

# Exposición a pesticidas y esclerosis lateral amiotrófica: cuantificación de la relación causa-efecto a través de la técnica de meta-análisis.

Casanova AG, Corada M, Vicente-Vicente L, Hernández-Sánchez MT, Morales AI\*, Prieto M

Unidad de Toxicología. University of Salamanca; Grupo de Investigación traslacional en enfermedades renales y cardiovasculares (TRECARD), Salamanca; Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

**Resumen:** Recientes estudios han demostrado que algunos tipos de pesticidas están relacionados con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer, por lo que se postula la posibilidad de que también lo estén con la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Para determinar la existencia de esta relación se llevó a cabo una revisión bibliográfica de los estudios epidemiológicos publicados hasta la fecha que evaluaran el riesgo de desarrollar ELA tras la exposición a pesticidas. Posteriormente, se aplicó un meta-análisis sobre los datos numéricos publicados en ellos para obtener un valor combinado de Odds Ratio (OR) que permitiera evaluar el riesgo de manera estadística. Siete estudios epidemiológicos fueron incluidos en el análisis tras aplicar los criterios de inclusión. Se obtuvo un valor de OR de 1,42 (con intervalo de confianza del 95% de 1,09-1,86) con un p-valor altamente significativo ( $p=0,001$ ). A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que parece existir una relación de causalidad entre la exposición a pesticidas y el desarrollo de ELA, aunque ésta podría estar relacionada también con otros factores.

**Palabras clave:** Pesticidas; ELA; Meta-análisis; Epidemiología; Ambiental.

**Abstract:** *Pesticides exposure and Amyotrophic Lateral Sclerosis: quantification of cause-effect relationship through meta-analytical technique.*

Recent studies have revealed that some types of pesticides are related with the development of some neurodegenerative conditions such as Parkinson's and Alzheimer's disease. Because of that, a possible relationship between Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and pesticides exposure has been suggested.

To elucidate this relationship, a systematic review of epidemiological studies published up to date evaluating the risk of developing ALS after pesticides exposure was carried out. After that, a meta-analysis was applied to the numerical data compiled on them to obtain a combined Odds Ratio (OR) value that would allow to evaluate the risk statistically.

Seven epidemiological studies were included in the analysis after applying the inclusion criteria. An OR value of 1.42 (95% confidence interval of 1.09-1.86) with a highly significant p-value ( $p=0.001$ ) was obtained.

On the basis of the results obtained, it can be concluded that it seems to exist a causality relationship between pesticides exposure and ALS development, although this disease could be also related with other factors.

**Keywords:** d Environmental; Epidemiology; Meta-analysis; ALS; Pesticides.

## Introducción

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se define como una enfermedad neuronal fatal del sistema nervioso central, caracterizada por una degeneración progresiva tanto de las neuronas motoras superiores como de las inferiores (Bozzo y Mirra, 2016), que tiene como consecuencia una debilidad muscular que avanza hasta la hipotrofia, la parálisis y la aparición de otros efectos piramidales (Bozzoni et al., 2016). Existen dos variantes de la enfermedad: esporádica (sin predisposición genética), que representa más del 90%

de los casos diagnosticados; y familiar, con posible causa hereditaria (Tokuda y Furukawa, 2016).

La incidencia mundial de la ELA permanece constante entre 1,5 y 2,7 casos nuevos por cada 100.000 habitantes y año, afectando con una frecuencia ligeramente superior a los varones en comparación con las mujeres (Zarei et al., 2015). Se inicia en individuos con una edad promedio de 60 años en las formas no familiares y unos 10 años antes en las familiares (Wang et al., 2014). Su evolución es progresiva, y se desarrolla durante 2-6 años, con una supervivencia media de 2 a 3 años tras el diagnóstico para la lesión bulbar; y de 3 a 5 para la lesión espinal. A nivel geográfico, existen poblaciones en regiones tales como Japón, Guam, Península de Kii y Nueva Guinea cuya incidencia resulta 50-100 veces superior (Zarei et al., 2015). Actualmente se observa un aumento en el número de casos diagnosticados cada año en el resto del mundo, debido probablemente a una mejora en el diagnóstico y a la mayor supervivencia de la población (lo cual supone un aumento de la población susceptible) (Roman, 1996).

Su etiología por el momento es desconocida, aunque las investigaciones desarrolladas hasta la fecha han propuesto las siguientes hipótesis:

- Generación de mutaciones en el gen de la Superóxido Dismutasa (Cu/Zn) (SOD1), localizado en el cromosoma 21q22.1.: esta enzima es responsable de la eliminación de radicales libres, y su actividad está disminuida en los pacientes con ELA (Boll et al., 2003; Saccon, 2013).

- Producción de compuestos intermediarios del metabolismo por cianobacterias y su posterior acumulación en depósitos de agua para consumo humano: se ha observado que un 95% de las cepas estudiadas de cianobacterias son capaces de sintetizar  $\beta$ -metilamino-L-alanina, un compuesto con propiedades neurotóxicas demostradas en estudios preclínicos (Holtcamp, 2012).

- Comportamiento de sustancias endógenas como endotoxinas: se ha implicado específicamente al glutamato extracelular de la médula espinal y otras regiones cerebrales, basándose en el hecho de que el glutamato y el aspartato se encuentran elevados en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con ELA. Se ha propuesto la existencia de una alteración en el transporte del glutamato que conduciría a su acumulación, lo cual facilitaría la hiperactivación de los receptores de glutamato y, por tanto, la muerte neuronal. En estudios realizados con pacientes de ELA esporádica se ha observado una disminución del 30-90% de las proteínas encargadas del transporte del glutamato que no se manifestaba en otras regiones del cerebro no alteradas por la patología (Roman, 1996; Rowland y Shneider, 2001; Hand y Rouleau, 2002).

- Metales pesados: el metal más estudiado en este campo es el plomo, debido a que la intoxicación aguda por el mismo da lugar a un cuadro clínico similar a la ELA (Kamel, 2002). Se ha propuesto que el plomo sustituye al calcio en las reacciones químicas celulares causando daños a las mitocondrias, daño oxidativo a las neuronas y potenciando la excitotoxicidad del glutamato (Savolainen et al., 1998).

Actualmente el único fármaco autorizado para la ELA es el riluzol, el cual actúa por inhibición de procesos relacionados con el glutamato, aunque su mecanismo de acción no está claramente

\*e-mail: amorales@usal.es

descrito. Este agente sólo logra prolongar el tiempo de supervivencia. El resto de compuestos inicialmente muy esperanzadores no han logrado mostrar una mejoría suficiente (Cheah et al., 2010).

Numerosos estudios realizados con pesticidas han demostrado su capacidad para causar neurodegeneración. Investigaciones recientes han asociado, por ejemplo, el desarrollo de disfunción motora y degeneración de la región negroestriatal en ratas con la exposición al insecticida rotenona (Naughton et al., 2010). Así mismo, Mudawal et al. (2015) han concluido que dosis bajas de lindano son capaces de desencadenar estrés oxidativo y alteraciones proteómicas a nivel cerebral, mecanismos que están vinculados con la neurodegeneración; mientras que Coughlan et al. (2015) han demostrado que el herbicida paraquat y el fungicida maneb alteran el crecimiento axonal y la función sináptica de las neuronas centrales.

Dado que los pesticidas son agentes que actúan como factores de riesgo reconocidos en patologías como el Parkinson y el Alzheimer (Elbaz et al., 2009; Richardson et al. 2014), se ha planteado la posibilidad de que también lo sean para la ELA, a pesar de que los mecanismos a través de los cuales la causarían son aún desconocidos (Roman, 1996; Keifer y Firestone, 2007). El objetivo de este estudio fue comprobar si existe una relación causa-efecto significativa entre la exposición a pesticidas y el desarrollo de ELA a partir de los estudios epidemiológicos publicados hasta la fecha mediante la aplicación de un meta-análisis

## Material y métodos

### Criterios de inclusión

A la hora de realizar el trabajo de meta-análisis sólo se seleccionaron estudios epidemiológicos que cumplieran las siguientes características: (1) ser ensayos epidemiológicos de casos-controles o de cohortes, (2) comparar el efecto debido a la exposición a pesticidas con el de la no exposición, (3) proporcionar el número de sujetos totales de cada grupo de estudio y el número de sujetos que se expusieron a pesticidas, (4) proporcionar el número de sujetos que desarrollaron ELA y (5) estar publicados en un idioma comprensible para los revisores (inglés, castellano, francés, italiano o portugués).

### Estrategias de búsqueda

Las bases de datos a las que se accedió para buscar los ensayos epidemiológicos adecuados para el trabajo fueron Medline® (base de datos de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos), ScienceDirect® (servicio de acceso electrónico a las revistas científicas de la editorial Elsevier®), y Scopus® (base de datos de la editorial Elsevier®). Las palabras clave introducidas en la búsqueda fueron: (“Amyotrophic lateral sclerosis” OR “ALS”) AND (“pesticides” OR “insecticides” OR “fungicides”).

### Extracción de datos

La siguiente información fue recabada a partir de los artículos científicos seleccionados: el nombre del primer autor, el año de publicación, los años de realización del estudio, la zona geográfica donde se desarrolló, el tipo de estudio, el tamaño de muestra, la fuente de información de enfermos de ELA y su criterio de diagnóstico, la fuente de información sobre la exposición a pesticidas y el tipo de exposición; y la cuantificación del riesgo medida en Odds Ratio (OR) o Riesgo Relativo (RR).

### Análisis estadístico

El meta-análisis de los datos comparables fue llevado a cabo utilizando el paquete estadístico Simfit®, con el cual se realizaron los test de heterogeneidad de los datos (test Q de heterogeneidad y test I<sup>2</sup>), el estudio comparativo de los datos numéricos (cálculo de la OR combinada) y el forest plot que se incluye en el trabajo. Los resultados se representan en forma de Promedio ± Intervalo de confianza (IC 95%).

## Resultados

### Características individuales de los estudios

Tras realizar la búsqueda de artículos en las bases de datos se seleccionaron siete estudios epidemiológicos (6 retrospectivos o de casos-controles; 1 prospectivo o de cohortes) que cumplían todos los requisitos para poder ser incluidos en este trabajo de meta-análisis. En todos ellos se evaluaba el riesgo de padecer ELA tras haber estado expuesto o no a pesticidas. Los estudios se desarrollaron en Estados Unidos, países europeos (Italia y Francia), India y Australia; y todos ellos incluyeron un tamaño de muestra superior o igual a 123 individuos. El criterio más empleado para diagnosticar la ELA fue el de El Escorial (criterio establecido por la World Federation of Neurology). Las características generales de los ensayos clínicos incluidos en el trabajo de meta-análisis se recogen en la Tabla 1.

### Meta-análisis del riesgo de desarrollar ELA tras la exposición a pesticidas

Tras aplicar sobre los datos recogidos los test de heterogeneidad descritos en el apartado “Materiales y Métodos”, se obtuvo un p-valor (Q) = 0,009 y un valor de I<sup>2</sup> = 64,77%; lo cual llevó a aceptar la hipótesis de heterogeneidad de los datos. Tras seleccionar el modelo de efectos aleatorios, se obtuvo un valor de OR combinada de 1,42 (IC 95%: 1,09-1,86) cuyo p-valor resultó estadísticamente significativo (p-valor = 0,001). Todos los parámetros calculados en el análisis estadístico se recogen en la Tabla 2.

Este valor de OR nos indica que el desarrollo de ELA está significativamente relacionado con la exposición a pesticidas, como se observa en la figura 1.

Tabla 1. Características de los estudios incluidos en el trabajo de meta-análisis.

Autor, año	Año de estudio	Zona geográfica	Criterio diagnóstico	Metodología	Fuente de información	Tipo de estudio	Agente de exposición	Número de casos	Número de controles
Beard, 2016	2005-2010	EEUU	ALS Functional Rating Scale	Cuestionario estandarizado	Registro Nacional de Veteranos	Casos-Controles	Pesticidas de uso personal/Herbicidas ambientales	621	958
Bonvicini, 2010	1995-2006	Italia	Criterios de El Escorial	Cuestionario estandarizado	Registro Hospitalario de la región Emilia Romagna	Casos-Controles	Pesticidas de exposición ocupacional	41	82
Das, 2012	2008-2011	India	Criterios de El Escorial	Historia clínica	Registro del Hospital y Colegio Médico Burdwan	Casos-Controles	Pesticidas en general	110	240
Furby, 2010	2006-2008	Francia	Criterios de El Escorial	Cuestionario estandarizado	Registros neurológicos de la región de Bretaña	Casos-Controles	Compuestos agrícolas	108	122
Kamel, 2012	1993-1997	EEUU	Diagnóstico clínico	Cuestionario estandarizado	Certificados de defunción	Cohortes	Pesticidas de exposición ocupacional	41	84.698
McGuire, 1997	1990-1994	EEUU	No especificado	Cuestionario estandarizado	Sistemas de vigilancia médica	Casos-Controles	Compuestos agrícolas	174	348
Pamphlett, 2012	2000-2011	Australia	Diagnóstico clínico	Cuestionario estandarizado	Bases de datos australianas de asociaciones de EMN	Casos-Controles	Pesticidas de exposición doméstica y ocupacional	787	778

Tabla 2. Parámetros calculados en el meta-análisis. OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de confianza del 95%

Estudio	Exposición a pesticidas		No exposición a pesticidas		Peso estadístico	OR, 95% IC
	Casos de ELA	Total	Casos de ELA	Total		
Beard, 2016	128	330	491	1245	20,68%	0,97 (0,81; 1,16)
Bonvicini, 2010	13	24	28	99	6,45%	3,00 (1,55; 5,75)
Das, 2012	56	164	54	186	14,71%	1,27 (0,92; 1,75)
Furby, 2010	17	24	91	206	6,37%	3,07 (1,58; 5,93)
Kamel, 2012	77	150.917	87	188.039	18,95%	1,10 (0,89; 1,38)
McGuire, 1997	33	81	138	438	13,80%	1,49 (1,06; 2,12)
Pamphlett, 2012	274	498	106	259	19,03%	1,77 (1,42; 2,20)
COMBINADO	598	152.038	995	190.472	100,00%	1,42 (1,09; 1,86)

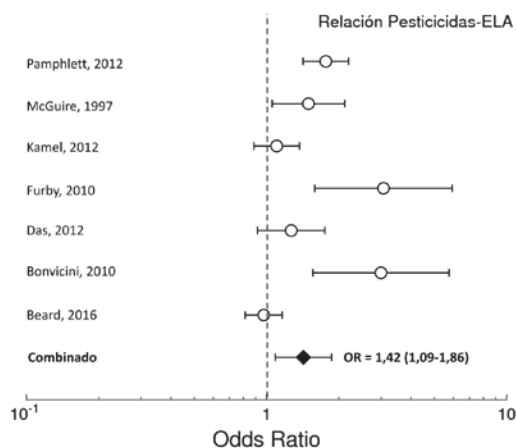


Figura 1 Forest plot donde se compara la incidencia de aparición de ELA en pacientes que se expusieron a pesticidas frente a la de aquellos que no fueron expuestos. Los resultados se presentan en forma de Promedio  $\pm$  Intervalo de Confianza (IC 95%). Valores de Odds Ratio superiores a 1 indican la existencia de una relación de causalidad entre la exposición a pesticidas y el desarrollo de ELA.

## Discusión

Con este trabajo se pretendía evaluar la relación causa-efecto entre la exposición a pesticidas y el desarrollo de ELA. Para ello se ha utilizado la técnica de meta-análisis, utilizando como base siete estudios epidemiológicos cuyas características se ajustaban a los criterios de inclusión descritos en el apartado de materiales y métodos.

Una de las principales fortalezas que presenta la técnica meta-analítica es que permite estimar el valor "combinado" ponderando una serie de estudios fuente (utilizando pesos estadísticos que dan más influencia a aquellos resultados que presentan menor variabilidad y que proceden de un mayor tamaño muestral). En este caso, la OR combinada calculada a partir de los siete trabajos incluidos resulta ser significativamente superior al valor de relación de causalidad nula (OR = 1), es decir, se atribuye una relación de asociación causal entre exponerse a pesticidas y desarrollar ELA. Debido a las propias restricciones que la técnica meta-analítica presenta, no ha sido posible incluir otros estudios que hubieran reforzado o modificado este resultado global. Por ejemplo, Malek et al., (2014) realizaron un estudio de casos-controles entre 2008-2010 en la región de Pittsburgh y Philadelphia (EEUU) cuya cuantificación del riesgo fue de 6,50 (95% IC: 1,78-23,77); así como Yu et al., (2014), cuya OR resultó ser de 6,95 (95% IC: 1,23-39,1) tras revisar las historias clínicas de 132 pacientes de ELA de la región de Michigan (EEUU) de los últimos 30 años. Por otro lado, Weisskopf et al., (2009) desarrollaron en EEUU un estudio prospectivo entre 1989-2004 con un tamaño muestral de 13.579.156 individuos cuyo riesgo asociado fue de 1,07 (95% IC: 0,79-1,44). Es evidente, por tanto, que la aplicación de la técnica meta-analítica sobre un conjunto de estudios homogéneos no proporciona una conclusión rotunda y definitiva ante el problema estudiado, pues se debe considerar la

existencia de un sesgo de publicación (algunos de los estudios epidemiológicos realizados pueden no haberse publicado por no haber obtenido resultados satisfactorios para el autor) y un sesgo de selección (a la hora de seleccionar los trabajos a incluir se eliminan de antemano muchos estudios a los que es imposible acceder y, por tanto, no llegan a la etapa de aplicación de los criterios de inclusión).

Además, se hace imposible atribuir por el momento el papel causante de ELA a ningún pesticida en concreto ni a ninguna familia de compuestos (debido a que la gran mayoría de estudios realizados son de tipo retrospectivo y en ellos no se contempla el tipo de pesticida al que se expusieron los trabajadores, sino que se habla de pesticidas en el ambiente laboral). Probablemente, éste es uno de los motivos por los que pueda existir discrepancia entre estudios, pues es posible que algunos pesticidas sí sean causantes de ELA mientras que otros no lo sean. Para poder discriminarlos, sería recomendable realizar más estudios de tipo prospectivo en los que se conozcan desde el principio los compuestos concretos a los que se expone el trabajador.

Existen otros factores ajenos a la naturaleza del pesticida que podrían ser parcialmente responsables de las diferencias observadas entre los estudios. En primer lugar, la zona geográfica en la que se ha desarrollado el trabajo es un aspecto importante a considerar, pues la normativa que regula el uso de pesticidas en cada región y que establece los compuestos que se pueden utilizar y los límites de exposición es diferente y podría jugar un papel muy importante en los resultados obtenidos. También se debe prestar atención al año o años durante los cuales se ha realizado cada estudio, pues este factor también condicionará la regulación vigente, así como la adecuación de las medidas de protección del trabajador ante las sustancias empleadas. Además, el tiempo y la cantidad de pesticida a la que el individuo ha estado expuesto, también pueden ser clave a la hora de desarrollar o no la enfermedad. Estos datos tampoco se detallan en los trabajos epidemiológicos recogidos en el actual estudio.

## Conclusiones

Considerando los estudios incluidos en el análisis estadístico, parece que existe una relación de causalidad entre exponerse a pesticidas y desarrollar ELA. Es probable que solamente algunos grupos de pesticidas, y en ciertos grados de exposición, estén involucrados en el desarrollo de ELA, por lo que se hace necesario estudiarlos de forma individualizada. A pesar de la participación de los pesticidas como factores de riesgo, la ELA también podría deberse a la acción de otros factores ambientales o genéticos.

## Agradecimientos

Casanova AG disfruta actualmente de un contrato de "Formación del Personal Investigador" cofinanciado por la Universidad de Salamanca y el Banco Santander.

Hernández-Sánchez MT disfruta actualmente de un contrato de "Formación del Personal Investigador" cofinanciado por la Junta de Castilla y León; y el Fondo Social Europeo.

## Bibliografía

- 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 exposures in relation to amyotrophic lateral sclerosis etiology. *Environ Int.* 2016; 91, 104-115.
- Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Murillo-Bonilla L, Rios C. Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients. *Neurochem Res.* 2003; 28 (5), 699-703.
- Bonvicini F, Marcello N, Mandrioli J, Pietrini V, Vinceti M. Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Ann Ist Super Sanita.* 2010; 46 (3), 284-287.
- Bozzo F, Mirra A and Carri MT. Oxidative stress and mitochondrial damage in the pathogenesis of ALS: new perspectives. *Neurosci Lett.* 2016; [en prensa], <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.065>
- Bozzoni V, Pansarasa O, Diamanti L, Nosari G, Cereda C, Ceroni M. Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors. *Funct Neurol.* 2016; 31 (1), 7-19.
- Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Med Chem.* 2010; 17 (18), 1942-1199.
- Coughlan C, Walker DI, Lohr KM, Richardson JR, Saba LM, Caudle WM, Fritz KS, Roede JR. Comparative Proteomic Analysis of Carbonylated Proteins from the Striatum and Cortex of Pesticide-Treated Mice. *Parkinsons Dis.* 2015; 2015, 812532.
- Das K, Nag C, Ghosh M. Familial, environmental, and occupational risk factors in development of amyotrophic lateral sclerosis. *N Am J Med Sci.* 2012; 4 (8), 350-355.
- Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, Alperovitch A, Tzourio C. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2009; 66 (4), 494-504.
- Furby A, Beauvais K, Kolev I, Rivain JG, Sébille V. Rural environment and risk factors of amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study. *J Neurol.* 2010; 257 (5), 792-798.
- Grube A, Donaldson D, Kiely T, Wu L. Pesticides Industry Sales and Usage. 2006 and 2007 Market Estimates [monografía en Internet]. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency; 2011 [acceso 27 de junio de 2016]. Disponible en: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/market\\_estimates2007.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/market_estimates2007.pdf).
- Hand CK, Rouleau GA. Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2002; 25 (2), 135-159.
- Holtcamp W. The emerging science of BMAA: do cyanobacteria contribute to neurodegenerative disease?. *Environ Health Perspect.* 2012; 120 (3), A110-A116.
- Kamel F, Umbach DM, Munsat TL, Shefner JM, Hu H, Sandler DP. Lead exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Epidemiology.* 2002; 13 (3), 311-319.
- 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; 33 (3), 457-462.
- Keifer MC, Firestone J. Neurotoxicity of pesticides. *J Agromedicine.* 2007; 12 (1), 17-25.
- Malek AM, Barchowsky A, Bowser R, Heiman-Patterson T, Lacomis D, Rana S, Youk A, Stickler D, Lackland DT, Talbott EO. Environmental and occupational risk factors for amyotrophic lateral sclerosis: a case-control study. *Neurodegener Dis.* 2014; 14 (1), 31-38.
- McGuire V, Longstreth WT Jr, Nelson LM, Koepsell TD, Checkoway H, Morgan MS, van Belle G. Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis. A population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 1997; 145 (12), 1076-1088.
- Mudawal A, Singh A, Yadav S, Mishra M, Singh PK, Chandravanshi LP, Mishra J, Khanna VK, Bandyopadhyay S, Parmar D. Similarities in lindane induced alterations in protein expression profiling in different brain regions with neurodegenerative diseases. *Proteomics.* 2015; 15(22), 3875-3882.
- Naughton C, O'Toole D, Kirik D, Dowd E. Interaction between subclinical doses of the Parkinson's disease associated gene,  $\alpha$ -synuclein, and the pesticide, rotenone, precipitates motor dysfunction and nigrostriatal neurodegeneration in rats. *Behav Brain Res.* 2016; 316, 160-168.
- Pamphlett R. Exposure to environmental toxins and the risk of sporadic motor neuron disease: an expanded Australian case-control study. *Eur J Neurol.* 2012; 19 (10), 1343-1348.
- 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; 71 (3), 284-290.
- Roman GC. Neuroepidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: clues to aetiology and pathogenesis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996; 61 (2), 131-137.
- Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 2001; 344, 1688-1700.
- Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RK, Fisher EM, Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis?. *Brain* 2013; 136 (Pt 8), 2342-2358.
- Savolainen KM, Loikkanen J, Eerikäinen S, Naarala J. Interactions of excitatory neurotransmitters and xenobiotics in excitotoxicity and oxidative stress: glutamate and lead. *Toxicol Lett.* 1998; 102-103, 363-367.
- Tokuda E, Furukawa Y. Copper Homeostasis as a Therapeutic Target in Amyotrophic Lateral Sclerosis with SOD1 Mutations. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (5), 10.3390/ijms17050636.
- Weisskopf MG, Morozova N, O'Reilly EJ, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A. Prospective study of chemical exposures and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009; 80 (5), 558-561.
- Wang MD, Gomes J, Cashman NR, Little J, Krewski D. A meta-analysis of observational studies of the association between chronic occupational exposure to lead and amyotrophic lateral sclerosis. *J Occup Environ Med.* 2014; 56 (12), 1235-1242.
- Yu Y, Su FC, 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; 9 (6), e101186.
- Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Fernandez-Altamirano P, Pagani W, Lodin D, Orozco G, Chinea A. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int.* 2015; 6, 171-7806.169561.