



**UNIVERSIDADE ESTADUAL  
PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Carolina Vaccari**

**Paraquat e Doença de Parkinson: Revisão Sistemática  
e Metanálise de Estudos Observacionais**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus  
de Botucatu, para obtenção do  
título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Paolucci El Dib

**Botucatu  
2017**

Carolina Vaccari

**PARAQUAT E DOENÇA DE PARKINSON:  
REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE  
DE ESTUDOS OBSERVACIONAIS**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, Câmpus de Botucatu,  
para obtenção do título de  
Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Coorientadora: Profa. Dra. Regina Paolucci El Dib

Botucatu  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vaccari, Carolina.

Paraquat e doença de Parkinson : revisão sistemática e metanálise de estudos observacionais / Carolina Vaccari. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Coorientador: Regina Paolucci El Dib

Capes: 40105008

1. Doença de Parkinson. 2. Paraquat. 3. Herbicidas - Fatores de risco. 4. Metanálise. 5. Revisão.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Metanálise; Paraquat; Revisão sistemática.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho - fruto de muito esforço - ao meu orientador, Dr. João Lauro Viana de Camargo, que confiou em mim para mergulhar no mundo das Revisões Sistemáticas, mesmo sendo algo completamente novo para nós. Obrigada por ter aprendido comigo e, com toda paciência e elegância, me acalmado em momentos de loucura.

À minha coorientadora, Dra. Regina El Dib, que sempre se desdobrou em dez para me abrir um espaço em sua agenda apertada. Desculpe ter feito você trocar tantos almoços por lanchinhos improvisados nas nossas longas reuniões que atravessavam o meio dia. Você foi peça fundamental no desenvolvimento deste projeto.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado, me permitindo morar em Botucatu para a realização deste projeto.

Ao Dr. Leandro Gobbo Braz e Dra. Luciane Lopes, membros da banca, pelas valiosas contribuições ao enriquecimento do projeto.

A todos do laboratório TOXICAM pelo companheirismo, aprendizado e risadas. Sinto que cresci muito nesses dois anos de mestrado com vocês.

À minha família, por terem me permitido viver essa oportunidade, dando apoio emocional e financeiro, mesmo cansados de tanto trabalhar. Vocês são meu alicerce. Prometo fazer valer a pena.

Ao meu namorado, por caminhar ao meu lado quando eu me desespero achando que tudo vai dar errado. Obrigada pela ajuda, por me ensinar a ser uma pessoa melhor, por sempre me fazer enxergar uma saída e, principalmente, por acreditar em mim quando nem eu mesma acredito.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

(Theodore Roosevelt)

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa progressiva que tem como possíveis fatores de risco o envelhecimento, a suscetibilidade genética e a exposição a certos agentes químicos. Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos e experimentais têm sugerido associação entre exposição a praguicidas e o desenvolvimento da DP. No total, nove revisões sistemáticas (RS) da literatura foram realizadas desde 2005 para verificar a associação entre exposição ao herbicida paraquat e a DP. A maioria dessas revisões apresentou limitações metodológicas, como restrições de idioma (apenas artigos em inglês), de bases de dados, de período de publicação dos estudos, e principalmente, não avaliou a qualidade metodológica dos estudos por ferramentas consistentes. Dentre as RS seguidas de metanálise, a maioria apresentou resultados positivos e estatisticamente significativos, apesar de ter identificado alto nível de heterogeneidade ( $I^2$ ) entre os estudos. Assim, justificou-se a realização de nova RS da literatura e metanálise que apresentassem menos limitações operacionais que as detectadas nas RS existentes. Para isso, foram selecionados estudos coortes, caso-controle e transversais comparativos que incluíssem quaisquer participantes expostos ambiental e/ou ocupacionalmente ao paraquat, sem restrição quanto à dose ou período de exposição. Os desfechos considerados foram a DP diagnosticada por especialistas ou relatada pelos participantes em entrevistas e/ou questionários. As bases de dados pesquisadas foram: PubMed, EMBASE, LILACS, TOXNET e *Web of Science*, sem restrição de idioma ou período de publicação. A heterogeneidade entre os estudos foi avaliada pelo teste  $I^2$ , sendo o *odds ratio* (OR) a medida de estimativa de efeito, com intervalo de confiança 95%. O risco de viés foi avaliado pelas ferramentas modificadas do *NewCastle Ottawa*. Como resultados, foram incluídos 15 estudos na RS e 12 estudos na metanálise, que resultou em um OR de 1,40 (IC 95% 1,16-1,70;  $I^2$  15%), demonstrando associação positiva entre exposição ao paraquat e DP. Essa associação pareceu ser mais evidente em indivíduos suscetíveis, expostos ocupacionalmente ao paraquat em coexposição a outros pesticidas e que fizeram pouco uso de equipamentos de proteção. No entanto, a maioria dos estudos incluiu pequeno número de participantes expostos e apresentou alto risco de viés. Assim, novos estudos prospectivos que documentem cuidadosamente a exposição ao herbicida, com maior número de indivíduos potencialmente expostos, ainda são necessários para consolidar a associação positiva observada. Também, a análise de genes específicos que aumentam a predisposição à DP, e coexposições a outros praguicidas que podem estar relacionados a essa doença, poderão contribuir para a identificação de fatores que modulam a sua ocorrência.

## **ABSTRACT**

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative condition whose possible risk factors are aging, genetic susceptibility and exposure to certain chemical agents. In the last decades, epidemiological and experimental studies have suggested an association between pesticide exposure and the development of PD. In total, nine systematic reviews (SRs) of the literature have been conducted since 2005 in order to verify the association between exposure to the herbicide paraquat and PD. However, most of them presented methodological limitations, such as language restrictions (only articles in English), databases, period of publication of the studies, and mainly, they did not evaluate their methodological quality by consistent tools. From the SRs followed by meta-analysis, the majority presented positive and statistically significant results, although a high level of heterogeneity ( $I^2$ ) was identified among studies. Thus, the conception of a new SR of the literature and meta-analysis that presented less operational limitations than those detected in the existing SRs was justified. For this, cross-sectional, cohort and case-control studies enrolling any participant exposed to environmental and/or occupational exposure to paraquat, without restrictions regarding dose or period of exposure, were selected. Outcomes considered were PD diagnosed by specialists or reported by the participants themselves in interviews and/or questionnaires. The searched databases were: PubMed, EMBASE, LILACS, TOXNET and Web of Science, without language or publication period restrictions. The heterogeneity among studies was evaluated by the  $I^2$  test. Data were summarized as odds ratios with their respective 95% confidence intervals. Risk of bias was assessed by modified tools from the NewCastle Ottawa Scale. As results, 15 studies were included in the SR and 12 studies included in the meta-analysis. An OR of 1.40 (95% CI 1.16-1.70,  $I^2$  15%) was obtained, demonstrating a positive association between exposure to paraquat and PD. This association appeared to be more evident in susceptible individuals, occupationally exposed to paraquat in coexposure to other pesticides, lacking use of protective equipment. However, most studies included a small number of exposed participants and presented a high risk of bias. Thus, new prospective studies that carefully document the herbicide exposure, with a greater number of potentially exposed individuals, are still necessary to consolidate the positive association observed. Also, the analysis of specific genes that increase predisposition to PD, and coexposure to other pesticides that may be related to this disease, may contribute to the identification of factors that modulate its occurrence.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
A Doença de Parkinson .....	11
A dopamina e o circuito motor.....	11
Mecanismos da degeneração neuronal .....	12
Paraquat e DP – plausibilidade biológica.....	13
Evidências epidemiológicas e limitações dos estudos observacionais.....	15
Revisões sistemáticas e metanálises.....	16
Análise das revisões sistemáticas existentes sobre paraquat e DP.....	17
REFERÊNCIAS .....	28
CAPÍTULO II. MANUSCRITO. ....	34
RESUMO .....	35
ABSTRACT .....	36
INTRODUÇÃO .....	37
MÉTODOS.....	38
Critérios de inclusão/exclusão.....	38
Métodos de busca para identificação dos estudos .....	39
Seleção dos estudos.....	39
Extração de dados.....	40
Avaliação da qualidade metodológica.....	40
Metanálise .....	41
Avaliação da heterogeneidade.....	41
Análise de sensibilidade dos estudos.....	41
RESULTADOS .....	41
Seleção dos estudos.....	41
Extração dos dados.....	42
Avaliação da qualidade metodológica.....	42
Metanálise .....	44
Análise de sensibilidade .....	45
DISCUSSÃO.....	45
CONFLITO DE INTERESSE.....	49
FINANCIAMENTO.....	50
REFERÊNCIAS .....	50
APÊNDICES .....	69
Apêndice A. Estratégia de busca.....	69
Apêndice B. Critérios para avaliação dos vieses.....	70
Apêndice C. Fluxograma.....	72
Apêndice D. Estudos principais e suas referências múltiplas .....	73

Apêndice E. Avaliação da qualidade metodológica .....	74
Apêndice F. Metanálise .....	76
Apêndice G. Análises de sensibilidade .....	77

## CAPÍTULO I. REVISÃO DA LITERATURA

### A Doença de Parkinson

A Síndrome Parkinsoniana ou Parkinsonismo é um dos distúrbios do movimento mais frequentes e debilitantes encontrados na população idosa; apresenta-se com a manifestação de pelo menos dois dos quatro sinais cardinais clássicos: tremor, bradicinesia (lentidão do movimento), rigidez muscular (amplitude reduzida do movimento) e instabilidade postural (Barbosa & Sallem, 2005; Mandel et al., 2012). A doença de Parkinson (DP), inicialmente denominada “Paralisia Agitante”, foi descrita pela primeira vez pelo médico inglês James Parkinson em 1817 (Parkinson, 2002)<sup>1</sup>. Correspondente a 75% de todas as formas de Parkinsonismo, é também chamada de Parkinsonismo primário ou idiopático, pois geralmente não há uma causa bem caracterizada (Barbosa & Sallem, 2005). O diagnóstico da doença primária pressupõe a exclusão das outras formas de Parkinsonismo, que podem decorrer do efeito de drogas bloqueadoras de receptores dopaminérgicos como as neurolépticas e antivertiginosas, traumatismo craniano, hidrocefalia, acidentes vasculares cerebrais, encefalites virais, entre outras (Barbosa & Sallem, 2005). Sintomas e sinais não motores (cognitivos, sensoriais e comportamentais) também se associam à DP, embora em frequência e intensidade variáveis (Ffytche et al., 2017).

Somente no Brasil, estima-se que cerca de 200 mil pessoas sofriam com a DP em 2014 (Academia Brasileira de Neurologia, 2014). No mundo todo, a prevalência em 2005 foi de 4,4 milhões (Wirenfeldt et al., 2011). Com base no crescimento esperado da população com mais de 65 anos, até 2030 esse número terá dobrado (Mandel et al., 2012).

### A dopamina e o circuito motor

O circuito motor, responsável pelo controle dos movimentos realizados pela musculatura estriada esquelética, envolve áreas do córtex motor e dos núcleos da base encefálica (Morris et al., 1996). As conexões que partem dos núcleos da base e alcançam as áreas corticais podem tanto as estimular, como as inibir, dependendo do tipo de

---

<sup>1</sup> “An essay on the Shaking Palsy” de James Parkinson foi publicado originalmente como uma monografia por Sherwood, Neely and Jones em Londres, 1817. O artigo foi republicado na revista *The Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences*, em 2002.

via ativada. Enquanto a via direta é capaz de ativar o córtex, estimulando os movimentos, a via indireta cessa as atividades do córtex motor (Nakano et al., 2000; Teixeira & Cardoso, 2004).

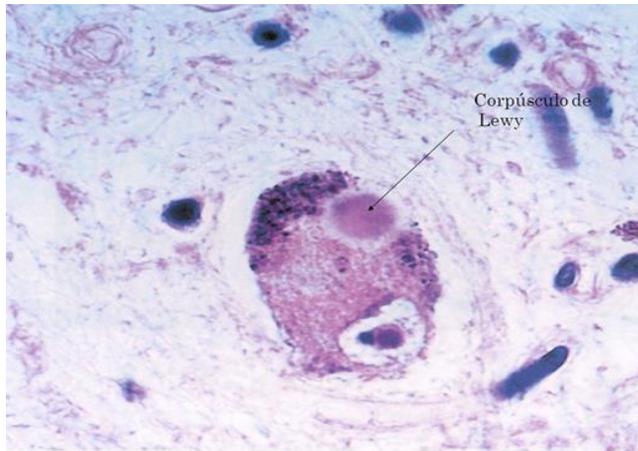
A dopamina, neurotransmissor derivado do aminoácido tirosina, é sintetizada principalmente em uma região do mesencéfalo conhecida por Substância Negra *Pars Compacta* (SNpc) e tem papel neuromodulador no circuito motor, facilitando a via direta ou inibindo a via indireta pela ativação dos receptores de dopamina D1 e D2, respectivamente (Girault & Greengard, 2004). A desregulação da dopamina pode levar a distúrbios do movimento caracterizados pelas hipercinesias (exacerbação dos movimentos) ou hipocinesias (redução dos movimentos) (Girard & Greengard, 2004), das quais a DP é o tipo mais conhecido.

Estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, disfunção proteossômica, agregação e deposição de proteínas específicas ( $\alpha$ -sinucleínas) e apoptose são eventos associados à degeneração e morte seletiva de neurônios dopaminérgicos na SNpc, com diminuição da produção de dopamina (Alves, 2003; Jenner, 2003; Ebadi & Sharma, 2003; McNaught & Olanow, 2003; Wirenfeltd et al., 2011).

As causas da DP não são bem definidas, mas sugere-se que sua patogenia seja multifatorial, envolvendo suscetibilidade genética, envelhecimento e exposição a certos agentes químicos (Warner et al., 2005; Di Monte et al., 2012).

### **Mecanismos da degeneração neuronal**

As  $\alpha$ -sinucleínas, proteínas desdobradas que atuam na reciclagem, armazenamento e compartimentação de neurotransmissores (Abeliovitch et al., 2000), podem anormalmente se agregar e se acumular no interior de neurônios devido a polimorfismos nos genes específicos responsáveis por sua codificação, como o PARKIN 1 e SNCA, ou a disfunções no sistema ubiquitina-proteossoma, que não conseguem eliminar proteínas mal-formadas (Yavitch et al., 2004). As  $\alpha$ -sinucleínas são o componente principal dos corpos de Lewy, estruturas que se depositam no citoplasma de neurônios (Figura 1). Novos estudos sugerem que a presença dessas proteínas mal-formadas pode ativar resposta autoimune contra as células neuronais, acarretando em sua morte (Sulzer et al., 2017).

**Figura 1.** Corpo de Lewy intracitoplasmático

Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/4983334/>

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas do oxigênio (EROS) e a capacidade do organismo neutralizar tais moléculas (Halliwell, 1992; Uttara et al., 2009). Estudos experimentais mostram que fisiologicamente ocorre produção de EROS no sistema nervoso central (SNC), seja pela grande taxa de oxigênio consumida pelo cérebro, pelo próprio metabolismo da dopamina ou por haver menor quantidade da enzima antioxidante glutathiona no SNC (Halliwell, 1992; Barath et al., 2002). Porém, a exacerbação do estresse oxidativo, provocado tanto por determinantes genéticos, como por envelhecimento ou exposição a certas substâncias químicas, pode resultar em peroxidação lipídica importante, uma vez que o cérebro apresenta grande quantidade de gorduras poli-insaturadas (Shichiri, 2014).

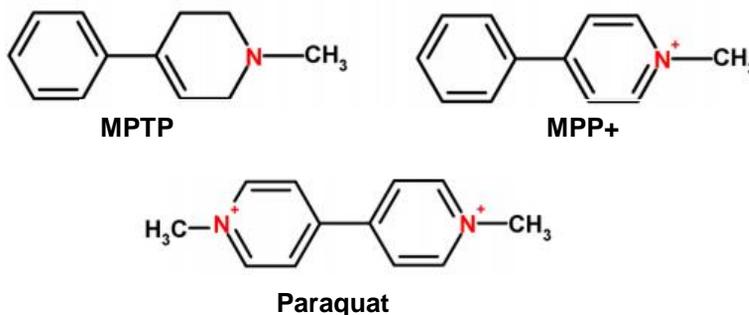
### **Paraquat e DP – plausibilidade biológica**

No verão de 1976, o estudante de química Barry Kidston sintetizou em um laboratório improvisado em sua própria casa uma droga recreacional a partir da molécula 1-metil-4-fenil-4-hidroxipiperidina (MPPP). Por vários meses o jovem fez uso da substância produzida, tendo descrito seus efeitos como semelhantes aos da heroína. Porém, após modificar o processo de síntese a fim de encurtar o tempo de preparo, os efeitos da substância não foram mais os mesmos. Em novembro de 1976, após fazer uso deste novo lote por vários dias, Barry passou a desenvolver mudez, rigidez severa, face inexpressiva, tremor e fraqueza, condizentes com estado de Parkinsonismo (Davis et al., 1979). Posteriormente, foi demonstrado que a molécula 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) (Fig.2), uma impureza gerada acidentalmente no processo de

fabricação da MPPP, seria a responsável pelos sintomas (Langston et al., 1983). A MPTP é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica devido a sua elevada lipofili- cidade; no SNC sofre oxidação pela enzima monoamino oxidase (MAO), dando origem ao seu subproduto tóxico, a 1-metil-4-fenil-2,3-dipiridínio (MPP<sup>+</sup>) (Fig.2) (Shimizu et al., 2001). A MPP<sup>+</sup> pode então ser transportada aos neurônios dopaminérgicos pelos transportadores de dopamina (DAT), provocando a morte de tais neurônios (Dinis-Oliveira et al., 2006). A partir deste incidente, a MPTP passou a ser a molécula de esco- lha para estabelecer um modelo da DP em animais de laboratório (Meredith & Radema- cher, 2011). Devido à grande semelhança estrutural entre a MPP<sup>+</sup> e alguns pesticidas, em especial o paraquat (Fig. 2) (Richardson et al., 2005; Dinis-Oliveira et al., 2006), várias suspeitas foram levantadas nas últimas décadas relacionando a exposição a esse pesticida e o desenvolvimento da DP (Yang et al., 2007; Fei et al., 2008; Morán et al., 2008; Yang et al., 2009; Chorfa et al., 2013).

O paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina) (Fig.2), do grupo químico biperidílio, é um herbicida de amplo espectro registrado no Brasil para o controle de pragas em cultu- ras como soja, sorgo, cana-de açúcar, algodão, milho, maçã, entre outras (AGROFIT, 2016). Ele age comoceptor de elétrons, provocando depleção de NADPH e inibição da fixação de CO<sub>2</sub> nas plantas, com conseqüente produção de radicais livres que promo- vem a destruição das membranas celulares vegetais (Serra et al., 2003).

**Figura 2.** Fórmulas estruturais da MPTP, MPP<sup>+</sup> e paraquat



(Dinis-Oliveira et al., 2006)

Por muitos anos acreditou-se que o paraquat não conseguiria alcançar o SNC com a mesma eficácia da MPTP (Pardridge, 2012), por se tratar de uma molécula dica- tiônica hidrofílica, baixo coeficiente de partição e não atravessar facilmente as membra- nas (Shimizu et al., 2001). Porém, estudos *in vitro* e *in vivo* indicaram que ele atravessa- ria a barreira hematoencefálica pela ação de transportadores de aminoácidos neutros,

como o sistema carreador L (LAT-1) (Dinis-Oliveira et al., 2006; Kuter et al., 2007, 2010). O mecanismo pelo qual o paraquat seria transportado aos neurônios dopaminérgicos permanece controverso; um estudo recente aponta para o não envolvimento dos DAT, diferente do que ocorre com a MPTP (Richardson et al., 2005).

Sugere-se que o mecanismo de ação adversa da MPTP se dê por disfunção mitocondrial, com inibição do complexo 1 da cadeia respiratória (Meredith & Rademacher, 2011). Há muitas especulações de que, pelo fato de o paraquat ser estruturalmente semelhante à MPTP, ele exerça seus efeitos deletérios pelo mesmo mecanismo (Fukushima et al., 1994, Tawara et al., 1996). Porém, há evidências de que o paraquat é um fraco inibidor do complexo 1 (Richardson et al., 2005), sendo, no entanto, capaz de desencadear a produção de EROS devido a seu intenso ciclo redox, além de provocar agregação de  $\alpha$ -sinucleínas e dano seletivo aos neurônios da via nigroestriatal (Dinis-Oliveira et al., 2006; Kuter et al., 2007, 2010). Apesar das diferenças entre seus mecanismos de ação, em estudos experimentais ambas as substâncias acarretaram a morte de neurônios dopaminérgicos (Ren et al., 2009; Kuter et al., 2010; Mehdi & Qama, 2013).

Não obstante o crescente corpo de evidências experimentais que demonstram ação tóxica do paraquat em áreas encefálicas importantes, não é possível afirmar a relevância deste modo de ação (MoA) no desenvolvimento da DP em *humanos*. A possibilidade de extrapolação entre as espécies exige melhor estimativa das doses a que humanos estão expostos, uso de desenhos experimentais mais precisos e resolutivos e maior conhecimento sobre o mecanismo de ação do paraquat (ANVISA, 2015).

### **Evidências epidemiológicas e limitações dos estudos observacionais**

Ao longo das duas últimas décadas, inúmeros estudos epidemiológicos sugeriram associação entre risco aumentado para a DP e exposição a pesticidas e outros fatores ambientais, como vida no campo, trabalho rural e consumo de água de poço (Liou et al., 1997; Le Couteur et al., 1999; Dick, 2007; Kamel et al., 2007). No entanto, dentre os estudos que consideraram pesticidas específicos, como o paraquat, poucos encontraram associação significativa entre exposição a eles e a DP (Freire & Koifman, 2012).

As fontes mais comuns de evidências epidemiológicas são os estudos observacionais, com destaque para os ecológicos, transversais, caso-controle e coortes, sendo o último o de maior valor para inferência sobre a etiologia de uma doença (Freire & Koifman, 2012).

Ainda assim, é preciso ter em mente que *todo* estudo epidemiológico apresenta potenciais vieses que dificultam a interpretação dos resultados (Brown et al., 2006; Berry, 2010). Os aspectos próprios de determinado estudo, positivos (méritos) e negativos (vieses), é o que o caracteriza e o que explica a força maior ou menor de seus resultados. Além disso, são esses aspectos próprios que tornam os estudos heterogêneos entre si. Essa heterogeneidade entre os estudos observacionais pode ser medida pelas diferenças quanto ao delineamento, a seleção dos casos e controles, o tamanho das amostras e a caracterização da exposição. O viés de memória, muito comum em estudos de caso-controle, é importante fator limitante já que a avaliação da exposição é retrospectiva e feita pela aplicação de questionários - o que é relevante principalmente quando se trata de doenças neurodegenerativas (Berry, 2016). Nos estudos de coorte podem faltar informações satisfatórias sobre os pesticidas envolvidos, bem como sobre a extensão e duração da exposição. A escolha dos grupos controle, os quais serão contrastados com os grupos expostos, e a acurácia do diagnóstico da doença de Parkinson também podem influenciar a qualidade do estudo (Brown et al., 2006).

### **Revisões sistemáticas e metanálises**

Revisões sistemáticas (RS) são ferramentas objetivas e transparentes para coletar e sintetizar informações científicas a respeito de um tema específico (Higgins & Green, 2011). Em contraste com as revisões tradicionais da literatura, que baseiam suas conclusões em artigos selecionados aleatoriamente e tendem a ser parcialmente enviesadas pela opinião de seus autores, as RS oferecem rigor metodológico e possibilidade de otimização dos resultados por meio de metanálises (Sampaio & Mancini, 2007; Higgins & Green, 2011).

As RS e metanálises são mais amplamente utilizadas na área da saúde para comparar a eficácia de tratamentos farmacológicos e procedimentos cirúrgicos, tipicamente a partir de ensaios clínicos randomizados (McGuinness et al., 2017; Wang et al., 2017). No entanto, para abordar questões que envolvem exposição a contaminantes ambientais, não é possível, por questões éticas, conduzir ensaios com seres humanos. Nesse caso, os estudos incluídos nas RS deverão ser principalmente os observacionais, que frequentemente pecam por apresentarem diversos vieses, como já mencionado (Rooney et al., 2014).

Priyadarshi et al. (2000) foram um dos primeiros a realizar RS e metanálise de estudos epidemiológicos que avaliaram a associação entre DP e exposição a pesticidas

de modo geral. Eles selecionaram 19 estudos caso-controle, publicados em inglês entre 1989 e 1999; obtiveram um *odds ratio* (OR) de 1,94, com intervalo de confiança (IC 95%) de 1,49 - 2,53, indicando que a população exposta diretamente a pesticidas apresentava 1,94 vezes mais *chances* de desenvolver DP do que a população não exposta a aqueles agentes.

Mais de 10 anos depois, as RS e metanálises continuam demonstrando associação positiva entre exposição a pesticidas em geral e DP, apesar de detectarem falhas metodológicas e falta de poder estatístico nos estudos analisados (Brown et al., 2006; Van der Mark et al., 2012; Freire & Koifman, 2012; Pezzoli & Cereda, 2013). No entanto, poucas são as RS que abordaram a exposição a pesticidas específicos, como o paraquat, fazendo com que o peso da evidência disponível seja *suficiente* para indicar uma associação positiva genérica entre pesticidas e DP, mas *insuficiente* para indicar causalidade por um pesticida específico ou por determinada combinação de pesticidas (Brown et al., 2006; Van der Mark et al., 2012).

### **Análise das revisões sistemáticas existentes sobre paraquat e DP**

Na Tabela 1, abaixo, as RS e metanálises relacionadas ao paraquat e DP disponíveis na literatura até o momento foram sintetizadas e analisadas criticamente.

Tabela 1. Análise das Revisões Sistemáticas existentes sobre paraquat e DP.

<b>1. Referência</b>	<b>Li et al., 2005.</b>
<b>Título e palavras-chave</b>	<b>Evaluation of epidemiologic and animal data associating pesticides with Parkinson's disease.</b> <i>Palavras-chave:</i> não reportadas.
<b>Estudos</b>	Selecionaram estudos observacionais do PubMed relacionados à exposição a pesticidas e DP. Incluídos estudos com exposição específica ao paraquat.
<b>Dados do estudo</b>	Consideraram apenas os estudos nos quais a exposição foi avaliada a nível individual e estudos que utilizaram diagnóstico específico da DP. Aplicaram um sistema de pontuação de até 13 pontos para avaliação da qualidade e consistência crescentes dos estudos caso-controle: taxa de participação, definição dos casos, seleção dos controles, avaliação da exposição, tentativas de redução de possíveis vieses (e.g., problemas de delineamento do estudo) e de fatores de confusão (e.g., tabagismo, idade, histórico familiar de DP, etc). Tam-

	bém fizeram revisão de estudos experimentais <i>in vivo</i> de pesticidas específicos relacionados à DP, como o paraquat, rotenone e maneb.
<b>Resultados</b>	<p>Nenhum estudo coorte preencheu os critérios de inclusão. A pontuação dos 27 estudos caso-controle variou entre zero e oito, i.e., nenhum estudo obteve pontuação de nove a 13. Com relação ao paraquat, foram selecionados seis estudos, sendo um transversal (Engel et al., 2001) e cinco caso-controle (Hertzman et al., 1990, 1994; Seidler et al., 1996; Liou et al., 1997; Kuopio et al., 1999). A pontuação dos estudos com o paraquat variou de quatro a sete: Kuopio et al. (1999) - quatro pontos, Seidler et al. (1996) e Hertzman et al. (1994) – cinco pontos, Hertzman et al. (1990) - seis pontos e Liou et al. (1997) – sete pontos. O estudo de Engel et al. (2001) não foi avaliado pelo sistema de pontuação, pois trata-se de estudo transversal.</p> <p>Em três estudos o OR não foi reportado; dois estudos apresentaram associação positiva, uma delas significativa. Apenas um estudo relatou associação negativa, sem significância estatística. Não foram realizadas metanálises.</p>
<b>Comentários</b>	Limitação de base de dados: apenas PubMed. Quanto à seleção, não especificaram o idioma ou se houve restrição quanto ao ano de publicação. Desenvolveram uma escala de pontuação própria para avaliação da consistência dos estudos de caso-controle.
<b>2. Referência</b>	<b>Brown et al., 2006.</b>
<b>Título e palavras-chave</b>	<b>Pesticides and Parkinson's disease – Is there a link?</b> <i>Palavras-chave:</i> epidemiology, literature review, Parkinson's disease, pesticides, toxicology.
<b>Estudos</b>	Estudos sobre pesticidas e DP, publicados entre 1983 e 2003, em dez bases de dados bibliográficos <i>online</i> (não identificadas). Selecionados apenas estudos caso-controle, em inglês ou francês. Material Suplementar <i>online</i> apresenta revisão dos relatos e séries de casos, estudos de incidência/prevalência, mortalidade e estudos de coorte. Reviram também estudos experimentais sobre mecanismos celulares de agentes químicos envolvidos na DP.
<b>Resultados</b>	Selecionaram 38 estudos sobre pesticidas em geral e DP, sendo que

	em 15 estudos foram apresentados dados sobre herbicidas ou paraquat especificamente. Os estudos foram compilados na forma de <i>forest plot</i> , com os respectivos OR e IC de cada estudo, porém não foi realizada metanálise dos resultados. Quatro estudos apresentaram dados sobre o paraquat (Hertzman et al., 1994; Liou et al., 1997; Kamel et al., 2001; Firestone et al., 2005) que, em dois estudos foi positiva e significativamente associado à DP (Hertzman et al., 1990, Liou et al., 1996), especialmente após exposição > 20 anos (Liou et al., 1997).
<b>Comentários</b>	Não identificaram as bases de dados utilizadas. Basearam-se, além dos estudos epidemiológicos, em estudos experimentais, para concluir que o peso da evidência existente é suficiente para afirmar a associação genérica entre exposição a pesticidas e DP, mas insuficiente para indicar associação entre pesticidas específicos ou outros toxicantes exógenos.
<b>3. Referência</b>	<b>Brent &amp; Schaeffer, 2011.</b>
<b>Título e palavras-chave</b>	<b>Systematic review of parkinsonian syndromes in short- and long-term survivors of paraquat poisoning.</b> <i>Palavras-chave:</i> não reportado.
<b>Estudos</b>	Casos de intoxicação aguda por paraquat publicados até 31 de julho de 2010. Utilizaram o portal do Ovid para acessar a Biblioteca Nacional Americana de Medicina, EMBASE, e publicações do Departamento Americano de Agricultura. Também avaliaram os artigos selecionados buscando por referências a estudos não identificados por sua busca eletrônica.
<b>Dados do estudo</b>	Revisão sistemática de artigos que relataram casos de intoxicação aguda por altas doses de paraquat. Foram incluídos casos em que os pacientes sobreviveram por mais de 30 dias (análise primária - sobreviventes a longo prazo) ou de quinze a 30 dias (análise secundária – sobreviventes a curto prazo). Os prontuários dos pacientes foram avaliados por especialistas na busca de sinais de parkinsonismo, indicado por pelo menos um dos sinais cardinais clássicos: bradicinesia, tremor, instabilidade postural ou rigidez. Somente os casos que apresentaram sinais neurológicos durante o curso do envenenamento foram

	considerados viáveis.
<b>Resultados</b>	Sessenta e sete artigos com casos viáveis relataram 83 pacientes que atendiam à definição de intoxicação por paraquat; 70 deles sobreviveram a longo prazo e 13 a curto prazo. Sinais de parkinsonismo não foram identificados em qualquer paciente. Concluíram que a intoxicação aguda por paraquat não ocorre da mesma maneira que pela MPTP, já que os expostos a essa droga desenvolvem sintomas precoces de parkinsonismo.
<b>Comentários</b>	Não disponibilizaram os estudos de onde retiraram os casos de pacientes expostos a altas doses do paraquat. Nenhum paciente foi avaliado fisicamente; os especialistas apenas avaliaram seus prontuários e dados de evolução.
<b>4. Referência</b>	<b>Van Maely-Fabry et al., 2012.</b>
<b>Título e palavras-chave</b>	<b>Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies.</b> <i>Palavras-chave:</i> Parkinson, occupational exposure, pesticides, systematic review, meta-analysis, cohort studies.
<b>Estudos</b>	<b>Revisão sistemática e metanálise</b> de estudos coortes que avaliaram a relação entre exposição ocupacional a pesticidas e DP. Os estudos, apenas em inglês, foram selecionados do PubMed, de 1966 até novembro de 2011.
<b>Dados do estudo</b>	Foi feita metanálise com todo o conjunto de dados e com subgrupos definidos por sexo, caracterização da exposição (incluindo a categoria de pesticidas específicos, como o paraquat), diagnóstico da DP (avaliação de especialistas x auto-relatado), localização geográfica e tipo de delineamento dos estudos de coorte (prospectivos x retrospectivos).
<b>Resultados</b>	Incluídos 12 estudos coortes relatando exposição a pesticidas no geral. Utilizaram Risco Relativo (RR) como medida de estimativa de efeito. O valor metanalítico referente a todos os estudos foi RR 1,29 (IC 95% 1,03-1,59; I <sup>2</sup> 74%). A evidência mais forte de risco aumentado foi fornecida pelos estudos com diagnóstico da DP confirmado por neurologista (quatro estudos: RR 2,6; IC 95% 1,46-4,8; I <sup>2</sup> 60%).

	Não foi identificada associação positiva entre herbicidas em geral e DP (dois estudos), com RR 0,88 (IC 95% 0,60-1,29) e nem em dois estudos referentes ao paraquat (Engel et al., 2001; Tomenson & Campbell, 2011), cujo RR foi de 0,78 (IC 95% 0,49-1,29), não significativo.
<b>Comentários</b>	Apesar de positivo, o resultado geral apresentou alta inconsistência, principalmente devido a diferenças no desenho dos estudos e quantidade de estudos incluídos. Resultado negativo, mas não significativo, em relação ao paraquat. Limitação de bases de dados: apenas PubMed. Quantidade escassa de estudos não permitiu conclusões sobre exposição a classes de pesticidas ou a pesticidas específicos.
<b>5. Referência</b>	<b>Freire &amp; Koifman, 2012.</b>
<b>Título e palavras-chave</b>	<b>Pesticide exposure and Parkinson's disease: Epidemiological evidence of association.</b> <i>Palavras-chave:</i> Pesticides, Parkinson's disease, organochlorines, organophosphates, case-control, cohort studies, incidence.
<b>Estudos</b>	Estudos observacionais (ecológicos, transversais, coortes e caso-controle) publicados entre 2000 e 2011 nas bases de dados PubMed e SciELO. Selecionados apenas estudos em inglês, português e espanhol.
<b>Dados do estudo</b>	Revisão sistemática de estudos observacionais que abordaram exposição ambiental/ocupacional a qualquer tipo de pesticida, classe de pesticidas ou fatores relacionados (ex., trabalho rural e consumo de água de poço) e sua associação com DP/parkinsonismo.
<b>Resultados</b>	Identificados 50 estudos observacionais sobre a associação entre pesticidas/fatores ambientais e DP. Apenas nove estudos relataram exposição ao paraquat e DP: três estudos reportaram associação (OR) positiva e significativa (Kamel et al., 2007; Tanner et al., 2011; Wang et al., 2011), três com associação positiva mas não significativa (Dhillon et al., 2008; Costello et al., 2009; Tanner et al., 2009) e outros três estudos apresentando associação negativa (Firestone et al., 2010; Elbaz et al., 2009; Gatto et al., 2009). Os resultados dos estudos não foram submetidos à metanálise, sendo apresentados apenas na forma

	de tabela.
<b>Comentários</b>	Limitação de base de dados (SciELO é considerada uma base de dados fraca) e ano de publicação dos estudos.
<b>6. Referência</b>	<b>Pezzoli &amp; Cereda, 2013.</b>
<b>Título e palavras-chave</b>	<b>Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease.</b> <i>Palavras-chave:</i> não reportadas.
<b>Estudos</b>	Avaliados estudos coorte e caso-controle em língua inglesa, envolvendo exposição a pesticidas ou solventes e DP, sem restrição quanto ao ano de publicação, publicados até dezembro de 2011, nas bases de dados PubMed, EMBASE e CINAHL.
<b>Dados do estudo</b>	<b>Revisão sistemática e metanálise.</b> Para serem incluídos nas metanálises, os artigos tiveram que reportar pelo menos uma estimativa de risco (RR ou OR, IC 95%) relativa à exposição a poluentes (pesticidas, herbicidas, inseticidas, fungicidas, rodenticidas e solventes) ou a outros fatores ambientais associados (ocupação, vida rural, consumo de água de poço) e DP, ou apresentar dados suficientes para calculá-los. Os aa. consideraram também estudos com dados de pesticidas específicos que tivessem ligação com a DP bem estabelecida na literatura, como o paraquat. Aplicaram a escala <i>NewCastle Ottawa</i> (NOS) para identificação de possíveis vieses entre os estudos.
<b>Resultados</b>	Selecionados 104 artigos para avaliação qualitativa, dos quais 89 foram incluídos nas metanálises, sendo 06 estudos de coorte e 83 de caso-controle. Quando aplicada a NOS, os principais tipos de vieses verificados foram de seleção, exposição e de avaliação dos desfechos. Treze estudos relacionados ao paraquat e DP foram analisados qualitativamente, porém apenas sete deles foram incluídos na metanálise, sendo o resultado geral um OR de 2,19 (IC 95% 1,48-3,26; I <sup>2</sup> 51,1%). A metanálise dos cinco estudos de alta qualidade (NOS > 07) (Hertzman et al., 1994; Tanner et al., 2009; Firestone et al., 2010; Tanner et al., 2011; Wang et al., 2011), gerou OR de 1,72 (IC 95% 1,28-2,32; I <sup>2</sup> 0%). A metanálise dos dois estudos de má qualidade (NOS < 07) gerou OR de 3,22 (IC 95% 2,42-4,30; I <sup>2</sup> 0%). Não foi identificado viés de publicação entre os estudos com dados do paraquat.

<b>Comentários</b>	Limitação de idioma dos estudos. Não indicaram quais os dois estudos relacionados ao paraquat com NOS < 07 incluídos na metanálise. Única revisão que avaliou o risco de viés pela ferramenta NOS. A grande maioria dos estudos incluídos foi do tipo caso-controle; os aa. apontaram a necessidade de mais estudos de coorte, com um grande número de casos e maiores períodos de acompanhamento, para se obter poder estatístico adequado.
<b>7. Referência</b>	<b>Allen &amp; Levy, 2013.</b>
<b>Título e palavras-chave</b>	<b>Parkinson's disease and pesticide exposure – a new assessment.</b> <i>Palavras-chave:</i> Meta-analysis, occupational exposure, PD, pesticides, systematic review.
<b>Estudos</b>	Selecionaram estudos coorte, caso-controle e transversais, apenas em inglês, sobre associação entre pesticidas e DP no EMBASE, PubMed e CAB, publicados de 1 de janeiro de 1947 a 31 de agosto de 2010.
<b>Dados do estudo</b>	<b>Revisão sistemática e metanálise.</b> Os aa. objetivaram determinar se a associação encontrada estaria relacionada com o padrão de uso (exposição ocupacional ou domiciliar) de pesticidas. Foram examinados grupos funcionais de pesticidas (herbicidas, inseticidas, fungicidas, rodenticidas) e grupos/agentes químicos específicos.
<b>Resultados</b>	Com relação à exposição geral a pesticidas, foram incluídos 29 estudos (28 caso-controle e um coorte). Foram obtidas estimativas de efeito (EE) considerando os estudos semelhantes (modelo de efeitos fixos) ou diferentes entre si (modelo de efeitos aleatórios, mais conservador). <u>Exposição geral:</u> Modelo de efeitos fixos: 1,42 (IC 95% 1,32-1,52); Modelo de efeitos aleatórios: 1,63 (IC 95% 1,37-1,93; I <sup>2</sup> 74%). <u>Exposição ocupacional:</u> Modelo de efeitos fixos: 1,49 (IC 95% 1,34-1,66); Modelo de efeitos aleatórios: 1,66 (IC 95% 1,40-1,96; I <sup>2</sup> 64%), considerando 20 estudos (17 caso-controle e três coortes). <u>Exposição domiciliar:</u> Modelo de efeitos fixos: 1,34 (IC 95% 1,09-1,67); Modelo de efeitos aleatórios: 1,36 (IC 95% 1,05-1,75; I <sup>2</sup> 27%) considerando seis estudos caso-controle. <u>Exposição ao paraquat:</u> foram analisados seis estudos caso-controle (Costello et al., 2009; Firestone et al., 2010; Hertzman et al., 1994; Kamel et al., 2007; Kuopio et

	<p>al., 1999; Liou et al., 1997). A EE ajustada para sexo e idade foi de 1,82 (IC 95% 1,48-2,23) para modelo de efeitos fixos e 1,38 (IC 95% 0,72-2,66; P 83,3 %) para modelo de efeitos aleatórios. Os aa. enfatizaram a associação consistente entre exposição a pesticidas no geral e desenvolvimento da DP, estando particularmente a exposição ocupacional mais associada à DP do que a domiciliar, sugerindo que o risco de DP pode aumentar com a duração e /ou frequência de exposição aos pesticidas.</p>
<b>Comentários</b>	<p>Limitação de idioma, restrito ao inglês. Foram selecionados estudos até 2010, porém, como a publicação é de 2013, estudos eventualmente publicados entre 2011 a 2013 podem não ter sido incluídos. Os aa. não especificaram qual foi a EE utilizada (se RR, OR ou outra). Devido à pequena quantidade de estudos (seis) abordando especificamente o paraquat, não foram feitas avaliações separadas para exposição domiciliar ou ocupacional. Poucos estudos abordando o paraquat, sendo o nível de inconsistência muito alto (83,3%) entre eles. A falta de poder estatístico deve ser levada em conta na interpretação dos resultados.</p>
<b>8. Referência</b>	<b>Ntzani et al., 2013.</b>
<b>Título e palavras-chave</b>	<p><b>Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects.</b>  <i>Palavras-chave:</i> Pesticides; epidemiological studies; pesticide exposure; health outcomes; mortality; case control studies; cohort studies.</p>
<b>Estudos</b>	<p>Busca por estudos observacionais feita no EMBASE, PubMed, TOXNET (TOXLINE e DART) e ProQuest Dissertações Digitais e Teses, sem restrição quanto ao idioma, região geográfica ou população. Incluídos apenas estudos publicados entre 2006 e 2012.</p>
<b>Dados do estudo</b>	<p><b>Revisão sistemática</b> sobre exposição ocupacional/ambiental a pesticidas e desfechos variados, entre eles a DP. Só foi possível a realização de <b>metanálises</b> relacionadas à leucemia infantil e DP.</p>
<b>Resultados</b>	<p>Dentre 603 estudos selecionados, a maior proporção tratou da exposição a pesticidas e desfechos "câncer" (n = 164) e "saúde da criança" (n = 84). Com relação a doenças neurológicas, foram 60 estudos, sen-</p>

	do 32 sobre DP. Nove estudos reportando exposição ao paraquat foram incluídos na metanálise, sendo um estudo coorte (Kamel et al., 2007), oito estudos caso-controle [Gatto et al., 2007; Dhillon et al., 2008; Tanner et al., 2009; Tanner et al., 2011; Costello et al., 2009 (considerado duas vezes na metanálise), e duas referências não identificadas NRD 32 e NRD38]. Com relação à exposição a pesticidas em geral e DP, foi obtido OR de 1,49 (IC 95% 1,28-1,73; I <sup>2</sup> 54,6%) pelo modelo de efeitos aleatórios; já para o paraquat especificamente, OR 1,32 (IC 95% 1,10-1,60; I <sup>2</sup> 34%).
<b>Comentários</b>	Limitação de período de publicação. Os estudos receberam identificação própria (NRD e a numeração do estudo, seguindo critérios definidos pelos autores). Entramos em contato com os autores para identificação dos estudos referentes ao paraquat e DP. Ainda não obtivemos as referências para NRD 32 e NRD 38 – esperando o contato dos autores. Após pedido de esclarecimento à entidade patrocinadora do estudo (EFSA), a referência NRD 23 do artigo nos foi identificada incorretamente como Gatto et al. (2007), que trata de organoclorados e câncer de mama e não de DP. Os autores também não explicaram o motivo de Costello et al.(2009) ter sido considerado duas vezes na metanálise.
<b>9. Referência</b>	<b>Breckenridge et al., 2016.</b>
<b>Título e palavras-chave</b>	<b>Association between Parkinson’s disease and cigarette smoking, rural living, well-water consumption, farming and pesticide use: systematic review and meta-analysis.</b> <i>Palavras-chave:</i> não reportadas.
<b>Estudos</b>	Identificados estudos observacionais, em inglês, no PubMed, que avaliaram associação entre DP e tabagismo, vida rural, consumo de água de poço, agricultura e pesticidas, herbicidas, inseticidas, fungicidas, ou paraquat especificamente.
<b>Dados do estudo</b>	<b>Revisão sistemática e metanálise.</b> Os autores adicionaram avaliação qualitativa por peso da evidência baseada nos “critérios” de causalidade de Hill. Os estudos foram separados em duas categorias dependendo do rigor metodológico: Tier 1, em que o diagnóstico da DP foi

	feito por especialistas, os casos eram incidentes e a exposição caracterizada a nível individual, e Tier 2, em que o diagnóstico foi feito pelos próprios pacientes, os casos eram prevalentes e a exposição a nível de grupo. Metanálises foram realizadas para cada Tier.
<b>Resultados</b>	Foram identificados 893 estudos potenciais. No total, 105 estudos foram incluídos nas metanálises de qualquer uma das 14 exposições consideradas. Vinte estudos referiram dados sobre o paraquat, sendo que 13 foram incluídos na metanálise. Devido a apenas um único estudo ter preenchido os critérios necessários para classificação no Tier 1 (Firestone et al., 2010), a metanálise conduzida foi o resultado da combinação dos estudos de ambos os Tiers (Hertzman et al., 1994; Liou et al., 1996; Kuopio et al., 1999; Engel et al., 2001; Kamel et al., 2007; Dhillon et al., 2008; Tanner et al., 2009; Elbaz et al., 2009; Firestone et al., 2010; Rugbjerg et al., 2011; Tanner et al., 2011; Tomenson et al., 2011; Lee et al., 2012). Para o paraquat isoladamente foi demonstrada associação significativa tanto na abordagem pelo modelo de efeitos fixos (RR 1,69; IC 95% 1,44-1,98); como pelo modelo de efeitos aleatórios (RR 1,47; IC 95% 1,01-2,13; I <sup>2</sup> ~ 70%).
<b>Comentários</b>	Limitação de idioma dos estudos e base de dados (apenas PubMed). Os aa. alocaram os estudos em Tiers de acordo com o seu rigor metodológico, porém julgamos que a escolha de critérios para Tier 1 não foi adequada, pois foram consideradas exposições relatadas pelos próprios participantes como sendo de alto rigor metodológico, mesmo estando sob alto viés de memória.

Em relação às revisões sistemáticas e metanálises disponíveis na literatura até o momento (Tabela 1), podem ser feitos os seguintes comentários gerais. A maioria delas apresenta limitações metodológicas, como restrições de idioma (apenas artigos em inglês) (Li et al., 2005; Brown et al., 2006; Van Maely-Fabry et al., 2012; Pezzoli & Cereda, 2013; Allen & Levy, 2013; Breckenridge et al., 2016), períodos limitados de publicação (Freire & Koifman, 2012; Ntzani et al., 2013), e base de dados limitadas (Li et al., 2005; Van Maely-Fabry et al., 2012; Freire & Koifman et al., 2012; Breckenridge et al., 2016). Apenas uma delas (Pezzoli & Cereda, 2013) utilizou a escala NOS para identificação dos potenciais vieses nos estudos, como parte da avaliação da sua qualidade

metodológica. Um dos estudos (Li et al., 2005) criou a própria escala para avaliar a consistência dos estudos, julgando quatro parâmetros principais: taxa de participação, definição dos casos da DP, seleção dos controles e avaliação da exposição.

Breckenridge et al. (2016) classificaram os estudos de acordo com seu rigor metodológico, alocando-os em dois Tiers dependendo se o diagnóstico da DP fora feito por especialistas ou não, se os casos eram incidentes ou prevalentes e se a avaliação da exposição fora feita a nível individual ou em grupo. No quesito exposição, eles consideraram como alto rigor metodológico os estudos que obtiveram informações sobre a exposição a partir de entrevistas com cada participante. No entanto, vale ressaltar que tais relatos estão sujeitos a viés de memória, pois os participantes precisam se lembrar de detalhes de exposições que ocorreram muitos anos antes, de modo que de fato não houve rigor metodológico neste quesito. Como análise complementar, aqueles autores fizeram uma avaliação por peso da evidência baseando-se nos “critérios” de Hill (Hill, 1965) para determinar se havia associação causal entre a DP e fatores de risco específicos, como tabagismo, vida rural, consumo de água de poço, atividade agrícola, pesticidas em geral, herbicidas, inseticidas, fungicidas ou paraquat isoladamente. Como conclusão, afirmaram não ser possível inferir causalidade entre DP e o uso de paraquat baseando-se apenas no único estudo Tier 1 (Firestone et al., 2010), que relatou exposição ao paraquat em apenas três casos e dois controles, apresentando OR 0,9 (IC 95% 0,14-5,43), não significativo. Neste caso, os resultados não apresentaram força ou consistência suficiente a favor de causalidade. O gradiente biológico e temporalidade não foi avaliado. Embora a hipótese de que o paraquat possa causar DP seja altamente específica, os autores afirmaram haver discordância quanto à plausibilidade biológica, pois não está identificada a maneira pela qual o paraquat atravessaria a barreira hematoencefálica e atinge os neurônios dopaminérgicos.

Particularmente, a RS conduzida por Brent & Schaeffer (2011) levantou a importante questão de que talvez o paraquat não tenha a mesma eficácia e atue por mecanismos diferentes da MPTP, o que tem sido sugerido por alguns estudos experimentais (Shimzu et al., 2001; Richardson et al., 2005). Naquela RS os autores avaliaram prontuários de sobreviventes à intoxicação aguda por paraquat, em que a maioria dos casos se deu por ingestão oral da substância (91%); poucos foram os casos em decorrência de exposição dérmica ou inalatória. Como tem sido sugerido que o paraquat tenha um mecanismo de ação igual ao da MPTP, que provoca sintomas de parkinsonismo dentro de poucos dias após sua administração (Langston et al, 1983), seria de se esperar sintomas

de parkinsonismo nos pacientes agudamente expostos ao paraquat. No entanto, não foram encontradas referências aos sinais motores clássicos da DP; a maioria das descrições se referia à feridas na pele e mucosas, e síndromes pulmonar e renal. É possível que a avaliação neurológica motora desses pacientes, muitas vezes internados em unidade de tratamento intensivo, tenha sido prejudicada pela sedação e ventilação mecânica.

A maioria das RS e metanálises concordou quanto à associação entre pesticidas de modo geral e DP. Porém, com relação ao paraquat especificamente, nem todas as RS que realizaram metanálise obtiveram uma estimativa positiva de efeito. Van Maele Fabry et al. (2012), por exemplo, avaliaram apenas estudos coorte, e obtiveram uma associação negativa com RR de 0,78 (IC 95% 0,49-1,29;  $P^2$  0%), não significativa. Pezzoli & Cereda (2013) (OR 2,19; IC 95% 1,48-3,26;  $P^2$  51%), Allen & Levy (2013) (EE 1,82; IC 95% 1,48-2,23;  $P^2$  83,3%), Ntzani et al. (2013) (OR 1,32; IC 95% 1,10-1,60;  $P^2$  34%) e Breckeridge et al. (2016) (RR 1,69; IC 95% 1,44-1,98;  $P^2$  ~70%), por sua vez, chegaram a associações positivas e significativas, porém com valores relativamente altos de heterogeneidade – o maior valor de  $P^2$  foi de Allen & Levy (2013), chegando a 83,3%.

A visão conjunta dessas RS e metanálises, com seus méritos e limitações, indica que a questão da associação entre exposição ao herbicida paraquat e o desenvolvimento da DP carece de uma revisão sistemática atualizada, que contemple detalhes de rigor metodológico que não foram atendidos pelas revisões disponíveis.

## REFERÊNCIAS

Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 2000;25(1):239-52.

Academia Brasileira de Neurologia. Conheça os sintomas do Mal de Parkinson [Internet]. São Paulo: ABN; 2014 [citado 7 Jul 2017]. Disponível em: <http://abneuro.org.br/clippings/detalhes/150/conheca-os-sintomas-do-mal-de-parkinson>

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). AGROFIT [Internet]. Brasília: MAPA; 2017 [citado 2 Abr 2017]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Superintendência de Toxicologia Gerência Geral de Toxicologia. Coordenação de produtos novos e de baixo risco. Parecer Técnico de Reavaliação nº 01, de 2015/ggtox/anvisa. Analisa a nota técnica de reavaliação do ingrediente ativo paraquate elaborada pela Fiocruz [Internet]. Brasília: ANVISA; 2015 [citado 2 Abr 2017]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/59b95b804a3555b2bafbf4eff144ba1/CP+94-2015++NT.pdf?MOD=AJPERES>

Allen MT, Levy LS. Parkinson's disease and pesticide exposure – a new assessment. *Crit Rev Toxicol*. 2013;43(6):515-34.

- Alves DC. Recent advances on  $\alpha$ -synuclein cell biology: functions and dysfunctions. *Curr Mol Med*. 2003;3(1):17-24.
- Barbosa ER, Sallem FAZ. Doença de Parkinson – Diagnóstico. *Rev Neurociênc*. 2005;13(3):158-65.
- Bharath S, Bharat S, Cochran BC, Hsu M, Liu J, Ames BN, et al. Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology*. 2012;23(4):479-86.
- Berry C, La Vecchia C, Nicotera P. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ*. 2010;17(7):1115-25.
- Berry C. The dangers of hazards. *Toxicol Res*. 2016;5(2):373-6.
- Breckenridge CB, Berry C, Chang ET, Sielken RL Jr, 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;11(14):p.e0151841.
- Brent J, Schaeffer TH. Systematic review of Parkinsonian syndromes in short- and long-term survivors of paraquat poisoning. *J Occup Environ Med*. 2011;53(11):1332-6.
- Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and Parkinson's Disease- Is there a link? *Environ Health Perspect*. 2006;114(2):156-64.
- Chorfa A, Bétemps D, Morignat E, Lazizzera C, Hogeveen K, Andrieu T, et al. Specific pesticide-dependent increases in  $\alpha$ -synuclein levels in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and melanoma (SK-MEL-2) cell lines. *Toxicol Sci*. 2013;133(2):289-97.
- 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;169(8):919-26.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, et al. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res*. 1979;1(3):249-59.
- Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT, et al. Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J Agromed*. 2008;13(1):37-48.
- Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, Bennett J, et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med*. 2007;64(10):666-72.
- Di Monte DA, Lavasani M, Manning-Bog AB. Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2002;23(4-5):487-502.
- Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML, et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2006;27(6):1110-22.
- Ebadi M, Sharma SK. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2003;5(3):319-35.
- Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2009;66(4):494-504.

- Engel L, Checkoway H, Keifer M, Seixas N, Longstreth W, Scott K, et al. Parkinsonism and occupational exposure to pesticides. *Occup Environ Med.* 2001;58(9):582-9.
- Fei Q, McCormack AL, Di Monte DA, Ethell DW. Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2002;283(3):3357-64.
- Ffytche DH, Pereira JB, Ballard C, Chaudhuri KR, Weintraub D, Aarsland D, et al. Risk factors for early psychosis in PD: insights from the Parkinson's Progression Markers Initiative. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017;88(4):325-31.
- Firestone JA, Smith-Weller T, Franklin G, Swanson P, Longstreth WT Jr, Checkoway H. Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. *Arch Neurol.* 2005;62(1):91-5.
- Firestone JA, Lundin JI, Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, et al. Occupational factors and risk of Parkinson's disease: a population-based case-control study. *Am J Ind Med.* 2010;53(3):217-23.
- Freire C, Koifman S. Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology.* 2012;33(5):947-71.
- Fukushima T, Yamada K, Hojo N, Isobe A, Shiwaku K, Yamane Y. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. III. The effects of acute paraquat exposure on the electron transport system in rat mitochondria. *Exp Toxicol Pathol.* 1994;46(6):437-41.
- Gatto NM, Cockburn M, Bronstein J, Manthripragada AD, Ritz B. Well-water consumption and Parkinson's disease in rural California. *Environ Health Perspect.* 2009;117(12):1912-8.
- Gatto NM, Rhodes SL, Manthripragada AD, Bronstein J, Cockburn M, Farrer M, et al. Synuclein gene may interact with environmental factors in increasing risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology.* 2010;35(3):191-5.
- Girault JA, Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol.* 2004;61(8):641-4.
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992;59(5):1609-23.
- Hertzman C, Wiens M, Bowering D. Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Indust Med.* 1990;17(4-5):349-55.
- Hertzman C, Wiens M, Snow B, Kelly S, Calne D. A case-control study of Parkinson's disease in a horticultural region of British Columbia. *Mov Disord.* 1994;9(1):69-75.
- Green S, Higgins JPT, Alderson P, Clarke M, Mulrow CD, Oxman AD. Introduction. In: Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions.* Version 5.1.0 [updated March 2011]. Chichester: The Cochrane Collaboration; 2011 [citado 2 Abr 2017]. Chapter 1. Disponível em: [www.cochrane-handbook.org](http://www.cochrane-handbook.org).
- Hill AB. The environment and disease: association or causation? *Proc R Soc Med.* 1965;58(5):295-300.
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53(3):S26-36.
- Kamel F, Tanner C, Umbach D, Hoppin JA, Alavanja MCR, Blair A, et al. Pesticide exposure and self-reported Parkinson's Disease in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol.* 2007;165(4):364-74.

- Kuter K, Smiałowska M, Wieronska J, Zieba B, Wardas J, Pietraszek M, et al. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. *Brain Res.* 2007;1155:196-207.
- Kuter K, Nowak P, Golembiowska K, Ossowska K. Increased reactive oxygen species production in the brain after repeated low-dose pesticide paraquat exposure in rats. A comparison with peripheral tissues. *Neurochem Res.* 2010;35(8):1121-30.
- Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Rinne UK. Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1999;14(6):928-39.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 1983;219:979-80.
- Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother.* 1999;53(3):122-30.
- Lee PC, Bordelon Y, Bronstein J, Ritz B. Traumatic brain injury, paraquat exposure, and their relationship to Parkinson disease. *Neurology.* 2012;79(20):2061-6.
- Li B, He X, Sun Y, Li B. Developmental exposure to paraquat and maneb can impair cognition, learning and memory in Sprague-Dawley rats. *Mol Biosyst.* 2016;12(10):3088-97.
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: A case-control study in Taiwan. *Neurology.* 1997;48(6):583-8.
- Mandel JS, Adami HO, Cole P. Paraquat and Parkinson's disease: an overview of the epidemiology and a review of two recent studies. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012;62(2):385-92.
- McGuinness MB, Karahalios A, Finger RP, Guymer RH, Simpson JA. Age-related macular degeneration and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmic Epidemiol.* 2017;24(3):141-52.
- McNaught KS, Olanow CW. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S73-84.
- Mehdi SH, Qama A. Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Sci.* 2013;134(2):355-65.
- Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J Parkinsons Dis.* 2011;1(1):19-33.
- Morán JM, González-Polo RA, Ortiz-Ortiz MA, Niso-Santano M, Soler G, Fuentes JM. Identification of genes associated with paraquat-induced toxicity in SH-SY5Y cells by PCR array focused on apoptotic pathways. *J Toxicol Environ Health A.* 2008;71(22):1457-67.
- Morris ME. Movement disorders in people with Parkinson's disease: a model for physical therapy. *Phys Ther.* 2000;80(6):578-97.
- Nakano K. Neural circuits and topographic organization of the basal ganglia and related regions. *Brain Dev.* 2000;22:S5-16.

- Ntzani EE, Chondrogiorgi M, Ntritsos G, Evangelou E, Tzoulaki I. Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. *EFSA Supp Publ.* 2013;10(10):497E.
- Pardridge WM. Drug transport across the blood–brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(11):1959-72.
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002;14(2):223-36.
- Pereira M, Galvão TF. Extração, avaliação da qualidade e síntese dos dados para revisão sistemática. *Epidemiol Serv Saúde.* 2014;23(3):577-8.
- Pezzoli G, Cereda E. Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology.* 2013;80(22):2035-41.
- Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology.* 2000;21(4):435-40.
- Ren JP, Zhao YW, Sun XJ. Toxic influence of chronic oral administration of paraquat on nigrostriatal dopaminergic neurons in C57BL/6 mice. *Chin Med J.* 2009;122(19):2366-71.
- Rooney AA, Boyles AL, Wolfe MS, Bucher JR, Thayer KA. Systematic review and evidence integration for literature-based environmental health science assessments. *Environ Health Perspec.* 2014;122(7):711-8.
- Richardson JR. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci.* 2005;88(1):193-201.
- Rugbjerg K, Harris MA, Shen H, Marion SA, Tsui JK, Teschke K. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease – a population-based case–control study evaluating the potential for recall bias. *Scand J Work Environ Health.* 2011;27(5):427-36.
- Sampaio RF, Mancini M C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. *Rev Bras Fisioter.* 2007;11(1):83-9.
- Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology.* 1996;46(5):1275-84.
- Serra A, Domingos F, Prata MM. Intoxicação por paraquat. *Acta Méd Port.* 2003;16(1):25-32.
- Shichiri M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J Clin Biochem Nutr.* 2014;54(3):151-60.
- Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, et al. Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res.* 2001;906(1-2):135-42.
- Sulzer D, Alcalay RN, Garretti F, Cote L, Kanter E, Agin-Lieb J, et al. T cells from patients with Parkinson's disease recognize  $\alpha$ -synuclein peptides. *Nature.* 2017;546(7660):656-61.
- Tanner CM, Ross GW, Jewell SA, Hauser RA, Jankovic J, Factor SA, et al. Occupation and risk of parkinsonism. A multicenter case-control study. *Arch Neurol.* 2009;66(9):1106-13.

- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 2011;119(6):866-72.
- Tawara T, Fukushima T, Hojo N, Isobe A, Shiwaku K, Setogawa T, et al. Effects of paraquat on mitochondrial electron transport system and catecholamine contents in rat brain. *Arch Toxicol.* 1996;70(9):585-9.
- Teixeira AL, Cardoso F. Neuropsiquiatria dos núcleos da base: uma revisão. *J Bras Psiquiatr.* 2004;53(3):153-8.
- Tomenson JA, Campbell C. Mortality from Parkinson's disease and other causes among a workforce manufacturing paraquat: a retrospective cohort study. *BMJ Open.* 2011;1(1):e000283.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):65-74.
- Van Der Mark M, Vermeulen R, Nijssen PC, Mulleners WM, Sas AM, Van Laar T, et al. Occupational exposure to pesticides and endotoxin and Parkinson disease in the Netherlands. *Occup Environ Med.* 2014;71(11):757-64.
- Van Maele-Fabry G, Hoet P, Vilain F, Lison D. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environ Int.* 2012;46:30-43.
- Yang W, Chen L, Ding Y, Zhuang X, Kang UJ. Paraquat induces dopaminergic dysfunction and proteasome impairment in DJ-1-deficient mice. *Hum Mol Genet.* 2007;16(23):2900-10.
- Yang W, Tiffany-Castiglioni E, Koh HC, Son IH. Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett.* 2009;191(2-3):203-10.
- Yavich L, Tanila H, Vepsäläinen S, Jäkälä P. Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J Neurosci.* 2004;24(49):11165-70.
- Warner TT, Schapira AH. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53(3):16-25.
- 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;26 Suppl 1:S1-58.
- Wang A, Costello S, Cockburn M, Zhang X, Bronstein J, Ritz B. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol.* 2011;26(7):547-55.

## CAPÍTULO II. MANUSCRITO.

### **PARAQUAT E DOENÇA DE PARKINSON: REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE DE ESTUDOS OBSERVACIONAIS.**

### **PARAQUAT AND PARKINSON'S DISEASE: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS OF OBSERVATIONAL STUDIES.**

Carolina Vaccari<sup>1</sup> ([carol.vaccari@gmail.com](mailto:carol.vaccari@gmail.com))

Regina El Dib<sup>2,3</sup> ([eldib@ict.unesp.br](mailto:eldib@ict.unesp.br))

João Lauro V. de Camargo<sup>1</sup> ([jdecam@uol.com.br](mailto:jdecam@uol.com.br))

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM), Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Ciências e Tecnologia, Departamento de Biociências e Diagnóstico Oral, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade McMaster, Instituto de Urologia, Hamilton, Ontario, Canadá.

#### **\*Autor correspondente**

Carolina Vaccari

Departamento de Patologia, Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM), Botucatu, Brasil.

Distrito de Rubião Júnior

Universidade Estadual Paulista

Botucatu, SP

CEP 18618-970

(14) 3880-1590

E-mail: [carol.vaccari@gmail.com](mailto:carol.vaccari@gmail.com)

**A ser submetido na Revista de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP. [http://www.fsp.usp.br/rsp/?page\\_id=38](http://www.fsp.usp.br/rsp/?page_id=38)**

---

## RESUMO

**Introdução:** A doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa que tem como fatores de risco o envelhecimento, suscetibilidade genética e exposição a certos agentes químicos. Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos e experimentais têm sugerido associação entre exposição ao herbicida paraquat e o desenvolvimento da DP.

**Objetivos:** Verificar a associação entre paraquat e DP por meio de revisão sistemática da literatura e metanálise.

**Métodos:** Foram selecionados estudos coortes, caso-controle e transversais comparativos que incluíram quaisquer participantes expostos ambiental e/ou ocupacionalmente ao paraquat, sem restrição quanto à dose ou período de exposição. Os desfechos considerados foram a DP diagnosticada por especialistas (desfecho primário) ou relatada pelos participantes em entrevistas e/ou questionários (desfecho secundário). As bases de dados pesquisadas foram: PubMed, EMBASE, LILACS, TOXNET e *Web of Science*, sem restrição de idioma ou período de publicação. A heterogeneidade entre os estudos foi avaliada pelo teste  $I^2$ , sendo o *odds ratio* (OR) a medida de estimativa de efeito, com intervalo de confiança 95%. O risco de viés foi avaliado pelas ferramentas modificadas do *NewCastle Ottawa*.

**Resultados:** Foram incluídos 15 estudos na revisão sistemática e 12 estudos na metanálise. Ao final, foi obtido um OR de 1,40 (IC 95% 1,16-1,70;  $I^2$  15%), demonstrando associação positiva entre exposição ao paraquat e DP, que pareceu ser mais evidente em indivíduos suscetíveis, expostos ocupacionalmente ao paraquat em coexposição a outros pesticidas e que fizeram pouco uso de equipamentos de proteção individual.

**Discussão:** A maioria dos estudos incluiu pequeno número de participantes expostos e apresentou alto risco de viés. Novos estudos prospectivos, que documentem cuidadosamente a exposição ao herbicida, e com maior número de indivíduos potencialmente expostos, poderão consolidar a associação positiva observada. Também, a análise de genes específicos que aumentam a predisposição à DP, e o papel de coexposições a outros praguicidas que podem estar relacionados a essa doença, poderão contribuir para a identificação de fatores que modulam a sua ocorrência.

**Registro da Revisão Sistemática:** PROSPERO CRD42017069994.

**Palavras-chave:** paraquat; Doença de Parkinson; revisão sistemática; metanálise.

## ABSTRACT

**Introduction:** Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative condition that has aging, genetic susceptibility and exposure to certain chemicals as risk factors. In the last decades, epidemiological and experimental studies have suggested an association between the herbicide paraquat and the development of PD.

**Objectives:** To verify an association between paraquat and PD through systematic review of the literature and meta-analysis.

**Methods:** Cohort, case-control, and comparative cross-sectional studies eligible for this systematic review enrolled any participant who was occupationally and/or environmentally exposed to paraquat, regardless of doses or period of exposure. Outcomes of interest were PD diagnosed by experts or reported by the participants in questionnaires and/or interviews. The following electronic databases were searched: PubMed, EMBASE, LILACS, TOXNET and Web of Science, without language or publication period restrictions. The heterogeneity among studies was evaluated by the  $I^2$  test and data were summarized as odds ratios with their respective 95% confidence intervals. Risk of bias was assessed by modified tools from the NewCastle Ottawa Scale.

**Results:** Fifteen studies were included in the systematic review and 12 studies were included in the meta-analysis. A significant OR of 1.40 (95% CI: 1.16-1.70,  $I^2$  15%) was obtained, demonstrating a positive association between paraquat exposure and PD. This association seemed to be more evident in susceptible individuals, occupationally exposed to paraquat in coexposure to other pesticides and lacking use of protective equipment.

**Discussion:** Most studies included a small number of participants exposed to paraquat and were at high risk of bias. New prospective studies, which carefully document the herbicide exposure, with a greater number of potentially exposed individuals, could consolidate the positive association observed. Also, the analysis of specific genes that increase the predisposition to PD, and the role of coexpositions to other pesticides that may be related to this disease, may contribute to the identification of factors that modulate its occurrence.

**Systematic Review Registration:** PROSPERO CRD42017069994.

**Key-words:** paraquat; Parkinson's Disease; systematic review, meta-analysis.

## INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa progressiva caracterizada pela degeneração e morte seletiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc), associadas à agregação e deposição de proteínas específicas ( $\alpha$ -sinucleínas), estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, disfunção proteassômica e apoptose<sup>1-5</sup>.

As causas da DP não estão bem estabelecidas, mas sugere-se que sua patogenia seja multifatorial envolvendo suscetibilidade genética, envelhecimento e, possivelmente, exposição a determinados produtos químicos<sup>6,7</sup>.

Em 1976, a descoberta da N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), uma impureza gerada acidentalmente no processo de fabricação da droga de abuso 4-propiloxi-4-fenil-N-metilpiperidina (MPPP), permitiu estabelecer relação entre exposição a uma neurotoxina e a DP<sup>8</sup>. Desde que usuários de MPPP contaminada com MPTP desenvolveram sintomas parkinsonianos, como mudez, rigidez severa, fraqueza, tremor e face inexpressiva<sup>8</sup>, esta molécula tem sido utilizada para estabelecer modelos experimentais de DP, a fim de investigar sua patogenia e reconhecer alvos terapêuticos<sup>9-11</sup>.

Devido à grande semelhança estrutural entre a MPTP e alguns pesticidas, em particular o paraquat, ao longo dos últimos anos foram levantadas suspeitas quanto à exposição a este pesticida e o desenvolvimento da DP<sup>12-16</sup>.

O paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina), membro da família de herbicidas bipiridílios, é utilizado para controlar pragas em culturas, como soja, sorgo, cana-de-açúcar, algodão, milho, maçã, entre outros<sup>17</sup>. Ele interfere com o transporte de elétrons fotossintéticos e reduz o oxigênio a superóxido, que leva à ruptura das membranas vegetais e dessecação das folhas<sup>18</sup>.

Em modelos experimentais de DP, o paraquat aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que resultam em peroxidação lipídica e agregação de  $\alpha$ -sinucleínas em neurônios dopaminérgicos, podendo levar à sua morte<sup>19,20</sup>. O mecanismo utilizado pelo paraquat para acessar tais neurônios ainda não é totalmente compreendido<sup>13,21</sup>.

Ao longo das últimas décadas, vários estudos epidemiológicos e revisões sistemáticas (RS) sugeriram associação entre a exposição a pesticidas e a outros fatores ambientais, como vida rural, agricultura e consumo de água de poço, a maior risco de

desenvolvimento da DP<sup>22-28</sup>. No entanto, poucas são as RS e metanálises realizadas sobre pesticidas específicos, como o paraquat, sendo que nelas há limitações de bases de dados, período de publicação, idioma dos artigos selecionados e dos métodos utilizados para avaliação da qualidade metodológica dos estudos<sup>25-33</sup>. Das RS seguidas de metanálise, a maioria apresentou resultados positivos e estatisticamente significativos, apesar de terem identificado alto nível de heterogeneidade ( $I^2$ ) entre os estudos.

Muitos países já proibiram o paraquat devido à sua toxicidade aguda pulmonar e cutânea, enquanto outros estabeleceram medidas de uso restritivo, como concentrações limitadas do ingrediente ativo em produtos formulados e manipulação apenas por aplicadores licenciados em solo<sup>34</sup>.

O paraquat está passando por processo de reavaliação regulatória no Brasil, durante o qual no final de 2015 ocorreu proposta de seu banimento<sup>34</sup>. Como as agências regulatórias norteiam suas decisões baseadas em estudos humanos e experimentais, é importante que seja realizada uma análise completa e atualizada da literatura. A RS e metanálise aqui descritas objetivaram avaliar as evidências disponíveis sobre exposição ao paraquat e desenvolvimento da DP em humanos com menos limitações operacionais que as detectadas nas RS e metanálises existentes.

## MÉTODOS

Foram seguidas as diretrizes do MOOSE (*Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology*)<sup>35</sup> para redação desta RS.

O protocolo de RS aqui realizado está cadastrado na base de dados da PROSPERO (PROSPERO CRD42017069994).

### **Critérios de inclusão/exclusão**

**Tipo de estudos** - Estudos observacionais de coorte, caso-controle e transversais comparativos. Não foram consideradas revisões convencionais de literatura, séries de casos, relatos de caso e estudos reportando apenas mortalidade por DP.

**Participantes** - Quaisquer adultos  $\geq 18$  anos expostos ocupacionalmente e/ou ambientalmente ao paraquat. Não houve restrição quanto ao sexo e etnia dos participantes.

**Exposição** - Qualquer duração, frequência e volume de exposição ao herbicida paraquat. A exposição foi considerada quando os próprios participantes relataram terem sido expostos ao paraquat, e/ou quando estimada por sistemas de georeferenciamento (cruzamento de informações sobre quantidade e frequência dos pesticidas mais utilizados

em determinada região com endereços residenciais e de trabalho dos participantes) e/ou matrizes de exposição ocupacional [informação da ocupação por setores econômicos que definam níveis de exposição a substâncias químicas. As matrizes podem produzir indicadores que identificam a exposição de forma dicotômica (sim; não), por gradientes (alto; baixo; não expostos), ou níveis e probabilidade de exposição (definitivamente expostos; provavelmente expostos; possivelmente expostos)].

**Controles** – Adultos  $\geq 18$  anos não expostos ao paraquat.

**Desfecho primário** - DP diagnosticada por especialistas no momento do recrutamento de cada participante ou seleção de pacientes com DP previamente diagnosticada por especialistas, identificados em hospitais e/ou clínicas especializadas.

**Desfecho secundário** - Diagnóstico de DP ou parkinsonismo relatados em entrevistas e/ou questionários pelos próprios participantes.

### **Métodos de busca para identificação dos estudos**

Em junho de 2016 foram acessadas eletronicamente as bases de dados: LILACS, PubMed, EMBASE, *Web of Science* e TOXLINE (uma das bases de dados do TOXNET). Não houve restrição quanto ao idioma dos artigos ou data da publicação.

A estratégia de busca combinou os termos *MeSh* para “paraquat”, “herbicidas” e “Doença de Parkinson”, além de termos livres relacionados (Apêndice A).

As referências bibliográficas listadas nos estudos identificados pela busca eletrônica também foram analisadas para citações complementares. Foram incluídos e analisados todos os estudos epidemiológicos que atenderam aos critérios de inclusão adotados.

### **Seleção dos estudos**

Dois revisores (CV e JLVC) selecionaram independentemente os estudos identificados pela busca bibliográfica. Com intuito de garantir a qualidade do processo, as divergências foram resolvidas por consenso e ou pela consulta a especialistas.

## Extração de dados

Dois revisores (CV e JLVC) extraíram os dados dos estudos de forma independente. Discrepâncias nesta fase foram resolvidas por discussão e consenso.

As seguintes informações dos estudos observacionais foram extraídas e colocadas sob forma de tabelas: referência do artigo (autores, local, ano de publicação), tipo de delineamento do estudo (caso-controle, coorte, transversais), tempo de seguimento (para estudos de coorte), características demográficas (número de doentes/não-doentes; número de expostos/não expostos; idade média dos participantes, proporção por sexo), características da exposição ao paraquat (definição da exposição; duração e/ou frequência; métodos usados para estimar a exposição, como aplicação de questionários ou matriz de exposição ocupacional), coexposições a outros pesticidas, critérios utilizados para diagnóstico da DP (confirmado por especialistas, prontuários médicos, auto relatado em entrevistas ou questionários) e hábitos dos participantes que pudessem estar relacionados à DP, como tabagismo.

## Avaliação da qualidade metodológica

A avaliação da qualidade metodológica ou validade interna de cada estudo se fez pela exclusão de vieses, ou seja, pela verificação se o delineamento e o modo como o estudo foi conduzido comprometeu a credibilidade de seus resultados<sup>36</sup>. As ferramentas modificadas da escala *NewCastle Ottawa* (NOS) para estudos coorte e caso-controle foram adaptadas para avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos<sup>37</sup>. A ferramenta utilizada para avaliação dos estudos coorte também foi utilizada para avaliação dos estudos transversais.

Foram feitas perguntas que remetem à confiança na especificidade dos métodos utilizados para avaliar a exposição ao paraquat, os desfechos de interesse, a seleção da amostra de participantes e os fatores de confusão (Apêndice B). Para cada pergunta, as possíveis respostas foram: “definitivamente/provavelmente sim” e, “definitivamente/provavelmente não”.

Os riscos de viés foram classificados de acordo com as respostas fornecidas:

***Definitivamente sim*** - Baixo risco de viés.

***Provavelmente sim*** - Evidências indiretas de baixo risco de viés.

***Provavelmente não*** - Evidências indiretas de alto risco de viés.

***Definitivamente não*** - Alto risco de viés.

Após a obtenção dos riscos de viés para cada pergunta, classificamos um estudo

como “baixo risco de viés”, ou seja, “confiável”, apenas se houve no máximo duas respostas “provavelmente/definitivamente não”. Caso contrário, o estudo foi considerado como “alto risco de viés”, ou “não confiável”.

### **Metanálise**

Utilizamos o software Review Manager (RevMan; versão 5.3.5 – disponível em: <http://community.cochrane.org/tools/review-production-tools/revman-5/revman-5-download>) para compilação estatística dos resultados dos estudos incluídos na RS, utilizando o modelo de efeitos aleatórios<sup>38</sup>. Utilizamos o *odds ratio* (OR) como medida de associação para dados dicotômicos, com intervalo de confiança de 95% (IC). Não foram incluídos dados contínuos.

### **Avaliação da heterogeneidade**

Quantificamos as inconsistências entre os resultados dos estudos através da estatística  $I^2$ , que ilustra a porcentagem da variabilidade nas estimativas de efeito que ultrapassa o efeito do acaso<sup>39,36</sup>:  $I^2 = [(Q - df) / Q] \times 100\%$ , onde Q é a estatística  $\chi^2$  e df o grau de liberdade. Avaliamos a heterogeneidade entre os estudos por meio de exame visual dos gráficos de metanálises para verificar superposição dos intervalos de confiança, utilizando o teste do  $\chi^2$  para homogeneidade com nível de significância de 10%, e considerando a estatística  $I^2$ . Um valor de  $I^2$  menor que 25% correspondeu à heterogeneidade baixa; 50% ou maior, heterogeneidade significativa e 75% ou maior, heterogeneidade substancial. A metanálise não foi considerada quando determinado um  $I^2$  substancial ( $\geq 75\%$ ).

### **Análise de sensibilidade dos estudos**

A análise da sensibilidade foi realizada para explorar a robustez dos resultados através de metanálises que agrupam os estudos de acordo com características específicas:

- Estudos observacionais (coortes versus caso-controle versus transversais);
- Estudos com baixo risco de viés versus aqueles com alto risco de viés.

## **RESULTADOS**

### **Seleção dos estudos**

No total, 3.244 artigos foram localizados nas diferentes bases de dados e listas bibliográficas. Dentre esses, 15 estudos, todos no idioma inglês, publicados de 1992 até

2014, foram selecionados para compor a RS: um estudo coorte<sup>40</sup>, 13 estudos caso-controle<sup>41-53</sup> e um estudo transversal<sup>54</sup> (Apêndice C).

Dez outros estudos compartilharam critérios de inclusão e exclusão, origem dos participantes e características demográficas semelhantes a alguns dos estudos selecionados, levando à suspeita de possível sobreposição de participantes entre esses estudos. Após contato com os autores, algumas sobreposições foram confirmadas. Assim, nessa revisão foram incluídos os estudos considerados principais por apresentarem maior número de participantes ou serem os mais recentes; os outros, que apresentaram sobreposição, foram considerados múltiplas publicações destes estudos, não sendo incluídos efetivamente<sup>55-64</sup> (Apêndice D). Por se tratar de amostras de participantes muito semelhantes, dados faltantes nos estudos principais foram eventualmente obtidos das múltiplas publicações, além de alguns desses resultados terem sido discutidos posteriormente.

### **Extração dos dados**

Os dados extraídos dos estudos - delineamento, cenário, número de participantes, idade média, proporção de homens, critérios de inclusão e exclusão e tempo de seguimento - encontram-se na Tabela 1. Informações sobre exposição, coexposições, métodos para avaliar a exposição ao paraquat, critérios para diagnóstico da DP, histórico familiar de DP, traumatismo craniano, uso de equipamentos de proteção e hábitos que poderiam influenciar o desfecho (DP), estão na Tabela 2.

### **Avaliação da qualidade metodológica**

As avaliações do risco de viés foram apresentadas na forma de tabelas (Apêndice E) e de gráficos gerados pelo software RevMan (Figuras 1 e 2). Nos gráficos, as respostas “provavelmente/definitivamente sim” estão representadas pela cor verde (baixo risco de viés), e as respostas “provavelmente/definitivamente não” pela cor vermelha (alto risco de viés).

Foram considerados sete estudos confiáveis (baixo risco de viés)<sup>44,46,47,49,50,52,53</sup> e oito estudos não confiáveis (alto risco de viés)<sup>41-43,45,40,48,51,54</sup>.

Os principais vieses identificados estiveram relacionados aos métodos de avaliação da exposição, seleção dos controles e ajustes para fatores de confusão.

A maioria dos estudos obteve informações sobre a exposição a partir de relatos dos participantes em entrevistas/questionários<sup>41-45,40,46-51,54</sup>, que são baseados na memória e, por isso, podem gerar viés, principalmente nos participantes com DP. Podem estar

menos propensas a vieses as estimativas de exposição feitas por matrizes de exposição ocupacional ou sistemas de georeferenciamento<sup>52,53</sup>.

No entanto, poucos estudos forneceram informação com relação à quantidade, frequência e duração das aplicações do paraquat, dificultando a investigação de possível relação dose-resposta<sup>44,47,53</sup>.

Idealmente, a exposição dos participantes deveria ser monitorada por marcadores de exposição, como pela detecção de resíduos do pesticida na urina ou sangue. Porém, isso só é possível em estudos prospectivos que acompanhem os participantes por algum tempo, garantindo que a exposição realmente ocorreu e precedeu o desfecho.

O único estudo prospectivo incluído<sup>40</sup>, no entanto, apresentou alto risco de viés, tendo obtido informações sobre a exposição apenas de relatos dos participantes. Neste estudo, fica até mesmo a dúvida se os participantes realmente foram acompanhados no período de seguimento estabelecido (1999-2003), ou se apenas em 2003 responderam questionários referentes ao período mencionado.

Com relação à seleção dos controles, poucos foram os estudos que os submetem à avaliação de especialistas durante o recrutamento, garantindo que eles não tinham a DP ou outra doença neurodegenerativa<sup>44,45,48</sup>.

Controles oriundos de hospitais e clínicas para tratamento de doenças não-neurodegenerativas são mais confiáveis do ponto de vista da garantia da ausência da DP comparados com controles populacionais, que não passaram por avaliação de especialistas<sup>46,49,53</sup>, porém menos confiáveis se considerarmos que, teoricamente, deveriam estar sob o mesmo fator de risco que os casos. Afinal, a informação de que frequentavam o mesmo hospital não indica que estiveram sob o mesmo fator de risco (ambiental ou ocupacional).

Controles retirados da vizinhança imediata dos casos, ou residentes da mesma região, por mais que também possam estar expostos ao paraquat ambientalmente, não inspiram confiança se não foram pareados por ocupação. No entanto, se casos e controles fossem recrutados da mesma localização geográfica e trabalhassem no meio rural, poderíamos assumir que estiveram igualmente expostos aos mesmos fatores de risco, ambiental e ocupacionalmente.

No entanto, apenas dois estudos incluíram populações específicas de trabalhadores rurais: Tanner et al<sup>50</sup>. (2011), que recrutaram aplicadores de pesticidas e suas esposas da Carolina do Norte e Iowa nos EUA, e Elbaz et al<sup>47</sup>.(2009), que recrutaram seus

participantes de uma base de dados de seguro de saúde específico para trabalhadores rurais, ou com ocupações relacionadas, na França.

Com relação aos ajustes para fatores de confusão, nenhum dos 15 estudos de nossa RS realizou ajustes para todas as variáveis potencialmente relacionadas à DP, como idade, sexo, duração da exposição, trabalho rural, vida rural, consumo de água de poço, tabagismo, uso de drogas neurolépticas e antiveriginosas, uso de equipamento de proteção individual e histórico familiar de DP. Liou et al.<sup>44</sup> (1997) foram os únicos a ajustar para uma maior quantidade de variáveis, como idade ( $\pm 2$  anos), sexo, e durações de: moradia em residência rural, trabalho rural, uso do paraquat, consumo de água de poço e tabagismo.

Os ajustes mais realizados foram para sexo, idade e tabagismo, sendo que este último deve sempre ser considerado em estudos populacionais sobre DP por estar conhecidamente associado à redução do risco dessa doença<sup>65</sup>. Como já foi sugerido que agricultores tendem a fumar menos do que a população em geral<sup>66</sup>, a falta de ajuste para tabagismo pode resultar em uma associação positiva superestimada.

### **Metanálise**

Dos 15 estudos incluídos na RS, quatro não foram incluídos na metanálise: Seidler et al.<sup>43</sup> (1996) e Semchuck et al.<sup>41</sup> (1992) por apresentarem cada apenas um participante exposto ao paraquat, Engel et al.<sup>54</sup> (2001) por não fornecerem o número total de expostos e não-expostos ao paraquat, apenas o total exposto a pesticidas no geral, e Tanner et al.<sup>48</sup> (2009), por não especificarem quantos pacientes com DP expostos ao paraquat estiveram coexpostos a outros pesticidas, não sendo possível identificar os participantes apenas expostos ao paraquat.

O estudo de Kamel et al.<sup>40</sup> (2007), incluído na metanálise, foi desmembrado em dois estudos independentes devido à impossibilidade de somar os participantes sem DP nos dois períodos analisados (prevalente e incidente) sem sobreposição dos dados. Assim, os resultados de ambos os períodos foram plotados separadamente. Dessa maneira, a metanálise foi composta por 12 estudos.

Pelo modelo de efeitos aleatórios, o conjunto desses estudos permitiu calcular um OR total de 1,40 (IC 95% 1,16 – 1,70), estatisticamente significativo, com heterogeneidade baixa ( $I^2$  15%) (Figura 3). Para checar se haveria alteração na metanálise, em um segundo momento, consideramos apenas os resultados obtidos por Kamel et al.<sup>40</sup> (2007) no período de seguimento, por ser o estudo mais recente, com casos incidentes.

Não foi observada variação expressiva na estimativa da associação: OR 1,42; IC 95% 1,14 – 1,77; I<sup>2</sup> 22% (Apêndice F).

### **Análise de sensibilidade**

Quando feita a metanálise para estudos com baixo risco de viés, a estimativa da associação entre paraquat e DP foi maior e significativa, embora com maior heterogeneidade (OR 1,52; IC 95% 1,13 - 2,05; I<sup>2</sup> 49%) quando comparadas a dos estudos com alto risco de viés (OR 1,17; IC 95% 0,81-1,70; I<sup>2</sup> 0%), não estatisticamente significativa (Apêndice G).

A comparação entre delineamentos foi feita apenas entre estudos caso-controle e coorte; o único estudo transversal<sup>54</sup> existente nessa revisão não foi incluído na metanálise. A metanálise apenas dos estudos caso-controle obteve um OR de 1,44 (IC 95% 1,22-1,71; I<sup>2</sup> 25%), e dos dois estudos de Kamel et al<sup>40</sup>. (2007), OR 1,16 (IC 95% 0,76-1,78; I<sup>2</sup> 0%) (Apêndice G).

## **DISCUSSÃO**

Em relação às RS que avaliaram a associação entre exposição ao paraquat e desenvolvimento de DP já publicadas, o protocolo de RS aqui apresentado utilizou critérios de inclusão mais abrangentes, pesquisou um maior número de bases de dados, e não restringiu os estudos quanto ao idioma ou período de publicação. Esse protocolo mais abrangente permitiu encontrar estudos que não foram incluídos e avaliados nas RS já existentes: um novo estudo caso-controle<sup>53</sup> e dois estudos caso-controle<sup>63,64</sup>, considerados múltiplas publicações de outro estudo<sup>50</sup>.

A presente revisão sistemática/metanálise revelou que indivíduos expostos ao paraquat apresentaram 1,40 vezes mais chances de desenvolver DP do que indivíduos não expostos, tal como indicado pela estimativa OR 1,40 (IC 95% 1,16-1,70). Embora a heterogeneidade entre os estudos possa ser considerada baixa (I<sup>2</sup> 15%), não podemos deixar de atentar para o fato de que a maioria deles apresentou alto risco de viés, e que muitos apresentavam poucos participantes expostos ao paraquat; apenas seis estudos apresentaram mais de 20 participantes expostos<sup>44,40,47,50,52,53</sup>.

Na presente metanálise foram plotadas informações relacionadas apenas à exposição isolada ao paraquat, embora muitos estudos não informarem a possibilidade de coexposições, e de ser difícil garantir que os participantes realmente não foram expostos a outros tipos de pesticidas em algum momento.

Estudos experimentais com roedores demonstraram que o paraquat em coexposição a outros pesticidas eleva o risco para parkinsonismo, se comparado à exposição ao paraquat isoladamente<sup>67,68</sup>. Estudos com humanos corroboram essa influência sinérgica de exposições associadas para a instalação de DP/parkinsonismo. Por exemplo, Costello et al<sup>56</sup>. (2009), múltipla referência do estudo de Lee et al<sup>52</sup>. (2012), identificaram que a exposição apenas ao paraquat obteve OR de 1,01 (IC 95% 0,71-1,43); já o paraquat em associação ao maneb gerou OR de 1,75 (IC 95% 1,13-2,73), sendo o valor ainda maior para indivíduos com menos de 60 anos de idade (OR 5,07; IC 95% 1,75-14,71). Wang et al<sup>59</sup>. (2011), também referência de Lee et al<sup>52</sup>. (2012), por sua vez, identificaram que apenas a exposição ao paraquat resultou em OR de 1,26 (IC 95% 0,86-1,86), já a coexposição de maneb, ziram e paraquat obteve OR três vezes maior (OR 3,09; IC 95% 1,69-5,64).

Estudos experimentais demonstraram que o maneb é capaz de potencializar os efeitos do paraquat pela modulação de sua toxicocinética, aumentando de duas a três vezes sua concentração em várias regiões do cérebro<sup>69</sup>. Fei & Ethel<sup>70</sup> (2008) ainda demonstraram que o maneb potencializaria a toxicidade do paraquat *in vitro*, induzindo a apoptose pela ativação da via intrínseca de morte celular.

A utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) pode exercer efeito modulador nas associações positivas encontradas entre o paraquat e a DP. Furlong et al<sup>64</sup>. (2015), referência múltipla de Lee et al<sup>52</sup>. (2012), indicaram que o uso de luvas em menos de 50% das vezes em que o paraquat é manuseado, apresenta um OR de 3,9 (IC 95% 1,5-10,2); quando as luvas são utilizadas em mais de 50% das vezes, essa estimativa cai para OR 1,6 (IC 95% 0,6-4,2). Os valores dos OR também se mostraram diminuídos quando os participantes expostos utilizaram duas ou três medidas de higiene após contato com o paraquat, comparados com participantes expostos que não as utilizaram.

Ainda não é possível responder se a associação positiva verificada entre vida rural/trabalho rural e DP está indiretamente relacionada apenas à exposição a pesticidas ou a outras possíveis exposições ambientais presentes em ocupações rurais. Novas teorias sugerem que a exposição a endotoxinas da membrana externa de bactérias Gram negativas está relacionada à DP por induzir neuroinflamação<sup>71,72</sup>. No entanto, o único estudo que investigou a exposição às endotoxinas não encontrou associação positiva com a DP<sup>53</sup>.

Além de agentes externos ao organismo, como os pesticidas, medicamentos e outras exposições, também existem fatores endógenos que podem modular o desenvol-

vimento da síndrome parkinsoniana. Já foram identificadas mutações em genes específicos que aumentam a suscetibilidade para o desenvolvimento da DP<sup>73,74</sup>. A diminuição na produção de enzimas antioxidantes pode exacerbar o efeito do estresse oxidativo nos neurônios dopaminérgicos, um dos mecanismos pelo qual a doença se instala<sup>73</sup>. Da mesma maneira, o aumento na produção das proteínas alfa-sinucleínas (SNCA) predispõe a seu dobramento e acúmulo anormal no interior de neurônios, levando-os à morte por apoptose<sup>74</sup>.

Assim, tem sido sugerido que indivíduos portadores de genótipos suscetíveis, quando expostos ao paraquat, estejam sob risco ainda maior para desenvolver precocemente a doença. Gatto et al<sup>58</sup>. (2010), referência de Lee et al<sup>52</sup>. (2012), identificaram maior risco de DP em indivíduos expostos ao paraquat com homozigose ou heterozigose para o genótipo SNCA REP1 263 (OR 1,45; IC 95% 0,59-3,59), principalmente nos indivíduos com menos de 68 anos (OR 3,15; IC 95% 0,74-13,37). Goldman et al<sup>62</sup>. (2012), referência múltipla de Tanner et al<sup>50</sup>. (2011), obtiveram risco elevado para DP em indivíduos expostos ao paraquat com genótipo nulo para a enzima antioxidante glutathione S-transferase T1 (GSTT1) (OR 11,1; IC 95% 3,0-44,6) comparado a indivíduos com GSTT1 funcionante (OR 1,5; IC 95% 0,6-3,6).

Em 1965, Hill sugeriu nove aspectos que deveriam ser levados em consideração para diferenciar associações causais de não causais entre exposições e desfechos: força da associação, especificidade, plausibilidade biológica, gradiente biológico, coerência, consistência, analogia, evidências experimentais e temporalidade<sup>75</sup>. Se aplicarmos esses critérios para avaliar a associação entre paraquat e DP, notamos que não podemos afirmar que exista relação de causalidade entre eles, principalmente pelas limitações inerentes aos desenhos de cada estudo.

Com relação à “força da associação”, apesar de o valor total de OR encontrado ter sido positivo e estatisticamente significativo, é muito próximo do valor de não associação (um). Normalmente, estimativas de efeito mais distantes da unidade falam a favor de causalidade, pois há maior probabilidade de que os efeitos encontrados não decorram de vieses e fatores de confusão. Porém, este não deve ser considerado o único parâmetro<sup>75</sup>.

O aspecto “especificidade” requer que um agente específico provoque um efeito específico<sup>75</sup>. Este item é mais facilmente verificado em doenças infecciosas, em que um agente é responsável pela infecção, como por exemplo, o bacilo de Koch que provoca a tuberculose. No entanto, para exposições a substâncias químicas, nem sempre há apenas

um único efeito que decorre de uma única exposição. O paraquat, além da Doença de Parkinson, também é associado a síndromes renais e pulmonares, assim como o cigarro também provoca, além de câncer de pulmão, doenças como enfisema e bronquite crônica, que podem decorrer de outras causas que não apenas o cigarro; ainda assim, não há dúvidas hoje em dia sobre a relação causa-efeito entre tabagismo e câncer de pulmão<sup>76-78</sup>.

A “analogia”, “coerência” e “plausibilidade biológica” do paraquat sempre foram pautadas na sua semelhança estrutural à molécula MPTP, conhecidamente indutora de parkinsonismo em animais e humanos<sup>77</sup>. Assim, sugere-se que ambas as substâncias atuem na degeneração neuronal e instalação da sintomatologia motora da mesma maneira.

No entanto, a MPTP é uma molécula não carregada e lipofílica, que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica<sup>79</sup>; apenas no interior do Sistema Nervoso Central é metabolizada ao seu subproduto tóxico, a MPP+<sup>79</sup>. O paraquat, por sua vez, se apresenta como uma molécula carregada e hidrofílica, não tendo tanta facilidade para atravessar a barreira hematoencefálica como a MPTP<sup>80,81</sup>. Não se sabe ao certo como ele o faz, mas alguns experimentos com roedores apontam para a utilização do transporte de aminoácidos neutros<sup>13,19</sup>. Os mecanismos de ação também têm se demonstrado diferentes nesses estudos; enquanto a MPTP estaria relacionada à disfunção mitocondrial, o paraquat provocaria a produção de espécies reativas do oxigênio devido ao seu intenso ciclo redox<sup>19,79</sup>.

As informações dos estudos experimentais *in vivo* são importantes para identificar possíveis mecanismos de ação do paraquat. Embora as evidências produzidas por esses estudos tenham demonstrado que o paraquat é capaz de induzir a DP *in vitro* e *in vivo*, na maioria dos casos o herbicida foi administrado aos roedores pelas vias intraperitoneal ou intravenosa em doses altas<sup>19-21</sup>, de maneira que essas informações são de utilidade questionável em eventual extrapolação para o cenário de exposição real humana.

O aspecto “gradiente biológico” ou “dose resposta”, apesar de ter sido verificado em alguns estudos que demonstraram maior efeito quanto maiores as concentrações ou períodos de exposição, ainda não é consistente o suficiente devido às poucas informações disponíveis. Liou et al<sup>44</sup>. (1997) não encontraram associação positiva para exposições ao paraquat por até 19 anos (OR 0,96; IC 95% 0,24-3,83), porém para exposições acima de 20 anos, o risco se mostrou aumentado em cerca de seis vezes (OR 6,44; IC 95% 2,41-17,2).

Elbaz et al<sup>47</sup>. (2009) coletaram informações sobre os tipos de pesticidas, frequência (dias/ano), duração (horas/ano), método (portátil, trator), e anos de aplicação (início/fim). As variáveis foram dicotomizadas usando a mediana de sua distribuição e os testes de tendência consideraram três níveis de exposição: nenhuma, abaixo e acima da mediana. Para o número acumulado de horas abaixo da mediana, não houve associação positiva entre paraquat e DP (OR 0,9; IC 95% 0,4-2,0), já para horas de exposição acima da mediana, a associação foi positiva, apesar de não estatisticamente significativa (OR 1,3; IC 95% 0,5-3,1).

Já Van der Mark et al<sup>53</sup>. (2014), calcularam a exposição a partir de matriz de exposição ocupacional, pela soma da probabilidade de uso do paraquat, vezes a frequência de uso, somada para todos os anos de trabalho nas fazendas. Os níveis de exposição foram divididos com base na mediana da distribuição da exposição entre os controles, sendo considerados três níveis de exposição: não expostos, até 3,8 (baixa exposição) e acima de 3,8 (alta exposição). Para exposições baixas, o valor do OR foi de 1,33 (IC 95% 0,68-2,60). Já para altas exposições, o valor obtido foi OR de 0,91 (IC 95% 0,45-1,84), ajustado para tabagismo, ingestão de café e habilidades ocupacionais, não sendo demonstrada relação dose-resposta.

A “temporalidade” também não é critério preenchido, pois a maioria dos estudos disponíveis é do tipo caso-controle, nos quais não há certeza de que a exposição ao paraquat realmente precedeu o aparecimento da DP.

Por fim, os resultados dos estudos com diferentes delineamentos e populações também não apresentam “consistência” suficiente, pois nem todas as associações são positivas, e muitas não são estatisticamente significativas.

Em suma, a associação positiva entre exposição ao paraquat e DP parece ser mais evidente em (1) indivíduos suscetíveis (2) expostos ocupacionalmente às maiores concentrações ao paraquat durante maiores períodos, e em coexposição a outros pesticidas e (3) que fazem pouco uso de EPIs. Embora nossos resultados demonstrem associação entre exposição ao paraquat e DP, não é possível assumir causalidade devido às limitações inerentes a cada estudo, que no geral apresentaram alto risco de viés e pequeno número de participantes.

## **CONFLITO DE INTERESSE**

Este trabalho corresponde à dissertação de mestrado de Carolina Vaccari, pelo Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu

(UNESP), defendida em julho de 2017. A pós-graduanda, seu orientador (JLVC) e coorientadora (RED) não têm conflitos de interesse a declarar.

## FINANCIAMENTO

Carolina Vaccari e Regina El Dib receberam bolsas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Procs. 134411/2015-3 e 310953/2015-4, respectivamente).

## REFERÊNCIAS

1. Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng Tl, Stephans SE. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp.* 1999;66:85-97.
2. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S26-36.
3. Ebadi M, Sharma SK. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5:319-335.
4. McNaught KS, Olanow CW. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S73-84.
5. Alves DC. Recent advances on a-synuclein cell biology: functions and dysfunctions. *Curr Mol Med.* 2003;3(1):17-24.
6. Di Monte DA, Lavasani M, Manning-Bog AB. Environmental factors in Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2002;23(4-5):487-502.
7. Warner TT, Schapira AH. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53(3):16-25.
8. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Sci Transl Med.* 1983;219:979-80.
9. He XJ, Uchida K, Megumi C, Tsuge N, Nakayama H. Dietary curcumin supplementation attenuates 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in C57BL mice. *J Toxicol Pathol.* 2015;28(1):197-206.
10. Jing H, Wang S, Wang M, Fu W, Zhang C, Xu D. Isobavachalcone attenuates MPTP-induced Parkinson's Disease in mice by inhibition of microglial activation through NF-KB pathway. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169560.
11. Elgueta D, Aymerich MS, Contreras F, Montoya A, Celorrio M, Rojo-Bustamante E, et al. Pharmacologic antagonism of dopamine receptor D3 attenuates neurodegeneration and motor impairment in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 2017;113(Pt A):110-23.
12. Fei Q, McCormack AL, Di Monte DA, Ethell DW. Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2002;283(6):3357-64.
13. Richardson JR. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci.* 2005;88(3):193-201.
14. Yang W, Chen L, Ding Y, Zhuang X, Kang UJ. Paraquat induces dopaminergic dysfunction and proteasome impairment in DJ-1-deficient mice. *Hum Mol Genet.* 2007;16(23):2900-10.
15. Morán JM, Gonzalez-Polo RA, Ortiz-Ortiz MA, Niso-Santano M, Soler G, Fuentes JM. Identification of genes associated with paraquat-induced toxicity in SH-SY5Y cells by PCR array focused on apoptotic pathways. *J Toxicol Environ Health A.* 2008;71(22):1457-67.
16. Yang W, Tiffany-Castiglioni E, Koh HC, Sona IH. Paraquat activates the

- IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett.* 2009;191(2-3):203-10.
17. Paraquat Information Center on behalf of Syngenta Crop Protection AG. Paraquat Information Center [Internet]. [citado 2016 Nov 12]. Disponível em: <http://paraquat.com/use/crops>.
  18. Esfahani M. Effects of pre-harvest application of paraquat on grain moisture reduction, grain yield and quality of rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. *Caspian J Environ Sci.* 2012;10(1):75-82.
  19. Kuter K, Smiałowska M, Wieronska J, Zieba B, Wardas J, Pietraszek M, et al. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. *Brain Res.* 2007;1155:196-207.
  20. Kuter K, Nowak P, Golembiowska K, Ossowska K. Increased reactive oxygen species production in the brain after repeated low-dose pesticide paraquat exposure in rats: a comparison with peripheral tissues. *Neurochem Res.* 2010;35(8):1121-30.
  21. Liou HH, Chen RC, Tsai YF, Chen WP, Chang YC, Tsai MC. Effects of paraquat on the substantia nigra of the Wistar rats: Neurochemical, histological, and behavioral studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;137(1):34-41.
  22. Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother.* 1999;53(3):122-30.
  23. Hancock DB, Martin ER, Mayhew GM, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, et al. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: A family-based case-control study. *BMC Neurol.* 2008;8:6. DOI: 10.1186/1471-2377-8-6.
  24. Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, Bennett J, et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med.* 2007;64(10):666-72.
  25. Van der Mark M, Brower M, Kromhout H, Nijssen P, Huss A, Vermeulen R. Is pesticide use related to Parkinson Disease? Some clues to heterogeneity in study results. *Environ Health Perspect.* 2011;120(11):340-7.
  26. Freire C, Koifman S. Pesticide exposure and Parkinson's disease: Epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology.* 2012;33(5):947-71.
  27. Li AA, Mink PJ, McIntosh LJ, Teta MJ, Finley B. Evaluation of epidemiologic and animal data associating pesticides with Parkinson's Disease. *J Occup Environ Med.* 2005;47(10):1059-87.
  28. Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and Parkinson's Disease - Is there a link? *Environ Health Perspect.* 2006;114(2):156-64.
  29. Van Maele-Fabry G, Hoet P, Vilain F, Lison D. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environ Int.* 2012;46:30-43.
  30. Allen MT, Levy LS. Parkinson's disease and pesticide exposure – a new assessment. *Crit Rev Toxicol.* 2013;43(6):515-34.
  31. Pezzoli G, Cereda E. Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology.* 2013;80(22):2035-41.
  32. Ntzani EE, Chondrogiorgi M, Nitritsos G, Tzoulaki I. Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. *EFSA Suppl Publ* [Internet]. 2013[citado 2016 Nov 12];10(10):497EN. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2013.EN-497/abstract>.
  33. 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;11(14):e0151841.
  34. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Parecer Técnico de Reavaliação n.

- 01, de 2015/GGTOX/ANVISA [Internet]. Brasília: ANVISA; 2015 [citado 2016 Nov 12]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2541353/CP%2B94-2015%2B-%2BNT.pdf/50fb348f-3c2a-4992-a3a2-ca89fd4d2127> Acesso em: nov 2016.
35. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. *JAMA*. 2000;283(15):2008-12.
  36. Higgins JPT, Altman DG, Sterne JAC. Assessing risk of bias in included studies. In: Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 [Internet]. Chinchester: The Cochrane Collaboration; 2011 [citado 2016 Nov 12]. Disponível em: <http://handbook.cochrane.org/>.
  37. Guyatt GH, Busse JW. Methods Commentary: risk of bias in cohort studies. In: Evidence Partners [Internet]. 2017 [citado 2017 Jun 20]. Disponível em: <https://www.evidencepartners.com/resources/methodological-resources>.
  38. Murad MH, Montori VM, Ioannidis JPA, Prasad K, Cook DJ, Guyatt G. Advanced topics in systematic reviews. Fixed-effects and random-effects models. In: Guyatt G, Rennie D, Meade M, Cook D. editors. *Users' guides to the medical literature: a manual for evidence based clinical practice* [Internet]. Hamilton: McGraw-Hill; 2008 [citado 2017 Abr 21]. Disponível em: <http://jamaevidence.mhmedical.com/content.aspx?bookid=847&sectionid=69031503>
  39. Higgins JPT, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ*. 2003;327(7414):557-60.
  40. Kamel F, Tanner C, Umbach D, JA Hoppin, MCR Alavanja, A Blair, et al. Pesticide exposure and self-reported Parkinson's Disease in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol*. 2007;165(4):364-74.
  41. Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology*. 1992;42(7):1328-35.
  42. Hertzman C, Wiens M, Snow B, Kelly S, Calne D. A case-control study of Parkinson's disease in a horticultural region of British Columbia. *Mov Disord*. 1994;9(1):69-75.
  43. Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology*. 1996;46(5):1275-84
  44. Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: A case-control study in Taiwan. *Neurology*. 1997;48(6):1583-8.
  45. Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Rinne UK. Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1999;14(6):928-39.
  46. Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbhone JT, et al. Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J Agromed*. 2008;13(1):37-48.
  47. Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol*. 2009;66(4):494-504.
  48. Tanner CM, Ross GW, Jewell SA, Hauser RA, Jankovic J, Factor SA, et al. Occupation and risk of parkinsonism. A multicenter case-control study. *Arch Neurol*. 2009;66(9):1106-13.
  49. Firestone JA, Lundin JI, Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, et al. Occupational factors and risk of Parkinson's Disease: A population-based case-control study. *Am J Ind Med*. 2010;53(3):217-23.

50. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rote none, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 2011;119(6):866-72.
51. Rugbjerg K, Harris MA, Shen H, Marion SA, Tsui JK, Teschke K. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease – a population-based case-control study evaluating the potential for recall bias. *Scand J Work Environ Health.* 2011;27(5):427-36.
52. Lee PC, Bordelon Y, Bronstein J, Ritz B. Traumatic brain injury, paraquat exposure, and their relationship to Parkinson disease. *Neurology.* 2012;79(20):2061-6.
53. Van Der Mark M, Vermeulen R, Nijssen PC, Mulleners WM, Sas AM, Van Laar T, et al. Occupational exposure to pesticides and endotoxin and Parkinson disease in the Netherlands. *Occup Environ Med.* 2014;71(11):757-64.
54. Engel L, Checkoway H, Keifer M, Seixas N, Longstreth W, Scott K, et al. Parkinsonism and occupational exposure to pesticides. *Occup Environ Med.* 2001;58(9):582-9.
55. Ritz BR, Manthripragada AD, Costello S, Lincoln SJ, Farrer MJ, Cockburn M, et al. Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 2009;117(6):964-9.
56. 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;169(8):919-26.
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;117(12):1912-8.
58. Gatto NM, Rhodes SL, Manthripragada AD, Bronstein J, Cockburn M, Farrer M, et al. Synuclein gene may interact with environmental factors in increasing risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology.* 2010;35(3):191-5.
59. Wang A, Costello S, Cockburn M, Zhang X, Bronstein J, Ritz B. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol.* 2011;26(7):547-55.
60. Firestone JA, Smith-Weller T, Franklin G, Swanson P, Longstreth WT Jr, Checkoway H. Pesticides and risk of Parkinson Disease. A population-based case-control study. *Arch Neurol.* 2005;62(1):91-5.
61. Hertzman C, Wiens M, Bowering D. Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Indust Med.* 1990;17(4-5):349-55.
62. Goldman SM, Kamel F, Ross GW, Bhudhikanok GS, Hoppin JA, Korell M, et al. Genetic modification of the association of paraquat and Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2012;27(13):1652-8. .
63. Kamel F, Goldman SM, Umbach DM, Chen H, Richardson G, Barber MR, et al. Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014;20(1):82-7.
64. Furlong M, Tanner CM, Goldman SM, Bhudhikanok GS, Blair A, Chade A, et al. Protective glove use and hygiene habits modify the associations of specific pesticides with Parkinson's disease. *Environ Int.* 2015;75:144-50.
65. 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;26:1-58.
66. Walrath J, Rogot E, Murray J, Blair A. Mortality patterns among US veterans by occupation and smoking status. Washington: US Government Printing Office, 1985. (NIH Pub #85-2756).
67. Norris EH, Uryu K, Leight S, Giasson BI, Trojanowski JQ, Lee VMY. Pesticide exposure exacerbates  $\alpha$ -synucleinopathy in an A53T transgenic mouse model. *Am J Pathol.* 2007;170(2):658-66.

68. Hou L, Zhang C, Wang K, Liu X, Wang H, Che Y, et al. Paraquat and maneb co-exposure induces noradrenergic locus coeruleus neurodegeneration through NADPH oxidase-mediated microglial activation. *Toxicology*. 2017;380:1-10.
69. Barlow BK, Thiruchelvam MJ, Bennice L, Cory-Slechta DA, Ballatori N, Richfield EK. Increased synaptosomal dopamine content and brain concentration of paraquat produced by selective dithiocarbamates. *J Neurochem*. 2003;85(4):1075-86.
70. Fei Q, Ethell DW. Maneb potentiates paraquat neurotoxicity by inducing key Bcl-2 family members. *J Neurochem*. 2008;105(6):2091-7.
71. Niehaus I, Lange JH. Endotoxin: is it an environmental factor in the cause of Parkinson's disease? *Occup Environ Med*. 2003;60(5):378-82.
72. Herrera AJ, Castano A, Venero JL, Cano J, Machado A. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis*. 2000;7(4):429-47.
73. Mazzetti AP, Fiorile MC, Primavera A, Lo Bello M. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int*. 2015;82:10-8.
74. Han W, Liu Y, Mi Y, Zhao J, Liu D, Tian Q. Alpha-synuclein (SNCA) polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2015;168B(2):123-34.
75. Hill AB. The environment and disease: association or causation? *Proc R Soc Med*. 1965;58(5):295.
76. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung. *BMJ*. 1950;2(4682):739-48.
77. Berkson J. Smoking and lung cancer. *Am Stat*. 1963;17(4):15-22.
78. Burch PRJ. Smoking and lung cancer: the problem of inferring cause. *J R Stat Soc A*. 1978;141(4):437-77.
79. Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML, et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2006;27(6):1110-22.
80. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, et al. Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res*. 2001;906(1-2):135-42.
81. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(11):1959-72.
82. Lewis S, Clarke M. Forest plots: trying to see the wood and the trees. *BMJ*. 2001;322(7300):1479-80.

**Tabela 1.** Características dos estudos incluídos na revisão sistemática: delineamento, cenário, número de participantes, idade média, proporção de homens, critérios de inclusão e exclusão e tempo de seguimento.

Autor, ano	Local	Cenário	Casos <sup>e</sup>	Controles <sup>y</sup>	Idade média (anos)	No <sup>1</sup> . homens (%)	Crítérios de inclusão	Crítérios de exclusão	Tempo de seguimento
<b>Estudos caso-controlle</b>									
<b>Van der Mark, 2014</b>	Holanda	Participantes recrutados entre Abril de 2010 e Junho de 2012 de cinco hospitais em 4 áreas diferentes da Holanda.	33/91	411/1229	DP <sup>1</sup> : 68 Não DP: 68	DP: 63,3 Não DP: 63,6	Casos (DP): diagnóstico inicial entre janeiro de 2006 e dezembro de 2011; selecionados dois controles/caso pareados por hospital, sexo e idade; controles (sem DP): visitaram o Depto <sup>1</sup> . de Neurologia entre janeiro de 2006 e dezembro de 2011 para tratar sintomas não-neurodegenerativos.	NR	NA
<b>Lee 2012<sup>s</sup></b>	EUA	Três condados agrícolas (Kern, Tulare, Fresno) da Califórnia central.	169/460	188/651	DP: 68,3 Não DP: 66,9	DP: 57,4 Não DP: 46,7	Casos (com DP): até três anos de diagnóstico da DP, feito entre 2001 a 2007, não estar nos últimos estágios de doença terminal, diagnóstico definitivo determinado por neurologistas. Controles: não ter DP, ter pelo menos 35 anos de idade. Casos e controles deveriam residir na área dos três condados no momento do recrutamento, e ter residido na Califórnia durante pelo menos cinco anos antes do recrutamento.	NR	NA

<b>Tanner 2011<sup>§</sup></b>	EUA	Participantes recrutados do AHS <sup>1</sup> (aplicadores de pesticidas e suas esposas; Iowa e Carolina do Norte; 1993-1997).	23/72	87/396	DP: 70 Não DP: 69  E: NR NE: NR	DP: 73 Não DP: 74  E: 100 NE: NR	Casos em potencial identificados com base em auto-relatos ou arquivos estaduais de mortalidade; diagnóstico definitivo determinado por neurologistas; controles selecionados aleatoriamente do AHS (aproximadamente 3/caso, pareados por idade, sexo e estado); avaliada exposição a 31 pesticidas em cada trabalho realizado entre os 14 anos e uma data de referência: para os pacientes com DP (casos): idade no diagnóstico; e para o grupo controle (sem DP): idade mediana dos casos na faixa correspondente à idade, sexo e estado.	Controles com DP ou parkinsonismo, mortos, cognitivamente prejudicados ou gravemente doentes não foram elegíveis; não foi incluído o uso de pesticidas fora das datas de aprovação pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA).	NA
<b>Rugbjerg 2011</b>	Canadá	Participantes selecionados de duas áreas da Colúmbia Britânica: Vancouver metropolitana e a Ilha de Vancouver, exceto Grande Vitória.	3/6	400/802	DP: NR Não DP: NR  E: NR NE: NR	DP: 66 Não DP: 50,4  E: NR NE: NR	Participantes com idade entre 40 e 69 anos que falavam inglês e residiam na área do estudo no momento da entrevista, pareados por idade, sexo e localização geográfica; casos (DP): terem tido uma prescrição de medicamentos antiparkinsonianos durante pelo menos um ano entre 1995-2002; controles (sem DP) selecionados aleatoriamente dos registros do Ministério da Saúde da Colúmbia Britânica.	NR	NA
<b>Firestone 2010<sup>§</sup></b>	EUA	Clínicas Gerais e farmácias do “Group Health Cooperative” e Clínica de Neurologia da Universidade de Washington, DC.	2/5	402/925	DP: 69 Não DP: 71  E: NR NE: NR	DP: 62,4 Não DP: 62  E: 100 NE: NR	Casos (DP) identificados entre 1992 e 2002 nas clínicas do estudo; controles sem DP ou outra doença neurodegenerativa selecionados do GHC; casos e controles pareados por idade e sexo.	Foram excluídos casos fazendo uso de medicamentos que possam provocar parkinsonismo durante os 12 meses anteriores ao diagnóstico, com história prévia de eventos cerebrovasculares ou outra explicação para os sintomas. Foram desconsideradas exposições durante os cinco anos anteriores à data da entrevista.	NA

<b>Tanner 2009</b>	EUA e Canadá	Oito clínicas de distúrbios do movimento da América do Norte.	9/13	510/1117	DP: 65 Não DP: 59,5 E: NR NE: NR	DP: 65 Não DP: 59,1 E: NR NE: NR	Participantes recrutados entre 1 de julho de 2004 e 31 de maio de 2007, pareados por sexo, idade e localização geográfica. Casos (DP): diagnosticados até 8 anos antes do recrutamento e capacidade para participar de entrevistas telefônicas. Controles (sem DP): parentes não consanguíneos (menos as esposas) ou conhecidos dos casos ou de outros pacientes parkinsonianos das clínicas e de listas telefônicas. As exposições foram avaliadas em relação a uma idade de referência (casos: idade no momento do diagnóstico; controles: idade mediana dos casos no momento do diagnóstico de DP dentro da faixa correspondente à idade e sexo).	Excluídos controles com distúrbios neurodegenerativos e colegas de trabalho.	NA
<b>Elbaz 2009</b>	França	Estudo conduzido entre afiliados do <i>Mutualite' Sociale Agricole</i> (MSA), o seguro de saúde para trabalhadores rurais da França.	27/89*	54/186*	DP: 68 Não DP: 69 E: NR NE: NR	DP: 52 Não DP: 53 E: 100 NE: NR	Casos (DP): (18-75 anos) que solicitaram cuidados médicos para DP ao MSA (fevereiro de 1998 - agosto de 1999); controles (sem DP): solicitaram reembolso ao MSA por despesas relacionadas à saúde (fevereiro de 1998 - fevereiro de 2000); três controles/caso, pareados pela idade, sexo e escritório de afiliação.	Não foram elegíveis casos e controles com assistência médica para demência.	NA
<b>Dhillon 2008</b>	EUA	Leste do Texas.	4/5	96/179	DP: 73 Não DP: 71 E: NR NE: NR	DP: 60 Não DP: 56 E: NR NE: NR	Casos (DP): (a) idade $\geq$ 50 anos, (b) vivendo no leste do Texas, (c) diagnosticados com DP por um neurologista. Controles: sem DP + critérios (a) e (b).	Foram excluídos pacientes com esclerose múltipla, esquizofrenia, doença de Alzheimer, doença de Pick, doença de Huntington ou outras síndromes parkinsonianas.	NA

<b>Kuopio 1999</b>	Finlândia	Cidade de Turku e nove municípios rurais na parte sudoeste da Finlândia.	3/8	120/359	DP: 68,7 Não DP: 69,3  E: NR NE: NR	DP: 51,2 Não DP: 51,2  E: NR NE: NR	Casos (DP) (a) com início da DP após 1984 (duração máxima da doença: sete anos), (b) pontuação $\geq 24$ no Mini-Exame de Estado Mental (MMSE) e (c) condições físicas adequadas. Controles (sem DP): selecionados aleatoriamente do Centro de Registro de População da Finlândia + critérios (b) e (c); dois controles/caso pareados por idade ( $\pm$ dois anos) e município.	NR	NA
<b>Liou 1997</b>	Taiwan	Clínica de Transtornos do Movimento do Hospital Nacional da Universidade de Taiwan (NTUH) em Taipei, Taiwan.	31/53  1-19 anos de exposição: 7/53  > 20 anos: 24/53	89/307	DP: 63,1 Não DP: 63,5  E: NR NE: NR	DP: 54,1 Não DP: 54,1  E: NR NE: NR	Casos (DP) e controles (sem DP) recrutados do NTUH entre Julho de 1993 e Junho de 1995, pareados por idade ( $\pm$ dois anos) e sexo; apenas participantes que nasceram e residiram em Taiwan; foram incluídos controles sem DP, diagnosticados com dores de cabeça, dores nas costas, espondilose cervical e neuropatia periférica.	Foram excluídos Imigrantes de outros países ou da China continental, casos com características atípicas que sugerem atrofia de múltiplos sistemas ou outras causas de parkinsonismo, e demência.	NA
<b>Seidler 1996</b>	Alemanha	Nove clínicas que cobrem grande parte do norte, sul, oeste e leste da Alemanha.	1/1	379/1134	DP: 56,2 Não DP vizinhança: 56,2 Não DP regionais: 56,5  E: NR NE: NR	DP: 66 Não DP: 34  E: NR NE: NR	Casos (DP) diagnosticados a partir de 1987, idade $\leq 65$ ; dois controles (sem DP)/caso: o primeiro recrutado da vizinhança imediata do caso e o segundo do mesmo ambiente, urbano ou rural; casos e controles pareados quanto ao sexo e idade ( $\pm$ dois anos).	Foram excluídos casos mais idosos, com duração maior da doença, síndromes parkinsonianas secundárias ou demência.	NA
<b>Hertzman 1994<sup>§</sup></b>	Canadá	Vale do Okanagan, Columbia Britânica.	6/15	121/357	DP: 70,5 Não DP: cardíacos 65,5 Eleitores 69,6  E: NR NE: NR	DP: 55,9 Não DP: 57,1  E: 100 NE: NR	Participantes entre 50 e 79 anos. Casos (DP) recrutados de clínicas e hospitais da região do estudo; dois controles/caso: o primeiro grupo controle (sem DP) selecionado aleatoriamente de zonas eleitorais; o segundo grupo, pacientes com doença cardíaca crônica, recrutados das mesmas clínicas que os casos de DP.	Foram excluídos participantes acima de 80 anos e, na medida do possível, casos de parkinsonismo induzido por fármacos ou outras causas.	NA

<b>Semchuk 1992</b>	Canadá	Cinco hospitais da cidade de Calgária, Alberta.	1/1	0/389	DP: 68,5 Não DP: 68,3 E: NR NE: NR	DP: 57,6 Não DP: 57,6 E: 100 NE: NR	Casos: pacientes diagnosticados com DP, não dementes, dispensados de um dos hospitais do estudo entre 1º de janeiro de 1984 e 31 de dezembro de 1987. Controles: sem DP ou doenças neurológicas, selecionados aleatoriamente de lista de telefones residenciais; apenas um morador/casa. Casos e controles pareados quanto ao sexo e idade ( $\pm 2,5$ anos).	Excluídos todos os casos que apresentassem sintomas parkinsonianos decorrentes de outras condições que não DP idiopática.	NA
<b>Estudos transversais</b>									
<b>Engel 2001</b>	EUA	Participantes foram recrutados de estudo coorte do Depto. de Saúde de Washington, DC.	20/238**	29/72***	E: 70,2 NE: 67,4	E: 100 NE: 100	Expostos: pomarquistas, aplicadores de pesticidas, operários de fábricas de pesticidas e outros trabalhadores agrícolas; não expostos: trabalhadores da construção civil, pintores, encanadores, bombeiros, etc. Expostos e não expostos pareados por idade, etnia e grau de atividade física ocupacional.	NR	NA
<b>Estudos coorte</b>									
<b>Kamel 2007</b>	EUA	Participantes recrutados do AHS (aplicadores de pesticidas e suas esposas; Iowa e Carolina do Norte; 1993-1997).	1993-1997: 14/11.280	1993-1997: 69/68.360	1993-1997 DP: 72 Não DP: 61	1993-1997 DP: NR Não DP: NR	Casos prevalentes e incidentes: participantes que relataram DP durante o recrutamento (1993-1997) e após o período de seguimento (1999-2003), respectivamente. Controles: participantes que não relataram DP no recrutamento ou após o seguimento.	Excluídos participantes com informações incompletas ou conflitantes sobre a DP durante o recrutamento.	Cinco anos.

<sup>1</sup> Abreviaturas: AHS: Agricultural Health Study, No.: Número; E: Exposto; NE: Não exposto; NR: Não reportado; DP: Doença de Parkinson; Depto.: Departamento.

<sup>§</sup> Estudos principais. Lista dos estudos derivados dessas publicações no Apêndice D.

<sup>€</sup> Número de pacientes com DP (i.e. eventos) no grupo de exposição ao paraquat/ número total de indivíduos expostos ao paraquat.

‡Número de pacientes com DP (i.e. eventos) no grupo de não expostos ao paraquat/ número total de indivíduos não expostos ao paraquat.

\*Faltam informações de 73 participantes; 20 casos e 53 controles.

\*\*Número total de expostos referente aos pesticidas em geral. Autores não forneceram o número total de expostos especificamente ao paraquat.

\*\*\* Número total de não expostos referente aos pesticidas em geral. Autores não forneceram o número total de não expostos especificamente ao paraquat.

**Tabela 2.** Características dos estudos incluídos na revisão sistemática: exposição, coexposições, métodos para avaliar a exposição ao paraquat, critérios de diagnóstico da Doença de Parkinson (DP), histórico familiar de DP, traumatismo craniano, uso de equipamentos de proteção e hábitos que podem influenciar o desfecho.

Autor, ano	Coexposição	Métodos utilizados para avaliação da exposição	Definição da exposição	Critérios para diagnóstico da DP <sup>1</sup>	Histórico familiar <sup>é</sup>	Traumatismo craniano <sup>y</sup>	Uso de EPI <sup>f</sup>	Hábitos
<b>Estudos caso-controle</b>								
<b>Van der Mark 2014</b>	NR <sup>1</sup>	Matriz de exposição ocupacional.	Ocupacional	Em cada hospital, um neurologista revisou os arquivos médicos de todos os casos potenciais; não menciona critérios utilizados.	NR	NR	Não informa a quantidade de casos e controles que fizeram uso dos EPI, mas ajustam os valores de exposição quanto ao seu uso.	Cigarro, caféina
			<p>Categorias: Nunca expostos; até 3,80; &gt; 3,80; a exposição foi calculada pela soma da probabilidade de uso do PQ<sup>1</sup>, vezes a frequência de uso, somada para todos os anos de trabalho nas fazendas. Os níveis de exposição foram divididos com base na mediana da distribuição da exposição entre os controles.</p>					
<b>Lee 2012<sup>s</sup></b>	NR	Georeferenciamento, que combinou dados e mapas do Departamentos de Regulação de Pesticidas (desde 1974) e de Águas da Califórnia, com informações geocodificadas para os endereços informados.	Ambiental e ocupacional	<p>Diagnóstico provável ou possível de DP feito por especialistas. Critérios: (I) presença de pelo menos dois dos quatro sinais cardinais da DP, sendo pelo menos um deles tremor de repouso ou bradicinesia; (II) ausência de sintomas parkinsonianos provocados por outra condição, (III) não ter características atípicas, (IV) início assimétrico, (V) melhora sintomática após o tratamento com levodopa.</p> <p>Diagnóstico como “provável” DP: critérios I a IV e/ou V; “Possível” DP: pelo menos um sinal cardinal da DP e critérios II e III.</p>	<p><b>Sim.</b> DP: 52 Não DP: 63</p> <p><b>Não.</b> DP: 305 Não DP: 664</p>	<p><b>Sim.</b> Casos expostos/total expostos: 21/460</p> <p>Casos não expostos/total não expostos: 21/651</p> <p><b>Não.</b> Casos expostos/total casos: 148/460</p> <p>Casos não expostos/ total não expostos: 167/651</p>	NR	Cigarro.
			<p>Consideraram exposição ao PQ se os participantes tivessem uma média de exposição maior que zero em seus endereços residenciais e de trabalho no período do estudo.</p>					

<b>Tanner 2011<sup>§</sup></b>	PQ + PQ e qualquer ditiocarbamato (ferbam, mancozeb, maneb, metamsódico, vegedex, zineb, ziram).	Entrevistas telefônicas assistidas por computador.	Ocupacional Se foi utilizado alguma vez e dias de uso (para cada trabalho agrícola, multiplicando os anos de uso por média de dias de uso/ano e, em seguida, somando entre os empregos).	Feito por especialistas baseando-se nos históricos médicos, exames domiciliares e filmagens gravadas durante a visita domiciliar seguindo critérios estabelecidos (Bain et al., 2000; Elble, 2000; Gelb et al., 1999, etc).	<b>Sim.</b> DP: 18 Não DP: 22	<b>Sim*</b> DP: 20 Não DP: 60	Uso de luvas**: Casos expostos/total de expostos: 8/70 Casos não expostos/total não expostos: 22/222  Duas ou três medidas de higiene: Casos expostos/total de expostos: 12/70 Casos não expostos/total não expostos: 22/222	Cigarro.
<b>Rugbjerg 2011</b>	NR	Entrevista com cada participante; o histórico de trabalho de cada participante foi revisado por um higienista ocupacional.	Ocupacional Foi considerada exposição positiva aquela acima do nível esperado na população em geral.	Avaliação por um neurologista utilizando os critérios: (I) dois dos seguintes sintomas: tremor de repouso, rigidez, bradicinesia, perda de expressão facial, micrografia ou instabilidade postural; (II) ausência de sintomas parkinsonianos provocados por outras causas.	NR	NR	NR	Cigarro.
<b>Firestone 2010<sup>§</sup></b>	NR	Entrevista estruturada na residência de cada participante.	Ocupacional Não explicitaram o que consideraram como exposição positiva ao PQ; apenas categorias “expostos” x “não expostos”.	Revisão de prontuários médicos; Critérios: (I) pelo menos dois dos quatro sinais cardinais da DP, sendo pelo menos um a bradicinesia ou tremor de repouso; (II) não fazer uso de drogas que possam induzir parkinsonismo durante 12 meses antes do diagnóstico; (III) não ter história de eventos cerebrovasculares ou outra explicação para os sintomas.	NR	NR	NR	Cigarro.

Tanner 2009	<p>PQ e ácido 2,4-diclorofenoxiacético em 1 indivíduo;</p> <p>PQ e permetrina em 2 indivíduos;</p> <p>PQ, ácido 2,4-diclorofenoxiacético e permetrina em 3 indivíduos.</p>	Entrevistas telefônicas padronizadas assistidas por computador.	<p>Ocupacional</p> <p>Não explicitaram o que consideraram como exposição positiva ao PQ; apenas categorias “expostos” x “não expostos”.</p>	Feito por especialistas. Critérios:(1) dois ou mais sinais cardinais da DP, um dos quais deve ser tremor de repouso ou bradicinesia; (2) ausência de demência; (3) DP idiopática sem outra causa que explique os sintomas.	NR	<p><b>Sim.</b> DP: 119 Não DP: 99</p>	NR	Cigarro, álcool, cafeína.
Elbaz 2009	NR	Relatada pelos participantes em questionários autoaplicados e verificados em entrevistas <i>in loco</i> conduzidas por profissionais (médicos, epidemiologistas, agrônomo).	<p>Ocupacional</p> <p>Para cada tipo de cultura/animal que recebeu o pesticida, foram registrados os tipos de pesticidas, frequência (dias/ano), duração (horas/ano), método (portátil, trator), e anos (início/fim). As variáveis foram dicotomizadas usando a mediana de sua distribuição; os testes de tendência consideraram três níveis de exposição: nenhuma, abaixo e acima da mediana.</p>	Feito por especialistas. Critérios: presença de dois sinais cardinais da DP; exclusão de sintomas neurológicos precoces ou parkinsonismo induzido por drogas.	<p><b>Sim.</b> DP: 9 Não DP: 5</p>	NR	NR	Cigarro.
Dhillon 2008	NR	Questionário administrado aos participantes durante entrevista estruturada.	<p>Ambiental e ocupacional</p> <p>Considerada exposição ao PQ se ele foi misturado ou aplicado uma ou mais vezes.</p>	Casos diagnosticados por neurologista, seguindo critérios clínico-laboratoriais padrão para a DP; não menciona critérios específicos.	NR	NR	NR	Cigarro, álcool.

<b>Kuopio 1999</b>	NR	Entrevista estruturada detalhada.	Ambiental e ocupacional NR	Os exames clínicos e entrevistas foram realizados em sessão particular com cada participante; critérios para diagnóstico definidos pela Sociedade de DP do Reino Unido (Hughes et al., 1992).	NR	<b>Sim.</b> DP: 32 Não DP: 34  <b>Não.</b> DP: 68 Não DP: 66	NR	Cigarro, álcool.
<b>Liou 1997</b>	NR	Questionário aberto e estruturado aplicado por entrevistadores treinados em entrevistas.	Ambiental e ocupacional Casos: exposição positiva definida como contato ocupacional ou residencial ao PQ por pelo menos um ano antes do início da DP. Controles: a exposição ao PQ definida como a que ocorreu antes do aparecimento da doença no caso correspondente. Categorias por anos de exposição (1-19 anos e > 20 anos).	Feito por neurologistas. Critérios: (I) dois ou mais sinais cardinais da DP, (II) responsividade à terapia com levodopa, (III) não ter características atípicas.	NR	NR	NR	Cigarro, álcool.
<b>Seidler 1996</b>	NR	Entrevista estruturada detalhada.	Ambiental e ocupacional NR	Feito por neurologistas. Critérios: bradicinesia e pelo menos um dentre os seguintes: rigidez muscular, tremor de repouso de 4 a 6 Hz e/ou instabilidade postural não causados por disfunção visual primária, cerebelar vestibular ou proprioceptiva; sem demência; quando disponíveis, foram usados exames de tomografia computadorizada.	NR	NR	NR	Cigarro.
<b>Hertzman 1994<sup>s</sup></b>	NR	Questionário aplicado por entrevistador.	Ocupacional Participantes expostos foram aqueles que manusearam o PQ ou trabalharam em área que tivesse sido recentemente pulverizada com o produto químico.	Feito por especialistas. Critérios: dois dos quatro sinais cardinais da DP, não ter parkinsonismo induzido por fármacos ou outras causas.	NR	NR	NR	Cigarro.

<b>Semchuck 1992</b>	NE	Entrevistas pessoais conduzidas por profissionais treinados.	Ocupacional  NR	Revisão de prontuários médicos. Critérios: pelo menos dois dos quatro sinais cardinais da DP, não ter parkinsonismo induzido por fármacos, traumatismo craniano ou outras causas.	NR	NR	NR	NR
<b>Estudos transversais</b>								
<b>Engel 2001</b>	NR	Questionário auto-administrado.	Ocupacional  Categorizaram em "qualquer exposição ao PQ" ou em medidas contínuas, agrupadas em tercís, de anos de exposição e o número de acres/anos de uso do PQ (anos de uso x número de acres da(s) cultura(s) em que foi aplicado.	Participantes examinados por enfermeira treinada. Critérios: parkinsonismo definido por dois ou mais sinais cardinais da DP em indivíduos sem medicação antiparkinsoniana ou a presença de pelo menos um sinal se estivessem sob tal medicação. A DP não foi estudada explicitamente pela dificuldade em distinguí-la de outras síndromes parkinsonianas.	NR	NR	NR	Cigarro, álcool.
<b>Estudos coorte</b>								
<b>Kamel 2007</b>	NR	Questionário auto-aplicado ou entrevista por telefone.	Ocupacional  Qualquer exposição ao PQ.	Participantes não avaliados por especialistas; baseado em relatos dos participantes sobre se já haviam recebido alguma vez o diagnóstico da DP.	NR	NR	Sim. 1993-1997*** DP: 56 Não DP: 45.933  1999-2003**** DP: 52 Não DP: 31.039	Cigarro, álcool.

<sup>1</sup> Abreviaturas: no.: número; EPI.: equipamento de proteção individual; DP: Doença de Parkinson; NR.: não reportado; PQ.: paraquat; Qte: quantidade.

<sup>§</sup> Estudos principais. Lista dos estudos derivados dessas publicações no Apêndice D.

<sup>€</sup> Consideramos "sim" quando nos estudos foi relatado que qualquer um dos familiares dos participantes, independentemente do grau, teve DP e se estava relacionado com os grupos expostos ou não expostos; "não" quando nos estudos foi relatado claramente que não havia familiares com DP; e "não reportado" quando não havia informações suficientes.

<sup>¥</sup> Consideramos "sim" se os participantes relataram terem tido ao menos um episódio de traumatismo craniano durante a vida, independente de perda de consciência; "não" quando foi relatado claramente que não havia histórico de traumatismo craniano; e "não reportado" quando não havia informações suficientes.

‡Consideramos "sim" quando os estudos mencionaram o uso de qualquer tipo de equipamento de proteção (por exemplo, luvas, botas, máscaras, práticas de higiene), independente de outras especificações; "não" quando os estudos relataram que nenhum dos participantes utilizou tais equipamentos; e "não reportado" quando não havia informações suficientes.

\*Informações retiradas de Goldman 2012, referência múltipla de Tanner 2011.

\*\*Informações retiradas de Furlong 2015, referência múltipla de Tanner 2011.

\*\*\* Soma de proteção baixa, moderada e alta. Faltam informações sobre 2.949 participantes; quatro casos e 2.945 controles.

\*\*\*\* Soma de proteção baixa, moderada e alta. Faltam informações sobre 1.985 participantes; quatro casos e 1.981 controles.

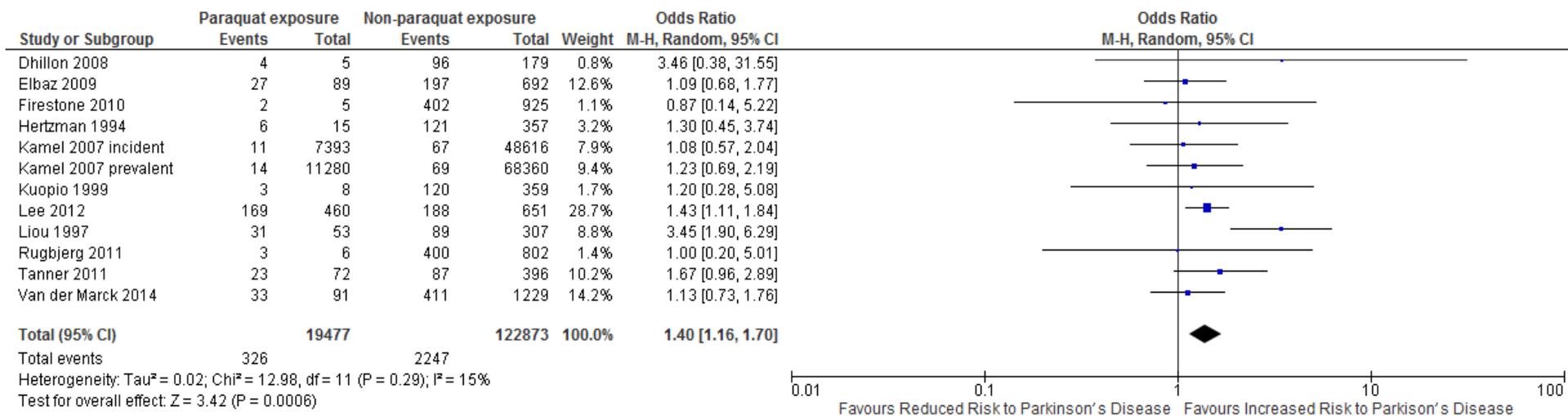
**Figura 1. Avaliação do Risco de Viés dos estudos caso-controlé incluídos na presente RS.**

Estudo	Podemos confiar na avaliação da exposição?	Podemos confiar no diagnóstico de DP dos casos?	Os casos foram selecionados adequadamente?	Podemos confiar que os controles não apresentavam a DP?	Os controles foram selecionados adequadamente?	Os casos e controles foram pareados de acordo com variáveis prognósticas importantes ou as análises estatísticas foram ajustadas para essas variáveis?
Dhillon 2008	+	+	+	-	-	+
Elbaz 2009	-	+	+	-	+	+
Firestone 2010	-	+	+	+	-	+
Hertzman 1994	-	+	+	+	-	-
Kuopio 1999	-	+	+	+	-	-
Lee 2012	+	+	+	-	-	+
Liou 1997	-	+	+	+	-	+
Rugbjerg 2011	-	+	+	-	-	+
Seidler 1996	-	+	+	-	-	-
Semchuck 1992	-	+	+	-	-	-
Tanner 2009	-	+	+	-	-	+
Tanner 2011	-	+	+	-	-	+
Van der Marck 2014	+	+	+	+	+	+

**Figura 2. Avaliação do Risco de Viés dos estudos coorte (Kamel 2007) e transversal (Engel 2001), incluídos na presente revisão sistemática.**

Kamel 2007	Engel 2001	
+	-	A seleção dos expostos e não expostos foi extraída da mesma população?
-	-	Podemos confiar na avaliação da exposição?
-	-	Podemos confiar que o desfecho de interesse não estava presente no início do estudo?
-	-	O estudo pareou os expostos e não-expostos para todas as variáveis associadas ao desfecho de interesse ou a análise estatística foi ajustada para essas variáveis prognósticas?
+	+	Podemos confiar na avaliação da presença ou ausência de fatores prognósticos?
-	-	Podemos confiar na avaliação dos desfechos?
-		O seguimento foi adequado?

**Figura 3.** Estimativas do risco de Doença de Parkinson em indivíduos expostos ao paraquat (*Forest plot*<sup>1</sup>).



<sup>1</sup> No *forest plot* estão listados os estudos incluídos na revisão sistemática e submetidos à metanálise. Os retângulos representam o peso de cada estudo na metanálise, centrados na sua estimativa de efeito. As linhas horizontais, que atravessam os retângulos, indicam seus respectivos intervalos de confiança (95%)<sup>82</sup>. O valor metanalítico (IC 95%) consolida os resultados de todos os estudos e é apresentado no formato de losango. O centro do losango equivale à estimativa de efeito calculada e sua diagonal maior, ao intervalo de confiança<sup>82</sup>. A linha vertical referente ao valor 1 no centro do *Forest Plot* representa a estimativa de não associação; estimativas > 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada à DP como “fator de risco” e valores < 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada a um “fator de proteção”.

## APÊNDICES

### Apêndice A. Estratégia de busca.

(Idiopathic Parkinson's Disease OR Lewy Body Parkinson Disease OR Lewy Body Parkinson's Disease OR Primary Parkinsonism OR Idiopathic Parkinson Disease OR Parkinson's Disease OR Parkinson Disease OR Parkinson Patients OR Parkinson Patient OR Parkinson's Patients OR Parkinson's Patient OR Paralysis Agitans) AND (Herbicides OR Methyl Viologen OR Gramoxone OR Paragreen A OR paraquat OR paraquat poisoning OR paraquat poisoned patients OR paraquat poisoned patient OR paraquat intoxication OR paraquat concentration OR neurotoxicity of paraquat OR paraquat neurotoxicity).

## **Apêndice B. Critérios para avaliação dos vieses.**

Para todas as variáveis associadas ao desfecho de interesse (DP) ou que foram ajustadas nas análises estatísticas, consideramos “definitivamente sim” (baixo risco de viés) quando os autores dos estudos mencionaram todas as variáveis seguintes: idade, sexo, duração da exposição, trabalho rural, vida rural, consumo de água de poço, uso do cigarro, uso de drogas neurolépticas e antivertiginosas, uso de equipamento de proteção individual e histórico familiar de DP. Foi considerado “provavelmente sim”, se os autores levaram em consideração pelo menos as variáveis “idade”, “sexo” e “uso do cigarro” nos ajustes.

Para a confiança na avaliação do desfecho, apoiamo-nos nos critérios de seleção dos casos tal como descrito pelos respectivos autores; considerando isto, os artigos foram categorizados como: “definitivamente sim” se o diagnóstico da DP fora feito por médico especialista, que examinou cada caso no momento do recrutamento, segundo critérios específicos e indicados no artigo, como pelo menos dois ou mais sinais cardinais da DP, sem histórico de outras possíveis causas de parkinsonismo; “provavelmente sim” quando os casos foram obtidos em hospitais ou clínicas especializadas em desordens do movimento, tendo passado pelo menos uma vez pela avaliação de médico especialista, não necessariamente no momento do recrutamento, ou com especificação dos critérios utilizados para diagnóstico; e “definitivamente não” (alto risco de viés) se os casos foram recrutados aleatoriamente de listas telefônicas ou zonas eleitorais, e o diagnóstico de DP ter sido relatado pelos próprios participantes em entrevistas.

Para a seleção adequada dos casos consideramos como “definitivamente sim” apenas se os casos foram sendo selecionados de um local específico durante um período determinado e se os critérios para diagnóstico da DP não mudaram do período do estudo até os dias de hoje.

Em relação à confiança de que os controles não apresentavam o desfecho (DP), consideramos como “definitivamente sim” se foram avaliados por especialista que confirmou não haver DP ou qualquer doença neurodegenerativa no momento do recrutamento; “provavelmente sim” se não foram avaliados por especialista no momento do recrutamento, mas foram selecionados de clínicas ou hospitais de doenças não-neurodegenerativas e “provavelmente não” se não foram examinados por especialistas, mas recrutados aleatoriamente de listas telefônicas, zonas eleitorais, etc.

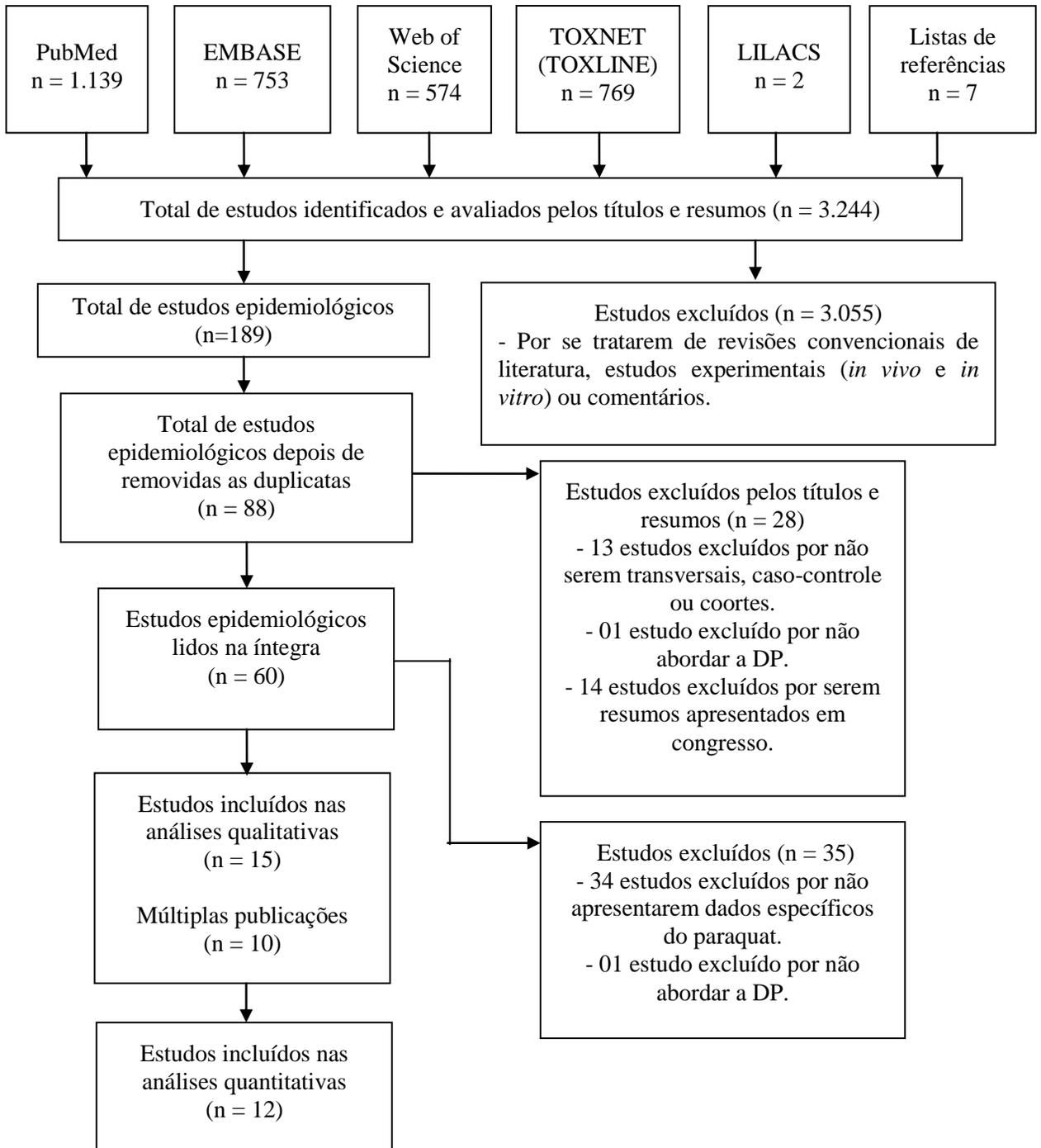
Para seleção adequada dos controles, consideramos “definitivamente sim” se os controles foram selecionados da mesma população que os casos, e estavam expostos ao mesmo fator de risco (e.g. todos os participantes eram trabalhadores rurais ou aplicadores de pesticidas)

e “provavelmente não” se os controles foram selecionados da mesma localização geográfica que os casos, mas não ficou claro se estavam expostos ao mesmo fator de risco.

Para avaliação da exposição, consideramos “definitivamente não” se a exposição foi apenas relatada em entrevistas pelos participantes, e “provavelmente sim”, se foi utilizada ferramenta específica para estimar a exposição (ex: matriz de exposição ocupacional).

Para estudos coorte com dados faltantes, estipulamos um período de seguimento com baixo risco de viés se houve perda de seguimento inferior a 10%, sendo que a diferença de perdas entre grupos de casos e controles deveria ser inferior a 5%. Essa pergunta foi desconsiderada para estudos transversais.

## Apêndice C. Fluxograma



## Apêndice D. Estudos principais e suas referências múltiplas

**Tabela1.** Resposta dos autores dos estudos incluídos quanto à sobreposição de casos e controles nos estudos relacionados e razões para escolha dos estudos principais.

<b>Auto, ano</b>	<b>Referências das múltiplas publicações</b>	<b>Resposta dos autores dos estudos incluídos quanto à sobreposição de casos e controles nos estudos relacionados</b>	<b>Razões para ter sido considerado o estudo principal</b>
<b>Lee 2012<sup>52</sup></b>	- Ritz 2009 <sup>55</sup> - Costello 2009 <sup>56</sup> - Gatto 2009 <sup>57</sup> - Gatto 2010 <sup>58</sup> - Wang 2011 <sup>59</sup>	Aguardando resposta	Lee 2012 é o estudo mais recente, com maior amostra de participantes e maior número de expostos ao paraquat.
<b>Firestone 2010<sup>49</sup></b>	- Firestone 2005 <sup>60</sup>	Sobreposição confirmada	Firestone 2010 é o estudo mais recente, com maior amostra de participantes.
<b>Hertzman 1994<sup>42</sup></b>	- Hertzman 1990 <sup>61</sup>	Sobreposição confirmada	Hertzman 1994 é o estudo mais recente com maior amostra de participantes.
<b>Tanner 2011<sup>50</sup></b>	- Goldman 2012 <sup>62</sup> - Kamel 2014 <sup>63</sup> - Furlong 2015 <sup>64</sup>	Sobreposição confirmada	Tanner 2011 é o estudo com maior amostra de participantes.

## Apêndice E. Avaliação da qualidade metodológica

**Tabela 1.** Avaliação do risco de viés para estudos coorte e transversais.

<b>Autor, ano</b>	<b>A seleção dos expostos e não expostos foi extraída da mesma população?</b>	<b>Podemos confiar na avaliação da exposição?</b>	<b>Podemos confiar que o desfecho de interesse não estava presente no início do estudo?</b>	<b>O estudo pareou os expostos e não-expostos para todas as variáveis associadas ao desfecho de interesse e/ou a análise estatística foi ajustada para essas variáveis prognósticas?</b>	<b>Podemos confiar na avaliação da presença ou ausência de fatores prognósticos?</b>	<b>Podemos confiar na avaliação dos desfechos?</b>	<b>O seguimento foi adequado?</b>
<b>Estudos coorte</b>							
<b>Kamel 2007</b>	Definitivamente sim	Definitivamente não	Provavelmente não	Provavelmente não	Definitivamente sim	Definitivamente não	Definitivamente não
<b>Estudos transversais</b>							
<b>Engel 2001</b>	Provavelmente não	Definitivamente não	Definitivamente não	Provavelmente não	Definitivamente sim	Definitivamente não	NA <sup>1</sup>

Todas as respostas como: definitivamente sim (baixo risco de viés), provavelmente sim, provavelmente não, definitivamente não (alto risco de viés). <sup>1</sup>NA: não aplicável.

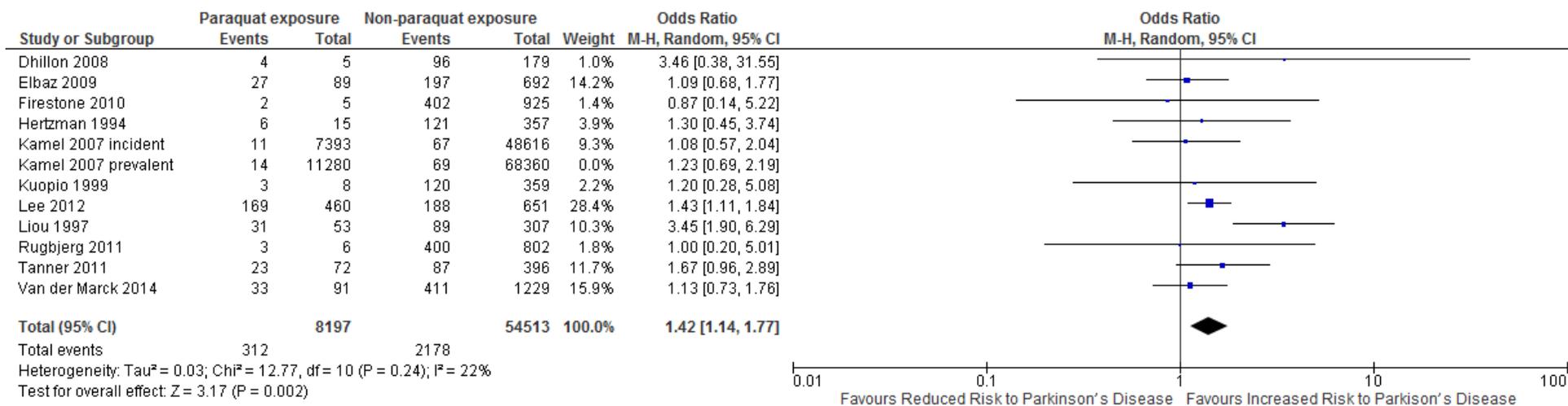
**Tabela 2.** Avaliação do risco de viés dos estudos caso-controle

<b>Autor, ano</b>	<b>Podemos confiar na avaliação da exposição?</b>	<b>Podemos confiar no diagnóstico de DP dos casos?</b>	<b>Os casos foram selecionados adequadamente?</b>	<b>Podemos confiar que os controles não apresentavam a DP?</b>	<b>Os controles foram selecionados adequadamente?</b>	<b>Os casos e controles foram pareados de acordo com variáveis prognósticas importantes ou as análises estatísticas foram ajustadas para essas variáveis?</b>
<b>Estudos caso-controle</b>						
<b>Van der Mark, 2014</b>	Provavelmente sim	Provavelmente sim	Definitivamente sim	Provavelmente sim	Provavelmente não	Provavelmente sim
<b>Lee 2012</b>	Provavelmente sim	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Provavelmente não	Provavelmente não	Provavelmente sim
<b>Tanner 2011</b>	Definitivamente não	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Provavelmente sim
<b>Rugbjerg 2011</b>	Definitivamente não	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Provavelmente não	Provavelmente não	Provavelmente sim
<b>Firestone 2010</b>	Definitivamente não	Provavelmente sim	Definitivamente sim	Provavelmente sim	Provavelmente não	Provavelmente sim
<b>Tanner 2009</b>	Definitivamente não	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Provavelmente não	Provavelmente não	Provavelmente sim
<b>Elbaz 2009</b>	Definitivamente não	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Provavelmente não	Definitivamente sim	Provavelmente sim
<b>Dhillon 2008</b>	Definitivamente não	Provavelmente sim	Provavelmente sim	Provavelmente sim	Provavelmente não	Provavelmente sim
<b>Kuopio 1999</b>	Definitivamente não	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Provavelmente não	Provavelmente não
<b>Liou 1997</b>	Definitivamente não	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Provavelmente não	Provavelmente sim
<b>Seidler 1996</b>	Definitivamente não	Definitivamente sim	Definitivamente sim	Definitivamente não	Provavelmente não	Provavelmente não
<b>Hertzman 1994</b>	Definitivamente não	Definitivamente sim	Provavelmente sim	Provavelmente sim	Provavelmente não	Provavelmente não
<b>Semchuck 1992</b>	Definitivamente não	Provavelmente sim	Definitivamente sim	Definitivamente não	Provavelmente não	Provavelmente não

Todas as respostas como: definitivamente sim (baixo risco de viés), provavelmente sim, provavelmente não, definitivamente não (alto risco de viés).

## Apêndice F. Metanálise

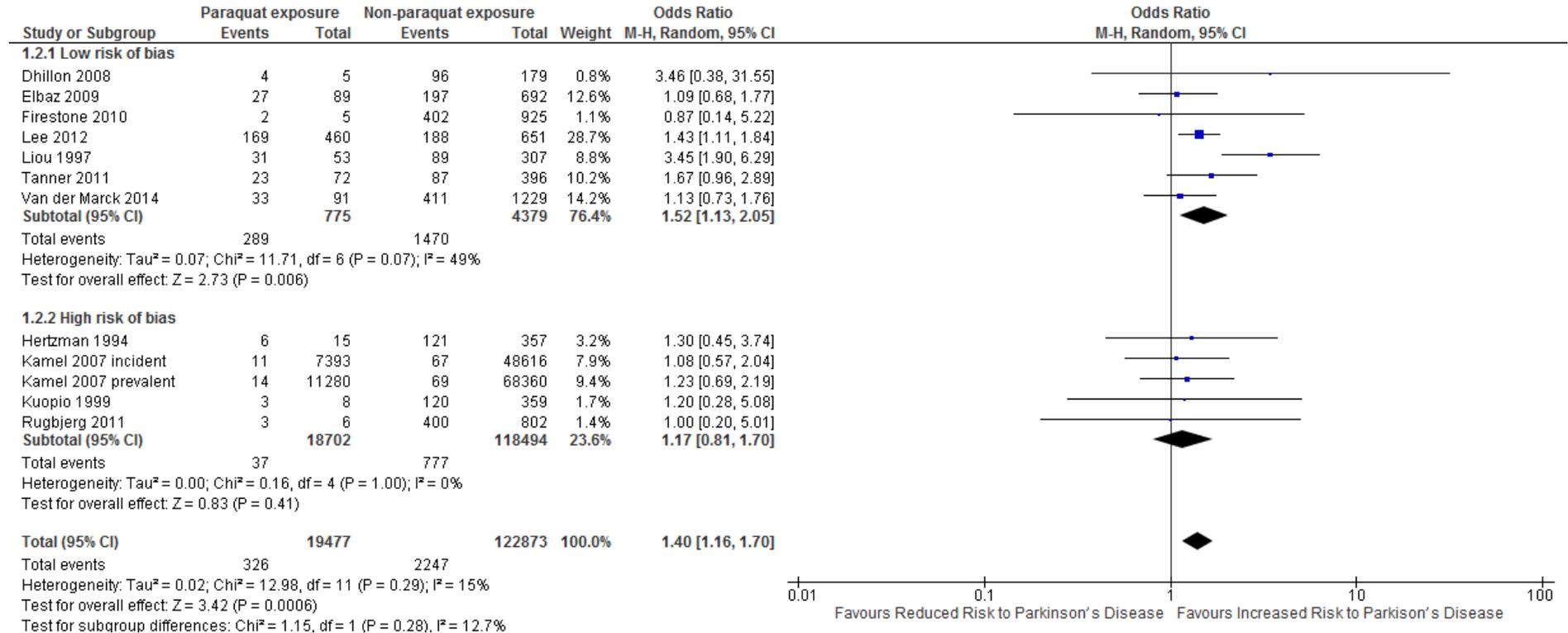
**Figura 1.** *Forest plot*<sup>1</sup> incluindo Kamel et al. (2007), casos incidentes apenas.



<sup>1</sup>No *Forest plot* estão listados os estudos submetidos à metanálise. Os retângulos representam o peso de cada estudo na metanálise, centrados na sua estimativa de efeito. As linhas horizontais, que atravessam os retângulos, indicam seus respectivos intervalos de confiança (95%)<sup>82</sup>. O valor metanalítico (IC 95%) consolida os resultados de todos os estudos e é apresentado no formato de losango. O centro do losango equivale à estimativa de efeito calculada e sua diagonal maior, ao intervalo de confiança<sup>82</sup>. A linha vertical referente ao valor 1 no centro do *Forest Plot* representa a estimativa de não associação; estimativas > 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada à DP como “fator de risco” e valores < 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada a um “fator de proteção”.

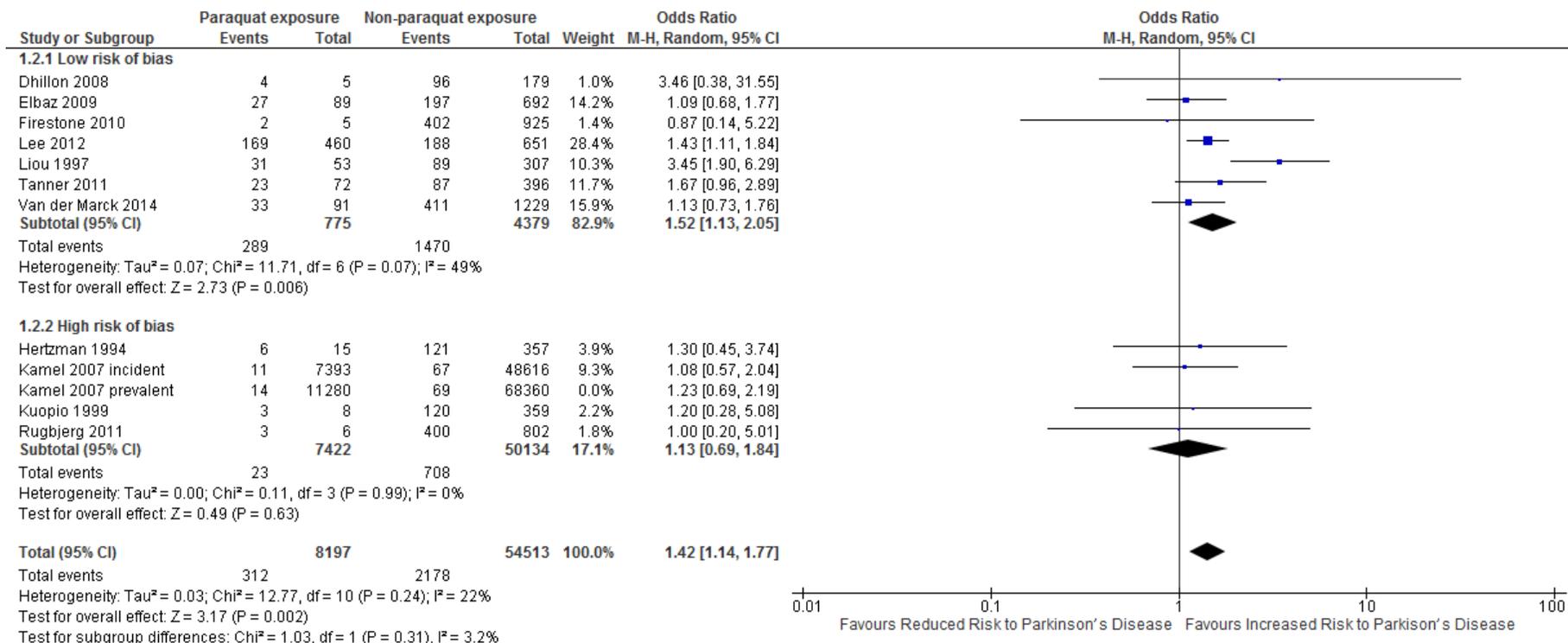
## Apêndice G. Análises de sensibilidade

**Figura 1.** *Forest plot*<sup>1</sup>. Estudos com baixo risco de viés versus alto risco de viés, com Kamel et al.(2007), casos prevalentes e incidentes.



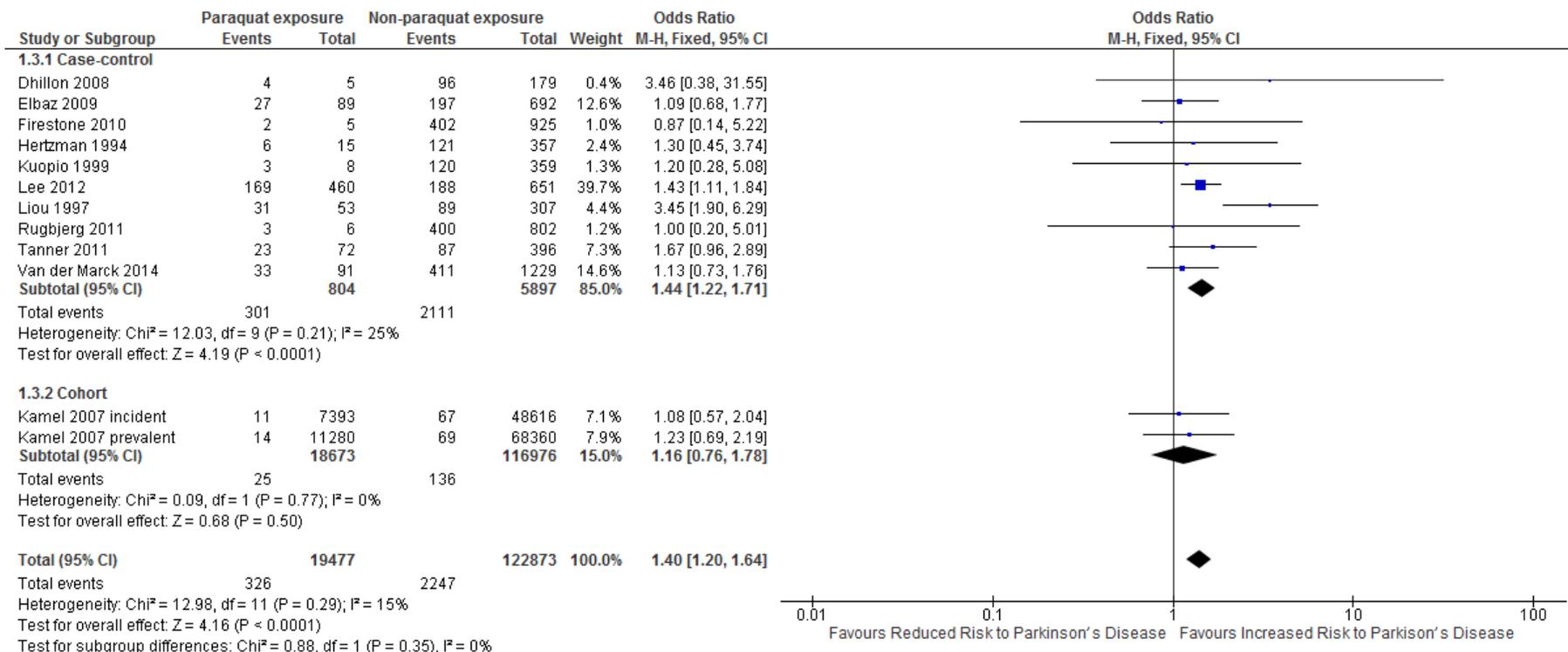
<sup>1</sup>No *Forest plot* estão listados os estudos submetidos à metanálise. Os retângulos representam o peso de cada estudo na metanálise, centrados na sua estimativa de efeito. As linhas horizontais, que atravessam os retângulos, indicam seus respectivos intervalos de confiança (95%)<sup>82</sup>. O valor metanalítico (IC 95%) consolida os resultados de todos os estudos e é apresentado no formato de losango. O centro do losango equivale à estimativa de efeito calculada e sua diagonal maior, ao intervalo de confiança<sup>82</sup>. A linha vertical referente ao valor 1 no centro do *Forest Plot* representa a estimativa de não associação; estimativas > 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada à DP como “fator de risco” e valores < 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada a um “fator de proteção”.

**Figura 2.** *Forest plot*<sup>1</sup>. Estudos com baixo risco de viés versus alto risco de viés, apenas com Kamel et al. (2007), casos incidentes.



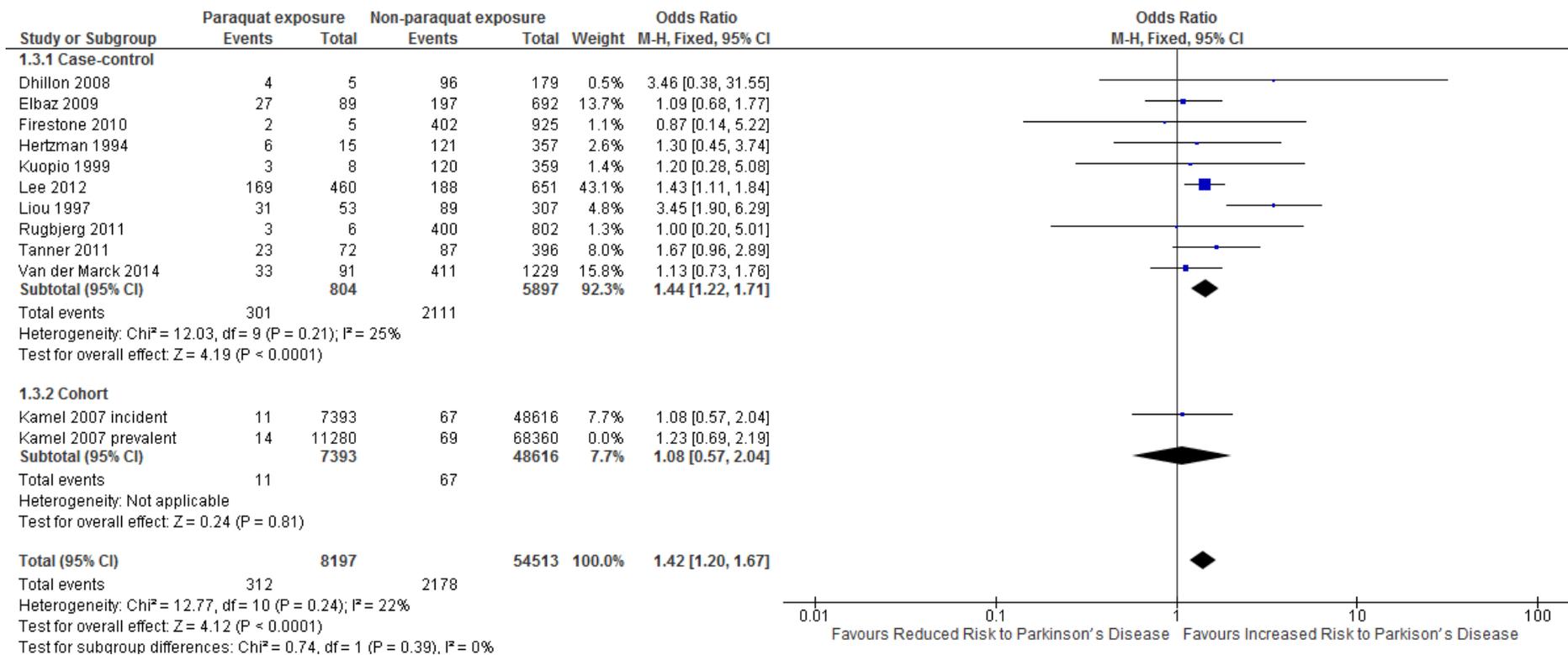
<sup>1</sup>No *Forest plot* estão listados os estudos submetidos à metanálise. Os retângulos representam o peso de cada estudo na metanálise, centrados na sua estimativa de efeito. As linhas horizontais, que atravessam os retângulos, indicam seus respectivos intervalos de confiança (95%)<sup>82</sup>. O valor metanalítico (IC 95%) consolida os resultados de todos os estudos e é apresentado no formato de losango. O centro do losango equivale à estimativa de efeito calculada e sua diagonal maior, ao intervalo de confiança<sup>82</sup>. A linha vertical referente ao valor 1 no centro do *Forest Plot* representa a estimativa de não associação; estimativas > 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada à DP como “fator de risco” e valores < 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada a um “fator de proteção”.

**Figura 3.** *Forest plot*<sup>1</sup>. Estudos caso-controle versus coorte, com Kamel et al.(2007), casos prevalentes e incidentes.



<sup>1</sup>No *Forest plot* estão listados os estudos submetidos à metanálise. Os retângulos representam o peso de cada estudo na metanálise, centrados na sua estimativa de efeito. As linhas horizontais, que atravessam os retângulos, indicam seus respectivos intervalos de confiança (95%)<sup>82</sup>. O valor metanalítico (IC 95%) consolida os resultados de todos os estudos e é apresentado no formato de losango. O centro do losango equivale à estimativa de efeito calculada e sua diagonal maior, ao intervalo de confiança<sup>82</sup>. A linha vertical referente ao valor 1 no centro do *Forest Plot* representa a estimativa de não associação; estimativas > 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada à DP como “fator de risco” e valores < 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada a um “fator de proteção”.

**Figura 4.** *Forest plot*<sup>1</sup>. Estudos caso-coorte versus coorte, com Kamel et al.(2007), casos incidentes apenas.



<sup>1</sup>No *Forest plot* estão listados os estudos submetidos à metanálise. Os retângulos representam o peso de cada estudo na metanálise, centrados na sua estimativa de efeito. As linhas horizontais, que atravessam os retângulos, indicam seus respectivos intervalos de confiança (95%)<sup>82</sup>. O valor metanalítico (IC 95%) consolida os resultados de todos os estudos e é apresentado no formato de losango. O centro do losango equivale à estimativa de efeito calculada e sua diagonal maior, ao intervalo de confiança<sup>82</sup>. A linha vertical referente ao valor 1 no centro do *Forest Plot* representa a estimativa de não associação; estimativas > 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada à DP como “fator de risco” e valores < 1 indicam que a exposição ao paraquat está associada a um “fator de proteção”.