



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THIAGO HISSNAUER LEAL BALTUS

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS,
GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO
EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE PARKINSON EM
LONDRINA, PARANÁ**

THIAGO HISSNAUER LEAL BALTUS

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS,
GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO
EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE PARKINSON EM
LONDRINA, PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa.

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Baltus, Thiago Hissnauer Leal.

Avaliação de Biomarcadores Bioquímicos, Genéticos e de Estresse Oxidativo/Nitrosativo em Indivíduos com Doença de Parkinson em Londrina, Paraná / Thiago Hissnauer Leal Baltus. - Londrina, 2020.
70 f. : il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Doença de Parkinson - Tese. 2. Estresse oxidativo - Tese. 3. Polimorfismo Genético - Tese. I. Sabbatini Barbosa, Décio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

THIAGO HISSNAUER LEAL BALTUS

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS,
GENÉTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO/NITROSATIVO
EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA DE PARKINSON EM
LONDRINA, PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Suhaila Mahmoud Smaili Santos
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Francine Carla Cadoná
Universidade Franciscana – UFN

Londrina, 25 de setembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha família por todo o suporte ao longo dessa caminhada. Agradeço meus pais, Sônia e João Leo, minha irmã Isabella, meus tios Cláudia e Britto, meus primos Paulo, Flávia, e família, e primos Altina e Rodrigo, por me apoiarem das mais diversas formas. Agradeço especialmente à minha noiva, Nayara, que me acompanhou (literalmente) de perto durante todo o curso do doutorado, me ajudando, me ouvindo, me levantando e me ajudando a crescer.

Agradeço aos amigos que, de alguma forma, fizeram parte dessa história, estejam eles ainda presentes comigo ou no passado, guardados com carinho junto à boas lembranças. Agradeço especialmente ao Dr. Lúcio Baena, não somente pela colaboração com o desenvolvimento deste trabalho, mas também pela amizade, apoio, bom humor e respeito que foram muito importantes para mim.

Agradeço ao meu orientador, professor Décio Sabbatini Barbosa, por tudo o que fez por e para mim ao longo dessa jornada. Chefe, mestre, amigo, senhorio, guia e exemplo. Muito tenho a agradecer por toda a paciência, esforço, compreensão e talvez, um pouco mais de paciência para comigo. Sou muito grato por ter tido o privilégio de ter sido seu pupilo.

Agradeço à Dra. Ana Cristina Andreazza, que me permitiu trabalhar em seu laboratório por um ano, me dando a oportunidade de viver o maior desafio e aventura de minha vida, até agora. Agradeço muito pela confiança, pela amizade, por todo o aprendizado e aconselhamento que vieram com esta parceria, pois foi uma experiência transformadora. I also would like to thank everybody from Andreazza's Lab, for being great co-workers, and for taking such good care of Nayara and me. Erika, David, Abbie, Angela, Jine, Cassandra, Young, Winston, Joyce, Dana, Alencar and Francine: guys, thank you so much for this wonderful experience. It would not be the same without you.

Agradeço à professora Dra. Karen Brajão de Oliveira e os colaboradores de seu laboratório, por desenvolverem as técnicas e realizarem as análises dos polimorfismos, essenciais para que este trabalho pudesse ter um diferencial e acrescentar ao conhecimento sobre a Doença de Parkinson. Agradeço especialmente a professora Karen e ao discente Kleber Paiva Trugilo, por me proverem suporte com as análises estatísticas, sugestões e interpretações dos dados.

Agradeço à professora Dra. Suhaila Mahmoud Smaili e equipe, pelo suporte técnico científico e pela colaboração no recrutamento de voluntários que foram de grande apoio, sem o qual a conclusão desse trabalho não seria possível.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, de maneira especial ao professor Dr. Waldiceu A. Verri Jr., por seu grande caráter e competência na

posição de coordenador. Além disso, agradeço também à Secretaria da Pós em Ciências da Saúde, principalmente Sandra e Manu, por todo o suporte administrativo impecável, pela disposição constante aos discentes e docentes, e pela amizade ao longo desses anos. Sou muito grato por todo o auxílio e por todo o trabalho.

Agradeço à CAPES por financiar meu doutoramento através das bolsas de estudo no Brasil e no Canadá, financiamentos sem os quais eu não conseguiria concluir mais esta etapa.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a Deus pelo dom da vida e da perseverança, dons sem os quais eu não chegaria até aqui.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

Ralph Waldo Emerson

Baltus, Thiago Hissnauer Leal. **Avaliação de biomarcadores bioquímicos, genéticos e de estresse oxidativo/nitrosativo em indivíduos com doença de Parkinson em Londrina, Paraná.** 2020. 70 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente no mundo, e é causada por uma destruição progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância *nigra pars compacta* (SNpc). Isto compromete o equilíbrio e vias de outros neurotransmissores (como acetilcolina, noradrenalina e serotonina) e resulta no desenvolvimento de sintomas motores (bradicinesia, rigidez muscular, tremor em repouso e perda de estabilidade postural) e não-motores (distúrbios autonômicos, alterações do sono, depressão e demência). Nos neurônios também são observadas inclusões citoplasmáticas de agregados de α -sinucleína denominadas Corpúsculos de Lewy (CL) que, juntamente com os sintomas motores clássicos, determinam o diagnóstico patognomônico da DP. Alterações genéticas foram identificadas como responsáveis por cerca de 10% dos casos, relacionadas principalmente com a produção de α -sinucleína defeituosa, disfunções mitocondriais e falhas na execução de processos autofágicos. Entretanto, a causa da destruição neuronal para os demais casos ainda permanece desconhecida e indícios sugerem a ação de múltiplos fatores. O estresse oxidativo/nitrosativo (EO/EN) desempenha um papel singular no desenvolvimento da doença por estar envolvido na formação de CL, no dano mitocondrial e na neuroinflamação, resultando em dano crônico a importantes biomoléculas. Apesar do seu papel ser extensivamente estudado na DP, alterações genéticas de elementos que possam modular favoravelmente o EO/EN ainda não são completamente conhecidas. Considerando isso, foram selecionados polimorfismos genéticos que poderiam influenciar o equilíbrio redox e a inflamação para um quadro pró-oxidativo/nitrosativo. Assim, os objetivos deste trabalho foram identificar a distribuição dos genótipos dos polimorfismos -94 ATTG ins/del *NFKB1* (rs28362491); c.*126G>A *NFKBIA* (rs696); e c.47C>T *MnSOD* (rs4880) em indivíduos com DP e sujeitos livres de doença; avaliar os biomarcadores de EO/EN: hidroperóxidos lipídicos (LOOH), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), metabólitos do óxido nítrico (NOx), grupamentos sulfidríla (SH), atividade da paraoxonase-1 (PON-1), capacidade total antioxidante (TRAP), e os biomarcadores bioquímicos: colesterol total (CT), triglicérides (TG), e lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL, respectivamente) em todos os participantes; e avaliar possíveis associações entre os polimorfismos genéticos e os biomarcadores bioquímicos e de EO/EN. 110 indivíduos foram convidados a participarem do estudo, sendo 55 na composição do grupo caso e 55 para a composição do grupo controle. Todos os polimorfismos foram avaliados nos modelos genéticos codominante (AA x Aa x aa), dominante (AA x Aa + aa) e recessivo (aa x AA + Aa). A distribuição dos polimorfismos, nos três modelos genéticos foi semelhante entre os grupos. No grupo caso, o genótipo del/del do polimorfismo *NFKB1* foi associado a níveis elevados de LOOH no modelo dominante e níveis elevados de SH no modelo codominante. No polimorfismo *NFKBIA*, níveis elevados de NOx foram associados ao genótipo GA no modelo codominante, e à combinação genotípica AA + GA, no modelo recessivo. Não foi observada diferença na distribuição dos biomarcadores de EO/EN em

relação aos genótipos/modelos avaliados no polimorfismo *MnSOD*. Entre os grupos, níveis elevados de LOOH e reduzidos de NOx foram observados no grupo caso, reforçando o possível envolvimento do EO/EN na DP. Desta forma, é possível concluir que a identificação de alterações genéticas de elementos envolvidos na inflamação e EO/EN pode representar um potencial foco na elucidação da etiologia da doença.

Palavras-chave: doença de Parkinson; estresse oxidativo; polimorfismo genético; NF-kappa B; superóxido dismutase

Baltus, Thiago Hissnauer Leal. **Evaluation of biochemical, genetic and oxidative/nitrosative stress biomarkers in subjects with Parkinson's disease in Londrina, Paraná.** 2020. 70 p. Doctoral thesis (Graduation Program in Health Sciences) State University of Londrina.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the world's second most common neurodegenerative disease, and it is caused by the progressive destruction of dopaminergic neurons in the substance nigra pars compacta (SNpc). This compromises the balance and pathways of other neurotransmitters (such as acetylcholine, norepinephrine and serotonin) and results in the development of motor (bradykinesia, muscle stiffness, tremor at rest and loss of postural stability) and non-motor symptoms (autonomic disorders, sleep disturbances), depression and dementia). In neurons, cytoplasmic inclusions of α -synuclein aggregates called Lewy Bodies (LB) are also observed, which, along with classic motor symptoms, determine the pathognomonic diagnosis of PD. Genetic alterations were identified as responsible for around 10% of cases, mainly associated with production of defective α -synuclein, mitochondrial dysfunctions and failures in the execution of autophagic processes. However, the cause of neuronal destruction for the remaining cases is still unknown and evidence suggests the action of multiple factors. Oxidative/nitrosative stress (OS/NS) plays a unique role in the development of the disease as it is involved in the formation of CL, mitochondrial damage and neuroinflammation, resulting in chronic damage to important biomolecules. Despite its role being extensively studied in PD, genetic alterations of elements that can favorably modulate OS/NS are not yet fully understood. Considering this, genetic polymorphisms were selected that could influence redox balance and inflammation towards a pro-oxidative/nitrosative condition. Thus, the objectives of this work were to identify the distribution of the genotypes of the -94 ATG ins/del NFkB1 (rs28362491); c.*126G> NFkBIA (rs696); and c.47C> T MnSOD (rs4880) genetic polymorphisms in individuals with PD and subjects free of disease; evaluate OS/NS biomarkers: lipid hydroperoxides (LOOH), advanced protein oxidation products (AOPP), nitric oxide metabolites (NOx), sulfhydryl groups (SH), paraoxonase-1 (PON-1) activity, total capacity antioxidant (TRAP), and biochemical biomarkers: total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and high and low density lipoproteins (HDL and LDL, respectively) in all participants; and to evaluate possible associations among the genetic polymorphisms and the biochemical and OS/NS biomarkers. 110 individuals were invited to participate in the study, 55 in the composition of the case group and 55 in the composition of the control group. All polymorphisms were evaluated in the codominant (AA x Aa x aa), dominant (AA x Aa + aa) and recessive (aa x AA + Aa) genetic models. The distribution of polymorphisms in the three genetic models was similar between groups. In the case group, the del/del genotype of the NFkB1 polymorphism was associated with higher LOOH levels in the dominant model and higher SH levels in the codominant model. In the NFkBIA polymorphism, higher NOx levels were associated with the GA genotype in the codominant model, and with the genotypic combination AA + GA, in the recessive model. No differences were observed in the distribution of OS/NS biomarkers regarding the genotypes/models evaluated in the MnSOD polymorphism. Between groups, increased LOOH levels and reduced NOx

levels were observed in the case group, reinforcing the possible involvement of OS/NS in PD. Thus, it is possible to conclude that the identification of genetic alterations of elements involved in inflammation and OS/NS could represent a potential focus on elucidating the disease etiology.

Key-words: Parkinson disease; oxidative stress; polymorphism, genetic; NF-kappa B; superoxide dismutase

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
ALT	Aminotransferase alanina
AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica
AST	Aminotransferase aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
AU	Ácido úrico
BHE	Barreira hematoencefálica
C	Citosina
CAT	Catalase
CL	Corpúsculos de Lewy
COMT	Catecol-O-metil transferase
COX-2	Ciclooxigenase-2
CT	Colesterol total
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
CuZnSOD	Superóxido dismutase cobre-zinco dependente
DBS	Estimulação cerebral profunda
Del	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Dinucleotídeos
DP	Doença de Parkinson
DTNB	Ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
G	Guanina
GPx	Glutaciona peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
H2O2	Peróxido de hidrogênio
IκB	Inibidor de κB
IκKB	Quinase de inibidor de κB
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Ins	Inserção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOO·	Radical lipoperoxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LRRK2	Quinase de repetição rica em leucina 2
MAO-B	Monoamino oxidase B
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MnSOD	Superóxido dismutase manganês dependente
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOO-	Peroxinitrito
NO _x	Metabólitos do óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
-O ₂ ·	Ânion superóxido
OH·	Radical hidroxila
pb	Pares de base
PINK1	Quinase putativa PTEN-induzida 1
PON	Paraoxonase
RHD	Rel homology domain
RFLP	Polimorfismo de fragmento de restrição
SH	Grupamento sulfidril
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNCA	Alfa-sinucleína (gene)
SNpc	Substância nigra pars compacta
SOD	Superóxido dismutase
T	Timina
TG	Triglicerídeos
TGF-β	Fator de crescimento transformante-β
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
U	Unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
URL	Unidade relativa de luz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	DOENÇA DE PARKINSON.....	12
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO.....	16
1.3	GENÉTICA	17
1.4	TRATAMENTO.....	18
1.4.1	Tratamento Medicamentoso	18
1.4.2	Tratamento Não-Medicamentoso	20
1.5	JUSTIFICATIVA.....	20
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	MÉTODOS	22
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	22
3.2	AMOSTRAGEM.....	22
3.3	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS.....	23
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA E AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS	23
3.4.1	Polimorfismo Genético -94 Inserção/Deleção ATTG <i>NFkB1</i> (rs28362491)	23
3.4.2	Polimorfismo Genético <i>NFkBIA</i> c.*126G>A (rs696).....	24
3.4.3	Polimorfismo Genético MnSOD c.47C>T (rs4880)	24
3.5	BIOMARCADORES DE EO/EN.....	24
3.5.1	Hidroperóxidos Lipídicos (LOOH).....	24
3.5.2	Produtos Avançados De Oxidação Proteica (AOPP).....	25
3.5.3	Metabólitos Do Óxido Nítrico (NOx).....	25
3.5.4	Capacidade Antioxidante Total Plasmática (TRAP).....	25
3.5.5	Grupamentos Sulfidril (SH).....	26
3.5.6	Atividade Enzimática Total Da Paraoxonase 1 (PON-1).....	26
3.6	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	26
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	ARTIGO 1	29
4.2	ARTIGO 2	44
5	CONCLUSÃO	59
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICES	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP), originalmente descrita por James Parkinson em 1817 como uma “paralisia agitante” (PARKINSON, 1817), é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, sendo a doença de Alzheimer a primeira. A doença afeta 1-2% de indivíduos com 55-65 anos e as chances aumentam com o avanço da idade, chegando a atingir 3,5% das pessoas com idade acima de 85 anos (TAN *et al.*, 2019). De acordo com Dorsey *et al.* (2016), a doença afeta aproximadamente seis milhões de pessoas no mundo todo. No Brasil, estima-se que 200 mil pessoas tenham a DP, mas por não ser uma doença de notificação compulsória, é possível que esse número seja consideravelmente maior. Além disso, estudos sugerem que até o ano de 2030 a prevalência da doença irá crescer mais que o dobro (BOVOLENTA *et al.*, 2016, DORSEY *et al.*, 2007). A DP é mais frequente em homens do que mulheres, estudos sugerem que o estrógeno atue como um possível fator neuroprotetor por meio de mecanismos anti-inflamatórios, antioxidantes e antiapoptóticos (MEONI, MACEROLLO & MORO, 2020).

A DP é uma doença complexa, caracterizada principalmente pela destruição crônica de neurônios dopaminérgicos na substância *nigra pars compacta* (SNpc), progressivamente diminuindo os níveis de dopamina (DA) resultando em perda do controle motor (TAN *et al.*, 2019). Isto resulta no desenvolvimento de sintomas motores, sendo os principais a diminuição dos movimentos voluntários (bradicinesia), rigidez muscular, instabilidade postural e tremor em repouso (VÁRADI, 2020). Além disso, vários sintomas não-motores também estão presentes como distúrbios gastrointestinais e urinários, perda de olfato (hiposmia), alterações cognitivas, insônia, depressão e demência (CHENG & SU, 2020), supostamente como consequência do comprometimento de outras vias de neurotransmissores, como o colinérgico, noradrenérgico e serotoninérgico (DEL-REY *et al.*, 2018).

Uma característica determinante na doença é a presença de inclusões neuronais citoplasmáticas denominadas Corpúsculos de Lewy (CL), que são constituídos por acúmulo da proteína α -sinucleína. Os CL são achados neuropatológicos clássicos da DP, apesar de também estarem relacionados com outras doenças, como a Demência por Corpos de Lewy e Atrofia de Múltiplos Sistemas, também chamadas de sinucleinopatias (GÓMEZ-BENITO *et al.*, 2020). A α -sinucleína é uma proteína constituída de 140 aminoácidos, codificada pelo gene *SNCA*, presente em abundância em compartimentos pré-sinápticos, onde

desempenha seu papel fisiológico na regulação de vesículas de neurotransmissores (LAMONACA & VOLTA, 2020). A proteína normalmente está presente nas células na forma monomérica, mas possui capacidade de autoconstrução, e alterações genéticas podem favorecer a α -sinucleína a assumir formas oligoméricas e gerar grandes agregados insolúveis, promovendo a formação dos CL (HOENEN *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que a α -sinucleína pode se ligar a lipídeos, o que permite sua interação com membranas e organelas. Esta interação pode comprometer a integridade e funcionamento normais destas estruturas e resultar na morte celular, o que explica seu importante papel no processo fisiopatológico da doença (LINDHOLM *et al.*, 2016). A α -sinucleína é normalmente degradada por sistemas de depuração proteicas, como autofagia lisossomal ou sistema ubiquitina-proteassoma. As alterações na conformação da α -sinucleína, bem como defeitos nesses sistemas regulatórios são alguns dos fatores responsáveis pelo acúmulo dos citados agregados insolúveis nos neurônios dopaminérgicos, que desempenham papel crucial nos eventos envolvidos no desenvolvimento da doença (LINDHOLM *et al.*, 2016; BLESA *et al.*, 2015).

Além de se acumular, a α -sinucleína também pode ser secretada no meio extracelular e desencadear respostas inflamatórias ao ser reconhecida por células da glia (CAPLAN & MAGUIRE-ZEISS, 2018). As células da glia, constituídas principalmente por oligodendrócitos, astrócitos e micróglia, são as representantes imunológicas no sistema nervoso central (SNC), sendo a micróglia considerada a principal controladora da imunidade inata neste ambiente (ILLES *et al.*, 2020). Em seu estado inativo, estas células apresentam morfologia filamentosa que se estendem e se contraem, vigiando o ambiente, e na presença de diversos estímulos, como resíduos de bactérias, vírus, fungos, proteínas endógenas anormais, citocinas e quimiocinas, essas células são ativadas e assumem uma conformação amebóide, conferindo-lhes maior capacidade fagocítica, além de secretarem moléculas pró-inflamatórias como interleucinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) (GUZMAN-MARTINEZ *et al.*, 2019; ILLES *et al.*, 2020). As células da micróglia também secretam citocinas imunossupressoras e anti-inflamatórias como interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformante-beta (TGF- β), para controlar a inflamação e promover reparação celular (KEMPURAJ *et al.*, 2016). Estas respostas pró e anti-inflamatórias da micróglia foram caracterizados como fenótipos M1 e M2, respectivamente (CAPLAN & MAGUIRE-ZEISS, 2018), e o desequilíbrio entre eles pode resultar em um quadro pró-inflamatório crônico, observado na DP e em outras doenças neurodegenerativas (KEMPURAJ *et al.*, 2016).

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é uma família de fatores de transcrição capazes de controlar a expressão de proteínas que regulam diversas respostas celulares:

proinflamatórias, imunológicas, proliferativas e apoptóticas. A família de fatores é constituída por homo e heterodímeros de cinco diferentes proteínas: RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NFκB1) e p100/p52 (NFκB2). Todas as proteínas NF-κB contêm um domínio Rel homólogo (Rel *homology domain* - RHD), que lhes confere a capacidade de dimerização, reconhecimento e ligação com o ácido desoxirribonucléico (DNA). Os dois heterodímeros mais estudados são o p50/p65 (ou NFκB1/RelA), envolvido na ativação canônica do NF-κB, e o p52/RelB (NFκB2/RelB), envolvido na ativação não-canônica (KURUTAS, 2016).

Por ser um fator de resposta rápida, o NF-κB permanece em estado inativo no citoplasma das células enquanto estiver associado às proteínas inibitórias de κB (IκB). A presença de estímulos indutores como ERO/ERN, citocinas, patógenos e moléculas associadas a dano celular, ativam as quinases de IκB (*inhibitor of κB kinase* - IκK), que realizam a ativação dos dímeros de NF-κB. Na via canônica, a IκK realiza a fosforilação do complexo IκB-p65/p105, degradando IκB e convertendo p105 em p50 (NFκB1), gerando p65/p50, dímero ativo de NF-κB. Já na via não canônica, IκKα atua na fosforilação do complexo p100/RelB, realizando a conversão de p100 em p52, gerando p52/RelB, outro dímero ativo de NF-κB (SIVANDZADEA *et al.*, 2019). Independente da via de ativação, o NF-κB rapidamente transloca-se para o núcleo, onde se liga a sequências específicas de DNA e promove a transcrição e expressão de citocinas, quimiocinas e outras proteínas pró-inflamatórias, como interleucina-1 beta (IL-1β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2), que, liberadas pela micróglia, resultam na propagação da neuroinflamação. Apesar de ser um mecanismo normalmente de neuroproteção contra patógenos e outras ameaças, a neuroinflamação persistente favorece o acúmulo de danos aos neurônios, sendo um importante mecanismo na fisiopatologia da DP (WAHAB *et al.*, 2019).

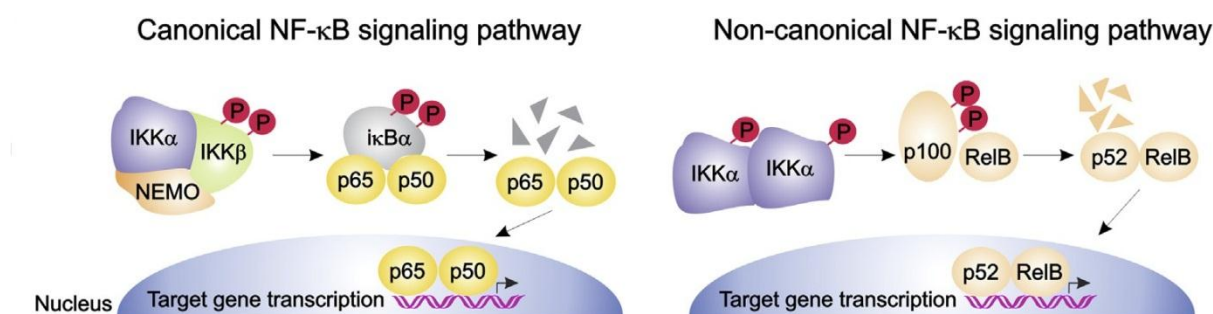


Figura 1: Representação simplificada das vias canônica e não-canônica de ativação do NF-κB (adaptado de ESPÍN-PALAZÓN & TRAVER, 2016)

A mitocôndria é a organela responsável por produzir energia para suprir todas as necessidades metabólicas celulares. Isto acontece através da fosforilação oxidativa, um

complexo processo em que a mitocôndria usa de seus complexos enzimáticos estruturais e da energia liberada da oxidação de nutrientes para produzir moléculas de adenosina trifosfato ou ATP (BLESA *et al.*, 2015). Os complexos enzimáticos I a V compõem a cadeia transportadora de elétrons (CTE), e a transferência de elétrons para o oxigênio (O_2) ocorre naturalmente nos Complexos I e III, produzindo ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), um metabólito comum deste processo. A mitocôndria, por sua vez, dispõe de mecanismos para se defender e eliminar a ERO. Na primeira linha de defesa está a enzima superóxido dismutase (SOD), que possui a capacidade de transformar o $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Apesar do H_2O_2 também ser considerada uma ERO, esta molécula é mais estável e apresenta menor ameaça do que a primeira, eliminada posteriormente por outros mecanismos (TRIST, HARE & DOUBLE, 2019).

A SOD é uma família de enzimas que, apesar de desempenharem a mesma função, possuem três isoformas diferentes: SOD 1, 2 e 3. A capacidade das SOD é derivada dos metais de transição existentes em seus sítios ativos. As SOD1 e SOD3 são cobre-zinco dependentes (CuZnSOD), enquanto a SOD2 é manganês-dependente (MnSOD) (KURUTAS, 2016). A SOD1 é mais comumente observada no citosol (e em menores quantidades entre as membranas da mitocôndria), e a SOD3 normalmente se encontra fora da célula, sendo também chamada de SOD extracelular. A MnSOD é encontrada exclusivamente na matriz mitocondrial, sendo fundamental na neutralização das ERO/ERN constantemente produzidas pela CTE (HOLLEY *et al.*, 2011). Distúrbios mitocondriais têm sido frequentemente associados com a patogênese da DP e se manifestam principalmente como diminuição da atividade da CTE, mutações no DNA mitocondrial, desequilíbrio nos metabolismos de ferro e cálcio, alterações na permeabilidade de membranas e acúmulo de ERO/ERN (LINDHOLM *et al.*, 2015; TRIST, HARE & DOUBLE, 2019).

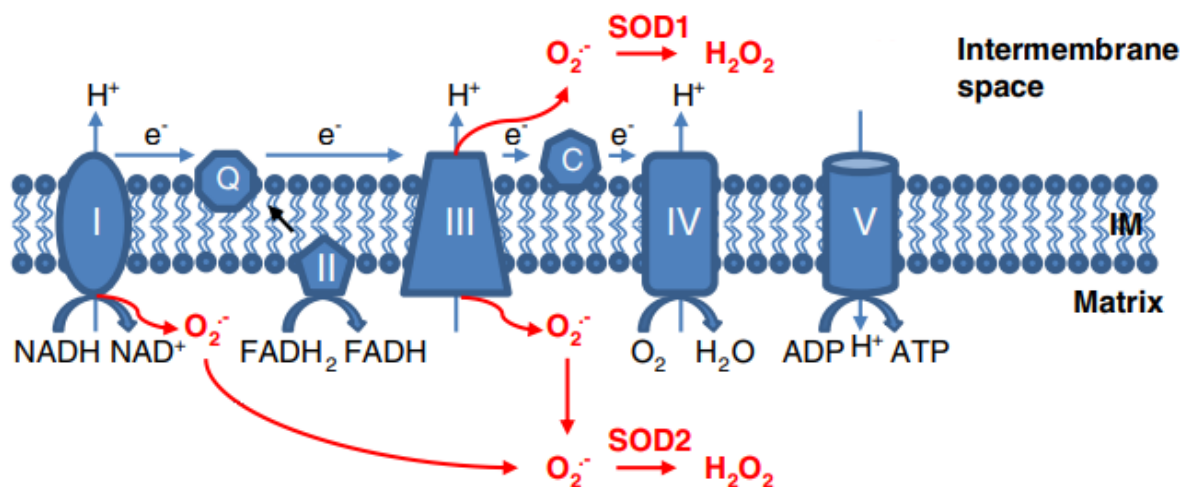


Figura 2: Ação da SOD1 e SOD2 na conversão de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 no espaço intermembrana e matriz mitocondrial, respectivamente (adaptado de LI *et al.*, 2013).

1.2 Estresse oxidativo e nitrosativo

A produção e acúmulo de ERO/ERN na SNpc é um fator de extrema relevância na DP e não está associado apenas com distúrbios mitocondriais, mas também com praticamente todos elementos envolvidos no processo de neurodegeneração da doença. A formação de ERO/ERN é fisiológica em organismos aeróbicos, presente em processos como produção energética, fagocitose, sinalização, entre outros (KIM *et al.*, 2015). As ERO/ERN são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio e nitrogênio, altamente reativas, podendo apresentar um elétron desemparelhado (espécies radicalares) ou não (espécies não radicalares). As principais espécies radicalares são o $\text{O}_2^{\cdot-}$, o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e radicais lipoperoxila (LOO^{\cdot}), enquanto as principais espécies não radicalares englobam o H_2O_2 , o óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO^-) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (GANDHI & ABRAMOV, 2012; ULLAH *et al.*, 2019). As ERO/ERN, por serem altamente reativas, podem ameaçar a homeostase celular caso não sejam controladas. Desta forma, o organismo dispõe de mecanismos antioxidantes que são capazes de neutralizar essas moléculas ao estabilizarem seu elétron desemparelhado ou transformá-las em moléculas estáveis e inócuas. Os mecanismos antioxidantes são classificados de acordo com sua forma de atuação, sendo normalmente enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas são a SOD, catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPx) e as paraoxonases (PON). A SOD transforma o $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , que pode ser ainda convertido em H_2O pela ação da GPx, ou em H_2O e O_2 pela ação da CAT. A PON-1 é uma enzima associada à partícula de HDL, que atua impedindo que lipídeos, como os de membrana celular e os associados a LDL, sejam alvo das ERO/ERN, evitando assim a ativação de vias pró-inflamatórias (LEVY, REICHERT & BYDLOWSKI, 2019). Por outro lado, as vitaminas C e E, o ácido úrico (AU) e os grupamentos sulfidríla (SH) constituem os principais mecanismos antioxidantes não-enzimáticos (KIM *et al.*, 2015).

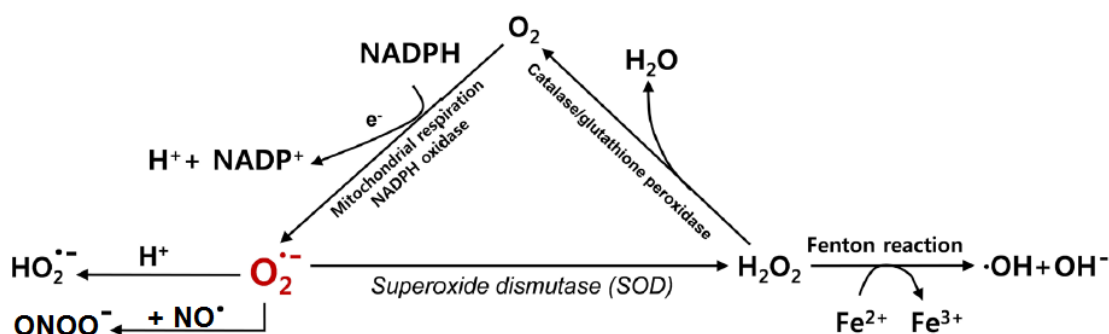


Figura 3: Elementos e processos envolvidos na produção e neutralização de ERO/ERN (adaptado de KIM *et al.*, 2015).

A manutenção dos ERO/ERN em níveis controlados é definido como equilíbrio redox. Quando as espécies reativas são produzidas em excesso, ou quando a capacidade dos sistemas antioxidantes está depletada, ou caso ambas condições aconteçam simultaneamente, as ERO/ERN em excesso ficam descontroladas e em desequilíbrio, substituindo o quadro de equilíbrio redox pelo denominado estresse oxidativo/nitrosativo (EO/EN), resultando em danos a biomoléculas importantes como DNA, lipídeos e proteínas (REKATSINA *et al.*, 2020). Os produtos oxidados/nitrosados resultantes diminuem atividade biológica, que conduzem à desregulação metabólica e alterações em sinalização, importantes no desenvolvimento de diversas doenças (ULLAH *et al.*, 2019). Na DP, o EO/EN é um fator muito importante, pois está envolvido direta e indiretamente com os diversos processos patogênicos já citados, como acúmulo da α -sinucleína, formação dos CL (JEŠKO *et al.*, 2019), estímulo e propagação da neuroinflamação (GUZMAN-MARTINEZ *et al.*, 2019), disfunção mitocondrial (STANGA *et al.*, 2020), além de outros como desregulação do metabolismo do ferro e oxidação da dopamina (TRIST, HARE & DOUBLE, 2019).

1.3 Genética

Ao longo dos anos, mutações em vários genes foram associados, de alguma forma, ao desenvolvimento da DP. Essas alterações genéticas representam aproximadamente 10% de todos os casos e são chamados como forma familiar ou de herança monogênica/Mendeliana da doença (HERNANDES, REED & SINGLETON, 2016), enquanto os demais 90% são denominados idiopáticos, esporádicos ou de herança não-Mendeliana. Mutações em seis genes foram identificadas como as principais responsáveis pela forma monogênica da DP, sendo as dos genes *SNCA* (*PARK1*) e *LRRK2* (*PARK8*) de herança autossômica dominante, enquanto as mutações dos genes *Parkin* (*PARK2*), *PINK-1* (*PARK6*), *ATPase13A2* (*PARK9*) e *DJ-1* (*PARK7*) são de herança autossômica recessiva (ANTHONY *et al.*, 2013).

Apesar de mutações específicas terem sido associadas diretamente com a doença, pouco se sabe sobre outros elementos que possam influenciá-la indiretamente, ao modular processos relacionados à fisiopatologia da doença como a neuroinflamação e o EO/EN. Polimorfismos genéticos são os tipos mais comuns de variação genética em humanos, pois estão presentes em mais de 1% da população, não necessariamente associados à uma doença específica, enquanto mutações ocorrem em frequências muito baixas, em um número restrito de indivíduos, e estão comumente relacionadas à alguma doença genética (CHIARELLA *et al.*,). Os polimorfismos podem ser resultado de uma ou mais alterações de nucleotídeos, sendo a substituição de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* -

SNP) o tipo de polimorfismo mais frequente que existe, ocorrendo um a cada 1.000 pares de base (pb) no genoma humano, podendo aparecer em regiões importantes, sejam elas codificantes (resultando na produção proteína alterada) ou não-codificantes (interferindo na regulação da expressão gênica) (KARKI *et al.*, 2015).

Alterações genéticas que interfiram na expressão de agentes como o NF- κ B, elemento chave na transcrição de citocinas e na ativação de diversas vias inflamatórias, poderiam facilitar o estabelecimento de um quadro proinflamatório. No gene *NF κ B1*, região que codifica a proteína p105/p50, sabe-se de um polimorfismo genético em que há a possibilidade de deleção de quatro pb na posição -94 do gene, também conhecido como -94 ATTG ins/del NF κ B1 (rs28362491). A deleção da sequência ATTG resultaria em uma perda na capacidade do NF κ B de se ligar à proteínas nucleares, reduzindo a atividade de transcrição mediada por p50 (WANG *et al.*, 2015). Outro exemplo é um polimorfismo presente no gene *NF κ BIA*, região que codifica o I κ B. Neste gene, há uma possível substituição de uma Guanina (G) por uma Adenina (A), e esta troca resulta na expressão diminuída do inibidor, permitindo que dímeros de NF- κ B fiquem desassociados e livres para atuar por mais tempo (SIMONIAN *et al.*, 2018). Alternativamente, um polimorfismo favorável ao desenvolvimento do EO/EN é a substituição de uma Citosina (C) por uma Timina (T) na posição 47 no gene *MnSOD*, cuja troca interfere no transporte desta entre as membranas mitocondriais. A presença de C traduz a inserção de um aminoácido Alanina na proteína final, enquanto a substituição por um T resulta na inserção de um aminoácido Valina. A enzima que apresenta o alelo variante T (Valina) não consegue alcançar a matriz mitocondrial adequadamente e, livre da ação da MnSOD, o $^{\cdot-}O_2$ produzido durante a respiração celular pode interagir com outras estruturas, com conseqüente dano à biomoléculas e, possivelmente, levando à disfunção mitocondrial (BRESCIANI *et al.*, 2013).

1.4 Tratamento

1.4.1 Tratamento medicamentoso

Uma vez que se compreendeu que a DP é conseqüência da perda dos neurônios produtores de dopamina, o tratamento da doença inicialmente teve como foco principal corrigir o déficit desse neurotransmissor. A introdução da levodopa, droga precursora da dopamina, revolucionou o tratamento da doença, ao aliviar o tremor em repouso, a bradicinesia e os distúrbios de marcha e equilíbrio, considerados sintomas motores cardinais da doença (SMITH *et al.*, 2012). Por mais de cinquenta anos, a levodopa permaneceu como tratamento de padrão-ouro para a DP e outros parkinsonismos, e praticamente todos os pacientes parkinsonianos precisarão ser tratados com este agente (POEWE *et al.*, 2017).

Por ser uma pré-droga ou droga precursora, a levodopa precisa ser convertida em dopamina para desempenhar seu papel. Entretanto, se administrada isoladamente, a levodopa é convertida por enzimas dopamina-descarboxilase na periferia e pode ser metabolizada antes mesmo de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Desta forma, a levodopa é normalmente administrada em associação com um inibidor de dopamina-descarboxilase, sendo os mais comuns a benserazida e a carbidopa. Estes possuem propriedades físico-químicas que impedem sua passagem pela BHE, garantindo que a conversão de levodopa a dopamina não seja inibida no SNC, somente na periferia (KRAUß & BRACHER, 2018). Além disso, ao bloquearem a conversão periférica da levodopa, estes inibidores auxiliam minimizando efeitos colaterais do tratamento como distúrbios gastrointestinais e vasculares (WILLIS, 2013). Ainda assim, o uso prolongado da droga possui efeitos colaterais que acompanham a evolução da doença, como a flutuações da resposta motora e discinesias (POEWE *et al.*, 2017).

Desta forma, outros medicamentos são utilizados no tratamento, complementando a ação da levodopa, aumentando a biodisponibilidade de dopamina ou até mesmo atenuando possíveis efeitos colaterais. Os agonistas dopaminérgicos são drogas que mimetizam a ação do neurotransmissor por se ligarem aos receptores de dopamina, como a amantadina, o pramipexol e a apomorfina. Diferentemente da levodopa, estes compostos não necessitam ser convertidos em compostos bioativos e seus efeitos são independentes do metabolismo da dopamina, diminuindo consideravelmente a incidência de discinesia. Entretanto, seus efeitos são menos potentes que os da levodopa, e ainda podem desencadear Transtornos do Controle do Impulso, resultando em comportamentos compulsivos como ludomania, hiperfagia e hiperatividade sexual (POEWE *et al.*, 2017; KIM, JEON & JENNER, 2017). Dentre todos, a amantadina é um dos medicamentos mais eficazes para o controle da flutuação dos sintomas motores e da discinesia resultantes do tratamento com a levodopa (ARMSTRONG & OKUN, 2020).

A Monoamino oxidase B (MAO-B) é uma enzima presente na membrana mitocondrial externa de células do SNC. Esta enzima desempenha papel chave na patogênese da doença, pois atua no processo de degradação oxidativa da dopamina, produzindo grandes níveis de ERO/ERN e propagando o EO/EN (KINCSES & VECSEI, 2011). Assim, o uso de inibidores da MAO-B é uma abordagem terapêutica bastante utilizada por aumentarem a vida útil da dopamina nos neurônios e reduzirem o dano oxidativo derivado de sua degradação. Os inibidores de MAO-B, como a rasagilina, aumentam e prolongam os efeitos de manutenção motora da levodopa, de forma que a administração destes dois fármacos em conjunto é uma prática terapêutica comum (KIM, JEON & JENNER, 2017). Além da MAO-B, outro grupo enzimático de interesse são as catecol-O-metil transferases (COMT), que atuam

na degradação da levodopa. Inibidores da COMT, como o entacapone, reduzem o metabolismo da levodopa a 3-O-metildopa na periferia, aumentando a biodisponibilidade da droga precursora para o SNC e estendendo ainda mais a duração de seus efeitos (SMITH *et al.*, 2012).

1.4.2 Tratamento não-medicamentoso

A estimulação cerebral profunda (*Deep Brain Stimulation* - DBS) é um procedimento efetivo para o tratamento da DP, em alguns casos específicos. A DBS envolve o implante de eletrodos, uni ou bilateralmente, no núcleo subtalâmico ou no globo pálido interno, que são conectados a um gerador de pulsos, semelhante a um marcapasso. Os eletrodos são programados para promover uma modulação da atividade neuronal por meio da estimulação da área cerebral alvo de maneira específica, de forma a aliviar as flutuações motoras que persistem mesmo com o tratamento farmacológico adequado, como tremores e discinesias (ARMSTRONG & OKUN, 2020). Infelizmente nem todas as formas clínicas da DP respondem ao DBS, de forma que rigorosos critérios de inclusão e exclusão devem ser seguidos. O tratamento e manutenção dessa terapia é realizado por equipe multiprofissional, com envolvimento de neurologistas, neurocirurgiões e psicoterapeutas, que avaliam a qualidade dos estímulos e a adaptação constante dos pacientes WILLIS, 2013).

Outra intervenção terapêutica não-farmacológica muito explorada é a fisioterapia. A fisioterapia aplica uma abordagem que busca restaurar e maximizar a qualidade do controle motor dos pacientes e, conseqüentemente, manter sua independência funcional. A prática de exercícios físicos é uma das intervenções mais comuns e está associada à melhora de habilidades motoras como destreza da marcha, coordenação, trocas posturais e equilíbrio, além da diminuição da deterioração funcional e redução da progressão da doença (BOUÇA-MACHADO *et al.*, 2019; CHENG & SU, 2020). Além disso, estudos apontam que o treinamento físico possui propriedades neuromoduladoras por estar associado à maior expressão de fatores neurotróficos pelo cérebro e pelas células da glia, promovendo o estabelecimento de novas vias de sinalização, novas sinapses, novos vasos sanguíneos e até novos neurônios (PALASZ *et al.*, 2019).

1.5 Justificativa

Uma vez que os dados na literatura sobre a relação dos polimorfismos genéticos - 94 ATTG ins/del *NFKB1*, c.*126G>A *NFKBIA* e c.47C>T *MnSOD* com o EO/EN na DP são insuficientes ou conflitantes, a obtenção de novas informações para expandir o entendimento de possíveis fatores no desenvolvimento da doença justificam este trabalho.

1 2 OBJETIVOS

2 2.1 Objetivo geral

3 Determinar a frequência dos polimorfismos genéticos -94 ATTG ins/del *NFkB1*
4 (rs28362491), c.*126G>A, *NFKBIA* (rs696) e c.47C>T *MnSOD* (rs4880), bem como avaliar a
5 relação de biomarcadores bioquímicos e de EO/EN em indivíduos com DP e em sujeitos
6 livres de doença, de Londrina, Paraná.

7

8 2.2 Objetivos específicos

- 9 • Avaliar dados sociodemográficos como idade, sexo e etnia em indivíduos com DP
10 (grupo caso) e sujeitos livres de doença (grupo controle) da região de Londrina;
- 11 • Quantificar os parâmetros bioquímicos ácido úrico, lipoproteínas de alta e baixa
12 densidade, triglicerídeos e colesterol total dos indivíduos dos grupos caso e controle;
- 13 • Quantificar os biomarcadores de EO/EN hidroperóxidos lipídicos, metabólitos do
14 óxido nítrico, produtos avançados de oxidação proteica, capacidade antioxidante
15 total, grupamentos sulfidríla e atividade total da paraoxonase-1 dos indivíduos dos
16 grupos caso e controle;
- 17 • Verificar a distribuição dos genótipos dos polimorfismos genéticos -94 ATTG ins/del
18 *NFkB1* (rs28362491), c.*126G>A, *NFKBIA* (rs696) e c.47C>T *MnSOD* (rs4880), nos
19 modelos codominante, dominante e recessivo, nos indivíduos dos grupos caso e
20 controle;
- 21 • Comparar os resultados dos parâmetros bioquímicos, de EO/EN e genótipos entre os
22 indivíduos dos grupos caso e controle;
- 23 • Analisar possíveis associações dos polimorfismos genéticos com os biomarcadores
24 bioquímicos e de EO/EN nos indivíduos do grupo caso.

25 3 MÉTODOS

26

27 3.1 Aspectos éticos

28

29 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres
30 Humanos da Universidade Estadual de Londrina/Hospital Universitário Regional Norte do
31 Paraná, como previsto nos pareceres n.º1.819.877 do CEP e n.º1.872.067 da CONEP,
32 CAAE: 58604216.9.0000.5231. Todos os indivíduos foram convidados a participar
33 voluntariamente da pesquisa e informados, em detalhes, sobre o estudo a ser desenvolvido.
34 Após tomarem ciência do projeto e sendo plenamente esclarecidos, assinaram o termo de
35 consentimento (APÊNDICE I).

36

37 3.2 Amostragem

38

39 O estudo, de delineamento transversal do tipo caso-controle, foi desenvolvido por
40 amostra estimada em 31 indivíduos considerando a prevalência da DP de 2% e erro padrão
41 máximo de 5% (POURHOSEINGHOLI *et al.*, 2013). Para composição do grupo caso, foram
42 convidados 55 indivíduos atendidos no setor de Neurologia do Ambulatório de
43 Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) e do Ambulatório de Fisioterapia
44 Especializada em DP da UEL, diagnosticados com DP segundo os critérios do banco de
45 cérebros da sociedade de Parkinson do Reino Unido (HUGHES *et al.*, 1992). Os pacientes
46 ainda foram selecionados de acordo com o estadiamento da doença, sendo incluídos
47 somente aqueles entre as fases 1 e 3 da escala de *Hoehn e Yahr* (GOETZ *et al.*, 2004). O
48 grupo controle foi composto por 55 indivíduos clinicamente e laboratorialmente saudáveis
49 provenientes de diversas regiões de Londrina como participantes de projetos de atividade
50 física em farmácias, mercados, igrejas, funcionários da UEL, entre outros, e foram pareados
51 com os indivíduos do grupo caso considerando idade, sexo e etnia. Foram excluídos do
52 estudo sujeitos com comorbidades de caráter inflamatória ou crônica (diabetes, doenças
53 autoimunes, câncer) e indivíduos que fizessem uso de suplementos antioxidantes, para
54 evitar interferências na interpretação dos parâmetros de EO/EN.

55

56

57 3.3 Coleta e processamento de amostras

58

59 Foram coletados aproximadamente 28 mL de sangue por punção venosa, de todos
60 os voluntários após jejum de 10h: 8 mL de sangue em tubos com vácuo (vacutainer[®])
61 contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para a obtenção da amostra de DNA para
62 a análise dos polimorfismos (leucócitos), e 20 mL de sangue em tubos com vácuo
63 (vacutainer[®]) sem anticoagulante para a avaliação dos biomarcadores de EO/EN e
64 bioquímicos (descritos com mais detalhes nos itens 3.6 e 3.7). Os tubos foram centrifugados
65 por 10 minutos a 3.000 rpm em centrífuga EVLAB[®], (Londrina, PR, Brasil) e alíquotas de
66 soro foram armazenadas em freezer a -80°C (Kendro[®], Asheville, NC, EUA) até o momento
67 das análises.

68

69 3.4 Extração de DNA e avaliação dos polimorfismos

70

71 O DNA genômico foi obtido de leucócitos de amostras de sangue periférico dos
72 voluntários por meio de uso de kit de extração BioPur[®] (Biometrix, São José do Pinhais,
73 Paraná, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A determinação da qualidade do
74 DNA extraído foi avaliada por leitura espectrofotométrica a 260 nm utilizando o equipamento
75 NanoDrop 2000c[™] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e a pureza do DNA
76 estimada pela razão das leituras 260 nm/280 nm. Para cada amostra, em torno de 100 ng
77 de DNA foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* -
78 PCR), utilizando aproximadamente 0,20 µM de *primers* de sequência específica para cada
79 polimorfismo, 100 µM de dinucleotídeos (dNTP), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂),
80 tampão de PCR 1X e 1 unidade (U) da enzima Taq Polimerase (Invitrogen, São Paulo). A
81 detecção dos genótipos foi realizada por digestão enzimática dos fragmentos amplificados
82 pela técnica de polimorfismo de fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length*
83 *Polymorphism* - RFLP), utilizando endonucleases específicas para cada polimorfismo,
84 descritas com mais detalhes a seguir.

85

86 3.4.1 Polimorfismo genético -94 inserção/deleção ATTG *NFκB1* (rs28362491)

87

88 Para este polimorfismo foram utilizados os primers *sense*: 5'- TGG GCA CAA GTC
89 GTT TAT GA -3' e *antisense*: 5'- CTG GAG CCG GTA GGG AAG -3'. Condições de
90 amplificação: desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 30 segundos a 95°C
91 para desnaturação, 30 segundos a 65°C para o anelamento e 30 segundos a 72°C para
92 extensão; e 5 minutos a 72°C para a extensão final (adaptado de KOC *et al.*, 2014). Para a

93 avaliação dos genótipos foi utilizada 1 U da endonuclease *PfIMI* para a digestão enzimática
94 dos fragmentos amplificados, incubados por 24 horas a 37°C. O alelo deleção (del) gerou
95 um fragmento de 281 pb, enquanto o alelo com inserção (ins) de 4 pb, gerou um fragmento
96 com 285 pb e sofreu clivagem, produzindo dois fragmentos, um de 240 pb e outro de 45 pb.

97

98 **3.4.2 Polimorfismo genético *NFkBIA* c.*126G>A (rs696)**

99

100 Para este polimorfismo foram utilizados os primers *sense*: 5'- GGC TGA AAG AAC
101 ATG GAC TTG -3' e *antisense*: 5'- GTA CAC CAT TTA CAG GGA GGG -3'. Condições de
102 amplificação: desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 30 segundos a 95°C
103 para desnaturação, 30 segundos a 61°C para o anelamento e 40 segundos a 72°C para
104 extensão; e 5 minutos a 72°C para a extensão final (adaptado de YENMIS *et al.*, 2015 e
105 OLTULU *et al.*, 2014). Para a avaliação dos genótipos foi utilizada 1 U da endonuclease
106 *HaeIII* para a digestão enzimática de cada um dos fragmentos amplificados, incubados por
107 24 horas a 37°C. O alelo A gerou um fragmento de 424 pb, enquanto o alelo G sofreu
108 clivagem gerando dois fragmentos, um de 316 pb e outro de 108 pb.

109

110 **3.4.3 Polimorfismo genético *MnSOD* c.47C>T (rs4880)**

111

112 Foram utilizados os primers *sense*: 5'- GCC CAG CCT GCG TAG ACG GTC CC -3' e
113 *antisense*: 5'- TGC CTG GAG CCC AGA TAC CCC AAG -3'. Condições de amplificação:
114 desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para
115 desnaturação, 30 segundos a 66°C para o anelamento e 30 segundos a 72°C para
116 extensão; e 5 minutos a 72°C para a extensão final (adaptado de PALUDO *et al.*, 2013).
117 Para a avaliação dos genótipos foi utilizada 1 U da endonuclease *BsaWI* para a digestão
118 enzimática dos fragmentos amplificados, incubados por 24 horas a 37°C. O alelo T sofreu
119 clivagem gerando dois fragmentos, um de 81 pb e outro de 30 pb, enquanto o alelo C gerou
120 um fragmento de 111 pb.

121

122 **3.5 Biomarcadores de EO/EN**

123

124 **3.5.1 Hidroperóxidos lipídicos (LOOH)**

125

126 A avaliação de LOOH foi realizada por técnica de quimioluminescência, em uma
127 adaptação da metodologia descrita por Gonzalez-Flecha *et al.* (1991) e Panis *et al.*, (2012).
128 O t-butil sequestra um hidrogênio dos LOOH presentes na amostra, convertendo-os a um

129 estado excitado, emitindo fótons, que foram detectados em luminômetro Glomax (TD 20/20),
130 sob temperatura controlada (30°C), ao abrigo da luz para evitar interferências. O
131 equipamento realizou uma contagem/segundo por 60 minutos e os resultados foram
132 expressos em unidades relativas de luz (URL).

133

134 **3.5.2 Produtos avançados de oxidação proteica (AOPP)**

135

136 Para a quantificação de AOPP no plasma utilizou-se o método descrito por
137 Hanasand et al. (2012), sendo um parâmetro de avaliação de oxidação de proteínas. A
138 leitura da reação foi realizada em leitora de microplacas da marca Perkin Elmer[®], modelo
139 EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 340 nm. A concentração de
140 AOPP foi expressa em μM de equivalente de cloramina T.

141

142 **3.5.3 Metabólitos do óxido nítrico (NOx)**

143

144 A determinação dos metabólitos do NOx foi realizada pela técnica descrita por
145 Navarro-Gonzalvez et al. (1998). O método de detecção baseia-se na redução dos nitratos
146 da amostra a nitritos, mediada por reações de oxirredução ocorridas entre o nitrato e o
147 sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do
148 azocomposto formado pela adição do reagente de Griess. Os NOx foram quantificados em
149 leitora de microplacas Perkin Elmer[®], modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA), sendo as
150 leituras realizadas em 540 nm e os resultados expressos em μM de equivalente de nitrito de
151 sódio (NaNO_2).

152

153 **3.5.4 Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)**

154

155 Este teste avaliou, de forma inespecífica, a ação dos antioxidantes presentes na
156 amostra, em uma adaptação do método descrito por Repetto *et al.* (1996). A técnica de
157 quimioluminescência foi realizada utilizando uma leitora de microplacas Victor X3, Perkin
158 Elmer[®], (Waltham, MA, EUA) em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e
159 uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm com temperatura controlada no aparelho a 30°C.
160 Os resultados foram expressos em μM de equivalente de Trolox (análogo hidrossolúvel da
161 vitamina E). No ARTIGO 1 (item 4.1), os resultados do TRAP foram corrigidos pelos níveis
162 séricos de AU (TRAP/AU). Por constituir um dos principais componentes antioxidantes
163 plasmáticos, o AU poderia mascarar o resultado do TRAP, de forma que ao ser corrigido
164 obtém-se uma avaliação melhor dos demais antioxidantes presentes.

165

166 3.5.5 Grupamentos sulfidrila (SH)

167

168 A quantificação dos grupamentos SH foi realizado utilizando o método descrito
169 previamente por Hu (1994) e adaptado para microplaca por Taylan e Resmi (2010). O
170 método baseia-se na reação do ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) com os
171 grupamentos SH presentes na amostra, sejam eles derivados de proteínas ou compostos
172 não-proteicos. A leitura da reação foi feita em leitora de microplacas da marca Perkin
173 Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) em comprimento de onda de 412 nm. Os
174 resultados foram expressos em μM de equivalente de GSH.

175

176 3.5.6 Atividade enzimática total da paraoxonase 1 (PON-1)

177

178 A atividade total da PON-1 foi determinada pela formação de hidrólise do fenil-
179 acetato baseado na metodologia descrita por Richter, Jarvink e Furlong (2008). A taxa de
180 hidrólise do fenil-acetato foi detectada durante 4 minutos (16 leituras com intervalo de 15
181 segundos) com controle de temperatura a 25° . O teste foi realizado em leitora de
182 microplacas da marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento
183 de onda de 270 nm. A atividade da PON-1 total é expressa em U/mL com base no
184 coeficiente de extinção molar do fenil-acetato (equivalente a $1,31\text{mMol/Lcm}^{-1}$).

185

186 3.6 Biomarcadores bioquímicos

187

188 Os níveis séricos de ureia, creatinina, glicose, aminotransferases aspartato (AST) e
189 alanina (ALT), proteínas totais, magnésio, AU, lipoproteínas de alta densidade (*high density*
190 *lipoprotein* - HDL), triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT) foram obtidos por meio do
191 aparelho Dimension®, RxL (Deerfield, IL, EUA). Os níveis de lipoproteínas de baixa
192 densidade (*low-density lipoprotein* - LDL) foram calculados por meio da equação de
193 Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972), considerando que em todos os
194 indivíduos convidados, os níveis séricos de TG quantificados foram abaixo de 400 mg/dL.

195

196

197

198 3.7 Análise Estatística

199

200 O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para a determinação da distribuição de
201 normalidade do dados em ambos os grupos. Teste t de Student ou Análise de Variância com
202 pós-teste de Tukey foram utilizados para detectar diferenças na distribuição de variáveis
203 contínuas paramétricas, enquanto os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com pós-
204 teste de Dunn para as variáveis contínuas não-paramétricas. Teste de qui-quadrado foi
205 aplicado para as variáveis categóricas gênero e etnia, bem como para os genótipos dos três
206 polimorfismos para o modelo codominante. Coeficientes de correlação de Pearson e de
207 Spearman foram utilizados para avaliar o grau de relacionamento entre biomarcadores, de
208 acordo com sua distribuição. A razão de chance (*odds ratio* - OR) foi obtida por meio de
209 regressão logística binária, para avaliar a influência dos polimorfismos, dos biomarcadores
210 bioquímicos e de EO/EN para o desenvolvimento da doença, corrigidos por idade, gênero e
211 etnia. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram valor de $p < 0,05$.
212 Todas as análises foram realizadas por meio do software IBM SPSS Statistics 21 (IBM
213 Corp., Armonk, N.Y., USA).

214 **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

215

216 Os resultados obtidos estão descritos e discutidos nos ARTIGO 1 e ARTIGO 2.

217 **4.1 ARTIGO 1**

218 **Association of -94 ATTG insertion/deletion *NFkB1* and c.*126G>A *NFkBIA* genetic**
219 **polymorphisms with oxidative and nitrosative stress biomarkers in subjects with**
220 **Parkinson's Disease**

221

222 Thiago Hissnauer Leal Baltus^a, Nayara Rampazzo Morelli^a, Carine Coneglian de Farias^a,
223 Kleber Paiva Trugilo^b, Nádia Calvo Martins Okuyama^b, Karen Brajão de Oliveira^b, Lucio
224 Baena de Melo^{a,c}, Suhailia Mahmoud Smaili^d, Décio Sabbatini Barbosa^a.

225

226

227 ^aHealth Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of
228 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

229 ^bDepartment of General Pathology, Biological Sciences Center, State University of
230 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

231 ^cDepartment of Clinical Medicine Neurology, Health Sciences Center, State University of
232 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

233 ^dDepartment of Physiotherapy, Program of Masters and Doctoral degree in Rehabilitation
234 Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

235

236

237

238 Submetido à revista *Neuroscience Letters* em 14 de julho de 2020.

239 ABSTRACT

240 Parkinson's disease (PD) is a complex neurodegenerative disorder, resulting
241 dopaminergic neuronal cell death in the substantia nigra. The disease is characterized by
242 major motor impairment, being bradykinesia, rest tremor, rigidity and loss of postural reflexes
243 the most common, while autonomic dysfunctions, sleep disturbances and psychiatric
244 disorders are some of the wide range of non-motor symptoms. Several processes have been
245 identified to be associated with disease development, such as mitochondrial dysfunction,
246 oxidative/nitrosative stress and neuroinflammation. NF- κ B is an important transcription factor
247 that regulates several inflammatory elements and pathways, and polymorphisms on NFKB1
248 and NFKBIA genes can potentially influence redox balance towards a pro-oxidative frame,
249 modulating disease progression. Evaluation of these polymorphisms in the redox status of
250 PD subjects could provide new insights on the subject. The study aimed to test associations
251 of -94 ins/del ATTG *NFKB1* (rs28362491) and c.*126G>A *NFKBIA* (rs696) polymorphisms
252 with PD development, and to test the influence of both polymorphisms on
253 oxidative/nitrosative stress (OS/NS) parameters. A total of 110 Brazilian individuals were
254 enrolled, being 55 subjects recruited from University Hospital of Londrina as the PD group,
255 and 55 subjects matched for age, sex and ethnicity composed the healthy control (HC)
256 group. *NFkB1* and *NFkBIA* polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP. Lipid
257 hydroperoxides (LOOH), nitric oxide metabolites (NOx), advanced oxidation protein products
258 (AOPP), sulfhydryl groups (SH), total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) and
259 paraoxonase-1 activity (PON-1) were assessed. Despite no association of polymorphisms on
260 disease development was observed, in PD subjects the *NFKB1* del/del genotype was
261 associated with higher levels of LOOH, while *NFkBIA* GA and AA genotypes were associated
262 with higher NOx levels, suggesting that NFkB plays a role in PD susceptibility. In conclusion,
263 the prospect of genetic polymorphisms of elements involved in inflammation and OS/NS
264 might be a new approach to unravel PD etiology.

265

266 KEY WORDS

267 Parkinson Disease; Oxidative Stress; NF κ B; NF κ B1; NF κ BIA

268

269 INTRODUCTION

270 Parkinson's disease (PD) is a complex neurodegenerative disorder, characterized by
271 loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, which results on debilitating motor

272 symptoms such as bradykinesia, resting tremor, rigidity and postural instability, and on non-
273 motor symptoms, such as sleep disorders, depression, cognitive impairment, olfactory loss
274 and autonomic dysfunctions [1,2]. Despite intensive research, PD etiology remains unclear,
275 but increased oxidative/nitrosative stress (OS/NS) is known to play an important role, since it
276 can lead to mitochondrial dysfunction, impairment of autophagy systems, protein misfolding
277 and aggregation, neuroinflammation, among other consequences [2,3]. OS/NS is defined as
278 the imbalance between the production of reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and
279 the antioxidant defense system. The ROS/RNS, highly reactive molecules, are potentially
280 hazardous to important biomolecules and results indicating oxidation/nitrosation of nucleic
281 acids, proteins and lipids have been previously reported in PD patients [4,5,6].

282 The nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) is a family
283 of transcription factors responsible for the regulation of over 200 genes related to
284 inflammation, immune response, cell differentiation, apoptosis and other functions. The NF-
285 κ B family consists of five members, p105/p50 (NF κ B1), p100/p52 (NF κ B2), p65 (RelA), RelB
286 and cRel. They share the same Rel homology domain, which allows them to form homo and
287 heterodimers, generating distinct transcriptional complexes. While the homodimeric p50/p50
288 form has anti-inflammatory properties, by expressing IL-10 for example, the p50/p65
289 heterodimer is the most abundant form found in the cytosol of almost all cell types, with
290 proinflammatory effects [7,8]. In unstimulated cells, proteins of inhibitory κ B (I κ B) family are
291 bound to NF- κ B, keeping it on an inactive state, being I κ B α (I κ B α) their most critical
292 inhibitor. Upon stimulation, I κ B α is phosphorylated and degraded by I κ B Kinase (IKK),
293 revealing a nuclear localization signal for NF- κ B, which promotes its translocation into the
294 nucleus and initiates the transcription of proinflammatory genes such as TNF- α , IL-1 β and IL-
295 6 [9].

296 The NF κ B1 subunit, encoded by *NF κ B1* gene on chromosome 4q24, has a common
297 insertion/deletion of 4 base-pair ATTG sequence at position - 94, described as - 94 ins/del
298 ATTG (rs28362491) polymorphism, in which the 4 base-pair deletion results in the loss of
299 NF- κ B capacity to bind to nuclear proteins, with decreased promoter activity [10,11]. I κ B α , on
300 the other hand, is encoded by *NF κ BIA* gene on chromosome 14q13, and may present a
301 substitution of guanine (G) for an adenine (A) at position 7852 in the gene 3'-untranslated
302 region (3'UTR), also known as c.*126G>A polymorphism (rs696), resulting in lower
303 expression of I κ B, allowing unchecked NF- κ B to remain free with prolonged activity [12,13].
304 Since both polymorphisms can potentially influence the NF- κ B transcription levels and
305 function, several studies have been developed in order to elucidate the role of the
306 aforementioned polymorphisms in several diseases [8,9,14]. Therefore, the objective of this

307 study was to investigate the association of NFκB1 and NFκBIA polymorphisms with PD, and
308 their influence on patients' ROS/RNS profile as well.

309

310 MATERIAL AND METHODS

311 Subjects

312 The study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human
313 Subjects of the State University of Londrina (protocol n° 58604216.9.0000.5231) and written
314 informed consent was obtained from all subjects. Sample size was calculated considering
315 prevalence of PD as 2% and a 95% confidence level [15]. The study group consisted of 55
316 individuals with PD, enrolled from the Neurology and the Specialized in PD Physiotherapy
317 Ambulatories, at the Clinical Hospital of the State University of Londrina. PD was diagnosed
318 according to the criteria of the United Kingdom PD Society Brain Bank [16]. The control
319 group consisted of 55 volunteers with no history of severe/chronic disease, with normal
320 laboratorial results for urea, creatinine, aminotransferases AST and ALT, glucose, total
321 protein, magnesium levels and lipid profile. The subjects were matched for age, sex and
322 ethnicity.

323

324 Methods

325 Peripheral blood was collected after an overnight fast (10 h) from all subjects. DNA
326 was extracted from leukocytes using a kit from Biopur® (São José dos Pinhais, PR, Brazil)
327 according to the manufacturer's protocol. For DNA concentration, NanoDrop 2000c™
328 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 260 nm was used and
329 purity was assessed by measuring the 260/280 ratio. Approximately 100 ng of DNA were
330 amplified using sequence-specific primer polymerase chain reaction (PCR). PCR and the
331 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) technique were used to assess the
332 polymorphisms. For the *NFκB1* polymorphism (rs28362491), primers and amplification
333 conditions were the same as used by Koc et al. [10]. The deletion (del) and insertion (ins)
334 alleles were detected by digesting the PCR products with *PfIMI* endonuclease. The ins allele
335 of 285 base pairs (bp) was digested into two fragments of 240 bp and 45 bp, while the del
336 genotype of 281 bp remained undigested. For the *NFκBIA* polymorphism (rs696), primers
337 and amplification conditions were the same as used by Oltulu et al. [17]. PCR products were
338 digested with *HaeIII* endonuclease. The A allele showed a 424 bp undigested fragment,
339 while the G allele was cleaved into two fragments of 108 bp and 316 bp. Genotypes of both
340 polymorphisms were sorted in three genetic models: codominant, dominant and recessive, in

341 order to evaluate the genotypes from different perspectives. Advanced oxidation protein
342 products (AOPP) [18], lipid hydroperoxides (LOOH) [19], nitric oxide metabolites (NOx) [20],
343 total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) [21], paraoxonase-1 (PON-1) activity
344 [22], and sulfhydryl groups (SH) [23] were analyzed by previously described methods. Urea,
345 creatinine, aminotransferases AST and ALT, glucose, total protein, magnesium levels, total
346 cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL) and triglycerides (TG) were performed on the
347 Dimension[®], RxL (Deerfield, IL, USA) apparatus. Low-density lipoprotein (LDL) levels were
348 calculated by applying the Friedewald equation [24].

349

350 Statistical analysis

351 Variables distribution was assessed by Kolmogorov-Smirnov test. Differences
352 between groups on sociodemographic data and polymorphisms genotypes distribution were
353 checked using Chi-squared test. Biochemical and OS/NS biomarkers differences were
354 evaluated using Student t or one-way ANOVA, and Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests,
355 accordingly. Odds ratio (OR) was calculated for OS/NS biomarkers, *NFkB1* and *NFkBIA*
356 genetic models by logistic binary regression, considering the HC group as reference.
357 Spearman and Pearson tests were applied to observe correlations among biomarkers. All
358 tests were performed by the IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA)
359 software.

360

361 RESULTS

362 Socio-demographic data, biochemical and OS/NS biomarkers of both groups are
363 displayed in Table 1. All subjects were statistically similar in terms of age, ethnicity and sex,
364 but TC, HDL, LDL, LOOH, SH and NOx levels were significantly different. Genotype
365 distribution of codominant, dominant and recessive models of *NFkB1* and *NFkBIA*
366 polymorphisms are shown in Table 2, and genotypes were further combined to observe
367 stronger effects as displayed in Table 3. No difference was observed of genotypes
368 distribution between groups, were polymorphisms analyzed alone or in combination.

369 In PD group only, OS/NS biomarkers distribution was assessed considering all
370 genotypes and models for both polymorphisms, being the pro-oxidatives displayed in Table 4
371 and the antioxidants in Table 5. *NFkB1* del/del genotype was significantly associated with
372 higher LOOH levels in the dominant model, and with higher SH levels in the codominant
373 model. In the *NFkBIA* polymorphism, higher NOx levels were associated with both GA
374 genotype in codominant model and with the AA + GA combined genotypes in recessive
375 model. All genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium.

376 **Table 1** Distribution of socio-demographic data, biochemical and OS/NS biomarkers of PD
 377 subjects and Healthy controls.

Variables	HC	PD	<i>p</i>
Age (years) ^A	71.85 (± 9.99)	69.51 (± 10.46)	0.32
Ethnicity (caucasian/other) ^B	42/13	42/13	0.86
Sex (f/m) ^B	30/25	32/23	0.70
TC ^A	194.27 (± 32.87)	175.73 (± 33.09)	<0.01
HDL ^C	51 (41-61)	45 (38-54)	0.04
LDL ^A	119.55 (± 28.70)	108.43 (± 28.95)	<0.05
TG ^C	100.0 (64.00-134.00)	87.0 (62.00-121.00)	0.20
LOOH ^C	1.48*(1.11*-1.92*)	1.93* (1.22*-2.60*)	0.02
TRAP ^C	1028.47 (899.83-1163.69)	1028.95 (943.12-1096.17)	0.42
AOPP ^C	61.55 (51.29-75.23)	59.18 (49.87-71.33)	0.46
SH ^A	309.44 (± 44.36)	328.95 (± 54.82)	0.04
PON-1 ^A	179.10 (± 46.59)	168.74 (± 49.43)	0.26
NOx ^C	6.11 (4.93-8.09)	4.99 (4.21-6.69)	0.01

378 A: Student t test; B: Chi-squared test; C: Mann Whitney test; * x10⁶; TC: total cholesterol, HDL: high density
 379 lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, TG: triglycerides, LOOH: lipid hydroperoxides, TRAP: total radical-
 380 trapping antioxidant parameter, AOPP: advanced oxidation protein products, SH: sulfhydryl groups, PON-1:
 381 paraoxonase-1, NOx: nitric oxide metabolites; HC: healthy controls; PD: Parkinson Disease
 382

383 **Table 2** Distribution of NFκB1 and NFκBIA genotypes and models between PD
 384 subjects and Healthy controls (HC).

	HC N (%)	PD N (%)	OR	95% CI	<i>p</i>
NFκB1					
(rs28362491)					
Codominant					
del/del	15 (28)	14 (26)	1.00	Reference	-
ins/del	20 (36)	21 (38)	1.10	0.44 - 2.72	0.84
ins/ins	20 (36)	20 (36)	0.93	0.35 - 2.48	0.88
Dominant					
del/del	15 (28)	14 (26)	1.00	Reference	-
ins/del + ins/ins	40 (72)	41 (74)	0.90	0.46 - 2.29	0.96
Recessive					
ins/del + del/del	35 (64)	35 (64)	1.00	Reference	-
ins/ins	20 (36)	20 (36)	1.02	0.38 - 2.11	0.81
NFκBIA					
(rs696)					
Codominant					
AA	8 (14)	9 (16)	1.00	Reference	-
GA	29 (54)	24 (44)	0.74	0.25 - 2.22	0.60
GG	18 (32)	22 (40)	1.04	0.33 - 3.28	0.94
Dominant					
AA + GA	37 (68)	33 (60)	1.00	Reference	-
GG	18 (32)	22 (40)	1.31	0.60 - 2.89	0.50
Recessive					
AA	8 (14)	9 (16)	1.00	Reference	-
GA + GG	47 (86)	46 (84)	0.86	0.30 - 2.42	0.77

385 Binary logistic regression, OR values adjusted for age, sex and ethnicity. HC: healthy controls; PD:
 386 Parkinson disease; OR: odds ratio; CI: confidence interval; del: deletion; ins: insertion
 387

388 **Table 3** Genotype combinations of NFKB1 and NFKBIA polymorphisms in PD subjects
 389 and in Healthy controls (HC).

Combined genotypes	HC (N)	PD (N)	OR	CI 95%	<i>p</i>
ins/ins + AA	1	3	–	Reference	–
ins/ins + GA	16	9	0.19	0.02 – 2.08	0.17
ins/ins + GG	3	8	0.89	0.06 – 12.25	0.93
ins/del + AA	5	5	0.33	0.03 – 4.40	0.40
ins/del + GA	9	11	0.46	0.04 – 4.62	0.47
ins/del + GG	6	5	0.28	0.02 – 3.58	0.33
del/del + AA	2	1	0.17	0.01 – 4.52	0.29
del/del + GA	4	4	0.33	0.02 – 4.74	0.42
del/del + GG	9	9	0.33	0.03 – 3.84	0.38
ins/ins + GA + GG	18	17	0.32	0.03 – 3.33	0.34
ins/del + GA + GG	16	16	0.33	0.03 – 3.56	0.36
del/del + GA + GG	13	13	0.33	0.03 – 3.64	0.37

390 Binary logistic regression. HC: healthy controls; PD: Parkinson disease; OR: odds ratio; CI: confidence
 391 interval; del: deletion; ins: insertion

392

393
 394 **Table 4** Distribution of pro-oxidative biomarkers within the NFKB1 and NFKBIA genotypes
 395 and genetic models in PD subjects.

NFKB1 (rs28362491)	LOOH ^A	<i>p</i>	AOPP ^B	<i>p</i>	NOx ^B	<i>p</i>
Codominant						
del/del	2.30*(± 0.71*)	0.09	60.56 (49.87-69.36)	0.30	4.41 (3.98-6.11)	0.33
ins/del	1.79*(± 0.80*)		52.87 (43.72-71.33)		4.99 (4.34-6.75)	
ins/ins	1.78*(± 0.71*)		60.89 (52.40-77.30)		5.55 (4.59-6.60)	
Dominant						
del/del	2.30* (± 0.71*)	0.03	60.56 (49.87-69.36)	0.87	4.41 (3.98-6.11)	0.16
ins/ins + ins/del	1.78* (± 0.75*)		58.23 (50.19-71.49)		5.32 (4.47-6.69)	
Recessive						
ins/ins	1.78* (± 0.71*)	0.32	60.89 (52.40-77.30)	0.19	5.55 (4.59-6.60)	0.27
ins/del + del/del	1.99* (± 0.80*)		57.29 (46.40-71.33)		4.66 (4.10-6.75)	
NFKBIA (rs696)	LOOH ^A	<i>p</i>	AOPP ^B	<i>p</i>	NOx ^B	<i>p</i>
Codominant						
AA	2.13* (± 0.92*)	0.50	58.23 (50.50-69.36)	0.42	4.99 (4.10-5.84)	0.04^C
GA	1.79* (± 0.80*)		53.82 (48.19-66.73)		5.46 (4.71-7.16)	
GG	1.97* (± 0.67*)		63.44 (52.24-71.33)		4.44 (3.81-6.51)	
Dominant						
GG	1.97* (± 0.67*)	0.70	63.44 (52.24-71.33)	0.34	4.44 (3.81-6.51)	0.04
GA + AA	1.88* (± 0.83*)		54.76 (49.87-69.36)		5.34 (4.59-6.69)	
Recessive						
AA	2.13* (± 0.92*)	0.37	58.23 (50.50-69.36)	0.63	4.99 (4.10-5.84)	0.50
GA + GG	1.87* (± 0.74*)		59.50 (49.87-71.33)		5.02 (4.31-6.75)	

396 A: one-way ANOVA /Student t test; B: Kruskal-Wallis/ Mann-Whitney test; C: NOx levels were different between
 397 AA x GA and GG x GA genotypes only; *: x10⁶; HC: healthy controls; PD: Parkinson disease; LOOH: lipid
 398 hydroperoxides, AOPP: advanced oxidation protein products, NOx: nitric oxide metabolites; del: deletion; ins:
 399 insertion

400 **Table 5** - Distribution of antioxidant biomarkers within the NFKB1 and NFKBIA genotypes and
 401 genetic models in PD subjects.

NFKB1 (rs28362491)		TRAP ^A	<i>p</i>	SH ^A	<i>p</i>	PON-1 ^A	<i>p</i>
Codominant							
del/del		1035.31 (± 125.43)	0.51	350.76 (± 58.25)	0.03^C	168.56 (± 51.98)	0.44
ins/del		1033.64 (± 112.76)		305.68 (± 59.80)		159.07 (± 43.04)	
ins/ins		996.69 (± 110.43)		338.11 (± 37.66)		179.01 (± 54.13)	
Dominant							
del/del		1035.31 (± 125.43)	0.58	350.76 (± 58.25)	0.09	168.56 (± 51.98)	0.99
ins/ins + ins/del		1015.61 (± 111.80)		321.50 (± 52.26)		168.80 (± 49.19)	
Recessive							
ins/ins		996.69 (± 110.43)	0.25	338.11 (± 37.66)	0.29	179.01 (± 54.13)	0.25
ins/del + del/del		1034.31 (± 116.17)		323.71 (± 62.47)		162.86 (± 46.32)	
NFKBIA (rs696)		TRAP ^C	<i>p</i>	SH ^A	<i>p</i>	PON-1 ^A	<i>p</i>
Codominant							
AA		1023.86 (988.00-1040.19)	0.64	327.19 (± 54.38)	0.37	165.45 (± 64.93)	0.81
GA		1023.99 (930.87-1118.57)		318.32 (± 52.90)		164.99 (± 45.65)	
GG		1035.20 (1000.08-1096.11)		341.26 (± 56.98)		174.17 (± 48.40)	
Dominant							
GG		1035.20 (1000.08-1096.11)	0.59	341.26 (± 56.98)	0.18	174.17 (± 48.40)	0.51
GA + AA		1023.86 (941.19-1103.53)		320.74 (± 52.60)		165.11 (± 50.51)	
Recessive							
AA		1023.86 (988.00-1040.19)	0.35	327.19 (± 54.38)	0.92	165.45 (± 64.93)	0.83
GA + GG		1032.49 (943.12-1099.99)		329.29 (± 55.50)		169.38 (± 46.69)	

402 A: one-way ANOVA/Student t-test; B: Kruskal-Wallis/Mann-Whitney test; C: SH levels were significant different
 403 between ins/del and del/del genotypes only. HC: healthy controls; PD: Parkinson disease; TRAP: total radical-
 404 trapping antioxidant parameter, SH: sulfhydryl groups, PON-1: paraoxonase-1; del: deletion; ins: insertion

405

406 **DISCUSSION**

407 We did not find any association of polymorphisms with disease development (Table
 408 2), were they analyzed alone or in combination (Table 5). However, in PD group, the
 409 distribution of LOOH an SH was different in dominant and codominant models of NFKB1,
 410 respectively, and NOx distribution was different in both codominant and recessive models of
 411 NFKBIA (Tables 4 and 5). Also, these biomarkers were significantly different between
 412 groups (Table 1).

413 Studies have tried to elucidate the relationship of NFKB1 and NFKBIA polymorphisms
 414 due to their capacity to modulate NF-κB expression and activation, ultimately (dis)regulating
 415 inflammation [9, 10, 25]. In this sense, the objectives of this study were to establish the
 416 relationship of these genetic polymorphisms with disease development, and their influence
 417 on the OS/NS biomarkers as well. Although NF-κB is known to be involved in microglia
 418 activation and expression of proinflammatory cytokines [26], no association between the

419 polymorphisms and disease was verified. Considering that, our hypothesis is that the
420 polymorphisms could disrupt inflammatory pathways, shifting the parameters towards a
421 proinflammatory setting, ultimately disregulating the redox balance.

422 In the PD group, the GA genotype of NF κ BIA was found associated with higher levels
423 of NO_x than AA and GG genotypes, and in the recessive model, AA + GA genotypes were
424 associated with significantly higher levels of NO_x (Table 3). This indicates an apparent
425 proinflammatory and pro-oxidative aspect of A allele. In the literature, studies show
426 conflicting data on this matter. Lai et al. [9] and Oltulu et al. [17] did not find any significant
427 relationship of NF κ BIA with Coronary Artery Disease or with Non-Small Cell Lung Cancer,
428 respectively. Katarina et al. [27], did not observe a difference in A and G allele frequency of
429 NF κ BIA in Type-1 diabetes, but reported association of AA genotype with latent autoimmune
430 diabetes in adults. Researchers have evaluated NF κ BIA and NF κ B1 polymorphisms
431 combined, in order to find stronger effects. Song et al. [28] have found that the combined
432 genotype of ins/ins + ins/del and GG was associated with an increased risk of sporadic
433 colorectal cancer, and suggested that presence of GG variant genotype would result in lower
434 I κ B α levels, enhancing NF- κ B activity. Contradictorily, Koc et al. [10] have found the
435 combined genotype ins/ins and GA to be a protective factor for Hashimoto thyroiditis,
436 compared to ins/ins and AA combination, suggesting that protection would be related to G
437 allele.

438 Under normal circumstances, NO is a signaling substance produced by two
439 constitutive nitric oxide synthases (cNOS): endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS
440 (nNOS). cNOS constantly produces basal NO levels, important for blood flow maintenance,
441 inhibition of platelet aggregation and neurotransmission [29, 30]. Basal NO levels can
442 modulate NF- κ B directly, by S-nitrosylation of p50 subunit at cysteine 62, blocking it from
443 DNA binding [30, 31], and indirectly by preventing I κ B degradation and its dissociation from
444 NF- κ B [32]. However, in the presence of ROS/RNS, cNOS are uncoupled, unable to
445 synthesize NO [33]. This diminishes NO levels, activating inducible NOS (iNOS), an isoform
446 that produces large amounts of NO. This overproduction increases ROS/RNS formation that
447 can turn NF- κ B into its active state, allowing further iNOS activation [32].

448 Despite NO being such a pivotal element, we observed lower values of NO_x in the PD
449 subjects, compared to the Healthy controls (Table 1). Possibly, the peripheral levels of NO_x
450 are not representative of the real amount produced in the brain. A meta-analysis [34]
451 compared studies regarding ROS/RNS biomarkers in plasma of PD subjects. No difference
452 between PD and controls NO/nitrates levels was found, supporting our hypothesis. Another
453 possibility is that antioxidant mechanisms are systemically overexpressed as an attempt to
454 neutralize the ROS/RNS produced in the brain, consequently controlling peripheral

455 ROS/RNS. Some of our data can support this. Although no difference was observed in the
456 total antioxidant capacity (TRAP) between groups, SH levels were higher in the PD subjects.
457 SH are functional residues with capacity to go under modifications, some being useful for
458 signaling and antioxidant processes, such as S-nitrosylation, while others generate
459 deleterious products, such as sulfinic and sulfonic acids, disrupting protein chains and
460 leading to abnormal cellular function [35]. We also observed a correlation between NO_x and
461 SH ($r = -0.31$, $p = 0.02$, data not shown), indicating that, partially, as SH levels increase,
462 NO_x decrease. S-nitrosylation may be a possibility, where NO (or byproducts) binds onto
463 protein active cysteines to form S-nitrosothiol, decreasing NO_x formation [35].

464 We observed an association of SH with del/del genotype of NFκB1 polymorphism.
465 Studies suggest the presence of a del variant allele would result in decreased expression of
466 p50 and p105 proteins [8], conferring it an anti-inflammatory feature. In the canonical NF-κB
467 pathway, IKK beta (IKKβ) phosphorylates IκBα, freeing the NF-κB p50/p65 dimer to move to
468 the nucleus and activating proinflammatory pathways [36]. In the non-canonical pathway,
469 NF-κB inducing kinase (NIK) activates IKKα, which phosphorylates the inactive dimer of
470 NFκB2, p100/RelB, into its active form, p52/RelB, which also starts proinflammatory
471 cascades [37]. In both pathways, several mediators are regulated through SH modifications
472 [35], altering signalling. This could explain the association of del/del genotype and SH, both
473 mechanisms synergically interfering with NF-κB expression.

474 Even though del/del genotype shows an apparent anti-inflammatory aspect by
475 decreasing p50 expression, this polymorphism is not fully understood and studies have found
476 contradictorily results. Koc et al. [10] observed higher levels of IL-6 in subjects with the
477 del/del genotype. Similarly, Lai et al. [9] reported del/del genotype as an independent risk
478 factor for CAD. However, authors have reported worse clinical developments associated with
479 ins allele instead. Bianco et al. [38] found higher chances of moderate/severe endometriosis
480 and infertility in women with ins allele. Wang et al. [11] and Yenmis et al. [12] reported
481 combined genotypes ins/del and ins/ins to increase the chance for Non-small cell Lung
482 Cancer and Behçet disease, respectively. Fakhir et al. [39] observed ins allele to be related
483 to both development and aggravation of C hepatitis. We found higher levels of LOOH
484 associated with the del/del genotype. This was unexpected, since lower expression of NF-κB
485 was more likely to result in lower pro-oxidative biomarkers. Koc et al. [10] suggested that the
486 signaling of inflammatory mediators could be imbalanced due to NFκB1 protein
487 dysregulation.

488 LOOH levels were higher in the PD group (Table 1). Lipoperoxidation seems to be an
489 important process in PD. In the aforementioned meta-analysis [34], increased LOOH and
490 malondialdehyde levels were found in PD subjects, both lipoperoxidation biomarkers. This

491 may be related to the oxidative damage in the brain, which is a lipid rich environment, with
492 high oxygen consumption, very susceptible to OS/NS [40]. Therefore, we hypothesize that
493 some of the LOOH found in peripheral plasma of these subjects are oxidized lipids from the
494 brain, that crossed the blood-brain-barrier (BBB), due to their lipophilic nature. Studies
495 reported BBB permeability to be disrupted in PD, as consequence of neuroinflammation [41],
496 supporting this idea.

497 We have observed an inverse correlation of LOOH with HDL in the PD group
498 (Spearman $r = -0.29$, $p = 0.03$, data not shown), and a direct correlation of HDL with PON-1
499 (Spearman $r = 0.27$, $p = 0.05$, data not shown). Even though these results are not strong
500 mathematically, the biological effect might be taken in consideration. HDL is a major carrier
501 of LOOH in human plasma, preventing oxidized lipids from accumulating [42]. Its antioxidant
502 properties are derived from components such as apo A-I, apo A-II and PON-1. PON-1
503 prevents oxidized LDL (oxLDL) formation, scavenges oxLDL associated lipids, and maintains
504 eNOS [29]. Possibly, the constant pressure of ROS/RNS could have overwhelmed HDL
505 antioxidant capacity and increased LDL oxidation, consequently increasing LOOH levels and
506 depleting the HDL, LDL and TC in PD group (Table 1). Brites et al. [42] reported similar
507 mechanisms, such as the influence of highly-oxLDL on LOOH formation and its neutralization
508 by HDL.

509 Nevertheless, this study isn't flawless. We were unable to measure NF- κ B and I κ B,
510 which could provide clearer data of the polymorphisms influence over protein expression.
511 Even though this study was carried out in a reference institution for movement disorders of
512 Londrina's region, multicentric studies could assess more subjects, with stronger statistical
513 effects. Despite socio-economic status not being evaluated to match PD and healthy control
514 individuals, all the subjects were strictly selected to avoid confounder comorbidities, especially
515 regarding the ROS/RNS parameters, to ensure the quality of results. Moreover, in the best of
516 our knowledge, this is the very first study to characterize the -94 ATTG ins/del *NF κ B1* and
517 c.*126G>A *NFKB1A* polymorphisms in PD.

518 In conclusion, the observed associations of polymorphisms with oxidative and
519 nitrosative parameters suggest that NF- κ B may play a role in PD susceptibility, by
520 modulating OS/NS and inflammatory pathways. Taken together, these findings provide
521 evidence and knowledge for future studies that may explore other genetic polymorphisms in
522 PD.

523

524 CONFLICTS OF INTEREST

525

526 None.

527 REFERENCES

528

529 [1] C. Váradi. Clinical Features of Parkinson's Disease: The Evolution of Critical Symptoms.
530 *Biology*, v. 9, n. 103, p. 1-13, 2020.

531 [2] D. Lindholm, J. Mäkelä, V. Di Liberto, G. Mudò, N. Belluardo, O. Eriksson, et al., Current
532 disease modifying approaches to treat Parkinson's disease. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73 (2016),
533 1365–1379. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2101-1>.

534 [3] C. Fecchio, L. Palazzi, P.P. de Laureto, α -Synuclein and Polyunsaturated Fatty Acids:
535 Molecular Basis of the Interaction and Implication in Neurodegeneration, *Molecules*,
536 23(2018), 1531. <https://doi.org/10.3390/molecules23071531>.

537 [4] R.G. Oli, G. Fazeli, W. Kuhn, S. Walitza, M. Gerlach, H. Stopper, No increased
538 chromosomal damage in L-DOPA-treated patients with Parkinson's disease: a pilot study. *J.*
539 *Neural Transm. (Vienna)*, 117 (2010), 737–746. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0401-z>.

540 [5] M.S. Medeiros, A. Schumacher-Schuh, A.M. Cardoso, G.V. Bochi, J. Baldissarelli, A.
541 Kegler et al., 2016. Iron and Oxidative Stress in Parkinson's Disease: An Observational
542 Study of Injury Biomarkers, *PLoS One* 11, e0146129.
543 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146129>.

544 [6] C. C. de Farias, M. Maes, K. L. Bonifácio, C. C. Bortolasci, A. de Souza Nogueira, F.F.
545 Brinholi et al., Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in
546 Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug
547 targets, *Neurosci. Lett.* 617 (2016) 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.011>.

548 [7] S.N. Mowla, N.D. Perkins, P.S. Jat, Friend or foe: emerging role of nuclear factor kappa-
549 light-chain-enhancer of activated B cells in cell senescence, *Onco. Targets Ther.* 6 (2013)
550 1221-1229. <https://doi.org/10.2147/OTT.S36160>.

551 [8] M. S. Mohd Suzairi, S.C. Tan, A.A. Ahmad Aizat, M. Mohd Aminudin, M.S. Siti
552 Nurfatimah, Z.D. Andee, et al., The functional -94 insertion/deletion ATTG polymorphism in
553 the promoter region of NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer, *Cancer*
554 *Epidemiol.* 37 (2013) 634-638. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2013.05.007>.

555 [9] H. Lai, Q. Chen, X. Li, Y. Ma, R. Xu, H. Zhai, et al., Association between genetic
556 polymorphism in NFKB1 and NFKBIA and coronary artery disease in a Chinese Han
557 population. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8 (2015) 21487-21496. eCollection 2015.

558 [10] A. Koc, B. Batar, O. Celik, I. Onaran, E. Tasan, G.K. Sultuybek, Polymorphism of the
559 NFKB1 affects the serum inflammatory levels of IL-6 in Hashimoto thyroiditis in a Turkish
560 population, *Immunobiology* 219 (2014) 531-536. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.009>.

561 [11] Y. Wang, L. Chen, L. Pan, J. Xue, H. Yu, The association between NFKB1-94ins/del
562 ATTG polymorphism and non-small cell lung cancer risk in a Chinese Han population. *Int. J.*
563 *Clin. Exp. Med.* 8 (2015) 8153-8157.

- 564 [12] G. Yenmis, T. Oner, C. Cam, A. Koc, O.S. Kucuk, M.C. Yakicier, et al., Association of
565 NFKB1 and NFKBIA polymorphisms in relation to susceptibility of Behçet's disease. *Scand.*
566 *J. Immunol.* 81(2015) 81-86. <https://10.1111/sji.12251>.
- 567 [13] M. Simonian, M. Mosallayi, M. Miraghajani, A. Feizi, S. Khosravi, A.R. Salehi, D.
568 Mortazavi, F. Saberi, R. Salehi. Single nucleotide polymorphism rs696 in miR449a binding
569 site of NFKBIA gene is correlated with risk of colorectal cancer. *Gastroenterol. Hepatol. Bed.*
570 *Bench.* 11(2018) 48–53.
- 571 [14] S. Pallavi, K. Anoop, H. Showket, N. Alo, B. Mausumi, NFKB1/NFKB1a polymorphisms
572 are associated with the progression of cervical carcinoma in HPV-infected postmenopausal
573 women from rural area. *Tumour. Biol.* 36(2015) 6265-6276. [https://10.1007/s13277-015-](https://10.1007/s13277-015-3312-7)
574 [3312-7](https://10.1007/s13277-015-3312-7).
- 575 [15] M.A. Pourhoseingholi, M. Vahedi, M. Rahimzadeh. Sample size calculation in medical
576 studies. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench*, 6,1 (2013) 14–17.
577
- 578 [16] A.J. Hughes, S.E. Daniel, L. Kilford, A.J. Lees, Accuracy of clinical diagnosis of
579 idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol.*
580 *Neurosurg. Psychiatry* 55 (1992) 181-184. <https://10.1136/jnnp.55.3.181>.
- 581 [17] Y.M. Oltulu, E. Coskunpinar, G. Ozkan, E. Aynaci, P. Yildiz, T. Isbir, et al., 2014.
582 Investigation of NF- κ B1 and NF- κ BIA gene polymorphism in non-small cell lung cancer.
583 *Biomed. Res. Int.* 530381. <https://10.1155/2014/530381>.
- 584 [18] M. Hanasand, R. Omdal, K.B. Norheim, L.G. Gøransson, C. Brede, G. Jonsson,
585 Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin. Chim. Acta.*
586 413(2012) 901-906. <https://10.1016/j.cca.2012.01.038>.
- 587 [19] B. Gonzalez Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence:
588 an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 10
589 (1991) 93–100, [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-k](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-k).
- 590 [20] J.A. Navarro-González, C. García-Benayas, J. Arenas, Semiautomated measurement
591 of nitrate in biological fluids, *Clin. Chem.* 44 (1998) 679–681.
592 <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.3.679>
- 593 [21] M. Repetto, C. Reides, M.L. Gomez Carretero, M. Costa, G. Griemberg, S. Llesuy,
594 Oxidative stress in blood of HIV infected patients, *Clin. Chim. Acta* 255 (1996) 107–117.
595 [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(96\)06394-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(96)06394-2)
- 596 [22] R.J. Richter, G.P. Jarvik, C.E. Furlong, Determination of paraoxonase 1 status without
597 the use of toxic organophosphate substrates, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 1 (2008) 147–152,
598 <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.811638>.
- 599 [23] M.L. Hu, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma, *Methods*
600 *Enzymol.* 233 (1994) 380–385. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33044-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33044-1).
- 601 [24] W. T. Friedewald, R.I. Levy, D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low-
602 density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin.*
603 *Chem.* 18 (1972) 499-502.

- 604 [25] S. Tilborghs, J. Corthouts, Y. Verhoeven, D. Arias, C. Rolfo, X.B. Trinh et al., The role of
605 Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 120
606 (2017) 141-150. <https://10.1016/j.critrevonc.2017.11.001>.
- 607 [26] I.F. Caplan, K.A. Maguire-Zeiss, Toll-Like Receptor 2 Signaling and Current Approaches
608 for Therapeutic Modulation in Synucleinopathies. *Front. Pharmacol.* 9 (2018)
609 <https://10.3389/fphar.2018.00417>.
- 610 [27] K. Katarina, P. Daniela, N. Peter, R. Marianna, C. Pavlina, P. Stepanka et al., HLA,
611 NFKB1 and NFKBIA gene polymorphism profile in autoimmune diabetes mellitus patients.
612 *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2 (2007) 124-129. <https://10.1055/s-2007-949589>.
- 613 [28] S. Song, D. Chen, J. Lu, J. Liao, Y. Luo, Z. Yang, et al., 2011. NFkB1 and NFkBIA
614 polymorphisms are associated with increased risk for sporadic colorectal cancer in a
615 southern Chinese population. *PLoS One* 6, e21726. <https://10.1371/journal.pone.0021726>.
- 616 [29] M. Marín, C. Moya, S. Máñez, Mutual Influences between Nitric Oxide and Paraoxonase
617 1. *Antioxidants (Basel.)* 8 (2019). <https://10.3390/antiox8120619>.
- 618 [30] M. Gliozzi, M. Scicchitano, F. Bosco, V. Musolino, C. Carresi, F. Scarano, et al.,
619 Modulation of Nitric Oxide Synthases by Oxidized LDLs: Role in Vascular Inflammation and
620 Atherosclerosis Development. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) <https://10.3390/ijms20133294>.
- 621 [31] A. delaTorre, R.A. Schroeder, S.T. Bartlett, P.C. Kuo, Differential effects of nitric oxide-
622 mediated S-nitrosylation on p50 and c-jun DNA binding. *Surgery* 124 (1998) 137-141.
- 623 [32] E. Janda, V. Visalli, C. Colica, S. Aprigliano, V. Musolino, N. Vadalà, et al., The
624 protective effect of tianeptine on Gp120-induced apoptosis in astroglial cells: role of GS and
625 NOS, and NF-κB suppression. *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 1590-1599.
626 <https://10.1111/j.1476-5381.2010.01172.x>.
- 627 [33] H. Li, U. Förstermann, Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and
628 vascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13 (2013) 161-167
629 <https://10.1016/j.coph.2013.01.006>.
- 630 [34] Z. Khan, S.A. Ali, Oxidative stress-related biomarkers in Parkinson's disease: A
631 systematic review and meta-analysis. *Iran. J. Neurol.* 17 (2018) 137-144.
- 632 [35] O.G. Miller, J.J. Mieyal. Sulfhydryl-mediated redox signaling in inflammation: role in
633 neurodegenerative diseases. *Arch. Toxicol.* 89 (2015) 1439-1467. <https://10.1007/s00204-015-1496-7>.
- 635 [36] M.A. van Delft, L.F. Huitema, S.W. Tas, The contribution of NF-κB signalling to immune
636 regulation and tolerance. *Eur. J. Clin. Invest.* 45(2015) 529-539. <https://10.1111/eci.12430>.
- 637 [37] S.C. Sun, Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell Res.* 21 (2011) 71-85.
638 <https://10.1038/cr.2010.177>.
- 639 [38] B. Bianco, T.G. Lerner, C.M. Trevisan, V. Cavalcanti, D.M. Christofolini, C.P. Barbosa,
640 The nuclear factor-κB functional promoter polymorphism is associated with endometriosis
641 and infertility. *Hum. Immunol.* 73 (2012) 1190-1193. <https://10.1016/j.humimm.2012.08.008>.

- 642 [39] F.Z. Fakhir, M. Lkhider, W. Badre, R. Alaoui, P. Pineau, S. Ezzikouri et al., The -
643 94Ins/DelATTG polymorphism in NFκB1 promoter modulates chronic hepatitis C and liver
644 disease progression. *Infect. Genet. Evol.* 39 (2016) 141-146.
645 <https://10.1016/j.meegid.2016.01.023>.
- 646 [40] S. Salim, Oxidative stress and psychological disorders. *Curr. Neuropharmacol.* 12
647 (2014) 140-147. <https://10.2174/1570159X11666131120230309>.
- 648 [41] L. Costea, Á. Mészáros, H. Bauer, H.C. Bauer, A. Traweger, I. Wilhelm, et al., The Blood-
649 Brain Barrier and Its Intercellular Junctions in Age-Related Brain Disorders. *Int. J. Mol. Sci.*
650 20 (2019) 5472. <https://10.3390/ijms20215472>.
- 651 [42] F. Brites, M. Martin, I. Guillas, A. Kontush, Antioxidative activity of high-density
652 lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin.* 19 (2017) 66-
653 77. <https://10.1016/j.bbacli.2017.07.002>.
- 654

655 **4.2 ARTIGO 2**

656

657 **c.47C>T *MnSOD* polymorphism does not play a major role in Parkinson's Disease**
658 **and oxidative/nitrosative stress biomarkers**

659

660 Thiago Hissnauer Leal Baltus^a, Nayara Rampazzo Morelli^a, Carine Coneglian de Farias^a,
661 Kleber Paiva Trugilo^b, Nádia Calvo Martins Okuyama^b, Karen Brajão de Oliveira^b, Lucio
662 Baena de Melo^{a,c}, Suhailia Mahmoud Smaili^d, Décio Sabbatini Barbosa^a.

663

664 ^aHealth Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of
665 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

666 ^bDepartment of General Pathology, Biological Sciences Center, State University of
667 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

668 ^cDepartment of Clinical Medicine Neurology, Health Sciences Center, State University of
669 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

670 ^dDepartment of Physiotherapy, Program of Masters and Doctoral degree in Rehabilitation
671 Sciences State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

672

673

674 Submetido à revista *Free Radical Research* em 14 de setembro de 2020.

675 ABSTRACT

676 Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disorder
677 after Alzheimer's disease, caused by progressive loss of dopaminergic neurons, resulting in
678 major impairment in movement and balance. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD)
679 or SOD2 is an important antioxidant defense that prevents reactive oxygen and nitrogen
680 species (ROS/RNS) formation, especially in mitochondria. The genetic polymorphism
681 c.47C>T in the SOD2 gene (rs4880) disrupts the enzyme intracellular trafficking, which
682 results in lower amounts of MnSOD in the mitochondrial matrix, potentially increasing
683 oxidative/nitrosative stress (OS/NS), and previous studies reported association of this
684 polymorphism with PD. The aims of this study are to check for associations of MnSOD
685 c.47C>T polymorphism with PD development, and to observe its influence over the OS/NS
686 biomarkers. A total of 92 individuals from the Brazilian population were enrolled, being 46
687 subjects recruited from University Hospital of Londrina to compose the PD group, and 46
688 subjects matched for age, sex and ethnicity, to compose the healthy control (HC) group.
689 Blood samples were obtained and genotyped for MnSOD polymorphism by PCR-RFLP. Lipid
690 hydroperoxides (LOOH), advanced oxidation protein products (AOPP), nitric oxide
691 metabolites (NOx), paraoxonase-1 activity (PON-1), total radical trapping antioxidant (TRAP)
692 and sulfhydryl groups (SH) were evaluated to determine the redox status in all subjects. We
693 found no difference in the distribution of the MnSOD c.47C>T polymorphism genotypes
694 between groups, and no difference in genotypes' distribution was observed among OS/NS
695 biomarkers as well, suggesting that the influence of this polymorphism might not be pivotal in
696 PD development for Brazilian subjects.

697

698 KEY-WORDS: Parkinson Disease; Oxidative Stress; MnSOD; Polymorphism, Genetic

699

700 INTRODUCTION

701 Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative movement disorder, occurring in 2%
702 of people over the age of 60 years [1]. PD clinical manifestations comprises severe motor
703 symptoms such as resting tremor, postural instability, bradykinesia and muscle rigidity [2],
704 and non-motor symptoms such as olfactory loss, insomnia, depression, impairment of
705 cognition and dementia [3]. The disease is characterized by chronic loss of dopaminergic
706 neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and accumulation of α -synuclein
707 inclusions named Lewy-bodies (LB). Genetic mutations in α -synuclein (*SNCA*), Parkin,
708 PTEN-induced kinase 1 (*PINK1*) and other genes are responsible for the familial form of PD,

709 representing 10% of all cases [4] The majority 90% of cases are sporadic and the cause for
710 neuronal loss is not fully understood, which indicates PD as a multifactorial disease, being
711 aging [4], neuroinflammation [5], mitochondrial disorders [6], and disruption of redox
712 homeostasis [7] elements known to play a role in disease development and progression.

713 Oxidative/nitrosative stress (OS/NS) is a complex process that plays a pivotal role
714 both in disease pathogenesis and progression. OS/NS is defined as the imbalance between
715 reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and the antioxidant systems [8]. ROS/RNS are
716 highly reactive molecules, byproducts of oxygen and nitrogen metabolism, normally
717 produced for signaling, regulation of gene transcriptions, immune responses, and other
718 purposes [8,9]. ROS/RNS production is regulated by several antioxidant defenses which
719 neutralize these molecules into more stable, harmless compounds. ROS/RNS progressive
720 accumulation results in damage to biomolecules, specially lipids, proteins and DNA,
721 compromising cellular function and structural integrity [1]. Moreover, OS/NS is involved with
722 several mechanisms in PD pathophysiology, such as aberrant protein aggregation, protein
723 misfolding, mitochondrial disruption, and apoptosis [10].

724 Superoxide dismutase (SOD) is a family of enzymes with important antioxidant
725 activity. It neutralizes superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) by transforming it into hydrogen peroxide
726 (H_2O_2), which can be further broken into H_2O and O_2 by other mechanisms [1]. Three
727 isoforms of SOD have been identified in humans, and they are classified by the transition
728 metals found in their prosthetic group, their functional significance and respective encoded
729 gene [11]. SOD1 and SOD3 are copper-zinc dependent (Cu-ZnSOD) and both require these
730 two metals as cofactors. SOD1 is found intracellularly, mostly in the cytosol and in some
731 organelles, while SOD3 is commonly found in the vascular extracellular space [11]. SOD2 is
732 a manganese-dependent SOD (MnSOD), encoded by the chromosome 6 long arm (6q25)
733 and is the first antioxidant defense in mitochondria. Dysfunctions in this organelle by
734 ROS/RNS accumulation are known to be associated with PD development [9], and MnSOD
735 activity could be a potential candidate to modulate disease outcome [12]. In the genetic
736 polymorphism *MnSOD* c.47C>T (rs4880), there is a substitution of C for T in the coding
737 position 47, leading to a functional alteration replacing aminoacid Alanine (Ala) to Valine (V).
738 This switch interferes with MnSOD transport through the mitochondria, where the MnSOD
739 expressing Ala (C allele) are able to reach the mitochondrial matrix, while the others
740 expressing Valine (T allele) remain trapped between membranes [13]. Since that genetic
741 alteration could interfere with disease development and progression, it makes this an
742 interesting biomarker to evaluate. Therefore, this study aimed to evaluate the *MnSOD*
743 genetic polymorphism c.47C>T, biochemical and OS/NS biomarkers, in individuals with PD
744 and in healthy controls.

745 MATERIALS AND METHODS

746 *Subjects*

747 This study was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human
748 Subjects of the State University of Londrina (CAAE 58604216.9.0000.5231). Sample size
749 was assessed considering prevalence of PD of 2% and confidence level of 95% [14]. The
750 study group consisted of 46 PD subjects enrolled from both the Neurology and the
751 Physiotherapy Specialized in PD Ambulatories, at the Clinical Hospital of the State University
752 of Londrina. PD was diagnosed according to United Kingdom PD Society Brain Bank (UKPD)
753 criteria [15]. The control group consisted of 46 volunteers with no previous history of
754 inflammatory/chronic disease, and tested for urea, creatinine, aminotransferases AST and
755 ALT, glucose, total protein, magnesium levels and lipid profile, with results within normal
756 reference interval. The subjects from both groups were matched for age, sex and ethnicity.

757 *DNA extraction*

758 DNA extraction was performed from leukocytes using a kit from Biopur[®] (São José
759 dos Pinhais, PR, Brazil) according to the manufacturer's protocol. For DNA concentration,
760 NanoDrop 2000c™ Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at
761 260 nm was used and purity was assessed by measuring the 260/280 ratio.

762 *MnSOD c.47C>T (rs4880) polymorphism genotyping*

763 Approximately 100 ng of extracted DNA were amplified using sequence-specific
764 primer polymerase chain reaction (PCR). The chosen primers were sense: 5'- ACC AGC
765 AGG CAG CTG GCG CCG G -3' and antisense 5'- GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG -3',
766 and amplification conditions were adapted from those described by Paludo et al. [13]. The
767 detection of polymorphisms was performed through Restriction Fragment Length
768 Polymorphism (RFLP) technique. PCR products were digested with the *BsaWI* restriction
769 enzyme. The C allele remained undigested, generating a 111 base pairs (bp) fragment, while
770 the T allele was digested into two fragments, 81 bp and 30 bp. Genotypes were sorted in
771 codominant, dominant and recessive genetic models, in order to evaluate their effects from
772 different perspectives.

773 *OS/NS biomarkers*

774 Advanced oxidation protein products (AOPP) [16], lipid hydroperoxides (LOOH)
775 [17,18], nitric oxide metabolites (NOx) [19], total radical-trapping antioxidant parameter
776 (TRAP) [20], paraoxonase 1 (PON-1) activity [21], and total sulfhydryl groups (SH) [22], were

777 evaluated according to previously described methods. TRAP results were corrected for UA
778 influence, referred as TRAP/UA.

779 *Biochemical biomarkers*

780 Analysis of urea, creatinine, aminotransferases AST and ALT, glucose, total protein,
781 magnesium levels, uric acid (UA), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL) and
782 triglycerides (TG) were performed on the Dimension[®], RxL (Deerfield, IL, USA) apparatus.
783 Low-density lipoprotein (LDL) levels were calculated by Friedewald equation [23].

784 *Statistical analysis*

785 Kolmogorov-Smirnov test was applied to assess the distribution of all variables.
786 Differences between groups concerning sociodemographic data and MnSOD genotypes
787 distribution were checked using the chi-squared test. Biochemical and OS/NS biomarkers
788 differences were evaluated by Student t or ANOVA, and Mann-Whitney or Kruskal-Wallis
789 tests, accordingly. Odds ratio (OR) was calculated for OS/NS biomarkers and MnSOD
790 genetic models by logistic binary regression, considering the HC group as reference.
791 Spearman and Pearson correlation tests were used to look for correlations among the
792 biomarkers. The tests were performed using the IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp.,
793 Armonk, N.Y., USA) software.

794

795 RESULTS

796

797 Socio-demographic data, biochemical and OS/NS results of both groups are shown in
798 Table 1. The groups were statistically similar regarding age, ethnicity and sex, but levels of
799 UA, TC, LOOH, TRAP/UA, PON-1 and NOx were significantly different. The binary logistic
800 regression was performed to test associations of biochemical and OS/NS biomarkers with
801 PD (Table 2), and UA showed a strong protective factor. MnSOD c.47C>T genotypes were
802 sorted in codominant, dominant and recessive genetic models to evaluate the polymorphism
803 from different perspectives. Genotypes and models distribution are shown in Table 3, with no
804 significant difference between groups. For PD subjects, the OS/NS biomarkers levels were
805 sorted according to *MnSOD* genotypes/models, in order to observe possible associations of
806 the polymorphism with the redox balance (Table 4). Correlation tests were applied to assess
807 interactions of OS/NS and biochemical biomarkers, and the most relevant results are shown
808 in Table 5.

809

810

811 **Table 1** - Distribution of socio-demographic data, biochemical and OS/NS
812 biomarkers in PD subjects and Healthy controls.

Variables	HC	PD	<i>p</i>
Age (years) ^a	71.85 (± 9.99)	70.09 (± 10.94)	0.42
Ethnicity (caucasian/other) ^b	33/13	34/12	0.82
Sex (f/m) ^b	25/21	27/19	0.67
UA ^c	5.10 (4.20-6.40)	4.30 (3.90-5.30)	<0.01
TC ^a	193.33(± 32.35)	176.15 (± 30.20)	0.01
HDL ^c	50.50 (40.00-59.00)	43.50 (38.00-52.00)	0.06
LDL ^a	120.46 (± 29.08)	110.56 (± 28.70)	0.19
TG ^c	101.00 (64.00-134.00)	84.50 (62.00-123.00)	0.25
LOOH ^c	1.46* (1.18*-1.92*)	1.94* (1.39*- 2.70*)	0.01
TRAP/UA ^c	200.15 (184.21-223.80)	234.06 (211.54-259.25)	<0.01
AOPP ^c	56.90 (49.71-72.75)	57.76 (49.40-71.49)	0.80
SH ^a	310.14 (± 43.77)	318.77 (± 51.88)	0.39
PON-1 ^a	183.53 (± 43.47)	160.37 (± 42.55)	0.01
NOx ^c	5.72 (4.89-7.86)	4.78 (4.12-6.51)	0.03

813 a: Student t test, b: Chi-squared test, c: Mann-Whitney test, *: x10⁶; HC: healthy controls; PD:
814 Parkinson disease; UA: uric acid, TC: total cholesterol, HDL: high density lipoprotein, LDL: low-density
815 lipoprotein, TG: triglycerides, LOOH: lipid hydroperoxides, TRAP/UA: total antioxidant parameter
816 adjusted by uric acid, AOPP: advanced oxidation protein products, SH: sulfhydryl groups, PON-1:
817 paraoxonase-1, NOx: nitric oxide metabolites
818

819

820

821

822

823

824 **Table 2** - Automatic binary logistic regression analysis of biochemical and
825 OS/NS biomarkers of PD subjects, considering Healthy controls as reference.

Biomarkers	Wald	OR	CI 95%	<i>p</i>
TC	1.50	0.34	0.06-1.91	0.22
HDL	1.26	2.69	0.48-15.13	0.26
LDL	1.48	2.93	0.52-16.59	0.23
TG	1.30	1.22	0.87-1.73	0.25
UA	11.90	0.41	0.25-0.68	<0.01
LOOH	5.22	1.00	1.00-1.00	<0.01
TRAP/UA	9.46	1.02	1.01-1.03	<0.01
AOPP	<0.01	0.99	0.99-1.02	0.98
SH	1.23	1.00	0.99-1.01	0.39
PON-1	8.19	0.98	0.98-0.99	<0.01
NOx	0.83	0.92	0.81-1.05	0.36

826 Values were adjusted for age, sex and ethnicity HC: healthy controls; PD: Parkinson disease;
827 UA: uric acid, TC: total cholesterol, HDL: high density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein,
828 TG: triglycerides, LOOH: lipid hydroperoxides, TRAP/UA: total antioxidant parameter adjusted
829 by uric acid, AOPP: advanced oxidation protein products, SH: sulfhydryl groups, PON-1:
830 paraoxonase-1, NOx: nitric oxide metabolites; OR: odds ratio; CI: confidence interval

831 **Table 3** - Distribution of MnSOD genotypes and genetic models between PD
832 subjects and Healthy controls.

	HC N (%)	PD N (%)	OR	CI 95%	<i>p</i>
Codominant					
TT	15 (33)	12 (26)	1.00	Reference	-
CT	22 (48)	25 (55)	1.43	0.55 - 3.72	0.46
CC	9 (19)	9 (19)	1.25	0.38 - 4.17	0.71
Dominant					
TT	31 (67)	34 (74)	1.00	Reference	-
CC + CT	15 (33)	12 (26)	0.72	0.29 - 1.79	0.49
Recessive					
CT + TT	37 (81)	37 (81)	1.00	Reference	-
CC	9 (19)	9 (19)	1.00	0.34 - 2.94	1.00

833 All genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium (Chi-squared test, $p > 0.05$). OR adjusted for
834 age, sex and ethnicity. HC: healthy controls; PD: Parkinson disease; OR: odds ratio; CI:
835 confidence interval

836

837

838 **Table 4** - Distribution of OS/NS biomarkers within the MnSOD genotypes and genetic
839 models in PD subjects.

	LOOH ^a	<i>p</i>	AOPP ^b	<i>p</i>	NOx ^b	<i>p</i>
Codominant						
TT	1.85* ($\pm 0.10^*$)	0.83	66.49 (41.59-83.93)	0.21	4.78 (4.51-5.28)	0.90
CT	1.95* ($\pm 0.75^*$)		52.87 (49.87-60.29)		4.63 (3.98-7.66)	
CC	2.06* ($\pm 0.57^*$)		71.49 (58.23-72.91)		5.84 (4.03-7.08)	
Dominant						
TT	1.98* ($\pm 0.70^*$)	0.68	57.16 (49.87-71.33)	0.58	4.72 (3.98-7.66)	0.73
CC + CT	1.85* ($\pm 0.10^*$)		66.49 (41.59-83.93)		4.78 (4.51-5.28)	
Recessive						
CT + TT	1.92* (± 0.83)	0.63	54.76 (49.40-67.23)	0.15	4.75 (4.31-6.11)	0.72
CC	2.06* (± 0.57)		71.49 (58.23-72.91)		5.84 (4.03-7.08)	
	TRAP/AU ^a	<i>p</i>	SH ^a	<i>p</i>	PON-1 ^b	<i>p</i>
Codominant						
TT	240.51 (± 55.15)	0.94	324.09 (± 73.26)	0.83	154.9 (135.7-195.7)	0.65
CT	239.58 (± 53.76)		319.45 (± 46.21)		161.3 (129.0-183.0)	
CC	246.54 (± 40.82)		309.77 (± 34.89)		167.0 (162.7-181.7)	
Dominant						
TT	241.43 (± 50.15)	0.96	316.89 (± 43.21)	0.75	163.1 (129.7-183.0)	0.84
CC + CT	240.51 (± 55.15)		324.09 (± 73.26)		154.9 (135.7-195.7)	
Recessive						
CT + TT	239.88 (± 53.44)	0.73	320.96 (± 55.39)	0.57	158.6 (129.0-186.5)	0.37
CC	246.54 (± 40.82)		309.77 (± 34.89)		167.0 (163.7-181.7)	

840 a - One-way ANOVA or Student t-test, b - Kruskal-Wallis or Mann-Whitney test; LOOH: lipid
841 hydroperoxides, TRAP/UA: total antioxidant parameter adjusted by uric acid, AOPP: advanced oxidation
842 protein products, SH: sulfhydryl groups, PON-1: paraoxonase-1, NOx: nitric oxide metabolites

843

844

Table 5 - Correlations of OS/NS and biochemical biomarkers in PD group

Variables	Coefficient	<i>p</i>
TC x LDL ^a	0.92	<0.01
TC x PON-1 ^a	0.35	0.02
TRAP/UA x HDL ^b	0.41	<0.01
TG x HDL ^b	- 0.52	<0.01
NOx x SH ^b	- 0.44	<0.01

845

846

847

848

a - Pearson correlation coefficient, b - Spearman correlation rank, TC: total cholesterol, LDL: low-density lipoprotein, PON-1: paraoxonase-1, TRAP: total antioxidant parameter adjusted by uric acid, HDL: high-density lipoprotein, TG: triglycerides, NOx: nitric oxide metabolites, SH: sulfhydryl groups

849

850 DISCUSSION

851

852

853

854

855

856

857

858

859

The MnSOD polymorphism was not associated with PD development and no influence of the polymorphism over the OS/NS biomarkers was observed as well. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the *MnSOD* c.47C>T polymorphism and its relationship with biochemical and OS/NS biomarkers on PD individuals from the Brazilian population. Aside from that, we observed that the LOOH and TRAP/UA levels were significantly higher in PD group, while TC, UA, PON-1 and NOx levels were significantly lower, when compared to controls. Moreover, PON-1 and UA were protective factors for disease onset.

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870

871

872

873

No associations were observed of MnSOD c.47C>T polymorphism with chance for disease development, nor with OS/NS biomarkers. This finding is in agreement with previous studies. Grasbon-Frodl et al. [24], although observing the presence of T allele (Val) in German individuals with PD, the alleles and genotypes were equally distributed in cases and controls. Farin et al. [25], Wang et al. [26] and Redenšek et al. [27] also didn't find differences in the distribution between subjects with PD and healthy controls in the American, Chinese and Slovenian population, respectively. Contradictorily, Liu et al. [28] found a significant difference in the Chinese population and reported that C allele (Ala) was associated with a higher risk for PD. This polymorphism was first reported in humans by Shimoda-Matsubayashi et al. [29], who described that the substitution of the T allele (Val) would result in a conformational change in the mitochondrial targeting sequence, altering the capacity of MnSOD to be transported into the mitochondrial matrix. They also reported a significant difference in genotypes frequency between PD subjects and controls in the Japanese population.

874

875

876

LOOH levels were observed higher in PD subjects than in controls. This finding is in agreement with the literature. A recent meta-analysis [30] evaluated the data of 17 published articles that assayed OS/NS biomarkers in peripheral plasma of PD individuals, and two of

877 the biomarkers found significant were lipoperoxidation related: LOOH and malondialdehyde
878 (MDA). Lipoperoxidation seems to play an important role in PD, considering the high oxygen
879 consumption, the large amount of lipids and the constant energy production of the brain. That
880 being said, we believe that some of the LOOH found in PD subjects' plasma might be
881 derived from the brain, more specifically oxidized lipids that managed to cross the blood-
882 brain barrier (BBB) and were detected in peripheral blood. The LOOH intrinsic lipophilic
883 characteristics and the loss of selective permeability of BBB observed in PD [31], supports
884 this possibility.

885 PON-1 is an enzyme attached to HDL particle, with important antioxidant properties.
886 PON-1 prevents oxidation of LDL, scavenges and neutralizes oxLDL-related lipids, and even
887 promotes the release of oxLDL from macrophages, keeping them from turning into
888 deleterious foam cells [32,33]. We found a significant low OR value (Table 2), indicating
889 PON-1 protective role, although PON-1 activity was found significantly lower in PD group
890 (Table 1). This result concurs with those reported by Ikeda et al. [34], where PON-1 activity
891 was lower in PD subjects than in healthy individuals in the Japanese population. A positive,
892 significant correlation of PON-1 and TC can be observed in Table 5, suggesting that PON-1
893 activity might be under the influence of other lipidic molecules, aside from just HDL.

894 The NO_x levels were found significantly lower in PD subjects (Table 1). We also
895 observed an inverse correlation of NO_x with SH levels in the same group. These findings
896 suggest that peripheral NO_x levels are possibly being regulated by systemic antioxidant
897 mechanisms. The overall antioxidant defenses were originally expected to be diminished
898 within the PD group, however TRAP/UA was found increased in these subjects (Table 1). We
899 believe this might be a compensatory mechanism where antioxidant defenses are being
900 systemically produced/expressed, as an attempt to neutralize the local ROS/RNS production
901 taken place in the SNpc. Therefore, the higher TRAP/UA observed is more likely to be a
902 consequence of disease than a cause. This might be a stretch, but it could explain the
903 significantly increased OR associated with TRAP/UA, observed in Table 2. Besides,
904 although NO is known to be associated with important brain-related processes in PD, such
905 as microglia activation and neuroinflammation, specially due to peroxynitrite production [35],
906 our data suggest that NO might not be as relevant to OS/NS processes in the periphery. In
907 the literature, studies have not reported significant differences of blood NO levels between
908 PD and HC as well [8,36,37].

909 The UA levels were lower in PD subjects, compared to controls (Table 1). UA is the
910 end product of purines and its properties depend on concentration. At physiological blood
911 levels, UA is a powerful antioxidant and accounts for up to 60% of plasma antioxidant
912 capacity. It scavenges oxygen and nitrogen radicals, stabilizes iron complexes [38], and

913 prevents inactivation of extracellular SOD3 [39]. On the other hand, at high levels or
914 hyperuricemia, UA is prone to form crystals that trigger pro-inflammatory responses, being
915 most common in joints (resulting in gouty arthritis), blood vessels (leading to cardiovascular
916 issues) and kidneys (forming renal calculi). However, on neurodegenerative diseases, high
917 levels of UA seem to have a protective effect and studies reported higher levels of UA to
918 reduce the risk for PD development [40] and to influence clinical progression as well [41]. In
919 Table 2, UA showed a significative low OR, suggesting indeed to be a protective factor.
920 Studies also observed UA protective effect significantly stronger in males than in females
921 [42]. Interestingly, sorting results by sex, our data showed that UA protective effect remained
922 significant in females only (OR 0.21, CI 95% 0.08-0.56, $p < 0.01$, data not shown).

923 Nevertheless, this study has limitations. We were unable to measure the SOD2
924 isoform, directly or indirectly. Our team have published other studies where SOD activity was
925 assessed [43], however the methodology applied was specific for red blood cells, which is a
926 good source for SOD1, but not for SOD2. Socio-economic status was not evaluated to match
927 cases and controls; however, all the subjects were carefully and meticulously selected. It was
928 vital to choose individuals without inflammatory or chronic comorbidities, since they could
929 disrupt the OS/NS parameters. It was also reasonably challenging, considering the advanced
930 age of PD subjects to be matched with healthy individuals. At last, even though this study
931 was carried out in a reference center for movement disorders of Londrina's region, new
932 studies with support of multiple institutions might be able to reach more subjects, with
933 stronger statistical results.

934 Besides all that, this study screens, analyzes and provides new insights about the
935 relationship of a range of biomarkers, some never even evaluated in the Brazilian population
936 before. In conclusion, *MnSOD* polymorphism was not associated with PD development,
937 neither with the OS/NS parameters. However, some biomarkers demonstrated interesting
938 protective effects for PD susceptibility, such as PON-1 and UA, which could potentially
939 represent new approaches for laboratorial evaluation of disease.

940

941 REFERENCES

942

943 [1] Trist BG, Hare DJ, Double KL (2019). Oxidative stress in the aging substantia nigra and
944 the etiology of Parkinson's disease. *Aging cell* 18(6), e13031.
945 <https://doi.org/10.1111/accel.13031>

946 [2] Xicoy H, Wieringa B, Martens G (2019). The Role of Lipids in Parkinson's Disease. *Cells*
947 8(1) 27. <https://doi.org/10.3390/cells8010027>

- 948 [3] Lindholm D, Mäkelä J, Di Liberto V, Mudò G, Belluardo N, Eriksson O, Saarma M (2016)
949 Current disease modifying approaches to treat Parkinson's disease. *Cellular and molecular*
950 *life sciences* 73(7):1365–1379. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2101-1>
- 951 [4] Tan SH, Karri V, Tay N, Chang KH, Ah HY, Ng PQ et al. (2019) Emerging pathways to
952 neurodegeneration: Dissecting the critical molecular mechanisms in Alzheimer's disease,
953 Parkinson's disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*
954 111:765–777. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.101>
- 955 [5] Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, et al. (2016)
956 Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *Journal of neurology, neurosurgery and*
957 *spine* 1(1):1003
- 958 [6] Pozo Devoto VM, Falzone TL (2017). Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: a
959 role for α -synuclein?. *Disease models & mechanisms* 10(9): 1075–1087.
960 <https://doi.org/10.1242/dmm.026294>
- 961 [7] de Farias CC, Maes M, Bonifácio KL, Bortolasci CC, de Souza Nogueira A, Brinholi FF et
962 al. (2016) Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's
963 disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets.
964 *Neuroscience letters* 617:66–71. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.011>
- 965 [8] Fraunberger EA, Scola G, Laliberté VL, Duong A, Andreatza AC (2016) Redox
966 Modulations, Antioxidants, and Neuropsychiatric Disorders. *Oxidative medicine and cellular*
967 *longevity* 2016: 4729192. <https://doi.org/10.1155/2016/4729192>
- 968 [9] Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S (2015) The Role of Oxidative Stress in
969 Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology* 24(4):325–340.
970 <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>
- 971 [10] Yu Z, Zhang S, Wang D, Fan M, Gao F, Sun W, Li Z, Li S (2017) The significance of uric
972 acid in the diagnosis and treatment of Parkinson disease: An updated systemic review.
973 *Medicine* 96(45) e8502. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008502>
- 974 [11] Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular
975 function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling* 15(6):1583–1606.
976 <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>

- 977 [12] Bresciani G, da Cruz IB, González-Gallego J (2015) Manganese superoxide dismutase
978 and oxidative stress modulation. *Advances in clinical chemistry* 68:87–130.
979 <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.001>
- 980 [13] Paludo FJ, Simões-Pires A, Alho CS, Gelain DP, Moreira JC (2013) Participation of
981 47C>T SNP (Ala-9Val polymorphism) of the SOD2 gene in the intracellular environment of
982 human peripheral blood mononuclear cells with and without lipopolysaccharides. *Molecular
983 and cellular biochemistry* 372(1-2):127–135. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1453-1>
- 984 [14] Pourhoseingholi MA, Vahedi M, Rahimzadeh M. (2013) Sample size calculation in
985 medical studies. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* 6(1):14–17.
- 986 [15] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of
987 idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol.
988 Neurosurg. Psychiatry* 55:181-184. <https://10.1136/jnnp.55.3.181>.
- 989 [16] Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Jonsson G (2012)
990 Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica chimica acta*
991 413(9-10):901–906. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.01.038>
- 992 [17] Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated
993 chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle.
994 *Free radical biology & medicine* 10(2):93–100. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-k](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-k)
- 995 [18] Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, et al. (2012)
996 Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to
997 paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast cancer research and treatment* 133(1):89–97.
998 <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1693-x>
- 999 [19] Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J (1998) Semiautomated
1000 measurement of nitrate in biological fluids. *Clinical chemistry* 44(3):679–681.
- 1001 [20] Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S (1996)
1002 Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica chimica acta* 255(2):107–117.
1003 [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(96\)06394-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(96)06394-2)
- 1004 [21] Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE (2008) Determination of paraoxonase 1 status without
1005 the use of toxic organophosphate substrates. *Circulation. Cardiovascular genetics* 1(2):147–
1006 152. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.811638>

- 1007 [22] Hu ML (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods*
1008 *in enzymology* 233:380–385. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33044-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33044-1).
- 1009 [23] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-
1010 density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge.
1011 *Clinical chemistry* 18(6):499–502.
- 1012 [24] Grasbon-Frodl EM, Kösel S, Riess O, Müller U, Mehraein P, Graeber MB (1999)
1013 Analysis of mitochondrial targeting sequence and coding region polymorphisms of the
1014 manganese superoxide dismutase gene in German Parkinson disease patients. *Biochemical*
1015 *and biophysical research communications* 255(3):749–752.
1016 <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9998>
- 1017 [25] Farin FM, Hitoş Y, Hallagan SE, Kushleika J, Woods JS, Janssen PS et al. (2001)
1018 Genetic polymorphisms of superoxide dismutase in Parkinson's disease. *Movement*
1019 *disorders* 16(4):705–707. <https://doi.org/10.1002/mds.1153>
- 1020 [26] Wang V, Chen SY, Chuang TC, Shan DE, Soong BW, Kao MC (2010). Val-9Ala and
1021 Ile+58Thr polymorphism of MnSOD in Parkinson's disease. *Clinical biochemistry*
1022 43(12):979–982. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.05.009>.
- 1023 [27] Redenšek S, Flisar D, Kojović M, Kramberger MG, Georgiev D, Pirtošek Z, Trošt M,
1024 Dolžan V (2019) Genetic variability of inflammation and oxidative stress genes does not play
1025 a major role in the occurrence of adverse events of dopaminergic treatment in Parkinson's
1026 disease. *Journal of neuroinflammation* 16(1):50. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1439-y>
- 1027 [28] Liu C, Fang J, Liu W (2019) Superoxide dismutase coding of gene polymorphisms
1028 associated with susceptibility to Parkinson's disease. *Journal of integrative neuroscience*
1029 18(3):299–303. <https://doi.org/10.31083/j.jin.2019.03.127>
- 1030 [29] Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y,
1031 Mizuno Y (1996) Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human
1032 manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to
1033 influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease.
1034 *Biochemical and biophysical research communications* 226(2):561–565.
1035 <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1394>
- 1036 [30] Khan Z, Ali SA (2018) Oxidative stress-related biomarkers in Parkinson's disease: A
1037 systematic review and meta-analysis. *Iranian journal of neurology* 17(3):137–144.

- 1038 [31] Costea L, Mészáros Á, Bauer H, Bauer HC, Traweger A, Wilhelm I, et al. (2019) The
1039 Blood-Brain Barrier and Its Intercellular Junctions in Age-Related Brain Disorders.
1040 International journal of molecular sciences 20(21): 5472.
1041 <https://doi.org/10.3390/ijms20215472>
- 1042 [32] White CR, Anantharamaiah GM (2017) Cholesterol reduction and macrophage function:
1043 role of paraoxonases. Current opinion in lipidology 28(5):397–402.
1044 <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000444>
- 1045 [33] Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A (2017) Antioxidative activity of high-density
1046 lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. BBA clinical 8:66–77.
1047 <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2017.07.002>
- 1048 [34] Ikeda K, Nakamura Y, Kiyozuka T, Aoyagi J, Hirayama T, Nagata R, et al. (2011)
1049 Serological profiles of urate, paraoxonase-1, ferritin and lipid in Parkinson's disease: changes
1050 linked to disease progression. Neurodegenerative diseases 8(4):252–258.
1051 <https://doi.org/10.1159/000323265>
- 1052 [35] Gandhi S, Abramov AY (2012) Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration.
1053 Oxidative medicine and cellular longevity 2012:428010. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>
- 1054 [36] Tuncel D, Inanc Tolun F, Toru I (2009) Serum insulin-like growth factor-1 and nitric oxide
1055 levels in Parkinson's disease. Mediators of inflammation 2009:132464.
1056 <https://doi.org/10.1155/2009/132464>
- 1057 [37] Sanyal J, Sarkar BN, Banerjee TK, Mukherjee SC, Ray BC, Rao VR (2010) Plasma level
1058 of nitrates in patients with Parkinson's disease in West Bengal. Neurology Asia 15(1):55-59.
- 1059 [38] Tana C, Ticinesi A, Prati B, Nouvenne A, Meschi T (2018). Uric Acid and Cognitive
1060 Function in Older Individuals. Nutrients 10(8):975. <https://doi.org/10.3390/nu10080975>
- 1061 [39] Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V (2016) Regulation of uric acid
1062 metabolism and excretion. International journal of cardiology 213:8–14.
1063 <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.109>
- 1064 [40] Jesús S, Pérez I, Cáceres-Redondo MT, Carrillo F, Carballo M, Gómez-Garre P, Mir P
1065 (2013) Low serum uric acid concentration in Parkinson's disease in southern Spain.
1066 European journal of neurology 20(1):208–210. [https://doi.org/10.1111/j.1468-](https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03745.x)
1067 [1331.2012.03745.x](https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03745.x)

- 1068 [41] Yu Z, Zhang S, Wang D, Fan M, Gao F, Sun W, Li Z, Li S (2017) The significance of uric
1069 acid in the diagnosis and treatment of Parkinson disease: An updated systemic review.
1070 *Medicine* 96(45):e8502. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008502>
- 1071 [42] Schwarzschild MA, Schwid SR, Marek K, Watts A, Lang AE, Oakes D, et al. (2008)
1072 Serum urate as a predictor of clinical and radiographic progression in Parkinson disease.
1073 *Archives of neurology* 65(6):716–723. <https://doi.org/10.1001/archneur.2008.65.6.nct70003>
- 1074 [43] Maes M, Bonifácio, KL, Morelli NR, Vargas HO, Barbosa DS, Carvalho AF, et al. (2019)
1075 Major Differences in Neurooxidative and Neuronitrosative Stress Pathways Between Major
1076 Depressive Disorder and Types I and II Bipolar Disorder. *Molecular neurobiology* 56(1):141–
1077 156. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1051-7>

1078 5 CONCLUSÃO

1079

1080 Diante do exposto, é possível delinear algumas conclusões. Em primeiro lugar, os
1081 critérios utilizados para o recrutamento de indivíduos foram eficazes, resultando em grupos
1082 significativamente homogêneos, uma vez que não foi observada diferença estatística nas
1083 variáveis sociodemográficas avaliadas (sexo, idade e etnia). Em relação aos parâmetros
1084 bioquímicos e de EO/EN, como AU e PON-1, que apresentaram efeitos protetores, poderiam
1085 representar uma nova abordagem para avaliação laboratorial à doença, complementando
1086 esta com informações sob outra perspectiva. Sobre os polimorfismos genéticos, apesar de
1087 não ter sido encontrada diferença na distribuição entre os grupos, as associações
1088 observadas entre os polimorfismos *NFkB1* e *NFkBIA* e biomarcadores de EO/EN nos
1089 indivíduos com DP, sugere que polimorfismos possam, de fato, modular a expressão de
1090 elementos envolvidos nos processos oxidativos, nitrosativos e inflamatórios, de forma a
1091 estarem associados com o desenvolvimento da DP.

1092

1093 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1094

1095 Mais estudos são necessários para determinar, com maior precisão e clareza, a
1096 natureza da relação entre os polimorfismos e as variáveis bioquímicas e de EO/EN no
1097 desenvolvimento da doença. Estudos longitudinais, por exemplo, poderiam proporcionar
1098 condições para esclarecer a influência dos parâmetros avaliados, estabelecendo a real
1099 causalidade entre eles e a DP. Além disso, outros agentes, vias e mecanismos ainda
1100 permanecem desconhecidos. Considerando isso, a avaliação de outros elementos
1101 envolvidos no EO/EN e na inflamação poderia representar uma nova abordagem para
1102 ampliar o conhecimento sobre a doença e contribuir para a elucidação de sua etiologia.
1103 Desta forma, os resultados obtidos neste estudo fornecem evidências e conhecimento para
1104 futuros trabalhos que possam vir a explorar outros parâmetros genéticos, bioquímicos e de
1105 EO/EN na DP.

REFERÊNCIAS

- ANTHONY, P. M. A.; DIEDERICH, N. J.; KRÜGER, R.; BALLING, R. The Hallmarks of Parkinson's disease. **FEBS Journal**, v. 280, n. 2013, p. 5981-5993, 2013.
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA**, v. 323, n. 6, p. 548-560, 2020.
- BIANCO, B.; LERNER, T. G.; TREVISAN, C. T. CAVALCANTI, V.; CHRISTOFOLINI, D. M.; BARBOSA, C. P. The nuclear factor-kB functional promoter polymorphism is associated with endometriosis and infertility. **Human Immunology**, v. 73, p. 1190-1193, 2012.
- BLESA, J.; TRIGO-DAMAS, I.; QUIROGA-VARELA, A.; JACKSON-LEWIS, V. R. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Front. Neuroanat.**, v. 9, n. 91, 2015.
- BOUÇA-MACHADO, R.; ROSÁRIO, A.; CALDEIRA, D.; CALDAS, A. C.; GUERREIRO, D.; VENTURELLI, M.; TINAZZI, M.; SCHENA, F.; FERREIRA, J. J. Physical Activity, Exercise, and Physiotherapy in Parkinson's Disease: Defining the Concepts. **Mov. Disord. Clin. Pract.**, v. 7, n. 1, p. 7–15, 2019.
- BOVOLENTA, T. M.; FELÍCIO, A.C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **Einstein (São Paulo)**, v.14, n.3, p.7-9, jul-set 2016.
- BRESCIANI, G; CRUZ, I. B. M.; de PAZ, J. A.; CUEVAS, M. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The MnSOD Ala16Val SNP: Relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radical Research**, v.47, n. 10, p. 781-792, 2013.
- CAPLAN, I. F.; MAGUIRE-ZEISS, K. A. Toll-Like Receptor 2 Signaling and Current Approaches for Therapeutic Modulation in Synucleinopathies. **Front. Pharmacol.**, v. 9, n. 417, p. 1-18, 2018.
- CHENG, Y-C.; SU, C-H. Evidence Supports PA Prescription for Parkinson's Disease: Motor Symptoms and Non-Motor Features: A Scoping Review. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.17, p. 1-13, 2020.
- CHIARELLA P, CAPONE P, SISTO R. The Role of Genetic polymorphisms in the Occupational Exposure. The Recent Topics in Genetic Polymorphisms, Mahmut Çalışkan, Osman Erol and Gül Cevahir Öz, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.86975. Available from: <https://www.intechopen.com/books/the-recent-topics-in-genetic-polymorphisms/the-role-of-genetic-polymorphisms-in-the-occupational-exposure>, **Intech**, 2019.
- DEL REY, N. L.; QUIROGA-VARELA, A.; GARBAYO, E.; CARBALLO-CARBAJAL, I.; FERNÁNDEZ-SANTIAGO, R.; MONJE, M.; TRIGO-DAMAS, I.; BLANCO-PRIETO, M. J.; BLESA, J. Advances in Parkinson's Disease: 200 Years Later. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 12, n. 113, p. 1-14, 2018.
- DORSEY, E. R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J. P.; BIGLAN, K. M.; HOLLOWAY, R. G.; KIEBURTZ, K.; MARSHALL, F. J.; RAVINA, B. M.; SCHIFFITTO, G.; SIDEROWF, A.; TANNER, C. M. Projected Number of People With Parkinson Disease in the Most Populous Nations, 2005 Through 2030. **Neurology**, v. 68 n.5, p. 384-386, 2007.
- DORSEY, E. R.; ELBAZ, A.; NICHOLS, E.; ABD-ALLAH, F.; ABDELALIM, A.; ADSUAR J.C. *et al.* Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic

analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 939-953, 2016.

ESPÍN-PALAZÓN, R.; TRAVER, D. The NF- κ B family: Key players during embryonic development and HSC emergence. **Experimental Hematology**, v.44, p.519-527, 2016.

FRIEDEWALD, W. T., LEVY, R. I., FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanisms of Oxidative Stress in Neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

GOETZ, C.G.; POEWE, W.; RASCOL, O.; SAMPAIO, C.; STEBBINS, G.T.; COUNSELL, C.; GILADI, N.; HOLLOWAY, R.G.; MOORE, C.G.; WENNING, G.K.; YAHR, M.D.; SEIDL, L. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: Status and recommendations The Movement Disorder Society Task Force on rating scales for Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v. 19, p. 1020-1028, 2004.

GÓMEZ-BENITO, M.; GRANADO, N.; GARCÍA-SANZ, P.; MICHEL, A.; DUMOULIN, M.; MORATALLA, R. Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. **Front Pharmacol**, v. 11, n. 356, p 1-15, 2020.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 10, p. 93–100, 1991. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-k](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-k).

GUZMAN-MARTINEZ, L.; MACCIONI, R. B.; ANDRADE, V.; NAVARRETE, L. P.; PASTOR, M. G.; RAMOS-ESCOBAR, N. Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders. **Front. Pharmacol.** v. 10, n. 1008, p. 1-17, 2019.

HANASAND, M.; OMDAL, R.; NORHEIM, K. B. ; GØRANSSON, L. G.; BREDE, C.; JONSSON, G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clin. Chim. Acta.** v. 413, p. 901-906, 2012. <https://10.1016/j.cca.2012.01.038>.

HOENEN, C.; GUSTIN, A.; BIRCK, C.; KIRCHMEYER, M.; BEAUME, N.; FELTEN, P.; GRANDBARBE, L.; HEUSCHLING, P.; HEURTAUX, T. Alpha-Synuclein Proteins Promote Pro-Inflammatory Cascades in Microglia: Stronger Effects of the A53T Mutant. **PLoS One**, v. 11, n. 9, e0162717, 2016.

HOLLEY, A. K.; BAKTHAVATCHALU, V.; VELEZ-ROMAN J. M.; SAINT CLAIR D. K. Manganese Superoxide Dismutase: Guardian of the Powerhouse. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, p. 7114-7162, 2011.

HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 380–385, 1994.

HUGHES, A. J.; DANIEL, S. E.; KILFORD, L.; LEES, A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 55, n. 3, p. 181-184, 1992.

ILLES, P.; RUBINI, P.; ULRICH, H.; ZHAO, Y.; TANG, Y. Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS. **Cells**, v. 9, n. 1108, p. 1-24, 2020.

JĘŚKO, H.; LENKIEWICZ, A. M.; WILKANIEC, A.; ADAMCZYK, A. The interplay between parkin and alpha-synuclein; possible implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. **Acta Neurobiol. Exp.**, v. 79, p. 277-290, 2019.

KARKI, R.; PANDYA, D.; ELSTON, R. C.; FERLINI, C. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. **BMC Medical Genomics**, v. 8, n. 37, p. 1-7, 2015.

KEMPURAJ, D.; THANGAVEL, R.; NATTERU, P. A.; SELVAKUMAR, G. P. SAEED, D.; ZAHOOR, H.; ZAHEER, S.; IYER, S. S.; ZAHEER, A. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **Neurol Neurosurg Spine**, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2016.

KIM, G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 21, n. 1, p. 325-340, 2015.

KIM, H. J.; JEON, B. S.; JENNER, P. Hallmarks of Treatment Aspects: Parkinson's Disease Throughout Centuries Including L-Dopa. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 132, p. 295–343, 2017.

KINCSES, Z. T.; VECSEI, L. Pharmacological Therapy in Parkinson's Disease: Focus on Neuroprotection. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 11, n. 5, p. 345-367, 2011.

KOC, A.; BATAR, B.; CELIK, O.; ONARAN, I.; TASAN, E.; SULTUYBEK, G.K. Polymorphism of the NFKB1 affects the serum inflammatory levels of IL-6 in Hashimoto thyroiditis in a Turkish population, **Immunobiology**, v. 219, p. 531-536, 2014.

KRAUß, J.; BRACHER, F. Pharmacokinetic Enhancers (Boosters)—Escort for Drugs against Degrading Enzymes and Beyond. **Sci. Pharm.**, v. 86, n. 43, p. 1-28, 2018.

KURUTAS E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 71, p. 1-22, 2016.

LAMONACA, J.; VOLTA, M. Alpha-Synuclein and LRRK2 in Synaptic Autophagy: Linking Early Dysfunction to Late-Stage Pathology in Parkinson's Disease. **Cells**, v. 9, n.; 1115, p. 1-21, 2020.

LEVY, D.; REICHERT, C. O.; BYDLOWSKI, S. P. Paraoxonases Activities and Polymorphisms in Elderly and Old-Age Diseases: An Overview. **Antioxidants**, v.8, n.118, p. 1-24, 2019.

LI, X.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E. T.; WANG, H.; YANG, X-F. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **J. Hematol. Oncol.**, v. 6, n. 19, 2013.

LINDHOLM, D.; MÄKELÄ, J.; DI LIBERTO, V.; MUDÒ, G.; BELLUARDO, N.; ERIKSSON, O.; SAARMA, M. Current disease modifying approaches to treat Parkinson's disease. **Cellular and molecular life sciences**, v. 73, n. 7, p. 1365–1379, 2016.

MEONI, S.; MACEROLLO, A.; MORO, E. Sex differences in movement disorders. **Nat Rev Neurol** v. 16, p. 84–96, 2020.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 3, p. 679–681, 1998.

OLTULU, Y. M.; COSKUNPINAR, E.; OZKAN, G.; AYNACI, E.; YILDIZ, P.; ISBIR, T.; YAYLIM, I. Investigation of NF- κ B1 and NF- κ BIA Gene Polymorphism in Non-Small Cell Lung Cancer. **Biomed Research International**, v. 2014, ID 530381, 2014.

PALASZ, E.; NIEWIADOMSKI, W.; GASIOROWSKA, A.; MIETELSKA-POROWSKA, A.; NIEWIADOMSKA, G. Neuroplasticity and Neuroprotective Effect of Treadmill Training in the Chronic Mouse Model of Parkinson's Disease. **Neural. Plast.**, v. 2019, n. 8215017, p. 1-14, 2019.

PALUDO, F. J. O.; SIMÕES-PIRES, A.; ALHO, C. S.; GELAINS, D. P.; MOREIRA, J. C. F. Participation of 47C>T SNP (Ala-9Val polymorphism) of the SOD2 gene in the intracellular environment of human peripheral blood mononuclear cells with and without lipopolysaccharides. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 2013, n. 372, p. 127-135, 2013.

PANIS, C.; HERRERA, A. C.; VICTORINO, V. J.; CAMPOS, F. C.; FREITAS, L. F.; DE ROSSI, T.; COLADO SIMÃO, A. N.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI, R. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Res. Treat.** v. 133, n. 1, p. 89-97, 2012.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.**, v.14, n.2, p. 223-236, 1817.

POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; HALLIDAY, G. M.; BRUNDIN, P.; VOLKMANN, J.; SCHRAG, A.-E.; LANG, A. E. Parkinson disease. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v.3, n. 17013, p. 1-21, 2017.

POURHOSEINGHOLI, M. A.; VAHEDI, M.; RAHIMZADEH, M. Sample size calculation in medical studies. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**, v. 6, n. 1, p. 14–17, 2013.

REKATSINA, M.; PALADINI, A.; PIROLI, A.; ZIS, P.; PERGOLIZZI, J. V.; VARRASSI, G. Pathophysiology and Therapeutic Perspectives of Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review. **Adv. Ter.**, v. 37, p. 113-139, 2020.

REPETTO, M.; REIDES, C.; GOMEZ CARRETERO, M. L.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY, S. (1996) Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin.Chim. Acta.**, v. 255, n. 2, p. 107–117, 1996.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circ. Cardiovasc. Genet.**, v. 1, n. 2, p. 147–152, 2008.

SIMONIAN, M.; MOSALLAYI, M.; MIRAGHAJANI, M.; FEIZI, A.; KHOSRAVI, S.; SALEHI, A. R.; MORTAZAVI, D.; SABERI, F.; SALEHI, R. Single nucleotide polymorphism rs696 in miR449a binding site of NFKBIA gene is correlated with risk of colorectal cancer. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**, v.11 , n.1, p. 48–53, 2018.

SIVANDZADEA, F.; PRASADB, S.; BHALERAOA, A.; CUCULLO, L. NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. **Redox Biology**, n. 21, p. 1-16, 2019.

SMITH, Y.; WICHMANN, T.; FACTOR, S. A.; DELONG, M. R. Parkinson's Disease Therapeutics: New Developments and Challenges Since the Introduction of Levodopa. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p. 213-246, 2012.

STANGA, S.; CARETTO, A.; BOIDO, M; VERCELLI, A. Mitochondrial Dysfunctions: A Red Thread across Neurodegenerative Diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 3719, 2020.

TAN, S. H.; KARRI, V.; TAY, N. W. R.; CHANG, K. H.; AH., H. Y.; NG, P. Q.; HO, H. S.; KEH, H. W.; CANDASAMY, M. Emerging pathways to neurodegeneration: dissecting the critical molecular mechanisms in Alzheimer's disease, Parkinson's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.111, p.765-777, 2019.

TAYLAN, E.; RESMI, H. The Analytical Performance of a Microplate Method for Total Sulfhydryl Measurement in Biological Samples. **Turk. J. Biochem.** v.35, n.3, p. 275-278, 2010.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**, v. 18, n. 6: e13031, p. 1-23, 2019.

ULLAH, R.; KHAN, M.; SHAH, S. A.; SAEED, K.; KIM, M. O. Natural Antioxidant Anthocyanins - A Hidden Therapeutic Candidate in Metabolic Disorders with Major Focus in Neurodegeneration. **Nutrients**, v. 11, n. 1195, 2019.

VÁRADI, C. Clinical Features of Parkinson's Disease: The Evolution of Critical Symptoms. **Biology**, v. 9, n. 103, p. 1-13, 2020.

YENMIS, G.; ONER, T.; CAM, C.; KOC, A.; KUCUK, O. S.; YAKICIER, M. C.; DIZMAN, D.; SULTUYBEK, G. K. Association of NFKB1 and NFKBIA Polymorphisms in Relation to Susceptibility of Behçet's Disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 81, p. 81-86, 2015.

WAHAB, D. Y. A. A.; GAU, C. H.; ZAKARIA, R.; KARUPPAN, M. K. M.; A-RAHBI B. S.; ABDULLAH, Z.; ALRAFIAH, A.; ABDULLAH, J. M.; MUTHURAJU, S. Review on Cross Talk between Neurotransmitters and Neuroinflammation in Striatum and Cerebellum in the Mediation of Motor Behaviour. **BioMed Research International**, v. 2019, ID. 1767203, p. 1-10, 2019.

WANG, X.; PENG, H.; LIANG, Y.; SUN, R.; WEI, T.; LI, Z.; GONG, Y.; GONG, R.; LIU, F.; ZHANG, L.; ZHU, J. A functional insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases the risk of papillary thyroid carcinoma. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 19, n. 3, p. 167-171, 2015.

WILLIS, A. W. Parkinson Disease in the Elderly Adult. **Mo. Med.**, v. 110, n. 5, p. 406-410, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Termo De Consentimento - Grupo Parkinson**Termo de consentimento livre e esclarecido****Pesquisa:**

Análise de polimorfismos genéticos, biomarcadores inflamatórios, bioquímicos e de estresse oxidativo em pacientes com a doença de Parkinson em diferentes estágios da doença.

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(la) a participar da pesquisa “Análise de polimorfismos genéticos, biomarcadores inflamatórios, bioquímicos e de estresse oxidativo em pacientes com a doença de Parkinson em diferentes estágios da doença”, realizada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é avaliar pacientes com DP nos estágios I a IV sem demência, segundo a escala de Hoehn e Yarhr em seus diferentes esquemas terapêuticos, quantificando marcadores bioquímicos, genéticos, de estresse oxidativo e inflamatórios buscando correlacionar os resultados encontrados com a progressão da doença assim como também em pacientes sem essa patologia. A sua participação é muito importante e ela se daria pela doação de 45 mL de sangue por punção venosa (15mL de sangue com EDTA, 25mL de soro e 5mL de sangue com fluoreto) em uma única etapa, em apenas um momento, sendo todos os materiais usados descartáveis. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas para fins desta e de outras pesquisas que, eventualmente, poderão ser realizadas utilizando-se o banco de dados/amostras obtidas neste trabalho, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esperamos que essa pesquisa permita verificar se os marcadores genéticos, bioquímicos, de estresse oxidativo e inflamatórios propostos são interessantes para averiguar se há algum destes que possa contribuir na prevenção, acompanhamento e terapêutica na doença de Parkinson.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação nesta.

Os benefícios esperados são que de acordo com os resultados obtidos, uma nova abordagem terapêutica para a doença de Parkinson poderá ser desenvolvida. Quanto aos riscos, nenhum dos procedimentos utilizados constitui risco direto para a integridade física ou moral dos participantes. Entretanto, em alguns pacientes mais sensíveis pode ocorrer certo desconforto no momento da coleta de sangue como a lipotimia, que é uma sensação de mal estar levando a pessoa a um estado de quase desmaio. Nesta situação, a equipe de coleta que está treinada para esta intercorrência, prontamente prestará atendimento adequado.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contatar: professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa ((43) 3371-2451), Farmacêutico Thiago Hissnauer Leal Baltus ((43) 8824-5191), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 20__.

Décio Sabbatini Barbosa

(RG: 13.163.452 SSP-SP)

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

APÊNDICE B: Termo de Consentimento - Grupo Controle**Termo de consentimento livre e esclarecido****Pesquisa:**

Análise de polimorfismos genéticos, biomarcadores inflamatórios, bioquímicos e de estresse oxidativo em pacientes com a doença de Parkinson em diferentes estágios da doença.

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(la) a participar da pesquisa “Análise de polimorfismos genéticos, biomarcadores inflamatórios, bioquímicos e de estresse oxidativo em pacientes com a doença de Parkinson em diferentes estágios da doença”, realizada no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é avaliar pacientes com DP nos estágios I a IV sem demência, segundo a escala de Hoehn e Yarhr em seus diferentes esquemas terapêuticos, quantificando marcadores bioquímicos, genéticos, de estresse oxidativo e inflamatórios buscando correlacionar os resultados encontrados com a progressão da doença assim como também em pacientes sem essa patologia. A sua participação é muito importante, pois precisamos de indivíduos sem a doença, para nos guiar como parâmetro, constituindo o que chamamos de **grupo controle**, e isso se daria pela doação de 45 mL de sangue por punção venosa (15mL de sangue com EDTA, 25mL de soro e 5mL de sangue com fluoreto) em uma única etapa, em apenas um momento, sendo todos os materiais usados descartáveis. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Se houver qualquer desconforto durante ou após a coleta, nossa equipe está preparada para atendê-lo da melhor forma possível. Informamos ainda que as informações serão utilizadas para fins desta e de outras pesquisas que, eventualmente, poderão ser realizadas utilizando-se o banco de dados/amostras obtidas neste trabalho, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esperamos que essa pesquisa permita verificar se os marcadores genéticos, bioquímicos, de estresse oxidativo e inflamatórios propostos são interessantes para averiguar se há algum destes que possa contribuir na prevenção, acompanhamento e terapêutica na doença de Parkinson.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação nesta.

Os benefícios esperados são que de acordo com os resultados obtidos, uma nova abordagem terapêutica para a doença de Parkinson poderá ser desenvolvida. Quanto aos riscos, nenhum dos procedimentos utilizados constitui risco direto para a integridade física ou moral dos participantes. Entretanto, em alguns pacientes mais sensíveis pode ocorrer certo desconforto no momento da coleta de sangue como a lipotimia, que é uma sensação de mal estar levando a pessoa a um estado de quase desmaio. Nesta situação, a equipe de coleta que está treinada para esta intercorrência, prontamente prestará atendimento adequado.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contatar: professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa ((43) 3371-2451), Farmacêutico Thiago Hissnauer Leal Baltus ((43) 8824-5191), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 20__.

Décio Sabbatini Barbosa

(RG: 13.163.452 SSP-SP)

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____