0.17	0.86	0.62	0.50	0.85	0.54	0.31	0.79	0.54	0.19	0.00	0.35	0.51	0.65	0.79	0.52	0.43	0.15	0.76
12L 0.04	0.75	0.13	0.23	0.32	0.40	0.41	0.24	0.87	0.34	0.00	0.26	0.26	0.24	0.26	0.28	0.54	0.44	0.87	0.09	0.42
13S 0.04	0.28	0.05	0.71	0.23	0.04	0.82	0.15	0.03	0.23	0.05	0.02	0.00	0.15	0.15	0.12	0.93	0.24	0.05	0.02	0.01
14A 0.04	0.45	0.02	0.61	0.00	0.03	0.19	0.07	0.07	0.39	0.12	0.04	0.23	0.16	0.32	0.19	0.38	0.24	0.11	0.01	0.04
15C 0.04	1.00	0.43	0.33	0.28	0.13	0.63	0.13	0.24	0.42	0.38	0.12	0.36	0.31	0.35	0.34	0.65	0.48	0.46	0.05	0.13
16E 0.05	0.22	0.01	0.29	0.00	0.02	0.12	0.06	0.05	0.59	0.09	0.03	0.47	0.10	0.58	0.22	0.20	0.16	0.08	0.01	0.02
17D 0.05	0.35	0.01	0.57	0.00	0.02	0.12	0.06	0.05	0.54	0.09	0.03	0.15	0.13	0.28	0.14	0.21	0.17	0.08	0.01	0.02
18G 0.05	0.72	0.07	0.48	0.81	0.20	0.42	0.19	0.18	0.00	0.31	0.11	0.10	0.28	0.53	0.71	0.59	0.45	0.28	0.04	0.16
19E 0.05	0.42	0.03	0.53	0.00	0.03	0.29	0.07	0.04	0.25	0.07	0.03	0.21	0.22	0.25	0.10	0.26	0.15	0.08	0.01	0.04
20D 0.05	0.04	0.01	0.00	0.58	0.00	0.03	0.01	0.01	0.05	0.01	0.00	0.05	0.03	0.05	0.02	0.30	0.03	0.01	0.00	0.01
21C 0.05	0.57	1.00	0.13	0.09	0.14	0.31	0.06	0.09	0.12	0.14	0.05	0.16	0.17	0.09	0.09	0.94	0.48	0.17	0.31	0.15
22Q 0.05	0.06	0.01	0.03	0.10	0.01	0.05	0.34	0.02	0.00	0.06	0.02	0.06	0.04	0.91	0.30	0.05	0.06	0.03	0.01	0.03
23E 0.05	0.06	0.00	0.00	0.11	0.00	0.01	0.03	0.01	0.01	0.05	0.02	0.01	0.03	0.03	0.06	0.02	0.05	0.21	0.02	0.00
24N 0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
25G 0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pos	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
26V 0.04	0.55	0.11	0.09	0.18	0.17	0.11	0.10	0.10	0.59	0.25	0.63	0.17	0.11	0.15	0.16	0.19	0.19	0.37	0.00	0.14
27L 0.04	0.05	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	0.10	0.02	0.00	0.05	0.01	0.02	0.01	0.01	0.03	0.24	0.09	0.01	0.01
28Q 0.04	0.91	0.12	0.96	0.97	0.22	0.75	0.32	0.25	0.00	0.41	0.14	0.97	0.37	0.62	0.64	0.95	0.67	0.37	0.07	0.32
29K 0.05	0.21	0.03	0.00	0.39	0.02	0.29	0.09	0.04	0.76	0.06	0.02	0.44	0.11	0.18	0.13	0.50	0.19	0.06	0.01	0.05
30V 0.05	1.00	0.18	0.47	0.41	0.44	0.69	0.39	0.29	0.45	0.49	0.17	0.56	0.33	0.34	0.38	0.82	0.59	0.44	0.12	0.63
31V 0.05	1.00	0.19	0.38	0.41	0.51	0.66	0.43	0.32	0.48	0.55	0.19	0.46	0.33	0.35	0.43	0.70	0.47	0.47	0.14	0.72
32P 0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
33T 0.13	0.34	0.03	0.63	0.77	0.03	0.49	0.09	0.07	0.38	0.12	0.04	0.40	0.15	0.26	0.20	0.00	0.52	0.11	0.01	0.04
34P 0.13	0.36	0.02	0.46	0.00	0.03	0.36	0.09	0.08	0.86	0.14	0.05	0.24	0.80	0.59	0.38	0.30	0.25	0.13	0.02	0.04
35G 0.13	0.27	0.04	0.78	0.23	0.03	0.67	0.14	0.02	0.22	0.04	0.02	0.00	0.12	0.15	0.11	0.43	0.17	0.04	0.01	0.02
36D 0.13	0.13	0.14	0.00	0.19	0.30	0.39	0.12	0.02	0.17	0.03	0.01	0.98	0.09	0.30	0.09	0.31	0.13	0.03	0.01	0.06
37K 0.14	0.02	0.00	0.04	0.46	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	0.03	0.04	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00
38V 0.14	0.74	0.07	0.71	0.00	0.11	0.36	0.15	0.32	0.83	0.40	0.12	0.45	0.27	0.55	0.48	0.72	0.57	0.48	0.03	0.12
39E 0.15	0.24	0.03	0.91	0.00	0.03	0.50	0.11	0.04	0.39	0.07	0.03	0.64	0.14	0.24	0.14	0.33	0.18	0.06	0.01	0.05
40S 0.21	0.24	0.01	0.03	0.02	0.01	0.02	0.01	0.12	0.03	0.02	0.01	0.05	0.03	0.11	0.02	0.00	0.60	0.04	0.00	0.01
41G 0.21	0.45	0.01	0.42	0.09	0.01	0.00	0.05	0.01	0.25	0.02	0.01	0.89	0.04	0.05	0.04	0.13	0.06	0.01	0.01	0.02
42Q 0.21	0.15	0.01	0.11	0.00	0.01	0.30	0.20	0.02	0.21	0.04	0.02	0.17	0.09	0.53	0.10	0.13	0.09	0.04	0.01	0.03
43T 0.17	0.23	0.10	0.09	0.06	0.12	0.05	0.06	0.98	0.07	0.39	0.16	0.10	0.06	0.05	0.06	0.08	0.18	0.00	0.02	0.12
44S 0.22	0.44	0.02	0.65	0.40	0.02	0.12	0.04	0.06	0.42	0.10	0.03	0.16	0.09	0.28	0.17	0.00	0.31	0.09	0.01	0.01
45N 0.24	0.30	0.03	0.69	0.49	0.03	0.49	0.11	0.07	0.54	0.11	0.04	0.00	0.23	0.25	0.21	0.53	0.25	0.10	0.01	0.11
46G 0.18	0.03	0.00	0.23	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.06	0.01	0.01	0.13	0.09	0.00	0.00	0.01
47Y 0.18	0.81	0.09	0.64	0.00	0.20	0.43	0.23	0.26	0.92	0.42	0.15	0.54	0.30	0.61	0.56	0.78	0.63	0.37	0.06	0.27
48S 0.27	0.48	0.10	0.29	0.41	0.32	0.25	0.24	0.22	0.46	0.46	0.12	0.47	0.20	0.34	0.45	0.00	0.97	0.30	0.08	0.38
49A 0.27	0.95	0.09	0.49	0.78	0.08	0.54	0.27	0.17	0.00	0.27	0.09	0.40	0.22	0.56	0.42	0.74	0.64	0.34	0.02	0.09
50V 0.27	0.36	0.06	0.24	0.42	0.14	0.18	0.26	0.15	0.35	0.25	0.08	0.23	0.14	0.32	0.23	0.57	0.00	0.49	0.04	0.19
pos	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
51P 0.28	0.29	0.04	0.09	0.14	0.08	0.37	0.07	0.14	0.20	0.19	0.05	0.11	0.00	0.23	0.16	0.26	0.31	0.12	0.02	0.10
52S 0.31	0.78	0.02	0.15	0.08	0.01	0.05	0.02	0.03	0.30	0.04	0.02	0.08	0.18	0.06	0.05	0.98	0.00	0.05	0.01	0.01
53P 0.31	0.17	0.00	0.06	0.26	0.00	0.00	0.03	0.01	0.10	0.55	0.02	0.01	0.09	0.05	0.04	0.24	0.04	0.02	0.00	0.00
54G 0.22	0.38	0.04	0.36	0.31	0.10	0.00	0.40	0.09	0.29	0.16	0.05	0.45	0.17	0.20	0.22	0.28	0.21	0.18	0.03	0.14
55A 0.28	1.00	0.08	0.30	0.33	0.04	0.47	0.05	0.08	0.31	0.15	0.06	0.19	0.30	0.20	0.18	0.60	0.36	0.24	0.02	0.04
56G 0.28	0.79	0.23	0.63	0.91	0.04	1.00	0.11	0.14	0.69	0.22	0.08	0.97	0.22	0.44						


```

433T 1.000.14 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.210.050.000.000.000.021.000.010.000.00
434L 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
435G 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
436L 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
437D 1.000.00 0.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
438S 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
439T 1.000.47 0.010.010.010.000.012.000.000.001.010.000.010.010.000.000.701.000.010.000.00
440F 1.000.00 0.000.000.000.001.000.000.000.000.010.000.030.570.000.000.000.000.000.000.010.010.05
441A 1.000.13 0.000.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
442G 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
443L 1.000.02 0.010.000.010.030.010.000.060.011.000.430.010.010.010.010.010.290.070.040.000.00
444E 1.000.00 0.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
445G 1.001.00 0.070.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
446V 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
447I 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
448T 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
449A 1.001.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
450V 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
pos A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y
451L 1.000.43 0.090.020.070.090.010.020.540.070.520.140.030.090.05 0.040.070.301.000.010.02
452D 1.000.00 0.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
453E 1.000.04 0.000.0171.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
454F 1.000.08 0.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
455P 0.630.03 0.000.000.010.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
456H 0.990.76 0.050.560.710.180.290.370.211.000.260.090.360.250.850.780.630.430.240.030.11
457V 1.000.19 0.050.010.020.030.010.100.520.020.620.020.010.020.020.070.130.101.000.010.03
458W 0.710.02 0.010.000.000.000.050.080.000.400.011.000.060.000.010.010.010.010.010.060.140.01
459A 1.000.69 0.120.240.380.430.780.650.281.000.470.160.300.190.350.740.610.420.400.120.69
460K 1.000.01 0.030.000.020.000.080.090.000.260.010.000.030.030.071.000.010.030.010.000.01
461R 1.000.03 0.000.020.040.010.030.810.010.240.030.010.340.020.071.000.030.030.020.000.06
462R 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
463E 1.000.00 0.000.011.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
464R 1.000.09 0.010.010.020.090.020.110.150.041.000.030.020.010.030.060.030.020.170.070.06
465F 1.000.00 0.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
466V 1.000.03 0.010.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
467L 1.000.79 0.110.030.040.210.320.010.100.051.000.070.030.110.040.040.220.080.110.010.03
468A 1.000.50 0.170.180.240.680.330.460.770.261.000.280.270.190.260.310.360.360.800.160.86
469V 1.000.00 0.000.000.000.000.010.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
470V 1.000.08 0.010.000.010.360.000.000.230.010.490.070.010.010.010.010.050.211.000.000.01
471I 1.000.63 0.390.210.270.920.390.540.690.290.980.240.310.210.290.350.570.460.730.191.00
472T 1.000.58 0.170.200.260.790.400.520.410.280.760.210.290.200.280.330.430.390.620.201.00
473C 1.000.25 0.460.070.100.090.080.070.370.080.120.050.130.090.070.070.561.000.160.030.38
474F 1.000.00 0.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
475F 1.000.02 0.120.000.000.100.000.000.340.001.000.010.000.000.000.000.000.040.070.330.000.00
pos A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y
476G 1.000.06 0.020.010.020.120.030.011.000.030.670.130.020.020.020.020.020.060.900.010.04
477S 1.001.00 0.000.000.000.000.000.400.000.000.000.000.000.000.000.010.000.000.580.010.010.000.00
478L 1.000.00 0.050.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
479V 1.000.47 0.090.030.080.090.020.040.470.080.330.100.040.120.060.050.100.341.000.010.05
480T 1.000.08 0.420.030.020.010.020.010.020.030.020.040.250.040.030.020.601.000.040.010.01
481L 1.000.08 0.510.010.010.020.000.000.580.010.600.400.010.020.010.010.010.491.000.000.01
482T 1.000.01 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.041.000.000.000.00
483F 1.000.55 0.180.220.360.690.370.580.400.750.690.230.380.250.450.730.440.450.520.191.00
484G 1.000.00 0.000.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
485G 1.000.00 0.000.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
486A 1.000.56 0.040.050.060.590.140.121.000.070.180.230.070.090.060.080.090.090.790.040.36
487Y 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
488V 1.000.01 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
489V 1.000.02 0.010.000.010.690.010.000.340.010.520.050.010.010.010.010.010.021.000.010.01
490K 1.000.23 0.050.810.310.040.550.290.040.400.070.031.000.160.240.180.580.570.060.020.09
491L 1.000.00 0.000.000.000.000.180.000.000.050.001.000.130.000.000.000.000.000.000.000.000.00
492L 1.000.00 0.000.000.000.000.130.000.000.010.001.000.070.000.000.000.000.000.000.000.000.00
493E 1.000.00 0.001.000.260.000.010.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
494E 1.000.33 0.040.230.550.070.170.170.131.000.220.070.220.170.430.810.270.310.220.030.11
495Y 1.000.00 0.000.000.000.000.640.000.090.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
496A 1.001.00 0.000.000.000.000.000.480.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
497T 1.001.00 0.010.000.010.000.020.000.020.010.020.010.000.270.010.000.030.180.130.000.00
498G 1.000.01 0.000.010.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
499P 1.000.54 0.150.180.210.430.230.330.400.240.550.180.300.220.230.240.751.000.580.120.60
500A 1.000.47 0.000.000.000.000.010.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
pos A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y
501V 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
502L 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
503T 1.000.24 0.150.010.031.000.010.020.290.030.190.040.020.030.020.020.030.290.530.040.04
504V 1.000.89 0.020.020.020.030.450.000.530.020.210.030.020.050.010.020.250.051.000.010.02
505A 1.000.14 0.000.000.000.000.000.070.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
506L 1.000.01 0.000.000.000.001.000.000.000.020.000.900.010.000.000.000.000.000.000.000.000.00
507I 1.000.26 0.140.020.040.620.020.020.920.040.990.370.030.050.040.030.090.141.000.020.04
508E 1.000.00 0.000.011.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.030.000.000.000.00
509A 1.001.00 0.060.000.000.000.010.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
510V 1.000.36 0.010.000.010.000.000.001.000.010.030.010.000.010.000.000.000.000.000.000.000.00
511A 1.001.00 0.010.000.010.000.960.000.060.010.010.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
512V 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
513S 1.000.83 0.220.040.050.200.320.010.030.060.060.030.040.140.040.041.000.120.100.010.02
514W 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
515F 1.000.00 0.000.000.000.001.000.000.000.330.000.110.010.000.000.000.000.000.000.000.000.00
516Y 1.000.00 0.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
517G 1.000.00 0.000.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
518I 1.000.02 0.000.000.000.000.010.000.000.300.070.190.100.000.000.000.000.000.000.000.000.00
519T 1.000.13 0.011.000.430.010.200.020.030.580.050.020.300.050.210.180.130.400.050.030.01
520Q 1.000.01 0.000.000.010.000.000.000.000.060.010.000.100.050.331.000.000.000.000.000.000.00
521F 0.990.00 0.000.000.001.000.000.000.000.000.000.040.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00

```

```

522C 0.990.330.400.030.030.010.160.010.020.060.030.010.030.070.020.021.000.090.050.000.01
523R 0.990.470.121.000.800.020.270.130.070.430.110.040.990.100.290.350.520.220.110.010.01
524D 0.990.000.001.000.040.000.000.000.000.000.000.000.040.000.000.000.000.000.000.000.00
525V 0.990.050.000.000.000.000.000.000.000.000.000.010.060.000.000.000.000.000.000.000.00
pos A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y
526K 0.990.090.000.011.000.010.020.020.010.770.030.010.120.020.980.630.030.030.020.000.06
527E 0.990.160.010.500.700.010.080.030.040.240.140.140.100.061.000.140.230.210.090.000.01
528M 0.990.000.000.000.000.000.000.000.030.000.011.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
529L 0.990.010.000.000.000.010.000.000.370.001.000.270.000.000.000.000.000.220.020.000.00
530G 0.990.000.000.000.000.001.000.020.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
531F 0.990.270.080.100.131.000.160.310.180.220.310.100.150.100.300.200.290.260.240.090.49
532S 0.990.390.010.100.180.020.110.040.041.000.070.030.100.280.170.870.240.240.060.010.05
533P 0.990.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.00
534G 0.990.050.000.010.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.090.000.000.000.170.000.000.000.00
535W 0.990.020.010.000.010.050.010.010.340.021.000.090.010.070.010.120.010.010.070.120.01
536F 0.990.000.000.000.000.0730.000.000.000.000.010.000.000.060.000.000.000.000.000.0051.00
537W 0.990.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.000.00
538R 1.000.000.000.000.050.000.000.000.000.000.040.000.000.000.000.181.000.000.000.020.000.00
539I 1.000.050.000.000.000.070.000.001.000.000.940.070.000.000.000.000.000.150.960.000.000.00
540C 1.000.011.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.040.000.000.040.040.000.000.00
541W 1.000.040.000.000.000.000.010.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.000.00
542V 1.000.350.030.100.180.020.080.040.161.000.110.040.110.100.130.370.240.470.360.010.02
543A 1.000.260.000.000.001.000.010.010.020.000.210.010.000.000.000.000.070.010.020.030.65
544I 1.000.030.000.000.000.000.000.000.1.000.000.010.000.000.000.000.000.000.070.930.000.000.00
545S 1.000.260.140.010.050.000.020.000.000.010.000.000.010.010.000.001.000.070.010.000.000.00
546P 1.000.040.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.00
547L 1.000.610.500.020.040.050.010.021.000.040.480.060.020.050.030.030.070.400.910.010.12
548F 1.000.000.000.000.001.000.000.000.040.000.050.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
549L 1.000.000.000.000.000.000.000.000.080.001.000.000.000.000.000.000.000.000.040.000.000.000.00
550L 1.000.110.000.000.000.060.000.000.070.001.000.060.000.000.000.000.000.000.000.040.000.000.00
pos A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y
551F 1.000.180.110.060.081.000.270.160.160.080.190.060.090.060.090.100.150.250.230.050.38
552I 1.000.010.020.000.000.000.000.000.1.000.000.110.000.030.000.000.000.000.060.660.000.000.00
553I 1.000.010.000.000.000.420.010.000.940.010.210.040.000.000.000.000.010.441.000.000.000.01
554C 1.000.080.100.000.000.000.000.000.530.000.050.000.000.000.000.000.000.011.000.000.000.00
555S 1.000.510.180.200.270.710.330.530.400.290.660.220.310.200.290.340.410.400.510.191.00
556F 1.000.120.030.040.031.000.210.030.100.020.240.050.040.040.020.020.380.060.110.200.85
557L 1.000.010.000.000.100.010.020.000.800.001.000.010.000.000.000.000.000.040.230.000.000.00
558M 1.000.250.020.020.030.140.040.060.660.061.000.350.040.030.030.040.140.210.790.020.16
559S 1.000.490.090.400.420.401.000.250.200.480.330.110.830.170.470.290.590.720.270.070.57
560P 1.000.470.160.310.390.500.60.410.300.340.620.180.360.250.290.330.520.410.410.141.00
561P 1.000.340.020.241.000.020.160.050.070.860.180.040.190.820.440.260.320.220.230.010.02
562Q 1.000.250.010.160.790.010.090.310.040.230.070.020.111.000.330.120.360.180.090.000.01
563L 1.000.020.000.000.000.040.000.000.070.001.000.340.000.100.010.000.000.010.250.000.027
564R 1.000.750.050.621.000.050.390.120.190.930.330.100.490.270.590.530.730.600.290.020.04
565L 0.790.700.160.310.390.500.60.410.300.340.620.180.360.250.290.330.520.410.410.141.00
566F 0.790.530.180.230.310.710.350.540.400.320.660.220.320.210.310.360.420.410.510.181.00
567Q 1.000.340.011.000.510.010.070.020.030.130.040.010.250.040.170.070.170.150.140.000.01
568Y 1.000.000.000.000.000.060.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.00
569N 1.000.520.160.250.450.640.330.510.520.380.640.220.380.210.310.380.420.520.710.171.00
570Y 1.000.000.000.000.000.410.000.000.000.000.010.000.000.070.000.000.000.000.000.000.011.00
571P 1.000.010.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.000.000.000.000.060.000.000.000.00
572Y 1.000.870.190.680.860.700.550.560.460.770.780.260.560.500.610.600.840.740.640.181.00
573W 1.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.000.00
574S 1.001.000.000.000.000.000.050.000.000.000.000.000.000.010.000.000.520.150.100.000.000.00
575I 1.000.090.030.030.030.120.040.041.000.040.420.080.060.020.030.040.050.090.970.020.10
pos A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y
576I 1.001.000.080.410.640.210.370.210.260.660.340.140.390.210.510.440.520.550.610.190.28
577L 1.000.120.010.000.010.010.000.000.080.011.000.060.000.010.000.000.010.060.970.000.000.00
578G 1.000.030.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.060.000.000.000.000.000.00
579Y 1.000.000.000.000.000.020.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.000.24
580C 1.001.000.690.050.070.150.790.060.800.080.650.180.060.110.060.070.240.130.780.030.13
581I 1.000.000.000.000.000.000.000.001.000.000.280.040.000.000.000.000.000.150.000.000.000.00
582G 1.001.000.010.000.000.000.330.000.000.010.010.000.000.010.000.000.090.400.150.000.000.00
583T 1.000.390.130.150.200.580.240.380.560.211.000.270.220.160.220.250.290.300.560.140.71
584S 1.000.000.000.000.000.000.000.000.030.000.000.000.000.000.000.001.000.040.000.000.000.00
585S 1.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.060.000.000.000.00
586F 1.000.030.010.000.010.420.010.000.530.010.501.000.010.150.010.010.010.020.940.010.01
587I 1.000.460.020.010.020.020.000.001.000.020.620.260.010.020.010.010.280.100.860.000.01
588C 1.000.080.340.010.020.290.020.030.300.031.000.490.020.030.040.030.050.050.190.080.07
589I 1.000.000.000.000.000.000.000.001.000.000.010.000.000.000.000.000.000.500.000.000.000.00
590P 1.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.00
591T 0.990.360.020.020.020.060.120.021.000.020.520.170.020.020.020.020.120.190.290.010.04
592Y 0.990.010.000.000.000.090.000.000.060.000.180.050.000.000.000.000.000.000.360.01.00
593I 0.991.000.060.040.050.040.330.010.340.060.130.250.040.140.040.040.310.110.330.010.02
594A 0.990.350.020.000.010.040.000.001.000.010.060.070.000.010.010.000.030.130.550.000.000.00
595Y 0.990.000.000.000.000.140.000.000.030.000.020.000.000.000.000.000.000.000.000.000.001.00
596R 0.990.000.020.000.010.000.000.050.021.000.000.000.000.000.040.090.030.000.000.000.000.00
597L 0.990.010.000.000.000.800.000.000.060.001.000.030.000.000.000.000.000.010.040.000.000.00
598I 0.990.170.540.010.020.420.010.010.820.021.000.200.010.050.020.020.020.080.580.010.02
599I 0.990.570.180.250.340.720.350.550.440.370.670.240.350.220.330.390.540.460.540.201.00
600T 0.980.400.050.020.040.090.010.020.370.040.500.060.030.050.030.030.321.000.550.010.02
pos A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y
601P 0.980.030.000.030.040.010.020.070.010.660.020.010.031.000.150.350.040.030.010.000.01
602G 0.980.000.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.000.00
603T 0.980.020.000.160.020.000.140.010.000.060.010.000.210.120.010.011.000.710.010.000.01
604F 0.970.040.330.010.010.830.010.010.190.011.000.120.010.020.020.010.030.030.110.080.13
605K 0.970.530.110.330.550.240.270.230.280.900.390.120.320.190.431.000.460.380.430.180.33
606E 0.970.010.000.091.000.000.000.000.000.010.000.000.050.000.930.000.030.000.000.000.000.00
607R 0.920.000.000.000.000.000.000.000.000.180.000.000.000.000.001.000.000.000.000.000.000.00
608I 0.890.000.000.000.000.110.000.000.250.001.000.040.000.000.000.000.000.000.140.040.00
609I 0.921.000.130.300.450.470.340.390.380.580.590.170.340.210.450.590.460.510.450.130.70

```

```

610K 0.920.470.180.200.270.660.300.500.390.310.610.210.280.190.300.320.370.370.480.171.00
611S 0.921.000.150.160.180.230.520.170.190.210.370.120.210.280.170.180.830.700.310.070.29
612I 0.920.010.000.000.000.260.000.001.000.000.200.030.000.000.000.000.320.030.040.02
613T 0.910.130.000.020.040.000.020.010.010.270.040.010.020.020.110.170.171.000.010.000.01
614P 0.910.000.000.000.000.000.010.000.000.000.000.000.001.000.000.030.000.000.000.000.00
615E 0.750.080.000.131.000.020.020.020.040.070.020.010.020.060.030.070.030.020.020.050.06
616T 0.690.790.050.701.000.070.370.140.210.990.300.100.570.270.590.540.770.650.300.020.04
617P 0.620.340.020.631.000.020.130.050.060.320.100.030.160.380.240.260.310.190.120.010.02
618T 0.610.640.170.380.460.590.440.730.390.840.640.220.570.350.510.840.871.000.510.170.87
619E 0.600.320.010.351.000.020.060.360.020.130.040.010.070.070.360.050.140.060.040.010.06
620I 0.510.010.000.000.000.020.000.000.460.000.340.060.000.000.040.000.010.011.000.000.19
621P 0.560.830.050.831.000.050.480.120.180.880.310.100.470.570.590.520.800.550.370.020.04
622C 0.540.780.070.631.000.100.390.160.210.930.340.120.510.280.600.540.740.590.310.030.11
623G 0.540.380.030.190.270.031.000.060.060.360.140.040.210.100.530.440.290.180.100.010.04
624D 0.530.020.001.000.630.000.080.010.000.030.010.000.080.010.250.010.240.020.010.000.01
625I 0.510.000.000.000.000.010.000.000.690.000.070.010.000.000.000.000.050.011.000.000.00
pos  A  C  D  E  F  G  H  I  K  L  M  N  P  Q  R  S  T  V  W  Y
626R 0.440.030.000.020.050.000.020.010.010.070.010.010.030.020.031.000.100.330.010.000.01
627L 0.090.010.000.000.000.020.000.000.130.001.000.270.000.000.000.000.000.010.030.000.00
628N 0.080.020.000.070.110.000.050.010.000.020.000.001.000.010.020.010.110.020.000.000.01
629A 0.071.000.010.010.010.000.130.000.000.010.010.000.010.020.010.010.120.020.010.000.00
630V 0.070.020.000.000.000.010.000.000.060.000.110.010.000.000.000.000.000.011.000.000.00

```