



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

Influência de contaminantes ambientais na patogénese de doenças neurodegenerativas

Cátia Andreia Rocha Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Medicina

(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Professor Doutor Francisco José Álvarez Pérez

Covilhã, abril de 2019

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais e a toda a minha família por sempre me incentivarem a seguir aquilo de que gosto e por me proporcionarem as oportunidades para o poder fazer.

Queria agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Francisco Alvarez, pela sua disponibilidade, os seus conselhos e a sua orientação na elaboração deste trabalho.

Gostaria também de agradecer aos meus amigos e a todas as pessoas que conheci nesta cidade e ao longo destes seis anos, por me apoiarem e ajudarem durante todo este percurso.

E queria ainda dizer um obrigado especial à Faculdade das Ciências da Saúde e à Covilhã, por me acolherem e permitirem que isto se tornasse possível.

Resumo

As doenças neurodegenerativas são um vasto grupo de doenças do Sistema Nervoso Central cuja patologia de base consiste na perda de grupos neuronais específicos, o que vai depois causar a clínica característica de cada uma delas. O maior fator de risco confirmado para estas doenças é a idade e, uma vez que a nível mundial a esperança média de vida está a aumentar e se verifica cada vez mais um envelhecimento da população, é expectável que a prevalência destas doenças aumente nas próximas décadas. Dado que estas doenças não têm tratamento curativo, é de grande importância o conhecimento dos seus fatores de risco e do seu processo patogénico, de modo que se possam investir em estratégias de prevenção. Dentro desta linha de pensamento, e uma vez que eles estão ubiquamente presentes no ambiente e os seres humanos estão inevitavelmente expostos a eles, os contaminantes ambientais têm tido cada vez maior interesse como possíveis fatores causais de diversas doenças, incluindo as neurodegenerativas.

O objetivo desta revisão bibliográfica é verificar a evidência que existe acerca da influência dos contaminantes ambientais, com um maior foco nos pesticidas e uma revisão mais geral de outros contaminantes frequentemente mencionados, nas três doenças neurodegenerativas mais comuns: Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica.

A metodologia utilizada para a realização desta tese foi uma pesquisa de artigos sobre o tema referido nas bases de dados Pubmed e SCOPUS, com consulta de alguns livros da área da Neurologia.

Palavras-chave

Neurodegeneração; Contaminantes ambientais; Doença de Alzheimer; Doença de Parkinson; Esclerose Lateral Amiotrófica.

Abstract

Neurodegenerative diseases are a vast group of Central Nervous System diseases, whose basic pathology consists in the loss of specific neuronal groups, which causes the characteristic clinical presentation of each of these diseases. The major confirmed risk factor is age and, since life expectancy is increasing globally and there's a rising older population, the prevalence of these diseases is expected to increase in the coming decades.

Since there's no curative treatment known yet, it is of the utmost importance to have a bigger knowledge of the risk factors and the pathogenic process, with the goal of developing prevention strategies. Following this line of thought, and since they have a ubiquitous presence in the environment and humans are inevitably exposed to them, the interest in environmental contaminants as possible risk factors in a variety of diseases, including neurodegenerative diseases, is growing.

The goal of this bibliographic review is to look at the evidence that there is regarding the influence of environmental contaminants, with a bigger focus on the role of pesticides and a more general approach to other contaminants frequently mentioned, in the three most common neurodegenerative diseases: Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis.

The method used for the construction of this thesis was an article research about the above mentioned theme in the databases Pubmed and SCOPUS, with the consultation of some Neurology books.

Keywords

Neurodegeneration; Environmental contaminants; Alzheimer's disease; Parkinson's disease; Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Palavras-chave	iii
Abstract.....	iv
Keywords	iv
Índice	v
Lista de tabelas	vii
Lista de Acrónimos.....	viii
Introdução.....	1
Metodologia.....	2
Capítulo 1: Doenças Neurodegenerativas.....	3
1.1 Definição de doenças neurodegenerativas	3
1.1.1 Mecanismos de neurodegeneração.....	3
1.2 Doença de Alzheimer	5
1.2.1 Patogênese da DA	5
1.3 Doença de Parkinson	7
1.3.1 Patogênese da DP	7
1.4 Esclerose Lateral Amiotrófica	9
1.4.1 Patogênese da ELA.....	9
Capítulo 2: Contaminantes ambientais e a sua influência na patogênese de doenças neurodegenerativas	11
2.1 Pesticidas.....	11
2.1.1 Influência na DA	13
2.1.2 Influência na DP	15
2.1.3 Influência na ELA	19
2.2 Outros contaminantes ambientais	21
2.2.1 Influência na DA	21
2.2.1.1 Metais	21
2.2.1.2 Solventes	22
2.2.1.3 Campos eletromagnéticos	22
2.2.1.4 Poluição atmosférica	22
2.2.2 Influência na DP	23
2.2.2.1 Metais	23

Influência de contaminantes ambientais na patogênese de doenças neurodegenerativas

2.2.2.2 Solventes	23
2.2.2.3 Bifenilpoliclorados	24
2.2.2.4 Poluição atmosférica	24
2.2.2.5 Campos eletromagnéticos	24
2.2.3 Influência na ELA	25
2.2.3.1 Metais	25
2.2.3.2 Solventes	26
2.2.3.3 Formaldeído.....	26
2.2.3.4 Campos eletromagnéticos	26
2.2.3.5 Oligoelementos.....	26
2.3 Tabelas para síntese das possíveis associações abordadas nesta revisão	27
Conclusão	33
Bibliografia.....	36

Lista de tabelas

Tabela 1: Principais subclasses químicas de pesticidas, exemplos de compostos específicos e o seu uso na EU	12
Tabela 2: Contaminantes ambientais com possível associação à Doença de Alzheimer	27
Tabela 3: Contaminantes ambientais com possível associação à Doença de Parkinson	29
Tabela 4: Contaminantes ambientais com possível associação à Esclerose Lateral Amiotrófica	31

Lista de Acrónimos

AB	Amiloide beta
Ach	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Al	Alumínio
ALAD	Desidratase de ácido delta-aminovulânico
APOE 4	Isoforma 4 da apolipoproteína E
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BMAA	β -N-Metilamino-L-alanina
BHE	Barreira hematoencefálica
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
ENF	Emaranhados neurofibrilares
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
FUS	Proteína fundida em sarcoma
GST	Glutathione S-transferase
HCB	Hexaclorobenzenos
HCH	Hexaclorociclohexano
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
PPA	Proteína precursora amiloide
PON 1	Paraoxonase 1
ROS	Espécies reativas de oxigénio

Influência de contaminantes ambientais na patogênese de doenças neurodegenerativas

SNC Sistema Nervoso Central

SNpc *Substancia nigra pars compacta*

SOD1 Dismutase superóxido 1

TDP43 Proteína de ligação a TAR DNA de 43 quilo-daltons

Introdução

As doenças neurodegenerativas são um grupo de doenças do Sistema Nervoso Central (SNC) que têm na sua maioria um curso progressivo e altamente debilitante, tanto a nível cognitivo quanto a nível físico, culminando numa perda completa da qualidade de vida e num estado de dependência total de terceiros (1). As doenças neurodegenerativas mais frequentes, e que vão ser o foco desta revisão bibliográfica, são a Doença de Alzheimer, a Doença de Parkinson e a Esclerose Lateral Amiotrófica.

Em termos etiológicos, ainda não se sabe muito sobre o que causa estas doenças. A idade é o fator de risco mais importante e, por isso, estima-se que nas próximas décadas a incidência destas doenças irá aumentar, assim como todos os custos a elas associadas, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (2,3). Sabe-se também que os fatores genéticos são integralmente responsáveis apenas por uma pequena porção dos casos (1). Assim, o consenso geral é que as doenças neurodegenerativas resultem da interação entre fatores genéticos, fatores ambientais e fatores do estilo de vida dos indivíduos (1). Uma vez que estas doenças não têm ainda um tratamento curativo ou modificador do seu curso, a investigação acerca destes fatores e quais em concreto estão associados a cada doença é bastante importante, de modo a tentar modificar e diminuir o seu impacto, nomeadamente através de estratégias preventivas (1).

Os contaminantes ambientais, ubíquos na água, nos alimentos ingeridos e no meio ambiente, têm tido cada vez mais interesse como possíveis fatores de risco para uma variedade de doenças humanas. A poluição atmosférica é já um fator de risco conhecido não só para doenças respiratórias, como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crónica, mas também para doenças cardiovasculares (4). Substâncias como o arsénio, cádmio, níquel, berílio, tricloroetileno, entre outras, são contaminantes ambientais com efeitos carcinogénicos conhecidos (5). Em termos de impacto no SNC, existe também já alguma evidência demonstrada, nomeadamente a neurotoxicidade comprovada do chumbo: a intoxicação por este metal denomina-se saturnismo e, se aguda e em altas doses, pode resultar numa encefalopatia com crises epiléticas e coma, potencialmente fatal (6). Além disso a exposição a este e outros metais, como o mercúrio, tem impactos negativos ao nível do desenvolvimento cognitivo infantil (6). Tendo em conta toda esta informação, é natural que os contaminantes ambientais tenham sido cada vez mais explorados em relação ao seu papel na patogênese das doenças neurodegenerativas. Uma vez que estas são caracterizadas por um processo patogénico que se inicia décadas antes da apresentação dos sintomas, existe uma larga janela temporal em que exposições a estes tóxicos podem ser impactantes na génese destas doenças.

Assim, esta revisão bibliográfica tem como objetivo verificar a evidência que existe acerca da influência de contaminantes ambientais nas três doenças neurodegenerativas anteriormente referidas, com um maior foco na classe dos pesticidas, mas abordando também outros tóxicos que são frequentemente mencionados para cada doença.

Metodologia

Para a elaboração desta dissertação foi realizada uma revisão bibliográfica dentro do tema da influência de contaminantes ambientais na patogênese de doenças neurodegenerativas.

A pesquisa de artigos foi realizada em duas bases de dados, PubMed e SCOPUS, nas línguas inglês e português, sem limite temporal definido e com o objeto de estudo definido como “human”. Na pesquisa inicial foram usadas as palavras-chave “environmental factors” e “neurodegenerative diseases” de modo a ter uma noção de quais os fatores que pareciam ter maior evidência de associações nas três doenças; a partir daqui, a pesquisa teve maior foco na influência dos pesticidas e as palavras-chave usadas foram a combinação de “pesticides” com “neurodegenerative diseases”, “Alzheimer’s disease”, “Parkinson’s disease” e “Amyotrophic Lateral Sclerosis”, sendo que foram incluídos na revisão vários artigos que falavam dos fatores ambientais em geral, para cada doença. A seleção das referências foi feita com base na sua relevância para o tema e também foi dada maior preferência a trabalhos mais recentes.

Foram ainda consultados alguns livros da área da Neurologia e outros *websites*, de modo a complementar a pesquisa com outras informações pertinentes.

Capítulo 1: Doenças Neurodegenerativas

1.1 Definição de doenças neurodegenerativas

O termo doenças neurodegenerativas refere-se a um vasto grupo de doenças do SNC nas quais ocorre a perda de grupos neuronais específicos (que irá ser responsável pela apresentação clínica característica de cada uma destas doenças). São, no geral, doenças com um curso insidioso e gradual para as quais ainda não existe tratamento curativo (7).

O diagnóstico destas doenças pode por vezes ser um desafio. Apesar de para cada doença estar descrito um mecanismo patológico e um curso clínico distintos, nem sempre a sua diferenciação é assim tão linear (8). Apresentações clínicas semelhantes podem ter diferentes doenças de base e, muitas vezes, diferentes tipos de patologias podem apresentar-se em simultâneo ou complicar uma doença neurodegenerativa já existente (7,8).

1.1.1 Mecanismos de neurodegeneração

O mecanismo base neste grupo de doenças é a acumulação de proteínas anormais. Estas proteínas geralmente têm origem numa proteína nativa da célula, que sofre um processo de alteração conformacional que a torna numa espécie tóxica (1). As causas exatas que levam a esta alteração da proteína nativa e a sucessiva acumulação da espécie tóxica não estão ainda completamente conhecidas, mas o mais provável é que sejam o resultado de interações entre fatores genéticos e ambientais (2,7).

O excesso destas proteínas aberrantes pode interferir com o normal funcionamento da célula neuronal de várias formas, nomeadamente: pode causar uma disrupção da transcrição génica e alterar a função do retículo endoplasmático, o que vai alterar a síntese proteica; pode causar disfunção mitocondrial, com depleção energética e *stress* oxidativo; interferir com os mecanismos normais de degradação proteica celular (as vias ubiquitina-proteossoma e autofágica), o que leva a uma maior acumulação das proteínas aberrantes; pode ainda causar anomalias no transporte axonal e na transmissão sináptica. Todos estes processos são capazes de ativar a cascata apoptótica e conduzir à morte neuronal (7).

Contudo, os eventos que conduzem à neurodegeneração não se limitam ao meio intracelular. Em todas as doenças neurodegenerativas ocorre uma resposta glial, que pode ser parte da génese da doença ou ser uma consequência da morte neuronal (1). Esta resposta glial pode consistir em alterações nas funções dos astrócitos de manutenção da homeostase local, o que compromete o ambiente extracelular dos neurónios (7). Pode também ocorrer excitotoxicidade por uma estimulação excessiva pelo neurotransmissor glutamato nas células, que leva a um grande influxo de cálcio, que por sua vez despoleta a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e acaba por também iniciar a cascata apoptótica (7). Além disso, há também um componente imune/inflamatório que, novamente, pode estar na origem da doença ou ser uma resposta à perda neuronal (1,9).

Influência de contaminantes ambientais na patogênese de doenças neurodegenerativas

Existe ainda outro mecanismo que tem vindo a ser explorado, que é o da disseminação da proteína aberrante de célula para célula (de maneira semelhante às doenças dos príões). Assim, esta proteína anormal pode afetar proteínas normais e pode também ser passada a outras células (provavelmente através de exossomas) (7).

Além disso, verifica-se ainda que nas doenças neurodegenerativas há afetação da integridade da barreira hematoencefálica (BHE), que poderá também ser um fator que contribui para a neurodegeneração ou ocorrer em resposta a esta (1). De qualquer modo, esta disfunção pode ser uma porta de entrada no SNC para produtos tóxicos exógenos (1).

1.2 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais frequente na população mundial e também a principal causa de demência. Estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas no mundo sofram de demência, sendo que dois terços desses casos são por DA; calcula-se ainda que esse número atinja quase 150 milhões em 2050 (10). Além de ser uma causa de grande incapacidade dos indivíduos afetados, é também uma doença que representa um elevado custo económico e social para os países (10).

Em Portugal, a prevalência de demência em 2017 era de 19,9 por 1000 habitantes (cerca de 200 mil pessoas no total), a quarta mais alta dos países da OCDE, com a estimativa de que em 2037 este número passará para 31,3 por 1000 habitantes (11).

Quanto à apresentação clínica da doença, esta parece ter um estadioprodrómico - o déficecognitivo ligeiro, que pode surgir anos antes da apresentação da doença em si (8). A progressão da doença costuma ser relativamente típica: a doença ligeira tem alteração da memória recente (geralmente o primeiro sintoma), perda de interesse nas atividades habituais, anomia e incapacidade para as atividades da vida diária mais complexas; segue-se depois a disfunção do planeamento executivo, défice da orientação visuo-espacial e agravamento dos défices da linguagem. Na doença avançada, há uma completa dependência de cuidados e podem ser mais manifestas as alterações psiquiátricas, com agitação e delírios, e também os distúrbios do sono (6,7).

Os doentes acabam por falecer cerca de 8 a 10 anos após o diagnóstico, por pneumonia de aspiração, desnutrição, infeções ou cardiopatias (6).

1.2.1 Patogénese da DA

Existem dois achados patogénicos típicos da DA: as placas extracelulares compostas primariamente pela proteína amiloide beta (AB) e os emaranhados neurofibrilares (ENF) intraneuronais compostos principalmente pela proteína tau hiperfosforilada (1,7).

A proteína AB é derivada da clivagem por secretases da proteína precursora amiloide (PPA), que tem normalmente propriedades neurotróficas e neuroprotetoras (3). Em condições normais, a AB é eliminada eficientemente pela célula (7).

O aparecimento das placas amiloides é explicado pela hipótese amiloide, segundo a qual uma alteração no metabolismo da proteína AB, que pode ocorrer por produção excessiva desta e/ou uma insuficiente degradação, leva à formação de oligómeros e a sua agregação em fibrilas, que vão depois constituir as placas (7,9). Estas placas vão interferir com o funcionamento da célula, como já foi explicado anteriormente nos mecanismos de neurodegeneração. Existe ainda a hipótese que a produção de AB pode ser em si uma resposta ao *stress* oxidativo causado por fatores externos, como uma maneira de neutralizar ROS, até que esta produção supera a capacidade de degradação da célula e começa então a haver deposição em placas (3).

A deposição das placas de amiloide ocorre de maneira sequencial, e que está relacionada com a apresentação clínica e progressão da doença. Geralmente depositam-se primeiro no

córtex entorrinal e no hipocampo (relacionados com a memória), depois nos gânglios basais, tálamo e, finalmente, no tronco cerebral e cerebelo (7).

Quanto aos ENF, a sua formação ocorre no citoplasma neuronal, onde a proteína tau hiperfosforilada e de conformação aberrante se organiza em fibrilas que depois formam os emaranhados. Normalmente, a proteína tau tem como função ligar-se e estabilizar os microtúbulos, essencial para o transporte axonal, sendo que a hiperfosforilação da tau compromete esta função celular (6,9).

Além desta acumulação de proteínas aberrantes, observa-se ainda um déficit de neurotransmissores nos indivíduos com DA, principalmente de acetilcolina (Ach), que pode também ser um dos mecanismos que levam às perdas de memória na DA (6).

A nível macroscópico, observa-se uma atrofia generalizada, com uma afetação maior em áreas específicas como o hipocampo, o giro cingulado, o lobo temporal e parietal (1,7).

Em termos genéticos, conhecem-se três genes, o gene da PPA e as pre-senilinas 1 e 2 (PSEN 1 e 2, que codificam parte dos complexos das secretases que degradam a PPA), cujas mutações estão na base das formas de início precoce da DA, que são correspondem apenas a cerca de 5-10% dos casos de DA (7,12).

Quanto à forma de início tardio, que é a que ocorre na maioria dos casos, o único fator genético que se sabe que aumenta o risco da doença é a isoforma 4 da apolipoproteína E (APOE 4), que vai interferir no metabolismo da AB (3). Existem também outros fatores de risco conhecidos para esta forma da DA, nomeadamente a idade (como na generalidade das doenças neurodegenerativas), sexo feminino, hipertensão arterial, Diabetes *Mellitus*, história de traumatismo craniano prévio, doença vascular cerebral e tabagismo (6,7).

Vários fatores ambientais têm vindo a ser estudados, como será abordado seguidamente.

1.3 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) constitui a segunda doença neurodegenerativa mais comum. Em 2015, a prevalência mundial desta doença estimava-se ser de 98 por 100 mil (cerca de 6 milhões de pessoas no total) (13). Assim como acontece com a maior parte das restantes doenças associadas ao envelhecimento, a prevalência da DP tem vindo a aumentar, estimando-se que pode chegar aos 13 milhões de pessoas em 2040 (13). Em Portugal, estima-se que a prevalência da doença seja de 180 doentes por 100 mil habitantes (cerca de 20 mil pessoas no total) (14).

A clínica mais característica da DP é a sua clínica motora, com tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e alterações da marcha (12), de início gradual e progressivo, e geralmente com apresentação assimétrica (6). Os sintomas não-motores da DP são também uma grande causa de incapacidade e perda de qualidade de vida. Incluem alterações cognitivas, com eventual demência em alguns dos casos, alterações comportamentais e de humor, doenças do sono e sintomas do sistema autónomo (15).

De salientar, DP não é sinónimo de parkinsonismo. Este refere-se a um síndrome clínico caracterizado por bradicinesia e/ou tremor, com variadas causas, sendo que a DP constitui um dos diagnósticos diferenciais deste síndrome (e também a causa mais comum) (6).

1.3.1 Patogénese da DP

A alteração patológica característica da DP é a perda de neurónios dopaminérgicos e despigmentação da *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (3,12). A SNpc integra o conjunto de estruturas cerebrais chamado núcleos da base, que são responsáveis pelo controlo dos movimentos, especificamente o início e manutenção do movimento e a supressão de movimentos involuntários (7).

A perda de neurónios dopaminérgicos relaciona-se, tal como nas restantes doenças neurodegenerativas, com a acumulação de uma proteína de conformação aberrante que, no caso da DP, é a α -sinucleína (daí que o termo sinucleinopatias seja também usado para a DP e outras doenças de origem semelhante) (7). Na sua forma nativa, esta proteína encontra-se na membrana celular e participa no controlo dos processos sinápticos (16). Na DP, a α -sinucleína encontra-se agregada nos corpos de Lewy, inclusões citoplasmáticas eosinofílicas que contêm também neurofilamentos hiperfosforilados, lípidos, ferro e ubiquitina (3). O aparecimento destes corpos de Lewy não é exclusivo da SNpc - eles ocorrem também no tronco cerebral e em outras estruturas dos núcleos da base (7,16). Estes agregados de proteínas aberrantes vão depois causar morte celular através dos mecanismos de neurodegeneração já descritos.

A diminuição de transmissão dopaminérgica nos núcleos da base leva a uma alteração dos mecanismos de controlo e inibição do movimento, com excessiva inibição da atividade talâmica e diminuição da ativação dos sistemas motores corticais, o que resulta na clínica motora característica da DP (9,16). A formação de corpos de Lewy e degeneração neuronal noutros

locais do SNC, com distúrbios nas vias neurotransmissoras GABAérgica, colinérgica e serotoninérgica, levam às manifestações não motoras da DP (6,16,17).

A grande maioria dos casos de DP é de origem esporádica (80-90% dos casos), mas conhecem-se algumas mutações associadas a casos de transmissão autossômica. O gene da α -sinucleína foi associado à primeira forma monogénica da DP descoberta, a PARK1 (3). Um outro gene, que codifica a proteína *parkina* (que participa no transporte vesicular e está associada aos microtúbulos), foi ligado a outra forma monogénica da DP, a PARK2 (3). Subsequentemente, outros genes foram sendo descobertos como causas de DP genética (7).

Quanto à forma esporádica da DP, existem também alguns genes conhecidos que se sabem que aumentam o risco desta doença, cujo papel poderá depender da interação com fatores ambientais. A procura para causas ambientais na DP ganhou um maior ímpeto devido à descoberta que vários toxicodpendentes desenvolveram uma forma de parkinsonismo após injetarem substâncias contaminadas com o tóxico mitocondrial 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (7), que é quimicamente semelhante a alguns pesticidas, como se irá abordar seguidamente.

1.4 Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), a forma mais frequente das Doenças do Neurónio Motor, apesar de ser uma doença relativamente rara, é a terceira doença neurodegenerativa mais comum. Estima-se que a sua prevalência mundial é 6 por 100 mil indivíduos (o que dá uma população total de cerca 460 mil doentes), com cerca de 140 mil novos casos diagnosticados por ano (18). Em Portugal, calcula-se que existam cerca de 500 casos de ELA (19). Apesar de os números não serem muito elevados quando comparados a outras doenças, a ELA é uma doença extremamente incapacitante, à qual está associada um enorme custo social e económico (20). É ligeiramente mais frequente no sexo masculino e a faixa com maior incidência de diagnóstico é a dos 65-75 anos (7).

A apresentação da ELA é bastante variável; depende de quais os grupos neuronais primeiro acometidos na doença. Devido à afetação do neurónio inferior, pode haver queixas de fraqueza muscular, geralmente assimétrica e distal, de um dos membros, com câibras e fasciculações (1). O envolvimento do trato piramidal gera os sinais típicos de comprometimento do neurónio superior, com hiperreflexia, rigidez muscular e espasticidade (1). A alteração na inervação da musculatura bulbar pode apresentar-se com queixas na deglutição e nos movimentos faciais e, ainda, um envolvimento dos músculos respiratórios (6).

A doença tem um curso rapidamente progressivo, com a morte a ocorrer geralmente 3 a 5 anos após o início dos sintomas, devido à paralisia dos músculos respiratórios (16).

1.4.1 Patogénese da ELA

A ELA caracteriza-se pela perda seletiva de neurónios motores superiores (cujos corpos neuronais estão no córtex motor e cujos axónios descem e formam o trato piramidal na medula) e inferiores (no tronco encefálico e no corno anterior da medula espinal), com a presença de inclusões neuronais (1,16). Ocorre também proliferação dos astrócitos e das células da glia (6,7).

Nesta doença, observam-se vários dos mecanismos já previamente descritos como causadores de neurodegeneração, nomeadamente: corpos de inclusão citoplasmáticos, que na ELA contêm agregados proteicos da enzima dismutase superóxido 1 (SOD1) e das proteínas de ligação a TAR DNA de 43 quilo-daltons (TDP43) e as proteínas fundidas em sarcoma (FUS) - que são normalmente proteínas encontradas apenas nos núcleos neuronais; diminuição dos transportadores de glutamato astrocitários no córtex motor e corno anterior da medula, o que conduz a um excesso deste neurotransmissor nas fendas sinápticas e excitotoxicidade; disfunção mitocondrial e alterações no processamento do ácido ribonucleico (ARN) - provavelmente devido a alterações em proteínas nucleares como TDP43 e FUS (7,16,21,22). A enzima SOD1 mutada pode contribuir para um aumento do *stress* oxidativo celular, o que gera um maior dano celular (22).

O nome da doença, Esclerose Lateral Amiotrófica, refere-se aos processos que seguem a degeneração neuronal: após a morte dos neurónios corticais e das suas projeções axonais que

formam o trato piramidal (que desce pelas colunas laterais da medula), ocorre gliose fibrilar nessa porção da medula - daí o nome “esclerose lateral”; e a perda dos neurónios inferiores causa desnervação e subsequente atrofia muscular - de onde vem o termo “amiotrófica” (6).

Também se observam alguns achados patológicos fora do sistema neuronal motor, nomeadamente no córtex frontotemporal, hipocampo, tálamo, outros tratos medulares e na substância *nigra* (7). Contudo, a perda neuronal e a clínica é praticamente apenas motora (excetuando alguns casos em que há desenvolvimento concomitante de demência frontotemporal), o que é também característico desta doença (7).

Cerca de 5 a 10% dos casos de ELA são de origem familiar, com os genes das proteínas TDP43 e FUS e também da enzima SOD1 como algumas das causas de hereditariedade autossómica conhecidas (2). Os restantes 90%-95% dos casos são de origem esporádica, sendo que não há ainda nenhum fator ambiental, físico ou ocupacional que esteja definitivamente associado a maior risco de doença (mas existem múltiplos potenciais fatores em estudo) (1).

Capítulo 2: Contaminantes ambientais e a sua influência na patogénese de doenças neurodegenerativas

2.1 Pesticidas

Os pesticidas constituem um grupo muito heterogéneo de químicos que são usados para controlo de várias pestes em diversas áreas, nomeadamente, na agricultura, no controlo de pestes nas habitações e no controlo de doenças infecciosas (23). A exposição do ser humano aos pesticidas pode ser dividida em dois grandes tipos: a exposição ocupacional, nos indivíduos envolvidos com a produção, transporte e aplicação destes produtos; e a exposição ambiental, que pode ocorrer em indivíduos que residem nas imediações de zonas com elevado uso de pesticidas ou através do consumo de água ou alimentos (tanto vegetais como animais) contaminados (23).

Podem ser classificados de acordo com o seu alvo biológico como fumigantes (usados contra insetos, roedores, fungos e bactérias nos solos ou em habitações ou prédios); fungicidas (usados contra fungos); herbicidas (usados para a erradicação de plantas indesejadas) e inseticidas (24). Podem ainda ser classificados de acordo com as suas subclasses químicas (ver tabela 1).

Influência de contaminantes ambientais na patogénese de doenças neurodegenerativas

Tabela 1: Principais subclasses químicas de pesticidas, exemplos de compostos específicos e o seu uso na UE.

Subclasses químicas (24)	Função (24)	Exemplos de compostos específicos e o seu uso na União Europeia (UE) (25)	
		Não aprovado	Aprovado
Organoclorados	Inseticidas	Diclorodifeniltricloroetano (DDT) e o seu metabolito diclorodifenildicloroetileno (DDE), hexaclorobenzenos (HCB), aldrina, dieldrina, hexaclorociclohexano (HCH), clordano e lindano. (O uso de todos os organoclorados está proibido na EU).	
Organofosfatos	Inseticidas e herbicidas	Paratião	Clorpirifos, glifosato
Carbamatos	Inseticidas	Aldicarb	Metomil
Cloroacetanilidas	Herbicidas	Alachlor e metolachlor	
Rotenoides	Inseticidas	Rotenona	
Bipiridinas	Herbicidas	Paraquat	
Ditiocarbamatos	Fungicidas	Maneb	Ziram
Piretróides	Inseticidas	Permetrina	Cipermetrina

2.1.1 Influência na DA

Devido à elevada prevalência da DA e à inexistência de terapia curativa, existe um grande ímpeto na busca de possíveis fatores de risco desta doença. A evidência quanto à influência de pesticidas na DA é numerosa, se bem que ainda não existe um consenso claro quanto ao seu real papel na doença e apenas existem algumas subclasses de pesticidas associadas, não se conseguindo ainda apontar com certeza para tóxicos concretos e muito menos relações de dose-efeito precisas.

A maioria dos estudos incluídos nesta revisão bibliográfica que abordam os pesticidas como classe geral aponta para uma associação entre a exposição a estes e à doença (2,9,23,24,26-33). Em geral, a evidência parece apontar para um maior risco associado à exposição ocupacional aos pesticidas (24,26,31,32), se bem que pela sua presença ubíqua na água e alimentos consumidos e pela sua capacidade de bioconcentração ao longo da cadeia alimentar, não se pode descartar o seu efeito na população em geral (24,27,30).

Olhando para os resultados por classe de pesticidas, os organofosfatos são um dos grupos mais frequentemente mencionados como possível fator de risco para a DA (12,24,26,27,30). A sua principal ação é a inibição da acetilcolinesterase, o que resulta numa acumulação da Ach nas sinapses (12,24). Apesar do aumento da Ach ser um dos mecanismos de medicamentos usados para tratamento sintomático da DA, especula-se que quando esta acumulação nas sinapses ocorre durante várias décadas - como resultado da exposição aos organofosfatos, por exemplo - resulta numa sobre-estimulação dos neurónios acetilcolinérgicos, o que pode ter efeitos de excitotoxicidade e conduzir à apoptose neuronal e à degeneração do sistema colinérgico observada na DA (12,24). Além disso, outros possíveis mecanismos dos organofosfatos (resultados de evidências experimentais) passam pelo aumento da PPA e a sua degradação em A β (12). Também podem provocar a produção de ROS e perturbação dos mecanismos antioxidantes das células neuronais, assim como podem induzir a ativação de neurónios glutamatérgicos e assim levar à excitotoxicidade por glutamato (24,30). O paratião, pertencente a esta classe, parece poder causar alterações morfológicas em proteínas do citoesqueleto neuronal e do transporte axonal (27).

Os carbamatos são outro grupo de pesticidas que poderá estar associado ao risco de DA (34,35). Eles são também inibidores da acetilcolinesterase, logo podem ter efeitos semelhantes aos organofosfatos no sistema colinérgico (35).

Outro grupo possivelmente implicado na patogênese da DA são os organoclorados (24,26-28). Dentro destes, são especificamente mencionados os ciclodienos, o DDT (e o seu metabolito DDE), HCH, *cis*- e *trans-nonachlor*, dieldrina, HCB e clordano (28). Uma vez que estes compostos são lipossolúveis, eles podem sofrer bioacumulação em tecidos adiposos, como o cérebro, e causar *stress* oxidativo, alteração da homeostase do cálcio, interferências no processo de neurotransmissão e respostas inflamatórias, com subsequente perda neuronal (28). Quanto a outras associações com esta classe de tóxicos, foram encontrados níveis séricos de DDE aumentados em doentes com DA, em relação a indivíduos saudáveis, sendo que este tóxico em particular pode ser responsável por um aumento de PPA nos neurónios (36). Um outro estudo

encontrou também níveis séricos mais elevados de β -HCH, dieldrina e DDE em doentes com DA, quando comparados a indivíduos do grupo de controlo (37). O uso desta classe de pesticidas é atualmente proibido na maior parte dos países, incluindo em Portugal desde há várias décadas (38), mas devido à sua elevada estabilidade e lipofilicidade, persistem no ambiente e nos tecidos animais, o que os torna capazes de exercer os seus efeitos tóxicos mesmo décadas após o fim da sua utilização (28).

Quanto aos fungicidas, um estudo prospetivo em França, com uma coorte de 1507 idosos, reportou uma associação entre a exposição ocupacional a pesticidas (sendo que os mais usados nesta zona foram os fungicidas - nomeadamente os ditiocarbamatos) e a DA (e também DP) (31). A relação foi observada exclusivamente em homens, o que é consistente com o facto de serem estes os que maioritariamente aplicam e estão expostos aos pesticidas (31).

Uma outra abordagem frequentemente mencionada em relação à toxicidade dos contaminantes ambientais é a possibilidade de existirem alguns fatores genéticos que aumentam a suscetibilidade de determinados indivíduos a certos tóxicos e, assim aumentam o risco de DA caso ocorra exposição (12). Em relação aos organofosfatos, polimorfismos da enzima paraoxonase 1 (PON1), que está envolvida na degradação destes pesticidas e também tem funções antioxidantes, poderá ser um fator genético que aumenta o grau de toxicidade destes produtos no SNC (12,24,39). Quanto aos organoclorados, foi observado que doentes com DA portadores do alelo APOE 4 e com níveis de DDE sérico elevados tinham uma performance cognitiva significativamente mais afetada que aqueles em que tinham níveis semelhantes de DDE sem terem o alelo, sugerindo que este alelo pode aumentar a suscetibilidade aos efeitos tóxicos do DDT (36).

As alterações epigenéticas, que correspondem a modificações em zonas do ácido desoxirribonucleico (ADN) não codificantes, são também um possível mecanismo pelo qual os pesticidas podem causar efeitos neurodegenerativos (3,9). O *stress* oxidativo causado por pesticidas pode levar a estas alterações epigenéticas, que vão silenciar genes importantes para o funcionamento das células e também alterar a expressão de PPA e, assim, levar a longo prazo à morte neuronal e à DA (3).

Contudo, como referido inicialmente, os resultados não são universalmente concordantes quanto à associação dos pesticidas com a DA. Um estudo prospetivo realizado nos Países Baixos acerca da relação da demência não vascular com exposições ambientais mostrou uma associação negativa significativa com a exposição a pesticidas (40); outro trabalho acerca dos níveis séricos de vários tóxicos do grupo dos organoclorados não encontrou associação entre níveis elevados e uma prevalência de DA (41). As contradições observadas entre os resultados de diversos estudos poderão advir de uma diferença na suscetibilidade dos indivíduos aos pesticidas, influenciada por polimorfismos genéticos, envelhecimento e diferentes níveis de exposição difíceis de mensurar (8).

2.1.2 Influência na DP

Como foi previamente referido, a descoberta de que o tóxico MPTP provoca um síndrome bastante semelhante à DP em indivíduos expostos e a verificação experimental de que os mecanismos de toxicidade são semelhantes aos que se verificam na patogênese da DP, voltou o foco da pesquisa da etiologia da DP para os contaminantes ambientais. Assim, a DP é provavelmente a doença neurodegenerativa com um maior corpo de investigações epidemiológicas e experimentais acerca deste tema. Em particular, os pesticidas são os fatores ambientais que maior quantidade de evidência têm quanto à sua associação positiva com a patogênese da DP.

Grande parte dos trabalhos aborda os pesticidas como classe geral (uma vez que é difícil classificar mais pormenorizadamente as exposições) e a maior parte destes encontra associação entre a exposição aos pesticidas e um maior risco de DP (1-3,9,15,23,29-31,42-55). À semelhança da DA, existe maior evidência para a exposição ocupacional (31,42,43,45,49,50,53), em grande parte porque é também a mais fácil de avaliar; mas na DP existem também alguns trabalhos que se focam especificamente ou que incluem a exposição ambiental e que mostram também uma associação positiva entre esta e a DP (30,44,45,48,50,53,55). Existe também já alguma tentativa de estabelecer uma relação de dose-resposta com a DP: uma meta-análise de 2018 demonstrou que uma maior duração da exposição estava associada a um maior risco de DP (5 e 10 anos de exposição estavam associados a 5% e 11% de aumento do risco de DP, respetivamente) (54); um outro estudo, de caso-controlo, encontrou uma associação entre uma maior duração de exposição e ainda entre atividades que implicam um maior nível de exposição direta aos pesticidas com um aumento do risco de DP (45).

De destacar um estudo de caso-controlo realizado em Portugal, com base em 88 casos de DP, que avaliou uma série de exposições ocupacionais e ambientais e verificou também que havia uma maior exposição a pesticidas, herbicidas e inseticidas nos doentes com DP (52).

A habitação em ambiente rural, o trabalho na agricultura e o consumo de água de poços têm também sido implicados na etiologia da DP (1,9,29,46,47,51,56,57). A maioria dos trabalhos considera que estes fatores são representativos da exposição a pesticidas e portanto estas associações são outro ponto a favor da influência dos pesticidas na DP. Contudo, alguns trabalhos também consideram que as associações a estes fatores se podem dever a outras exposições que não pesticidas (nomeadamente, endotoxinas bacterianas presentes no solo, maior risco de traumatismos crânio-encefálicos, exposições a fumos de combustíveis, entre outras) (42,47).

Quanto à associação a subclasses funcionais de pesticidas, a evidência no geral mostra uma maior associação com inseticidas e herbicidas, com menor evidência da associação com os fungicidas como classe (9,15,23,29,43-45,47,48,51).

Dentro dos grupos químicos, os organofosfatos parecem ser possíveis fatores de risco (1,2,9,12,16,23,39,45,50,57) - se bem que o grau de associação não parece ser tão forte como na DA. Os seus mecanismos tóxicos na patogênese da DP provavelmente devem-se aos seus

efeitos não colinérgicos, nomeadamente a sua capacidade de provocar *stress* oxidativo celular e de promover inflamação no SNC (12,42,50). Outros possíveis efeitos incluem a interferência no transporte axonal e a inibição do complexo mitocondrial I (2,16,50). Além destes possíveis efeitos na génese da DP, foi também verificado num estudo longitudinal que a exposição ambiental a estes compostos está associada a uma mais rápida progressão dos sintomas motores e cognitivos da doença (39). Dentro desta classe, o clorpirifos foi associado a um aumento do risco de DP num estudo que avaliou o consumo de água de poços potencialmente contaminada com pesticidas (57) e ainda noutro que avaliou diversas exposições ocupacionais e ambientais (58).

Os organoclorados são também frequentemente mencionados quanto à sua associação com a DP (1,15,23,28,45,46). Estes tóxicos podem danificar os neurónios dopaminérgicos através da promoção de agregação de α -sinucleína, produção de ROS, e disfunção mitocondrial e do proteossoma (28). Dentro destes, a dieldrina em particular foi encontrada em níveis mais elevados em cérebros de doentes com DP (59) (se bem que a amostra neste estudo era apenas de 20 doentes com DP). Apesar de ter sido banida na maioria dos países desenvolvidos, à semelhança dos restantes deste grupo, é bastante lipofílica e assim capaz de persistir no meio ambiente (16). Em trabalhos laboratoriais, a dieldrina causou um aumento da agregação da α -sinucleína, *stress* oxidativo, depleção da dopamina e também disfunção mitocondrial (1,2,9,15,16,28). Em relação a outro organoclorado, o lindano, num estudo epidemiológico que avaliou a exposição ambiental a este, ele foi também associado a um aumento do risco de DP (44). Apesar de este já não ser utilizado na agricultura, ele é ainda usado em alguns sítios para o tratamento da escabiose (15) - se bem que, em Portugal, ele também já não é autorizado para este efeito (60).

Os carbamatos são outro grupo para o qual também foram encontradas algumas associações epidemiológicas (45). Possíveis mecanismos destes compostos parecem ser a inibição do sistema ubiquitina-proteossoma e aumento da α -sinucleína (17).

O herbicida paraquat, pela sua semelhança estrutural com o metabolito do MPTP, foi dos primeiros tóxicos específicos a ser estudado quanto à sua possível associação com a DP e é o que parece ter maior evidência, tanto epidemiológica quanto mecanística, que corrobora essa associação (1,2,9,15,16,23,42,44,46,61). Apesar do seu uso estar bastante restrito na maior parte dos países desenvolvidos (incluindo na EU - ver tabela 1) continua a ser bastante usado, principalmente em países em desenvolvimento (1). O seu mecanismo de toxicidade neuronal, ao contrário do que seria esperado, difere do do metabolito do MPTP. Ele parece entrar no SNC através de um transportador de aminoácidos (1,15,16) e depois nos neurónios dopaminérgicos através do transportador de dopamina (9) e a sua principal ação é o aumento da produção de ROS, interferindo com os mecanismos celulares de *redox* (1,9,15,16,23,46,61). Além disso, o paraquat parece também interferir com a função do sistema ubiquitina-proteossoma e estimular um aumento da expressão da α -sinucleína, levando desta forma a uma maior acumulação desta proteína (16,23,46). É ainda capaz de estimular a libertação de glutamato nas fendas sinápticas, que provoca depois excitotoxicidade neuronal (16,46).

O inseticida rotenona, funcionalmente semelhante ao MPTP, é também outro tóxico específico que tem vindo a ser associado com a DP, tanto em estudos epidemiológicos como em estudos experimentais (1,2,9,15,42,46,58,61). O uso deste pesticida está também proibido na UE (ver tabela 1). Este composto é lipofílico, logo facilmente consegue atravessar a BHE e entrar no SNC (1,9). A principal ação é a inibição do complexo mitocondrial I (1,2,9,15,46,61). Este complexo é parte da cadeia transportadora de eletrões, e esta inibição conduz à depleção de adenosina trifosfato (ATP) e conseqüente produção de ROS, que acaba por conduzir à morte celular (9,15,46). Além disso, a rotenona também é capaz de promover a agregação da α -sinucleína e causar disfunção do proteossoma (1,15).

A exposição a combinações de tóxicos pode potenciar o efeito de cada um dos deles, de maneira sinérgica. Apesar do que foi dito anteriormente acerca dos fungicidas como classe funcional no geral, existe um grupo químico frequentemente utilizado com esta função que tem sido também bastante mencionado como possível fator de risco para a DP, que são os ditiocarbamatos (15,16,42,55). Estes incluem os compostos maneb, ziram e outros, e parece que eles atuam exacerbando um estado pró-oxidativo já existente, interferindo com os mecanismos antioxidantes celulares (16). Assim, eles parecem atuar em combinação com outros pesticidas, após exposições concomitantes a múltiplos tóxicos, sendo que o mais frequentemente mencionado é o paraquat (15,16,42). A associação entre a combinação dos ditiocarbamatos e paraquat com um aumento de risco da DP é também corroborada por estudos epidemiológicos (55,62).

A permetrina, um inseticida piretróide, foi também associada à DP, sendo que é também um inibidor do complexo mitocondrial I (2,15,16). Também a cipermetrina, do mesmo grupo, tem tido algum interesse como possível neurotóxico na SNpc (16).

Como se pode constatar, a capacidade de gerar *stress* oxidativo celular é um possível mecanismo comum da maioria destes tóxicos. Uma vez que o metabolismo da dopamina por si só causa uma maior produção de ROS na SNpc em comparação com outras regiões cerebrais (que, em condições normais é compensado pelos mecanismos antioxidantes das células), os neurónios dopaminérgicos são mais suscetíveis a este tipo de toxicidade, sendo que uma carga de *stress* oxidativo exógeno adicional sobrecarrega a célula e acaba por levar à sua apoptose (1,15,16). Além disso, estes compostos parecem também causar um estado de inflamação e imunorreação glial, que pode exacerbar a produção de ROS na SNpc (15,16). Um estudo do tipo caso-controlo que avaliou a exposição a dois grupos de pesticidas definidos pelos seus mecanismos tóxicos como pesticidas que provocam *stress* oxidativo (que incluía o paraquat) e os inibidores do complexo I mitocondrial (que incluía a rotenona), e a sua relação com o risco de DP, encontrou uma associação positiva para estes dois mecanismos, o que ajuda a estabelecer uma ponte entre a evidência experimental e epidemiológica (61).

À semelhança da DA, um outro mecanismo de toxicidade dos contaminantes ambientais poderá passar pela sua interação com polimorfismos de determinados genes envolvidos na sua detoxificação ou envolvidos na patogênese da doença (2,17,52). Assim como na DA, a interação dos organofosfatos com polimorfismos na enzima PON1 pode exacerbar os seus efeitos

neurotóxicos na SNpc (17,39,46). Outros genes cujos polimorfismos parecem aumentar o risco de DP perante a exposição a pesticidas são: o que codifica a enzima Glutathione S-transferase (GST), que tem normalmente funções antioxidantes; o gene MDR1, que codifica um transportador celular e o gene SLC6A3, que codifica um transportador da dopamina - que podem, assim, funcionar como portas de entrada destes tóxicos nas células neuronais (15,17).

Apesar de haver menos evidência do que na DA, também na DP se coloca a hipótese de que os pesticidas possam atuar através de alterações epigenéticas (3,9). Exposições precoces a estes contaminantes ambientais podem provocar uma desregulação da expressão génica (através da alteração da metilação do ADN, por exemplo), com efeitos tóxicos a longo prazo na *substância nigra* (9,28). Inclusive, eles parecem ser capazes de interferir com a regulação da expressão do gene SNCA, que codifica a α -sinucleína (17).

Ao contrário do que seria expectável, o uso de equipamento individual de proteção, como luvas e máscaras, nem sempre foi demonstrado estar associado a um menor risco de doença perante a exposição a pesticidas. Um estudo incluído nesta revisão demonstrou que de facto este equipamento parecia diminuir o risco de DP (63); contudo, outro que avaliou este fator em conjunto com a exposição a pesticidas não encontrou uma diminuição do risco (45), o que poderá significar que os equipamentos utilizados não eram os mais apropriados ou que não eram utilizados de maneira correta.

Contudo, é necessário salientar que, apesar da evidência aqui apresentada, não é ainda possível classificar inequivocamente os pesticidas como fatores participantes na patogênese da DP. Um estudo de coorte prospetivo na Suécia que avaliou uma série de exposições ocupacionais em 204 casos de DP não encontrou associação com a exposição a pesticidas (64); outro estudo, de caso-controlo nos Estados Unidos, que avaliou também vários tipos de exposições ocupacionais, não encontrou associação com os pesticidas nem com o trabalho na agricultura (65). Estas incongruências podem dever-se a diferentes intensidades, frequências e tipos de exposições em diferentes países e ao longo das décadas (64).

2.1.3 Influência na ELA

O interesse dos contaminantes ambientais na patogênese da ELA surgiu da constatação de que existiam algumas populações que tinham incidências marcadamente mais elevadas da doença. Um desses grupos é a população indígena Chamorro da ilha de Guam, no Pacífico, nos quais se descobriu que a ingestão alimentar de um aminoácido produzido pelas cianobactérias, a B-N-Metilamino-L-alanina (BMAA) estava associada à maior incidência de uma variante da ELA, que inclui também clínica de parkinsonismo e demência (1,2,21,66). Outro grupo são os veteranos da 2ª Guerra do Golfo, cuja maior incidência de ELA se pensa estar associada às várias exposições tóxicas durante este período (1,2,21,67).

À semelhança das doenças neurodegenerativas previamente abordadas, também na ELA os pesticidas parecem ser os fatores ambientais com maior apoio da evidência epidemiológica e experimental. Mas, em grande parte por ser uma doença rara, que torna difícil a realização de estudos com potência estatística significativa, não existe muita evidência acerca de classes e muito menos compostos específicos possivelmente implicados.

A maioria dos estudos aborda os pesticidas como classe geral. Os resultados de grande parte deles são uma associação positiva entre a exposição a esta classe e o risco de ELA (2,3,12,20-23,66-76). Contudo, nem todos os estudos corroboram esta associação (77-79).

Residência rural e trabalho agrícola foram também associados a um risco aumentado de ELA (22,70,74), o que faz sentido tendo em conta a exposição a pesticidas inerente a estas ocupações. Uma ocupação em particular que tem sido associada com um maior risco de ELA são os jogadores de futebol profissional e outros jogadores de desportos de campo relvado, nos quais este aumento de risco poderá estar relacionado com a sua exposição aos pesticidas usados nos campos (20,22,66,68) - contudo, diversas possíveis exposições são referidas, como excesso de atividade física ou maior probabilidade de história de traumatismos cranianos (20,66). Além disso, em mais nenhuma das doenças neurodegenerativas incluídas nesta revisão bibliográfica se encontrou uma associação com esta ocupação, apesar da relação que parecem ter com os pesticidas.

Os organofosfatos são a classe química que tem sido mais investigada pela sua possível associação com a ELA (12,20-22,80). Isto deve-se a vários motivos: a já referida maior incidência de ELA nos veteranos da guerra do Golfo poderá estar relacionada com a sua maior exposição a organofosfatos como componentes de pesticidas e agentes nervosos usados durante a guerra (12,66,81); e o facto de que a exposição repetida ou intoxicação aguda por estes compostos induz uma neuropatia tardia (*Organophosphate induced delayed neuropathy* - OPIDN), que tem uma clínica de afetação motora e degeneração dos neurónios motores superiores e inferiores semelhantes à da ELA (12,22,80). Na ELA, o seu efeito neurotóxico poderá dever-se à sua capacidade de inibição da acetilcolinesterase e também aos seus efeitos pró-oxidativos (21,22,66).

Os organoclorados também têm tido algumas associações positivas com a ELA (67,71), se bem que com menor força de evidência que as doenças previamente abordadas. Um estudo com 110 casos de ELA que analisou a relação entre níveis mais elevados de alguns poluentes

ambientais persistentes no sangue e o risco de doença, encontrou um maior risco em indivíduos que tinham níveis mais elevados de alguns compostos organoclorados (67). Estes compostos podem causar toxicidade através de um mecanismo de despolarização sustentada, com libertação de neurotransmissores como o glutamato e, conseqüentemente, danos por hiperexcitabilidade (67). Possivelmente, podem ainda induzir alterações na metilação do ADN, causando alterações a nível da regulação da expressão de determinados genes - ou seja, alterações epigenéticas (67).

Como se verificou nas doenças neurodegenerativas anteriores, existe um interesse crescente na possibilidade de que estes tóxicos exercem os seus efeitos mediante a interação com fatores genéticos que aumentam a suscetibilidade à doença (12,22,66,68). De particular interesse tem sido o papel de polimorfismos no gene PON1, que como já foi mencionado anteriormente, participa no metabolismo e degradação dos organofosfatos - assim, indivíduos com mutações que diminuem a atividade desta enzima e/ou a sua capacidade de degradar estes tóxicos vão ter uma maior suscetibilidade aos efeitos deletérios deste grupo de pesticidas (12,21,22,66).

Uma outra hipótese que tem sido colocada em particular na ELA é a disseminação das proteínas de conformação aberrante para outras células, onde vão estimular a produção de outras proteínas aberrantes - de maneira semelhante às doenças dos priões (20). Os pesticidas e outros tóxicos ambientais, pela sua capacidade de alterarem a conformação proteica, podem ser estimuladores deste processo (20).

2.2 Outros contaminantes ambientais

2.2.1 Influência na DA

2.2.1.1 Metais

Uma vez que o cérebro tem uma grande capacidade de concentrar metais provenientes da dieta ou da água ingerida, o papel dos metais na patogênese da DA tem sido das exposições ambientais mais estudadas nas últimas décadas (56). Contudo não se conseguiram estabelecer associações concretas, sendo que a grande parte da evidência que apoia a toxicidade dos metais nesta doença baseia-se mais em efeitos observados em estudos experimentais, com poucas associações positivas a nível epidemiológico (40).

O alumínio (Al) tem já uma associação comprovada com um síndrome demencial - a demência “da diálise” - uma encefalopatia que ocorria em doentes a realizar hemodiálise há mais de um ano, devido à presença deste metal nas soluções dialisantes; é atualmente muito rara, devido à remoção do Al destas soluções (7). Assim sendo, este é provavelmente o metal mais estudado quanto à sua associação com a DA. Verificou-se que o Al se encontra em grande quantidade nas regiões mais afetadas pela DA, associado às placas Aβ e aos ENF (1,2,27) - contudo, se este achado significa que o Al participa na patogênese da DA ou se simplesmente se acumula nestas zonas por maior afinidade é ainda incerto (1,3,8,9,35). Em relação às fontes de exposição ao Al, foi verificado maior risco de demência nos indivíduos que consumiam água com elevado conteúdo de Al, não tendo sido encontrado risco associado a outras fontes de exposição (1,2,32). Potenciais mecanismo patogénicos do Al são a interferência na obtenção de energia pelas células e alterações das conformações das proteínas, com aumento da formação de Aβ (1,9,29,32); também indução de *stress* oxidativo e de uma resposta inflamatória (27,35). Mas, estudos epidemiológicos de maior escala não identificaram ainda a exposição a elevadas concentrações de Al como um fator causal na DA (1,9,27).

Outros metais - cobre, zinco e ferro - também foram encontrados em elevadas quantidades associados às placas de Aβ e possivelmente podem causar *stress* oxidativo e promover a agregação de Aβ, aumentando a formação das placas (1-3,27,32,35). Em particular, o cobre poderá contribuir para a formação das placas Aβ e dos ENF (8). Contudo, novamente, a correlação com estudos epidemiológicos é escassa (1,2).

O chumbo tem tido também algum interesse uma vez que este metal tem efeitos neurotóxicos conhecidos (2,9,27). Este metal poderá ter influência na DA na medida em que as exposições numa idade precoce podem ter efeitos neurodegenerativos a longo prazo (1,9,27,35). Além disso, estes efeitos poderão ser aumentados pela presença do alelo APOE 4 (2).

O mercúrio é também um neurotóxico conhecido, sendo que foi encontrado em maiores quantidades no cérebro e sangue de indivíduos com DA (9). Foi observado (em estudos experimentais) que o mercúrio tinha a capacidade de aumentar a produção e diminuir a degradação da Aβ, aumentando os níveis cerebrais deste péptido (9,27); e ainda, que poderia causar a hiperfosforilação da proteína tau (27). O APOE 4 pode também ser um mediador do

efeito tóxico deste metal, uma vez que pela sua estrutura tem menor capacidade de remover metais como o mercúrio (9,56).

O arsênio e o cádmio foram também estudados pela sua possível relação com a DA, pois verificou-se experimentalmente que podiam causar um aumento da produção de AB (9,27). Contudo, os estudos epidemiológicos acerca da relação destes metais com DA são escassos e os resultados entre si algo contraditórios (9,27).

Quanto à influência dos metais, deve ser ainda abordado o potencial papel das exposições a misturas de metais, cujos efeitos tóxicos são sinérgicos e não apenas aditivos, sendo que a exposição a baixas quantidades de vários metais pode ter um efeito significativo a longo prazo (27).

Também os metais podem ter como possível mecanismo patogénico as alterações epigenéticas - após exposições precoces, podem ser responsáveis por modificações epigenéticas na regulação de genes a longo prazo, sendo que as alterações patológicas serão evidentes apenas muito mais tarde (3,9).

2.2.1.2 Solventes

A evidência é escassa e controversa quanto aos seus efeitos na DA (2,29,32) - apenas um estudo incluído nesta revisão bibliográfica mostra associação marginal com a exposição a solventes (40).

2.2.1.3 Campos eletromagnéticos

Existem alguns estudos que apontam para uma associação entre a exposição a campos eletromagnéticos de extrema baixa frequência (os associados a linhas de eletricidade) e a DA (29,32,40). Mecanismos de neurotoxicidade propostos para este fator ambiental são a geração de *stress* oxidativo e efeitos citogenéticos - contudo não está ainda estabelecida uma verdadeira relação causal com a DA (32).

2.2.1.4 Poluição atmosférica

Existe alguma evidência para associação da poluição atmosférica e a DA, principalmente para óxidos de nitrogénio, matéria particulada e ozono; e em menor grau, monóxido de carbono e fumo de tabaco ambiental (27,32,35). Estes compostos parecem um efeito de redução do fluxo sanguíneo cerebral (32) e, também, efeitos tóxicos diretos nas células neuronais, nomeadamente produção de ROS, inflamação neuronal crónica e acumulação de AB (27). Além disso, estes compostos podem causar uma reação inflamatória que danifica a BHE, permitindo a sua entrada e a de outro compostos exógenos no SNC (35).

2.2.2 Influência na DP

2.2.2.1 Metais

À semelhança da DA, o seu papel na patogênese da DP não é consistentemente demonstrado pela evidência - estudos experimentais mostram possíveis mecanismos patogénicos que se assemelham aos subjacentes à DP, mas a evidência epidemiológica em geral não corrobora esta associação (1,2,29,43,49,51,53,64,65).

O manganésio tem sido dos metais mais estudados quanto à sua relação com a DP, uma vez que se verificou que exposições agudas a elevadas concentrações deste metal - como pode ocorrer em mineiros ou outras ocupações relacionadas com metais - levava a um síndrome parkinsoniano (também chamado de “manganismo”) (1,9,46). Contudo, tanto a patologia, quanto a clínica deste síndrome são distintas da DP idiopática (1,9,46), e outros trabalhos também não demonstram uma associação direta deste metal com o surgimento da doença (15,51,53). Apesar disto, tendo em conta a sua capacidade de disrupção da função mitocondrial, não se conseguiu ainda excluir completamente um possível papel do manganésio na DP (1,46).

O ferro encontra-se em elevadas quantidades nos neurónios da SNpc de indivíduos com DP - contudo, é incerto se esta acumulação de ferro é causadora das alterações que levam à degeneração neuronal ou se ocorre como resultado desta (1,9,15,46,51,53). Devido à presença de neuromelanina, os neurónios da SNpc têm naturalmente uma elevada capacidade de quelar metais como o ferro - este pode depois exacerbar a produção de ROS que resulta do metabolismo da dopamina, causando um maior *stress* oxidativo nos neurónios dopaminérgicos (9,15,46,51). Mesmo que o ferro possa intervir na patogênese da DP, parece pouco provável que a sua acumulação se deva a exposições ambientais ou ao seu consumo na dieta, mas sim a alterações genéticas na homeostase de ferro, como a hemocromatose (1,9,15). Exposições a combinações de ferro com outros metais como manganésio, chumbo e cobre mostraram algumas associações positivas com a DP (51,56).

Existe também alguma evidência de que o chumbo pode estar envolvido na etiologia da DP (9,15). Foi demonstrado que este era capaz de diminuir os níveis cerebrais de dopamina e diminuir a sensibilidade dos recetores a este neurotransmissor (9,15).

2.2.2.2 Solventes

A exposição ocupacional a solventes tem também tido algumas associações com a DP, mas a evidência epidemiológica é fraca (1,2,9,15,51,53,64,65). Pelo facto de estas substâncias serem comuns numa grande variedade de produtos (como produtos de limpeza) e por persistirem no ambiente, pode ocorrer também alguma exposição não ocupacional (2).

O tricloroetileno é o que tem sido mais estudado quanto à sua associação - este é também um inibidor do complexo mitocondrial I, pode produzir *stress* oxidativo e estimular a agregação da α -sinucleína (1,2,9,15). Contudo, existe pouca evidência epidemiológica da sua associação com DP (1,9,15).

2.2.2.3 Bifenilpoliclorados

A evidência que existe acerca destas substâncias é no geral inconsistente quanto à sua relação com a DP, sendo que apesar de mostrarem toxicidade para os neurónios dopaminérgicos em estudos experimentais, a evidência epidemiológica é contraditória (2,15,28,46).

2.2.2.4 Poluição atmosférica

A matéria particulada pode ter alguma associação com a DP, sendo que poderá atuar através de respostas inflamatórias e reações imunes no SNC, pela ativação da microglia (2,15,64). A poeira inorgânica, constituinte da matéria particulada, foi associada a um risco aumentado de DP num estudo prospetivo na Suécia (64).

2.2.2.5 Campos eletromagnéticos

A evidência quanto à influência dos campos eletromagnéticos é escassa e não conclusiva; enquanto houve algumas associações positivas, em relação à exposição ocupacional (49), outros artigos não encontram associação (43,51). Além disso, não há evidência mecanística da ligação entre os dois (49).

2.2.3 Influência na ELA

2.2.3.1 Metais

Como nas doenças anteriores, os metais são também uma classe bastante estudada em relação ao seu possível papel causal na ELA. Da mesma maneira que nas anteriores, e evidência não é clara, com resultados experimentais a mostrar possíveis relações mecânicas, mas com conclusões contraditórias dos estudos epidemiológicos (66,69,72,74,75,78). O interesse no papel dos metais nesta doença deve-se em parte ao facto de eles serem capaz de entrar nos neurónios motores através de transporte axonal retrógrado (72). É possível que os metais sejam capazes de modular a função da enzima SOD1, causando assim *stress* oxidativo (20,72).

O chumbo tem sido dos metais mais estudados na ELA, mas apesar de algumas associações em estudos epidemiológicos (2,20,21,68,76), não se consegue ainda estabelecer uma associação definitiva (22,66,69,74). Em termos de possíveis mecanismos de patogênese, o chumbo parece interagir com os astrócitos do SNC e alterar a sua capacidade de regular os níveis de glutamato, o que poderá levar à degeneração neuronal por excitotoxicidade (1,22). Paradoxalmente, alguns estudos relataram uma associação positiva entre níveis de chumbo elevados e uma progressão mais lenta da doença (20,21,67) - possivelmente a exposição ao chumbo pode aumentar a produção de antioxidantes e de fator de crescimento endotelial vascular pelas células da glia (20-22). Assim, o chumbo poderá ter efeitos opostos durante o curso da ELA: inicialmente promove a degeneração dos neurónios motores, iniciando o processo patológico, mas as suas ações sob a glia podem modular e atrasar a progressão da doença (22).

O mercúrio, pelas suas propriedades neurotóxicas estabelecidas tem tido também algum interesse, mas o apoio epidemiológico é escasso (2,20-22,64,66,69,74). Estudos experimentais mostram que o mercúrio tem a capacidade de danificar os axónios de neurónios motores (20), e também causar um estado pró-inflamatório no SNC, que pode causar disfunção da microglia e da sua interação com os astrócitos (21,22). Este metal parece ser capaz de atravessar a BHE e danificá-la, ao formar ligações com proteínas da membrana que aumentam a sua permeabilidade (22). Outro possível mecanismo tóxico do mercúrio é a sua capacidade de causar alterações epigenéticas, uma vez que conjugados de mercúrio e cisteína são estruturalmente semelhantes à metionina - o que possibilita que estes conjugados possam interferir com a metilação do ADN (21).

Evidência experimental mostra que o zinco é capaz de causar toxicidade nos neurónios motores medulares através de mecanismos de aumento dos ROS (21). Além disso, este metal e o cobre são necessários para o funcionamento correto da enzima SOD1 - alterações nos níveis destes metais podem interferir com a atividade e estrutura desta enzima, fenómenos que se verificam na patogênese desta doença (21). Contudo, esta evidência é apenas experimental, sendo que o apoio epidemiológico é muito escasso.

O cádmio é outro metal que tem tido algum interesse, pela verificação que este metal estimula a produção de metalotioneínas, que através da sua ligação ao zinco alteram a atividade da enzima SOD1 (22). Além disso, o cádmio pode alterar a estrutura desta enzima, levando à sua agregação e à formação de inclusões citoplasmáticas nas células neuronais (22).

Contudo, apesar desta relação mecanística plausível, a evidência epidemiológica que apoia esta relação é escassa (22).

Também em relação aos metais, existe a possibilidade de estes exercerem os seus efeitos através da interação com polimorfismos genéticos (21,66). Variações no gene que codifica a desidratase de ácido delta-aminoavulânico (ALAD), que se liga ao chumbo, podem aumentar a sua afinidade a este metal e assim aumentar os níveis de chumbo no organismo perante uma exposição (21,66).

2.2.3.2 Solventes

Este grupo de tóxicos tem também sido referido como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da ELA. Esta associação tem algum apoio de estudos epidemiológicos (72,75,76) e inclusive algumas profissões que estão mais expostas a solventes, como carpinteiros, pintores, trabalhadores da construção civil, mecânicos e trabalhadores industriais, mostraram um maior risco de ELA (2,20,76). Contudo, os resultados de outros estudos não corroboram esta associação (74,78).

2.2.3.3 Formaldeído

Esta substância está presente no fumo do tabaco e em gases de colas e tintas e tem tido algumas associações com o aumento do risco de ELA (2,79). Pode ter efeitos neurotóxicos através da redução da atividade da SOD1 e da alteração das funções mitocondriais, com aumento do *stress* oxidativo celular (79).

2.2.3.4 Campos eletromagnéticos

A exposição a campos eletromagnéticos teve algumas associações epidemiológicas positivas com o risco de ELA (69,78), principalmente através de ocupações que envolvem maior exposição, como eletricitas ou semelhantes (21,66,68) (contudo, estes trabalhadores tem inúmeras outras exposições possivelmente tóxicas (21)); outros trabalhos referem que a relação é ainda controversa (21,66,68,74). A exposição prolongada a campos eletromagnéticos parece ser capaz de aumentar a produção de ROS, com subsequente dano celular (21).

2.2.3.5 Oligoelementos

O selénio é um oligoelemento ao qual os humanos estão expostos através da dieta, do ar (como resultado da combustão do carvão) e da água (22). Este material foi relacionado com o risco de desenvolver ELA em alguns estudos (2,21,22), principalmente em algumas populações que ingeriam água com elevada concentração deste material (2,22). Os efeitos tóxicos desta substância foram evidenciados noutros mamíferos, onde se verificou que é capaz de alterar a função neuromuscular, com toxicidade específica para os neurónios motores, possivelmente através de efeitos pró-oxidantes e alterações mitocondriais, que conduzem a uma acumulação de SOD1 aberrante (21,22).

2.3 Tabelas para síntese das possíveis associações abordadas nesta revisão

Tabela 2: Contaminantes ambientais com possível associação à DA.

Doença de Alzheimer			
Contaminante ambiental	Associação com a doença	Possíveis mecanismos patogénicos	Referências
Pesticidas			
Pesticidas como classe geral	↑↑	Interferência com processos celulares; estimulação da formação de agregados das proteínas aberrantes; alterações epigenéticas; interação com polimorfismos genéticos.	2,9,12,23, 24,26-33
Organofosfatos	↑↑	Inibição da acetilcolinesterase, com destruição do sistema colinérgico; aumento da formação de AB; <i>stress</i> oxidativo; excitotoxicidade por glutamato; interação com polimorfismos da enzima PON1.	12,24,26,27, 30,39
→Paratião		Paratião: também alterações morfológicas em proteínas do citoesqueleto neuronal.	27
Carbamatos	↑	Inibição da acetilcolinesterase.	34,35
Organoclorados →Ciclodienos, DDT e DDE, congêneres dos PCBs, HCH, <i>nonachlor</i> , dieldrina, HCB e clordano.	↑↑	Stress oxidativo; alteração da homeostase do cálcio; interferência no processo de neurotransmissão e indução de reações inflamatórias.	24,26-28
		DDE: também por aumento da PPA nos neurónios; interações com o alelo APOE 4.	36
Fungicidas (ditiocarbamatos)	↑		31
Metais			
Alumínio	↑↔	Encontra-se em grande quantidade associado às placas AB e aos ENF; interferência nos processos de obtenção de energia celular; alterações das conformações proteicas; <i>stress</i> oxidativo e respostas inflamatórias.	1-3,8,9,27, 29,32,35

Influência de contaminantes ambientais na patogênese de doenças neurodegenerativas

Cobre, zinco e ferro	↔	Encontram-se associados às placas AB; <i>stress</i> oxidativo com promoção da agregação de AB.	1-3,27,32,35
Chumbo	↑	Efeitos neurodegenerativos após exposição em idades precoces, possivelmente aumentados pela presença de APOE 4.	1,2,8,9,27,29,32,35
Mercúrio	↑↔	Aumento dos níveis de AB; hiperfosforilação da proteína tau; toxicidade aumentada pela presença de APOE 4.	9,27,29,56
Arsénio e cádmio	↔	Aumento da produção de AB.	9,27
Solventes	↔		2,29,32
Campos eletromagnéticos	↑↔	<i>Stress</i> oxidativo e efeitos citogenéticos.	29,32,40
Poluição atmosférica →Óxidos de nitrogénio, matéria particulada e ozono	↑	Produção de ROS; inflamação neuronal; aumento de AB; danificação da BHE.	27,32,35

Legenda: ↑↑ - Mais de 80% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença e existe um mecanismo de patogênese proposto;
 ↑ - 60% a 80% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença;
 ↑↔ - 40% a 60% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença;
 ↔ - Menos de 40% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença.

Tabela 3: Contaminantes ambientais com possível associação à DP.

Doença de Parkinson			
Contaminante ambiental	Associação com a doença	Possíveis mecanismos patogênicos	Referências
Pesticidas			
Pesticidas como classe geral	↑↑	Interferência com processos celulares; estimulação da formação de agregados das proteínas aberrantes; alterações epigenéticas; interação com polimorfismos genéticos.	1-3,9,15,23,29-31,42-55
Organofosfatos → Clorpirifos	↑	Stress oxidativo; promoção de inflamação neuronal; interferência no transporte axonal; inibição do complexo mitocondrial I; interação com polimorfismo da enzima PON1.	1,2,9,12,16,23,39,45,50,57
Organoclorados →Dieldrina →Lindano	↑↑	Agregação da α -sinucleína; produção de ROS; disfunção mitocondrial e do proteossoma.	1,15,23,28,45,46
		Dieldrina: também por depleção da dopamina.	1,2,9,15,16,28
Carbamatos	↑	Inibição do sistema ubiquitina-proteossoma; aumento da α -sinucleína.	45,17
Paraquat	↑↑	Interferência com os mecanismos de <i>redox</i> - aumenta produção de ROS; interfere com a função do sistema ubiquitina-proteossoma; aumenta a produção de α -sinucleína; excitotoxicidade por glutamato.	1,2,9,15,16,23,42,44,46,61
Rotenona	↑↑	Inibição do complexo mitocondrial I - produção de ROS; promoção da agregação de α -sinucleína; disfunção do proteossoma.	1,2,9,15,42,46,58,61
Fungicidas (ditiocarbamatos)	↑	Efeito sinérgico com outros tóxicos: exacerbam um estado pro-oxidativo já existente.	15,16,42,55,62
Piretróides	↑	Inibição do complexo mitocondrial.	2,15,16
Metais			
Manganésio	↔	Disrupção mitocondrial.	1,9,15,46,51,53
Ferro	↔	Exacerbação da produção de ROS pelos neurónios dopaminérgicos.	1,9,15,46,51,53
Chumbo	↑↔	Diminuição dos níveis cerebrais de dopamina e da sensibilidade dos recetores a esta.	9,15

Influência de contaminantes ambientais na patogênese de doenças neurodegenerativas

Solventes			
Solventes como classe	↔		1,2,9,15,51,53,64,65
Tricloroetileno	↑↔	Inibição do complexo mitocondrial I; aumento da agregação da α -sinucleína.	1,9,15
Bifenilpoliclorados	↔		2,15,28,46
Poluição atmosférica	↑	Indução de respostas imuno-inflamatórias.	2,15,64
Campos eletromagnéticos	↔		43,49,51

Legenda: ↑↑ - Mais de 80% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença e existe um mecanismo de patogênese proposto;
 ↑ - 60% a 80% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença;
 ↑↔ - 40% a 60% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença;
 ↔ - Menos de 40% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença.

Tabela 4: Contaminantes ambientais com possível associação à ELA.

Esclerose Lateral Amiotrófica			
Contaminante ambiental	Associação com a doença	Possíveis mecanismos patogênicos	Referências
Pesticidas			
Pesticidas como classe geral	↑↑	Interferência com processos celulares; estimulação da formação de agregados das proteínas aberrantes; alterações epigenéticas; interação com polimorfismos genéticos.	2,3,12,20-23,66-76
Organofosfatos	↑↑	Inibição da acetilcolinesterase; <i>stress</i> oxidativo; interação com polimorfismos da PON1.	12,20-22,66,80
Organoclorados	↑	Danos neuronais por excitotoxicidade; interferência na metilação do ADN.	67,71
Metais			
Chumbo	↑↔	Excitotoxicidade por glutamato; interação com polimorfismos da enzima ALAD.	2,20-22,66,68,69,74,76,
Mercúrio	↔	Indução de respostas inflamatórias; disfunção da microglia; danificação da BHE; interferência na metilação do ADN.	2, 20-22,66,69,74
Zinco	↔	Aumento de ROS; alteração da função e promoção da agregação da enzima SOD1.	21
Cádmio	↔	Estimulação da produção de metalotioneínas, com alteração da enzima SOD1 e estimulação da sua agregação em inclusões citoplasmáticas.	22
Solventes	↑↔		2,20,72, 74-76,78
Formaldeído	↑↔	Redução da atividade da enzima SOD1; <i>stress</i> oxidativo	2,79
Campos eletromagnéticos	↔	Aumento da produção de ROS.	21,66,68,69,74,78
Selênio	↑	Efeito pró-oxidante; disfunção mitocondrial; aumento da SOD1 aberrante	2,21,22,66

Influência de contaminantes ambientais na patogênese de doenças neurodegenerativas

Legenda: ↑↑ - Mais de 80% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença e existe um mecanismo de patogênese proposto;
↑ - 60% a 80% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença;
↑↔ - 40% a 60% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença;
↔ - Menos de 40% dos artigos incluídos nesta revisão que mencionam o contaminante mostram uma associação positiva com a doença.

Conclusão

Da análise dos artigos incluídos nesta revisão bibliográfica foi possível retirar algumas conclusões acerca da influência de contaminantes ambientais na patogênese das três doenças neurodegenerativas abordadas. Em relação ao papel dos pesticidas, a maioria da evidência incluída é concordante de que estes poderão ser efetivamente fatores causais da neurodegeneração, se bem que o grau de concordância e força da evidência variam de doença para doença e também em relação a classes específicas e tóxicos em concreto. Quanto à influência de outros tipos de contaminantes, nomeadamente metais, solventes, poluição atmosférica, campos eletromagnéticos, entre outros, o que é retirado da evidência na qual se baseia esta revisão é que as associações são, no geral, mais controversas.

Quanto à DA, as classes de pesticidas organofosfatos e organoclorados parecem ser fatores de risco para a doença, tendo evidência mecanística e epidemiológica que demonstram uma relação com a doença. Os carbamatos e alguns fungicidas também mostraram algumas associações, mas com menor força de evidência. Em termos de possíveis mecanismos, os principais são a inibição da acetilcolinesterase (pelos organofosfatos e pelos carbamatos) e uma estimulação do *stress* oxidativo (por quase todas as classes mencionadas), com a possível consequência de aumentarem a agregação de AB. Em relação aos outros contaminantes, o papel do alumínio, apesar de ser dos mais estudados na DA, continua a ser incerto; o chumbo parece ser um possível fator de risco, principalmente após exposições em idade precoce; e, dos restantes fatores, os campos eletromagnéticos e a poluição atmosférica parecem ser os mais promissores em termos de uma possível associação com a DA.

Em relação à DP, esta é a doença neurodegenerativa que tem uma maior quantidade de evidência que aponta para uma associação com os pesticidas. Os pesticidas paraquat (através do seu efeito pro-oxidativo) e rotenona (através da inibição do complexo mitocondrial I) são os contaminantes específicos que têm maior quantidade de evidência, quer epidemiológica quer mecanística, a indicar uma associação com a DP nos indivíduos expostos. Também as classes previamente mencionadas na DA - organofosfatos, organoclorados e carbamatos - mostraram associações positivas com a ocorrência de DP. De destacar ainda o papel de associações de pesticidas, concretamente o paraquat com os ditiocarbamatos (fungicidas), que parecem ter efeitos patogénicos sinérgicos. Quanto ao papel de outros tipos de contaminantes ambientais, os que parecem ser mais promissores em termos de um possível impacto na génese da DP são os solventes, a poluição atmosférica e o chumbo.

Em relação à ELA, o facto de esta doença ser relativamente rara implica que há menor quantidade de pesquisa no que toca aos contaminantes ambientais. Apesar disso, a maioria dos estudos incluídos nesta revisão mostra que os pesticidas poderão ser possíveis fatores de risco para esta doença, particularmente as classes já previamente mencionadas, organoclorados e organofosfatos. Quanto a outros contaminantes, o chumbo, o selénio e os campos eletromagnéticos parecem poder ter algum papel na patogênese da ELA, se bem que no geral todos necessitam de maior quantidade de investigação nesta doença.

Um dos principais mecanismos mencionados para quase todos os contaminantes ambientais é a sua capacidade de gerar *stress* oxidativo nas células do SNC, o que poderá então provocar a formação dos agregados de proteínas aberrantes característicos das doenças neurodegenerativas. Outros possíveis mecanismos frequentemente mencionados são a disfunção mitocondrial e a neuroinflamação; a capacidade da maior parte destes tóxicos de causarem alterações epigenéticas; e a sua interação com fatores genéticos de maior suscetibilidade a estas doenças. Tudo isto pode fazer com que um baixo nível de exposição (provavelmente a vários destes contaminantes) durante um longo período de tempo resulte numa perda neuronal progressiva, cuja clínica só se manifestará anos ou décadas depois. Assim, o mais provável é que não haja um fator singular causador de cada uma destas patologias, mas sim que múltiplas exposições ao longo da vida vão causando danos no SNC.

Devido ao facto das doenças neurodegenerativas serem um grupo de doenças para o qual ainda não existe tratamento curativo e cuja patogénese não está completamente esclarecida, a possibilidade de existirem fatores ambientais envolvidos tem interesse pela oportunidade que representa, em termos de medidas preventivas que possam ser implementadas para diminuir a exposição e, idealmente, a incidência destas doenças. Em particular, para os pesticidas, poderá ser feito um controlo mais restrito das substâncias utilizadas e um esforço para educar e incentivar as populações mais diretamente expostas, como agricultores e outras pessoas que trabalham diretamente com estes tóxicos, para utilizarem equipamentos de proteção individual e aderirem a procedimentos para uso seguro destas substâncias. Além disso deve continuar a investir-se na pesquisa de alternativas com menor toxicidade cruzada com a população humana. Apesar de muitas dos pesticidas aqui mencionados terem já o seu uso proibido ou pelo menos restringido na Europa e, em alguns casos, a nível mundial, a importância de esclarecer estas associações com as doenças neurodegenerativas não é atenuada, uma vez que alguns deles (como os organoclorados) são bastantes persistentes no meio ambiente, logo os seus efeitos neurotóxicos poderão fazer-se sentir durante décadas após o término do seu uso; e, também, porque o conhecimento de como estes tóxicos afetam o SNC permite focar a pesquisa e formulação de novos produtos em substâncias que tenham mecanismos de atuação diferentes.

Da leitura dos artigos para esta revisão, retiram-se ainda outras conclusões em relação à metodologia da pesquisa neste tema. A demonstração concreta de associações entre contaminantes e doenças neurodegenerativas apresenta vários obstáculos, nomeadamente a dificuldade em estimar os níveis de exposição a estes contaminantes que, dado o longo período pré-sintomático destas doenças, poderá ter ocorrido décadas antes do diagnóstico (82). Em estudos retrospectivos em que a exposição é avaliada através de inquéritos aos participantes está inerente um possível viés de memória (82). Além disso, uma vez que existe algum grau de défice cognitivo nestas doenças (principalmente na DA), a história de exposições passadas muitas vezes não pode ser dada pelos próprios indivíduos afetados pela doença, mas tem de ser dada por terceiros ou extrapolada através de outros dados, o que implica também algum viés na recolha da história de exposição (82). Outras limitações da maioria dos estudos nesta área são a dificuldade de quantificação do grau de exposição, da determinação de exposição a

uma classe de tóxico ou componente específico e a falta de monitorização em fluídos biológicos ou através de biomarcadores, para melhor estimar os níveis concretos de exposição (73). Deve ainda ser mencionado o facto de que os possíveis mecanismos de ação referidos resultam de evidências experimentais, que podem nem sempre traduzir-se de maneira semelhante para a população humana, o que acrescenta outro grau de dificuldade à criação de uma relação causa-efeito definitiva entre a exposição a contaminantes ambientais e o risco de doenças neurodegenerativas (16,46).

Para melhor determinar relações causais definitivas entre contaminantes ambientais e doenças neurodegenerativas são necessários no futuro um maior número de estudos prospetivos de larga escala, com métodos de qualidade para avaliar as exposições passadas, que tenham em conta a duração e o tipo concreto de exposição (33,52).

Bibliografia

1. Cannon JR, Greenamyre JT. The Role of Environmental Exposures in Neurodegeneration and Neurodegenerative Diseases. *Toxicol Sci.* 2011 Dec; 124(2):225-50.
2. Tanner CM, Goldman SM, Ross GW, Grate SJ. The disease intersection of susceptibility and exposure: Chemical exposures and neurodegenerative disease risk. *Alzheimers Dement.* 2014 Jun; 10(3 Supl):S213-25.
3. Migliore L, Coppedè F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res.* 2009 Jul; 667(1-2):82-97.
4. World Health Organization. Burden of disease from Ambient Air Pollution for 2012. Geneva; 2014. 3p
5. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Cancer-Causing Substances in the Environment [Internet]. [Atualizado a 2018 Dez 18; citado a 2019 Abril 06]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/substances>
6. Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 19th Edition. McGraw-Hill Education; 2015.
7. Daroff RB, Jankovic J, Mazziotta JC, Pomeroy SL, editors. *Bradley's Neurology in Clinical Practice.* 7th Edition. Elsevier; 2016.
8. Demartini DR, Schilling LP, Costa JC, Carlini CR. Alzheimer's and Parkinson's diseases: An environmental proteomic point of view. *J Proteomics.* 2014 Jun 2; 104:24-36.
9. Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015 Apr 10; 9:124.
10. Dementia [Internet]. 2017 Dez 12 [citado 2018 Dez 29]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
11. OECD. *Health at a Glance 2017: OECD Indicators.* Paris: OECD Publishing; Fev 2018. 220p.
12. Sánchez-Santed F, Colomina MT, Herrero Hernández E. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex.* 2016 Jan;74:417-26.
13. GBD 2015 Neurological disorders Collaborator Group. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol* Nov 2017. 16: 877-97.
14. Ferreira JJ, Goncalves N, Valadas A, Janeiro C, Silva MR, Nogueira L, Vieira JLM, Lima AB. Prevalence of Parkinson's disease: a population-based study in Portugal. *Eur J Neurol.* 2017; 24(5): 748-750.
15. Goldman SM. Environmental Toxins and Parkinson's Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:141-64.
16. Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, Bastos ML, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases – A mechanistic approach. *Toxicol Lett.* 2014 Oct 15;230(2):85-103.
17. Ahmed H, Abushouk AI, Gabr M, Negida A, Abdel-Daim MM. Parkinson's disease and pesticides: A meta-analysis of disease connection and genetic alterations. *Biomed Pharmacother.* 2017 Jun;90:638-649.

18. What is ALS/MND [Internet]. [Citado em 2018 Dez 30]. Disponível em: <https://www.alsmndalliance.org/what-is-alsmnd/>
19. Brites D. Esclerose Lateral Amiotrófica: O que se sabe hoje. *Cidade Solidária*. 2016; 35:152-161.
20. Wang MD, Little J, Gomes J, Cashman NR, Krewski D. Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology*. 2017 Jul;61:101-130.
21. Trojsi F, Monsurrò MR, Tedeschi G. Exposure to Environmental Toxicants and Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: State of the Art and Research Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2013 Jul 24;14(8):15286-311.
22. Vinceti M, Bottecchi I, Fan A, Finkelstein Y, Mandrioli J. Are environmental exposures to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis? *Rev Environ Health*. 2012;27(1):19-41.
23. Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol*. 2017 Feb;91(2):549-599.
24. Zaganas I, Kapetanaki S, Mastorodemos V, Kanavouras K, Colosio C, Wilks MF, Tsatsakis AM. Linking pesticide exposure and dementia: What is the evidence? *Toxicology*. 2013 May 10;307:3-11.
25. European Commission. EU pesticides database [Internet]. [Atualizado a 2016 Abril 07; citado a 2019 Março 20]. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>
26. Hayden KM, Norton MC, Darcey D, Ostbye T, Zandi PP, Breitner JC, Welsh-Bohmer KA; For the Cache County Study Investigators. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: The Cache County Study. *Neurology*. 2010 May 11;74(19):1524-30.
27. Yegambaram M, Manivannan B, Beach TG, Halden RU. Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: A Review. *Curr Alzheimer Res*. 2015;12(2):116-46.
28. Saravi SSS, Dephour AR. Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders: A review. *Life Sci*. 2016 Jan 15;145:255-64.
29. Campdelacreu J. Parkinson's disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurologia*. 2014 Nov-Dec;29(9):541-9.
30. Parrón T, Requena M, Hernández AF, Alarcón R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011 Nov 1;256(3):379-85.
31. Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues JF, Brochard P. Neurodegenerative Diseases and Exposure to Pesticides in the Elderly. *Am J Epidemiol*. 2003 Mar 1;157(5):409-14.
32. Killin LOJ, Starr JM, Shiue IJ, Russ TC. Environmental risk factors for dementia: a systematic review. *BMC Geriatr*. 2016 Oct 12;16(1):175.
33. Yan D, Zhang Y, Liu L, Yan H. Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2016 Sep 1;6:32222.
34. Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR. Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. *Environ Health Perspect*. 2005 Sep;113(9):1250-6.

35. Dosunmu R, Wu J, Basha MR, Zawia NH. Environmental and dietary risk factors in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2007 Jul;7(7):887-900.
36. Richardson JR, Roy A, Shalat SL, von Stein RT, Hossain MM, Buckley B, Gearing M, Levey AI, German DC. Elevated Serum Pesticide Levels and Risk for Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2014 Mar;71(3):284-90.
37. Singh N, Chhillar N, Banerjee B, Bala K, Basu M, Mustafa M. Organochlorine pesticide levels and risk of Alzheimer's disease in north Indian population. *Hum Exp Toxicol*. 2013 Jan;32(1):24-30.
38. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). Poluentes Orgânicos [Internet]. 2006 [citado a 2019 Janeiro 25]. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/pops.aspx>
39. Paul KC, Sinsheimer JS, Cockburn M, Bronstein M, Bordelon Y, Ritz B. Organophosphate pesticides and PON1 L55M in Parkinson's disease progression. *Environ Int*. 2017 Oct;107:75-81.
40. Koeman T, Schouten LJ, van den Brandt PA, Slottje P, Huss A, Peters S, Kromhout H, Vermeulen R. Occupational Exposures and Risk of Dementia- Related Mortality in the Prospective Netherlands Cohort Study. *Am J Ind Med*. 2015 Jun;58(6):625-35.
41. Medehouenou TC, Ayotte P, Carmichael PH, Kröger E, Verreault R, Lindsay J, Dewailly É, Tyas SL, Bureau A, Laurin D. Plasma polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide concentrations in dementia: The Canadian Study of Health and Aging. *Environ Int*. 2014 Aug;69:141-7.
42. Pouchieu C, Piel C, Carles C, Gruber A, Helmer C, Tual S, Marcotullio E, Lebaillly P, Baldi I. Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. *Int J Epidemiol*. 2018 Feb 1;47(1):299-310.
43. Gunnarsson LG, Bodin L.. Parkinson's disease and occupational exposures: a systematic literature review and meta-analyses. *Scand J Work Environ Health*. 2017 May 1;43(3):197-209.
44. Brouwer M, Huss A, van der Mark M, Nijssen PCG, Mulleners WM, Sas AMG, van Laar T, de Snoo GR, Kromhout H, Vermeulen RCH. Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environ Int*. 2017 Oct;107:100-110.
45. Narayan S, Liew Z, Bronstein M, Ritz B. Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson Environment Gene (PEG) study. *Environ Int*. 2017 Oct;107:266-273.
46. Nandipati S, Litvan I. Environmental Exposures and Parkinson's Disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Sep 3;13(9).
47. Breckenridge CB, Berry C, Chang ET, Sielken RL, Mandel JS. Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Apr 7;11(4):e0151841.
48. Wan N, Lin G. Parkinson's Disease and Pesticides Exposure: New Findings From a Comprehensive Study in Nebraska, USA. *J Rural Health*. 2016 Jun;32(3):303-13.
49. Brouwer M, Koeman T, van den Brandt PA, Kromhout H, Schouten LJ, Peters S, Huss A, Vermeulen R. Occupational exposures and Parkinson's disease mortality in a prospective Dutch cohort. *Occup Environ Med*. 2015 Jun;72(6):448-55.
50. Wang A, Cockburn M, Ly TT, Bronstein J, Ritz B. The association between ambient exposure to organophosphates and Parkinson's disease risk. *Occup Environ Med*. 2014 Apr;71(4):275-81.

51. Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 2011 Jun;26 Suppl 1:S1-58.
52. Pereira D, Garrett C. Fatores de risco na Doença de Parkinson: Um Estudo Epidemiológico. *Acta Med Port.* 2010 Jan-Feb;23(1):15-24.
53. Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, Bennett J, Semple S, Dick S, Counsell C, Mozzoni P, Haites N, Wettinger SB, Mutti A, Otelea M, Seaton A, Söderkvist P, Felice A; Geoparkinson study group. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med.* 2007 Oct;64(10):666-72.
54. Yan D, Zhang Y, Liu L, Shi N, Yan H. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: Dose-response meta-analysis of observational studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018 Jul;96:57-63.
55. Wang A, Costello S, Cockburn M, Zhang X, Bronstein J, Ritz B. Parkinson's disease risk from ambiente exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol.* 2011 Jul;26(7):547-55.
56. Coppedè F, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L, Murri L. Genes and the Environment in Neurodegeneration. *Biosci Rep.* 2006 Oct;26(5):341-67.
57. Gatto NM, Cockburn M, Bronstein J, Manthripragada AD, Ritz B. Well-Water Consumption and Parkinson's Disease in Rural California. *Environ Health Perspect.* 2009 Dec;117(12):1912-8.
58. Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT, Shepherd S. Pesticide/ Environmental Exposures and Parkinson's Disease in East Texas. *J Agromedicine.* 2008;13(1):37-48.
59. Fleming L, Mann JB, Bean J, Briggie T, Sanchez-Ramos JR. Parkinson's Disease and Brain Levels of Organochlorine Pesticides. *Ann Neurol.* 1994 Jul;36(1):100-3.
60. Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. Infomed (base de dados de medicamentos de uso humano). 2009 [citado a 2019 Abril 07]. Disponível em: <http://app7.infarmed.pt/infomed/lista.php>
61. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW. Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environ Health Perspect.* 2011 Jun;119(6):866-72.
62. Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson ' s Disease and Residential Exposure to Maneb and Paraquat From Agricultural Applications in the Central Valley of California. *Am J Epidemiol.* 2009 Apr 15;169(8):919-26.
63. Furlong M, Tanner CM, Goldman SM, Bhudhikanok GS, Blair A, Chade A, Comyns K, Hoppin JA, Kasten M, Korell M, Langston JW, Marras C, Meng C, Richards M, Ross GW, Umbach DM, Sandler DP, Kamel F .Protective glove use and hygiene habits modify the associations of speci fi c pesticides with Parkinson ' s disease. *Environ Int.* 2015 Feb;75:144-50.
64. Feldman AL, Johansson AL, Nise G, Gatz M, Pedersen NL, Wirdefeldt K. Occupational exposure in parkinsonian disorders: a 43-year prospective cohort study in men. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011 Nov;17(9):677-82.
65. Firestone JA1, Lundin JI, Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Longstreth WT Jr, Checkoway H. Occupational factors and risk of Parkinson's disease: A population-based case-control study. *Am J Ind Med.* 2010 Mar;53(3):217-23.

66. Bozzoni V, Pansarasa O, Diamanti L, Nosari G, Cereda C, Ceroni M. Amyotrophic lateral sclerosis and environmental. *Funct Neurol*. 2016 Jan-Mar;31(1):7-19.
67. Su FC, Goutman SA, Chernyak S, Mukherjee B, Callaghan BC, Batterman S, Feldman EL. Association of Environmental Toxins With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2016 Jul 1;73(7):803-11.
68. Oskarsson B, Horton DK, Mitsumoto H. Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin*. 2015 Nov;33(4):877-88.
69. Yu Y, Su F, Callaghan BC, Goutman SA, Batterman SA, Feldman EL. Environmental Risk Factors and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): A Case-Control Study of ALS in Michigan. *PLoS One*. 2014 Jun 30;9(6):e101186.
70. Kang H, Cha ES, Choi GJ, Lee WJ. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Agricultural Environments: A Systematic Review. *J Korean Med Sci*. 2014 Dec;29(12):1610-7.
71. Kamel F, Umbach DM, Bedlack RS, Richards M, Watson M, Alavanja MC, Blair A, Hoppin JA, Schmidt S, Sandler DP. Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology*. 2012 Jun;33(3):457-62.
72. Pamphlett R. Exposure to environmental toxins and the risk of sporadic motor neuron disease: an expanded Australian case-control study. *Eur J Neurol*. 2012 Oct;19(10):1343-8.
73. Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Youk A, Talbott EO. Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis of epidemiological studies Pesticide exposure as a risk factor for ALS. *Environ Res* 2012 Aug;117:112-9.
74. Sutedja NA, Veldink JH, Fischer K, Kromhout H, Heederik D, Huisman MH, Wokke JH, van den Berg LH. Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review. *Amyotroph Lateral Scler*. 2009 Oct-Dec;10(5-6):302-9.
75. Morahan JM, Pamphlett R. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Exposure to Environmental Toxins: An Australian Case-Control Study. *Neuroepidemiology*. 2006;27(3):130-5.
76. Andrew AS, Caller TA, Tandan R, Duell EJ, Henegan PL, Field NC, Bradley WG, Stommel EW. Environmental and occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in New England. *Neurodegener Dis*. 2017;17(2-3):110-116.
77. Vinceti M, Filippini T, Violi F, Rothman KJ, Costanzini S, Malagoli C, Wise LA, Odone A, Signorelli C, Iacuzio L, Arcolin E, Mandrioli J, Fini N, Patti F, Lo Fermo S, Pietrini V, Teggi S, Ghermandi G, Scillieri R, Ledda C, Mauceri C, Sciacca S, Fiore M, Ferrante M. Pesticide exposure assessed through agricultural crop proximity and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Environ Health*. 2017 Aug 29;16(1):91.
78. Koeman T, Slottje P, Schouten LJ, Peters S, Huss A, Veldink JH, Kromhout H, van den Brandt PA, Vermeulen R. Occupational exposure and amyotrophic lateral sclerosis in a prospective cohort. *Occup Environ Med*. 2017 Aug;74(8):578-585.
79. Weisskopf MG, Morozova N, Reilly EJO, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A. Prospective study of chemical exposures and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009 May;80(5):558-61.
80. Merwin SJ, Obis T, Nunez Y, Re DB. Organophosphate neurotoxicity to the voluntary motor system on the trail of environment-caused amyotrophic lateral sclerosis: the known, the misknown, and the unknown. *Arch Toxicol*. 2017 Aug;91(8):2939-2952.
81. Beard JD, Engel LS, Richardson DB, Gammon MD, Baird C, Umbach DM, Allen KD, Stanwyck CL, Keller J, Sandler DP, Schmidt S, Kamel F. Military Service, Deployments, and Exposure in Relation to Amyotrophic Lateral Sclerosis Etiology. *Environ Int*. 2016 May;91:104-15.

82. Elbaz A, Dufouil C, Alperovitch A. Interaction between genes and environment in neurodegenerative diseases. *C R Biol.* 2007 Apr;330(4):318-28.