



# EXPOSICIÓN A PESTICIDAS Y ENFERMEDAD DE PARKINSON

**Alba María Orellana Gallego**  
**Tutor: Antonio José Herrera Carmona**

Grado en Bioquímica por la Universidad de Sevilla y Málaga  
Universidad de Sevilla  
Facultad de Biología  
Curso 2022/2023

## ÍNDICE

Resumen	1
<b>1. Introducción</b>	
1.1 Enfermedad de Parkinson	1
1.1.1 Historia de la enfermedad	1
1.1.2 Sintomatología	2
1.1.3 Mecanismos fisiopatológicos	2
1.1.3.1 Etiología	2
1.1.3.2 Epidemiología	3
1.1.3.3 Procesos moleculares y celulares	3
1.1.4 MPTP como modelo tóxico en la enfermedad de Parkinson	4
1.2 Pesticidas	5
1.2.1 Definición y tipos de exposición	5
1.2.2 Clasificación de los pesticidas	5
<b>2. Objetivos</b>	6
<b>3. Materiales y métodos</b>	7
<b>4. Neurotoxicidad producida por pesticidas</b>	7
4.1 Disfunción del UPS	7
4.2 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo	8
4.3 Inhibición de la acetilcolinesterasa	11
4.4 Oligomerización de la $\alpha$ -sinucleína	12
4.5 Alteración de las neuronas dopaminérgicas	13
4.5.1 Inducción de estrés nitrosativo	13
4.5.2 Catabolismo de la dopamina	13
4.5.3 Reducción de los niveles de BDNF	15
4.5.4 Inducción de la apoptosis	16
4.6 Modificación de los micro-ARN	17
4.6.1 MPP <sup>+</sup>	18
4.6.2 Paraquat	19

4.6.3	Organofosforados	20
4.6.4	Triazinas (atrazina)	21
4.6.5	Organoclorados	22
4.6.6	Conazoles	23
4.6.7	Rotenona	24
4.7	Alteraciones genéticas y epigenéticas	24
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas futuras</b>	<b>25</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>26</b>

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo con una alta prevalencia, caracterizada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. Su etiología es muy diversa, aunque los principales mecanismos moleculares afectados parecen ser la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína, el sistema de degradación de proteínas y el incremento del daño oxidativo, que conllevan la disfunción de las neuronas dopaminérgicas.

Hoy en día, la exposición a numerosos agentes químicos es casi inevitable ya que su uso está ampliamente extendido en la alimentación y en la industria. Diversos ensayos sugirieron que la exposición a los pesticidas podría estar relacionada con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, por lo que sus mecanismos de acción se estudiaron en profundidad. Los pesticidas provocan una alteración del metabolismo normal de la célula, induciendo un aumento del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína, alteración del sistema UPS y neurotoxicidad en las neuronas dopaminérgicas, junto con la modificación de los niveles de diversos miARN.

**Palabras claves:** Enfermedad de Parkinson, pesticidas, neurotoxicidad, neuronas dopaminérgicas,  $\alpha$ -sinucleína, miARN.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enfermedad de Parkinson

En los últimos años se ha producido un incremento del número de casos de enfermedades neurodegenerativas (ENDs). Una de las más frecuentes es la enfermedad de Parkinson (EP), con una prevalencia de 160 casos por cada 100.000 individuos y una incidencia de 16-19 casos por 100.000 individuos y año (Kanwar et al., 2022). La prevalencia aumenta con la edad, observándose un incremento exponencial a partir de los 60 años.

#### 1.1.1 Historia de la enfermedad

La primera descripción clínica de la EP fue realizada en el año 1817 por el médico británico James Parkinson, autor de *An essay on shaking palsy*. El término ‘parálisis agitante’ hacía referencia a uno de los síntomas característicos de la enfermedad, el temblor. En 1872, el neurólogo francés Jean-Martin Charcon aportó nuevas evidencias y

renombró la enfermedad como enfermedad de Parkinson en honor al trabajo original de 1817.

### 1.1.2 Sintomatología

Los síntomas característicos de la EP a partir de los cuales se realiza un diagnóstico provisional son motores, entre los que se encuentran el temblor, la rigidez muscular, la pérdida en la capacidad de movimiento (aquinesia y bradiquinesia) y lentitud en su realización; en conjunto, estos síntomas producen un deterioro progresivo de la autonomía. Existe también un conjunto amplio de síntomas no motores que preceden a los motores y continúan durante el desarrollo de la enfermedad, como depresión, demencia, desorden del sueño y disfunción del sistema nervioso autónomo, así como hormigueo, adormecimiento y dolor en los miembros (Moustafa et al., 2016; Li et al., 2023).

Las manifestaciones sintomatológicas de la EP no son iguales en hombres y mujeres. En estas es más frecuente el dolor neurogénico y el temblor, mientras que en los hombres se suele encontrar una mayor afectación cognitiva y una alteración postural característica, la camptocormia, consistente en una inclinación hacia adelante cuando la persona está en posición vertical.

### 1.1.3 Mecanismos fisiopatológicos

#### 1.1.3.1 Etiología

La etiología de la EP es una combinación compleja de diversos factores de riesgo que parecen influir en el desarrollo de la enfermedad, entre ellos factores ambientales junto con exposición a tóxicos, factores genéticos y la edad.

Los factores ambientales juegan un papel fundamental. La incidencia de la enfermedad se ve incrementada en aquellas regiones donde se produce una exposición a niveles elevados de metales o diversos químicos como pesticidas; este tipo de lesiones puede verse potenciada por el estrés crónico. Se han descrito dos formas de la enfermedad: una forma familiar de comienzo temprano que afecta a menos del 5-10% de los pacientes y en la que se detectan mutaciones genéticas, y una forma esporádica tardía que da cuenta de la mayoría de los casos, en la que no se identifican mutaciones concretas, pero en la que parecen influir ciertos factores genéticos además de los factores ambientales ya mencionados.

### 1.1.3.2 Epidemiología

Como ya se ha descrito, la EP afecta a mujeres y hombres de forma diferente, siendo en los hombres el doble de frecuente que en mujeres. Los síntomas y la respuesta a diversos tratamientos también son diferentes. La progresión de la enfermedad en las mujeres se produce con una mayor velocidad que en los hombres, viéndose aumentada la mortalidad. En este sentido, la mayor cantidad de urea en hombres se ha asociado con una menor progresión de la enfermedad, ya que este metabolito de las purinas tiene propiedades neuroprotectoras y antioxidantes. Por otro lado, cabe destacar el hecho de que los estrógenos también pueden actuar como un factor protector, ya que se ha probado que las mujeres que han tenido una mayor exposición a ellos a lo largo de su vida tienen un menor riesgo de padecer la enfermedad (Cerri et al., 2019).

### 1.1.3.3 Procesos moleculares y celulares

En la EP se produce una disminución considerable del número de neuronas dopaminérgicas situadas en una estructura mesencefálica profunda llamada *substantia nigra*, en concreto en su *pars compacta* (SNpc). La característica macroscópica más evidente de esta muerte neuronal es la pérdida de la coloración oscura típica de esta estructura producida por el pigmento neuromelanina. Cuando los síntomas motores hacen evidente la existencia de la enfermedad, ya se ha producido la pérdida de más de la mitad de dichas neuronas.

La enfermedad se caracteriza por la aparición de unas inclusiones intracelulares denominadas cuerpos de Lewy, formadas por un número elevado de proteínas (fundamentalmente  $\alpha$ -sinucleína y proteínas ubiquitinadas) y otros componentes celulares (Balestrino & Schapira, 2020). La  $\alpha$ -sinucleína puede malplegarse y formar agregados amiloides insolubles ricos en hojas  $\beta$ .

La distribución anatómica de los cuerpos de Lewy en el sistema nervioso central sigue una progresión espacial y temporal característica, observándose inicialmente en el núcleo motor dorsal de los nervios vago y glossofaríngeo y en los núcleos olfatorios anteriores, continuando con el tronco encefálico, el mesocortex, el allocortex y el neocortex. Una posible explicación es la transmisión casi-priónica de formas patógenas de la  $\alpha$ -sinucleína a través de las neuronas (Braak et al., 2003; Prusiner et al., 2015; Balestrino & Schapira, 2020).

Otro mecanismo fisiopatológico presente es la disfunción mitocondrial, que al mismo tiempo produce y es aumentada por la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS), con la inducción de daño celular por estrés oxidativo. Se ha demostrado la importancia que tienen diferentes mutaciones monogénicas en la aparición de la forma temprana de la enfermedad. El gen *PINK-1* codifica para PTEN, una proteína quinasa mitocondrial perteneciente al tipo serina/treonina que puede llevar a cabo la fosforilación de parkina, una ubiquitín-ligasa E3 (Li et al., 2021; Yuan et al., 2022). Juntas, PINK-1 y parkina juegan un papel fundamental en distintas rutas de control de calidad mitocondrial. Por otro lado, existen evidencias de que el funcionamiento incorrecto del sistema proteasoma-ubiquitina (UPS) y de la autofagia, con un aclaramiento defectuoso de proteínas, está relacionado con la enfermedad de Parkinson (Chen et al., 2017). Una de las proteínas implicadas es la quinasa rica en repeticiones de leucina (LRRK2), algunas de cuyas mutaciones conllevan acumulación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína (Day & Mullin, 2021). El mantenimiento de la homeostasis del calcio es especialmente importante por sí misma (excitotoxicidad) y por su relación con el estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc dadas las especiales características de las mismas (Surmeier et al., 2017). La proteína desglucosa DJ-1, codificada en humanos por el gen *PARK-7*, actúa como sensor del estrés oxidativo; diversos estudios post-mortem en pacientes con EP han mostrado inmunoreactividad a la forma oxidada de la proteína DJ-1 en los somas y neuritas de la SNpc (Saito, 2014; Repici & Giorgini, 2019).

#### 1.1.4 MPTP como modelo tóxico de la enfermedad de Parkinson

En 1979, Davis y colaboradores informaron del desarrollo de parkinsonismo persistente en un paciente debido a la inyección de una mezcla de 4-propiloxi-4-fenil-N-metilpiperidin (PPMP), 4-hidroxi-4-fenil-N-metilpiperidina (HPMP) y dehidro-4-fenil-N-metilpiperidina (DPMP) (Davis et al., 1979). Los síntomas se controlaron con bromocriptina, un agonista del receptor del neurotransmisor dopamina (DA). Poco tiempo después, otro caso clínico relacionó la aparición súbita de parkinsonismo con la exposición (por inyección) a 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina (MPTP), un producto de la síntesis de 1-metil-4-fenil-4-propionoxi-piperidina (MPPP), un análogo del analgésico narcótico meperidina (Langston et al., 1983). En ambos estudios se apreciaba una considerable destrucción de la SNpc.

El MPTP es una sustancia lipofílica que puede acceder al cerebro ya que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE). Una vez allí es transformado por la enzima monoaminoxidasa B (MAO B) en 1-metil-4-fenil-2,3-hidropiridinio (MPDP<sup>+</sup>), que se oxida de forma espontánea a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>). Esta transformación ocurre sobre todo en los astrocitos; sin embargo, son las neuronas dopaminérgicas las que se ven afectadas por dicho metabolito tóxico. El MPP<sup>+</sup> es captado por las neuronas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT). En estas, el MPP<sup>+</sup> se acumula en la mitocondria (Langston, 2017), provocando la inhibición del complejo I de la cadena de transporte electrónico al interferir con el paso de electrones que tiene lugar del clúster Fe-S a la coenzima Q, su aceptor final (Ramsay et al., 1987). Curiosamente, el pesticida paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridinio) presenta una alta similitud estructural con el MPP<sup>+</sup>. Esta coincidencia, junto con los casos clínicos reportados, sugirió la existencia de una conexión entre la exposición a pesticidas y la enfermedad de Parkinson.

## **1.2 Pesticidas**

### **1.2.1 Definición y tipos de exposición**

Según la Organización Mundial de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <<*un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias capaz de prevenir, destruir, repeler o controlar una plaga*>>. Los seres humanos pueden verse expuestos a los pesticidas por diferentes vías, que incluyen la inhalación, la ingestión y la penetración por la piel.

Existen diversas formas de clasificar la exposición a los pesticidas. Por tiempo, el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS) habla de exposición aguda ( $\leq 24$  h), subaguda ( $\leq 28$  días), subcrónica ( $< 90$  días) y crónica ( $\geq 90$  días). Se puede hablar también de exposición intencional (suicida o con intenciones criminales), ocupacional (en el trabajo) y no ocupacional (el resto de individuos) (Sabarwal et al., 2018). La dosis y duración de la exposición a los pesticidas son importantes para determinar la toxicidad de los mismos.

### **1.2.2 Clasificación de los pesticidas**

Existe un elevado número de pesticidas que se pueden agrupar según la plaga contra la que actúen o por su estructura química.

Según su uso, se puede distinguir entre insecticidas (diseñados para eliminar insectos), rodenticidas (para controlar la existencia de roedores), fungicidas (eliminan el desarrollo de mohos y hongos), herbicidas (evitan o interrumpen el crecimiento de hierbas no deseadas) y antimicrobianos (controlan virus o bacterias).

Si se clasifican por su estructura química o por el método de producción, se pueden distinguir:

- Organofosforados (OP). Contienen una molécula central de fosfato con sustituyentes alquílicos o aromáticos. Estos pesticidas, al bloquear la acetilcolinesterasa (AChE), impiden la degradación de la acetilcolina en las sinapsis y aumentan la estimulación nerviosa de los receptores colinérgicos. La inhibición irreversible de la AChE bloquea la neurotransmisión en la placa neuromuscular y provoca la muerte por la incapacidad de movimiento del diafragma. Estos pesticidas se caracterizan por su amplio espectro, siendo conocidos como “gases nerviosos” debido a su empleo en la Segunda Guerra Mundial (Benedico, 2002). A este grupo pertenecen los clorpirifós y los diclorvos.
- Organoclorados. Contienen grupos clorados ciclodienos y dicloro-difenil-tricloro etano (DDT). Provocan toxicidad al inhibir al neurotransmisor inhibidor GABA (Kanwar et al., 2022). El insecticida dieldrina es un ejemplo de compuesto organoclorado.
- Carbamatos. Ésteres del ácido N-metil carbámico que actúan carbamoilando la serina del centro activo de la AChE, inhibiéndola. Bendiocarb o aprocarb se incluyen en este grupo (Mdeni et al., 2022).
- Piretroides. Son plaguicidas sintetizados a partir de piretrinas procedentes de la planta *Chrysanthemum*. En bajas dosis actúan regulando al alza a la proteína  $\alpha$ -sinucleína y al DAT. Algunos pesticidas piretroides son permetrina o cimetrina (Mohammadi et al., 2019).
- Otros: herbicidas sulfonilureas, rotenona, paraquat o atrazinas.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo del presente trabajo es revisar las evidencias que sugieren que los pesticidas pueden inducir la aparición de la enfermedad de Parkinson. Para ello, se considerarán los posibles mecanismos afectados en la enfermedad y la forma en que los pesticidas pueden alterarlos, incluyendo el efecto sobre los micro-ARN.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la redacción de este trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica amplia usando fundamentalmente las bases de datos PubMed, Science-Direct y Google Scholar. La búsqueda se limitó principalmente a artículos publicados en los últimos diez años en revistas de calidad contrastada (clasificadas en el Journal Citation Report, JCR) y en ella se emplearon términos como “pesticides and Parkinson”, “Parkinson’s disease”, “miRNA pesticide and Parkinson”, “pesticides and neurodegenerative diseases”, “neurotoxicity” o “pesticides and epigenetics alterations”.

### **4. NEUROTOXICIDAD PRODUCIDA POR PESTICIDAS**

Aunque los pesticidas tienen una función fundamental tanto para garantizar la salud como para facilitar diversas labores en la agricultura y la industria, sus dianas moleculares también pueden encontrarse en humanos, provocando efectos secundarios no deseados (Richardson et al., 2019). La interacción de estos tóxicos con distintas moléculas y genes provocan una neurotoxicidad que podría llegar a causar EP.

#### **4.1 Disfunción del UPS**

El plegamiento correcto de las proteínas y la eliminación de aquellas que no poseen una estructura adecuada es un proceso muy importante para el correcto funcionamiento de la célula. Este proceso, denominado proteostasis, se lleva a cabo por el sistema UPS, por la autofagia y mediante chaperonas, siendo estas últimas las encargadas de participar en el plegamiento de las nuevas proteínas formadas. Las proteínas mal plegadas acumuladas en el retículo endoplásmico que no pueden ser degradadas mediante mecanismos proteolíticos como el sistema UPS pueden conducir a la muerte de las células neuronales. En la EP se produce un deterioro del sistema UPS que puede incrementarse por la exposición a pesticidas (Chen et al., 2017). Diversos estudios han determinado que modificaciones en la parkina, la  $\alpha$ -sinucleína y el dominio C-terminal de la ubiquitina están implicadas en el mal funcionamiento del sistema UPS en esta enfermedad. En estos trabajos se utilizaron células aisladas de neuroblastoma (SK-N-MC) para estudiar la actividad del proteosoma. El uso de proteínas conjugadas con GFP demostró que la exposición a pesticidas provocaba una inhibición del sistema de eliminación de proteínas

en las células SK-N-MC, lo que conducía a la célula a un alto nivel de estrés y con ello a la muerte celular (Wang et al., 2011; Vellingiri et al., 2022).

El paraquat, un herbicida del que ya se ha comentado su similitud estructural con el MPP<sup>+</sup>, puede penetrar en el organismo mediante inhalación y por absorción dérmica, siendo esta última vía la más peligrosa (Huang et al., 2022). El paraquat podría alcanzar el cerebro mediante los transportadores de grandes aminoácidos neutros de la BHE (Shimizu et al., 2001); el DAT permitiría su entrada en la neurona, afectando específicamente a las neuronas dopaminérgicas. Se ha confirmado que el paraquat altera la actividad del proteasoma (Navarro et al., 2016).

#### **4.2 Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo**

Diversos trabajos han demostrado una disminución de la actividad mitocondrial en la EP. Se ha observado una disfunción mitocondrial causada por la falta de ADN mitocondrial, provocando el deterioro del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial junto con una reducción de la capacidad metabólica de la mitocondria (Bender et al., 2006). El complejo I, al translocar protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, interviene en la producción del gradiente electroquímico necesario para la generación de ATP. Una deficiencia en dicho complejo implicaría niveles menores de ATP y un aumento en la producción de ROS. El trabajo de Fukushima et al. (1993) estableció una relación entre la disfunción del complejo I mitocondrial y el incremento de la peroxidación lípida cuando se trató ganado bovino con paraquat. El complejo I es capaz de oxidar el NADPH a NADP<sup>+</sup> al cederle dos electrones a la ubiquinona. Este pesticida provoca la inhibición de las enzimas malato deshidrogenasa mitocondrial y citosólica, impidiendo el paso de NAD<sup>+</sup> a NADH. Con ello, se produce la inhibición de este complejo mitocondrial I al no poder usar dicho NADH. El paraquat también altera la actividad mitocondrial mediante la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, debida fundamentalmente a la apertura de un poro en la membrana mitocondrial interna. Esto provoca una enorme falta de energía, pudiendo inducirse apoptosis. La liberación de citocromo c al citosol inicia el reclutamiento de caspasa-9 y caspasa-3 (Cai et al., 1998). Este descubrimiento se confirmó al introducir en células SH-SY5Y de neuroblastoma un vector que permitía el marcaje de las mitocondrias con fluorescencia y la identificación de las proteínas proapoptóticas. Al tratar estas células con paraquat, se observó la salida de citocromo c al citosol (Yang et al., 2018).

El estrés oxidativo consiste en un desbalance entre la producción de ROS y su eliminación por la acción de diversos sistemas detoxificantes. Este desequilibrio induce lesiones en las neuronas dopaminérgicas, alterando las membranas celulares y las moléculas lipídicas, por lo que durante los últimos años se han intensificado los estudios para la detección temprana de niveles elevados de marcadores de oxidación. En la peroxidación lipídica se genera malondialdehído (MDA) como producto, que aumenta en los enfermos de Parkinson y en las células SK-N-SH tratadas con paraquat (14  $\mu$ M, 24 h). El uso de MDA como marcador del nivel de estrés oxidativo ha demostrado que el paraquat aumenta la peroxidación lipídica (Ravi et al., 2018).

Como se ha mencionado anteriormente, el organismo posee varios mecanismos de defensa antioxidante para eliminar las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el glutatión (GSH), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD). Los niveles de estos antioxidantes son inferiores tanto en la SN como en la sangre de pacientes con Parkinson. Una exposición continuada al pesticida paraquat en ratas adultas (5 mg/kg, dos veces a la semana durante 12 semanas) produjo un descenso del 45% del contenido de GSH en la SN de ratas que ya habían sufrido un contacto con el tóxico tras su nacimiento. Se determinó que, en roedores, una exposición a pesticidas en un período esencial para el desarrollo cerebral incrementaba la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas a una reexposición posterior en edad adulta (Mitra et al., 2020). Este tóxico también reduce a la mitad la actividad de la enzima SOD en *Drosophila*, confirmando así el daño oxidativo producido (Shukla et al., 2014).

El paraquat no es el único pesticida capaz de provocar este efecto. Los compuestos organoclorados son plaguicidas formados por dos ciclodienos clorados y compuestos tipo DDT. Son moléculas liposolubles capaces de penetrar la BHE, por lo que presentan una alta neurotoxicidad. La dieldrina, pesticida que pertenece a este grupo, induce una hiperexcitación al bloquear los receptores cerebrales de GABA<sub>A</sub>, generándose una activación de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) por la entrada masiva de calcio. Al igual que el paraquat, los organoclorados inducen la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol (Westerink, 2014).

La rotenona es un insecticida de origen vegetal que ha sido ampliamente utilizado para el control de distintas plagas. Al comienzo de su uso, en los años 1930, se pensaba que era inofensivo para el hombre; sin embargo, presenta una alta toxicidad por inhalación, por vía dérmica y al ingerir agua o alimentos contaminados con este insecticida. Provoca la

inhibición del complejo I mitocondrial, comprometiendo la producción de ATP (Uversky, 2004). El incremento de ROS inducido por la rotenona provocaría daño celular y muerte de las neuronas dopaminérgicas. Aplicada a células de neuroblastoma SH-SY5Y y al núcleo estriado en ratón, se observó un incremento de PINK-1, aumentando el estrés oxidativo y el desgaste mitocondrial (Huang et al., 2022). Diversos estudios realizados en agricultores expuestos a este tóxico correlacionaron las lesiones generadas tras su continua aplicación y el desarrollo de EP. La rotenona puede atravesar la membrana celular sin ayuda alguna al ser una molécula lipofílica; esto le permite traspasar la BHE con facilidad e introducirse en el cerebro de una forma rápida. La rotenona produce una activación de los astrocitos y la microglía, incrementándose los niveles de citoquinas inflamatorias, lo que junto con la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y las NADP oxidasas inicia una cascada de señalización neurotóxica que da como resultado la producción de ROS y un elevado estrés oxidativo (Sarkar et al., 2017).

El complejo I mitocondrial no es el único afectado. El pesticida Maneb es un fungicida que se encuentra dentro del grupo del ditiocarbamato y provoca la inhibición de enzimas sulfhidrúlicas y de cisteína. Maneb interviene en el ciclo redox del tiol, ya que oxida el glutatión y produce un cambio en el estado redox de la peroxirredoxina, un grupo de enzimas antioxidantes encargadas de eliminar principalmente el peróxido inducido por las citoquinas (Anderson et al., 2021; Vellingiri et al., 2022). El complejo mitocondrial III es el lugar de unión de este tóxico, bloqueándose la fosforilación oxidativa y aumentando las ROS.

Otros pesticidas de interés son los piretroides. Las piretrinas son insecticidas obtenidos de la flor de *Chrysanthemum cinerariaefolium* que, en la presencia de la luz, se descomponen produciendo piretroides. Para estudiar su toxicidad en el hipocampo y en el núcleo estriado se expusieron ratas a deltametrina y se observó que los sistemas antioxidantes se activaron como respuesta a una mayor concentración de ROS que provocó finalmente la apoptosis (Vellingiri et al., 2022). Se ha confirmado que la susceptibilidad a este compuesto varía con la edad, siendo los jóvenes más sensibles a cantidades mayores (Sheets, 2000). Por ello, la exposición a este compuesto debe limitarse en el embarazo para evitar problemas neurológicos en el feto.

Los mecanismos de defensa que posee el organismo para el control de la peroxidación lipídica también se ven alterados por los plaguicidas OP. Como ya se ha mencionado, los organofosforados son un tipo de insecticidas formados por compuestos OP en los que la

molécula presenta un fosfato en el centro y sustituyentes aromáticos o alquilos (Kanwar et al., 2022). Estos compuestos interrumpen la acción de distintas enzimas, como la GPx, la SOD y la AChE. Además, se ha observado que las variantes genéticas NOS1 y NOS2A de la NOS proporcionan una susceptibilidad distinta a la EP. Curiosamente, los pacientes con el genotipo NOS1 mostraron una mayor asociación de los OP con la enfermedad (Sabarwal et al., 2018). Como ya se ha comentado, el NO es un prooxidante que daña a las neuronas dopaminérgicas.

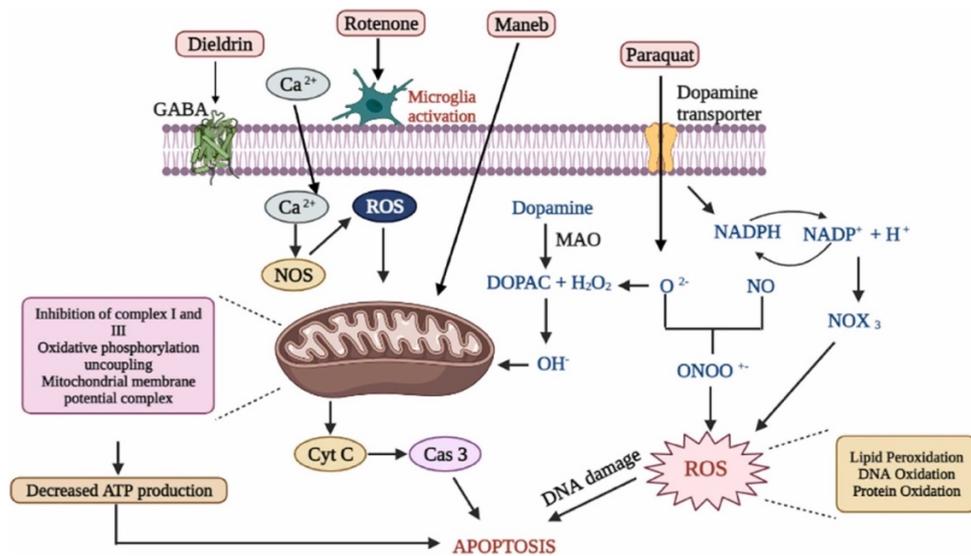


Figura 1. Influencia de los pesticidas en la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo. Tomada de Vellingiri et al., (2022).

### 4.3 Inhibición de la acetilcolinesterasa

La AChE es la enzima encargada de hidrolizar la acetilcolina, mensajero químico muy importante. Los principales pesticidas que inducen una inhibición de esta enzima son los OP y los carbamatos. Desde su invención en 1850, estos compuestos se han utilizado ampliamente en la agricultura y también se usaron como agentes nerviosos en conflictos bélicos desde la Segunda Guerra Mundial. Estas sustancias suponen un peligro para la salud ya que pueden ser inhalados, absorbidos por la piel o ingeridos a través de los alimentos y el agua (Georgiadis et al., 2018). Dichos tóxicos inhiben a la AChE de forma irreversible, por lo que la acetilcolina se concentra en la placa terminal de la sinapsis neuromuscular generando una sobreestimulación de los receptores colinérgicos. La inhibición irreversible de la AChE provoca la parálisis del diafragma junto con una

secreción excesiva, depresión del centro respiratorio y la muerte; aunque por causas diferentes, la rigidez muscular es uno de los síntomas de la EP (Kanwar et al., 2022).

Los carbamatos son ésteres del ácido N-metilcarbámico que también bloquean la AChE, carbamoilando la serina del sitio activo de la enzima en vez de fosforilándola como hacían los organofosforados. Esta inhibición es reversible pues se produce de nuevo la activación de la enzima por la unión de agua al sitio activo, y además los carbamatos no pueden acceder al sistema nervioso central, lo que hace que presenten una toxicidad menor (Kanwar et al., 2022).

#### **4.4 Oligomerización de la $\alpha$ -sinucleína**

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína pequeña, de 14 kDa, codificada por el gen *SNCA*. Esta molécula actúa en la regulación de la síntesis de neurotransmisores y en el almacenaje, recaptación y en la liberación de vesículas (Longhena et al., 2019). La agregación de esta proteína altera tanto las funciones sinápticas que tiene el cuerpo estriado como favorece la degeneración de las neuronas de la SN. La función de dichas neuronas puede verse comprometida por un aumento de la concentración de  $\alpha$ -sinucleína y su agregación al plegarse de forma incorrecta, produciéndose un incremento en la toxicidad (See et al., 2022). Se ha demostrado que la rotenona induce la agregación y la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína a través de la regulación de la vía de  $Ca^{2+}/GSK3\beta$  en células PC12, es decir, que acelera la formación de fibras (Huang et al., 2022).

Otro pesticida que altera la conformación de la  $\alpha$ -sinucleína es el paraquat, pues induce su oligomerización y con ello su agregación en la SNpc (Powers et al., 2017). Además, la  $\alpha$ -sinucleína interviene en la producción de ROS al establecer una relación con el complejo I de la cadena de transporte electrónico, razón por la cual la expresión los genes mitocondriales se ve afectada. Un estudio llevado a cabo por Kumar et al. (2016) demostró que dicho herbicida inducía la producción de radicales libres en cerebros de ratones mediante dos mecanismos. El primero era la activación en la microglía de las enzimas NADPH oxidasa e iNOS, produciéndose así peroxinitrito (ONOO $\cdot$ ). Por otro lado, la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol inducía la activación de la enzima peroxidasa.

## **4.5 Alteración de las neuronas dopaminérgicas**

### **4.5.1 Inducción de estrés nitrosativo**

El estrés nitrosativo consiste en la interacción de las ROS con NO produciendo el anión ONOO<sup>-</sup>. La 3-nitrotirosina es un subproducto generado en la estabilización de este anión que se utiliza como marcador del nivel de estrés nitrosativo. Diversos estudios han informado de la correlación positiva entre la concentración de 3-nitrotirosina y la presencia de diversas patologías en el SNC, incluyendo la EP (Bandookwala & Sengupta, 2020).

Se ha demostrado que tóxicos como el paraquat incrementan considerablemente la cantidad de 3-nitrotirosina y de ONOO<sup>-</sup> a nivel cerebral en modelos animales de la EP basados en la aplicación de paraquat a moscas *Drosophila* durante 3 semanas, confirmando así el daño neurodegenerativo que induce esta sustancia. Uno de los posibles mecanismos mediante el cual el herbicida es capaz de producir la pérdida de neuronas dopaminérgicas es la excitotoxicidad inducida por RNS al verse estimulado el flujo de glutamato (Maitra et al., 2019; Ahmad et al., 2021).

### **4.5.2 Catabolismo de la dopamina**

La concentración del neurotransmisor dopamina en la SNpc está muy regulada. Una vez liberada en la sinapsis, la DA es recaptada por la glía y la neurona; en esta última puede ser revesiculada para su posterior utilización, pero una parte queda libre en el citosol. La oxidación espontánea de la DA y su catabolismo contribuyen al estrés oxidativo, con el consiguiente efecto negativo sobre las neuronas dopaminérgicas en la EP. En el catabolismo de la DA, la enzima MAO lleva a cabo una desaminación oxidativa en la que se generan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> y 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL). Este último compuesto puede seguir metabolizándose hasta convertirse en 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) o 3,4-dihidroxifeniletanol (DOPET) (Masato et al., 2019; See et al., 2022), como se muestra en la figura 2.

Los ensayos post-mortem en pacientes con EP esporádica han mostrado un descenso en los niveles de DA, DOPAL y DOPAC en el cuerpo estriado (Goldstein et al., 2011). Cabe destacar que DOPAL puede ejercer una potente acción neurotóxica, asociándose un aumento de sus niveles con una disminución del número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc (Burke et al, 2003).

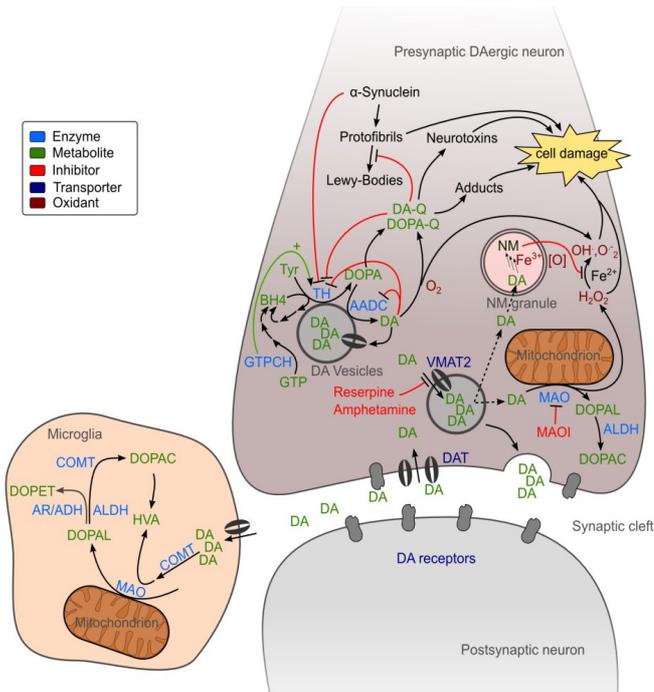


Figura 2. Metabolismo neuronal de la dopamina. En las neuritas de las neuronas dopaminérgicas, la dopamina es sintetizada por las enzimas tirosina hidroxilasa (TH) y DOPA descarboxilasa (AADC) e introducida en vesículas por el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2). La degradación de la DA se lleva a cabo por las enzimas MAO, catecol-O-metiltransferasa (COMT), alfa reductasas (AR), alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH). La DA y el DOPA pueden oxidarse a quinonas reactivas causantes del daño neurotóxico. Imagen obtenida de Meiser et al., 2013.

El fungicida benomil induce la inhibición de la enzima ALDH, incrementando los niveles de DOPAL (Fitzmaurice et al., 2013). La exposición a benomil podría afectar de esta forma a las neuronas dopaminérgicas, contribuyendo al desarrollo de EP.

La enzima TH controla la velocidad de formación de DA, que se ve reducida con la disminución del número de neuronas dopaminérgicas. En presencia de pesticidas como el paraquat se generan especies reactivas como el anión ONOO<sup>-</sup>, produciéndose una nitración que inactiva a la TH. El estudio de Dwyer et al. (2021) reveló que la disminución de las neuronas que expresaban TH se mantuvo durante los 6 meses posteriores a la última aplicación de paraquat en ratones C57B16. Por tanto, el paraquat afecta la síntesis de la DA e induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas (See et al., 2022).

Con respecto al transporte de DA, cabe destacar que la permetrina y la deltametrina, insecticidas que pertenecen al grupo de los piretroides, muestran una regulación positiva de la proteína DAT (Kanwar et al., 2022). Dicho aumento genera un incremento de los niveles citosólicos de DA que supera a los mecanismos de vesiculación, generándose diversas sustancias reactivas. La citotoxicidad producida conlleva peroxidación lipídica, degradación de proteínas, daño en el ADN e incluso la apoptosis celular (Pitzer et al., 2021). Esto permite establecer una conexión entre los piretroides y EP.

Se han encontrado altas concentraciones de organoclorados en cerebros de algunos pacientes con EP, aumentando la toxicidad en la SN y provocando la disminución de la función dopaminérgica (Corrigan et al., 2000). Se ha observado post-mórtem un aumento de los niveles de DDT en cerebros de enfermos y cómo sus metabolitos provocaron un importante daño en la DA de la vía nigroestriada (Hatcher et al., 2008).

#### 4.5.3 Reducción de los niveles de BDNF

Los factores neurotróficos son esenciales para la diferenciación, maduración, mantenimiento y supervivencia de las neuronas (Vilar & Mira, 2016). El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una neurotrofina que se encuentra en muchas estructuras cerebrales, entre ellas en la SNpc. Su síntesis parte de una proteína precursora denominada pre-pro-BDNF que sufre una escisión de su péptido señal, convirtiéndose en pro-BDNF, que se libera en vesículas secretoras desde el aparato de Golgi. Aunque el BDNF favorece la formación de dendritas, el pro-BDNF genera efectos opuestos, como la retracción del cono de crecimiento o la reducción axonal al interaccionar con el receptor de neurotrofina p75 (Moyano et al., 2020).

Siendo el BDNF un marcador de supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, diversos estudios se han centrado en establecer su relación con la EP. En el comienzo de los años 2000 se observó que los pacientes con Parkinson presentaban una regulación a la baja de los niveles del ARNm y de la proteína BDNF en la SN, con una disminución del número de neuronas dopaminérgicas (Howells et al., 2000). Los niveles de BDNF también se vieron reducidos en células SH-SY5Y tratadas con paraquat. Además, este tóxico es capaz de incrementar los niveles de interleucina 1 e interleucina 6, factores proinflamatorios que ocasionan la parada del ciclo celular (Zhan et al., 2018). Sin embargo, la gran heterogeneidad que presenta la EP hace que la relación entre la alteración de los niveles de BDNF y el desarrollo de la enfermedad no sea precisa, sino que varíe según el subtipo de la enfermedad, su gravedad y su duración, así como de diversos factores como el género. En este sentido, los estrógenos son hormonas sexuales femeninas capaces de potenciar la transcripción del BDNF al presentar el gen de BDNF un elemento de respuesta para ellos (Brann et al., 2021).

#### 4.5.4 Inducción de la apoptosis

La apoptosis es un proceso muy regulado que juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso. Las células apoptóticas presentan unas características bien definidas que permiten su identificación, como la condensación del núcleo y la posterior división de la cromatina. Estos rasgos se han detectado en las neuronas dopaminérgicas de pacientes que sufrían EP.

Existen dos vías para iniciar la apoptosis, una extrínseca controlada por receptores de muerte que se activan por ligandos extracelulares, y otra intrínseca, de origen mitocondrial, en la que se centran la mayoría de los ensayos. La vía intrínseca se inicia por estímulos como el estrés oxidativo, daños en el ADN o por una obstrucción del flujo sanguíneo. Estos daños aumentan la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria, permitiendo la liberación de proteínas apoptóticas como el citocromo c. Este proceso está regulado por proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) y proteínas proapoptóticas (Bak y Bax), entre las que debe existir un equilibrio (Green & Kroemer, 2004).

Numerosos estudios han determinado que el pesticida paraquat es capaz de inducir la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, en líneas celulares de neuroblastoma SK-N-SH y SH-SY5Y que han sufrido una exposición a este tóxico, la expresión del ARNm de Bcl-2 sufrió una disminución, mientras que se incrementó la expresión de las proteínas proapoptóticas.

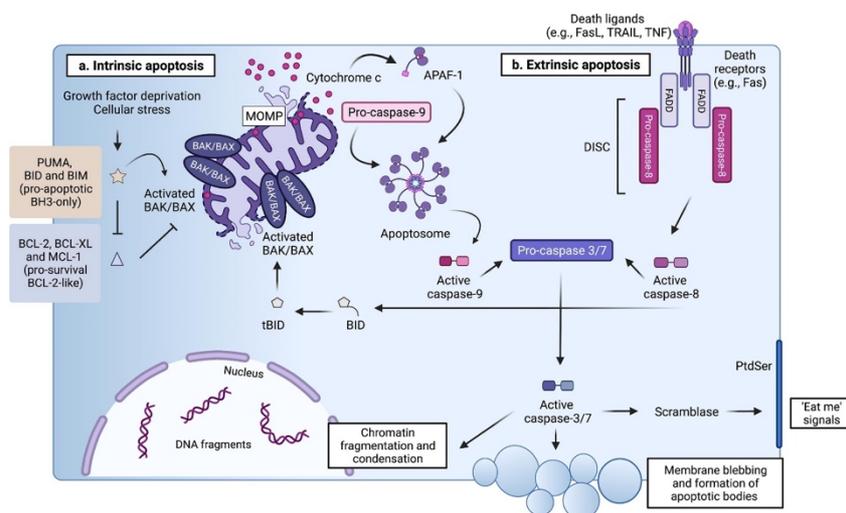


Figura 3. Mecanismos moleculares de la muerte celular apoptótica con la correspondiente activación de diversas caspasas. La vía intrínseca se inicia por factores proapoptóticos; las proteínas BAK/BAX provocan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP). En la vía extrínseca, el reconocimiento del ligando Apo1 o FAS recluta pro-

caspasas 8. Imagen obtenida de Ketelut-Carneiro & Fitzgerald, 2022.

La muerte celular programada puede sufrir una aceleración al amplificarse la vía de señalización apoptótica y producirse la activación de las caspasas. Existen diferentes grupos de caspasas, algunas implicadas en el comienzo de la vía (caspasas 8 y 9) y otras

relacionadas con la degradación celular (caspasas 3,6 y 7); el análisis post-mórtem de cerebros de enfermos de Parkinson mostró mayores niveles de caspasa 3 (Hartmann et al., 2000). Un estudio (Ju et al., 2019) encontró un incremento de 1,9 veces en la expresión de la caspasa 9 en células SH-SY5Y tratadas con paraquat (300  $\mu$ M, 24h). La supervivencia celular no sólo está determinada por los factores neurotróficos, sino que existen otras proteínas como la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) que participan en esta acción. PARP es una enzima encargada de reparar el daño en el ADN, tanto de cadena simple como de doble cadena. Cuando la apoptosis se inicia, las caspasas escinden la molécula de PARP, proceso que está implicado en distintas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo EP (Chaitanya et al., 2010). La exposición a paraquat aumenta la cantidad de PARP escindida.

Los organoclorados, y entre ellos el DDT, también participan en la inducción de la apoptosis. El R-DDT aplicado a células PC12 provoca un incremento de la caspasa 3 y del NF- $\kappa$ B. Una exposición a este insecticida induce una liberación de calcio al citosol de la célula, iniciando la acción de diversos factores apoptóticos (Huang et al., 2022). La figura 4 recopila alguno de los mecanismos de acción de diferentes pesticidas en relación con EP.

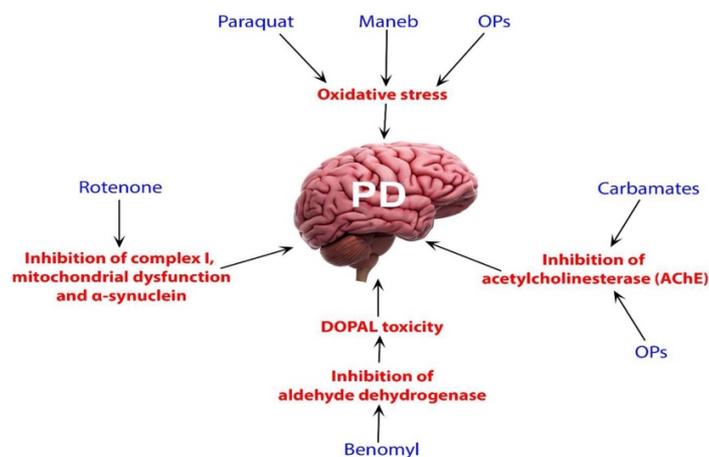


Figura 4. Aproximación a los mecanismos de acción de los pesticidas. Obtenida de Islam et al., 2021.

#### 4.6 Modificación de los miARN

Los microARN (miARN) son unas moléculas de pequeño tamaño, no codificantes, que se unen a la región 3'UTR del ARNm e intervienen en la regulación de su traducción y, por lo tanto, en la síntesis de proteínas. Se ha demostrado que un miARN puede controlar la expresión de varios genes y que un gen puede estar regulado por diferentes miARNs que cooperan sinérgicamente (Costa et al., 2020). En el ser humano existe una gran

cantidad de miARN maduros concentrados sobre todo en los fluidos corporales, fundamentalmente en la sangre y la orina. Estas moléculas están implicadas en procesos esenciales para el desarrollo celular como son la proliferación, la diferenciación celular y la apoptosis. Los miARN se ven alterados en diversas enfermedades, por lo que se han llevado a cabo numerosos ensayos para comprobar cómo se afectan estas moléculas al ser expuestas a pesticidas, así como su posible relación con EP.

#### 4.6.1 MPP<sup>+</sup>

Como ya se ha comentado, el MPP<sup>+</sup> es una toxina que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria e induce la formación de ROS en la mitocondria, generando parkinsonismo al dañar las neuronas dopaminérgicas de la SN, en las que penetra a través de DAT. El paraquat, un herbicida empleado en la agricultura del que ya se han discutido en este trabajo algunas de sus propiedades, guarda una estrecha similitud estructural con el MPP<sup>+</sup>. La exposición de células del neuroblastoma SH-SY5Y a MPP<sup>+</sup> *in vitro* ha permitido observar los cambios en diversos miARN que parecen estar implicados en EP. Uno de estos fue el miARN-505, cuya regulación negativa indujo la muerte celular (Zhu et al., 2018). Además, sus niveles también se encontraron disminuidos en el plasma de pacientes con EP. Un efecto que se observó en miARN-212 fue su regulación a la baja en las células del neuroblastoma como consecuencia de la exposición a MPP<sup>+</sup>. Una sobreexpresión de este miARN permitiría reducir el daño provocado por el MPP<sup>+</sup>, mostrando un efecto neuroprotector al inducir la activación de la vía del factor de transcripción KLF4/Notch (Song et al., 2018). Otro de los miARN implicados fue el miARN-210-3p, que presentaba una regulación al alza. Esta variación condujo a una menor producción de BDNF y a un aumento del daño en las neuronas dopaminérgicas (Zhang et al., 2018). Además, la supresión del miARN-494-3p se mostró como una posible diana terapéutica en EP, ya que esta molécula se encarga de regular negativamente a la sirtuina 3 (SIRT3), implicada en la detoxificación de ROS (Geng et al., 2018; Costa et al., 2020).

Finalmente, cabe destacar la importancia del miARN-7, expresado en el cerebro, que ejerce una actividad neuroprotectora ya que facilita la glucólisis, permitiendo que las neuronas consigan la energía necesaria cuando el MPP<sup>+</sup> bloquea la fosforilación oxidativa (Chaudhuri et al., 2015). Esta molécula regula negativamente la  $\alpha$ -sinucleína uniéndose al extremo 3'UTR de su ARNm. Además, miARN-7 está relacionado con la regulación del crecimiento de las neuritas y la diferenciación neuronal (Chaudhuri et al., 2015).

#### 4.6.2 Paraquat

Como ya se ha mencionado anteriormente, el paraquat aumenta la concentración de ROS y disminuye los niveles de NADPH. La estructura química del paraquat le permite penetrar la BHE a través del transportador de grandes aminoácidos neutros. Cuando las células SH-SY5Y se expusieron a paraquat se encontró una regulación al alza del miARN-153, específico del cerebro (Doxakis, 2010). Se confirmó que el ciclo de reducción del glutatión y los niveles del factor de transcripción Nrf2, que regula los genes de las enzimas antioxidantes, estaban afectados (Doxakis, 2010). Esto hace que el estrés oxidativo aumente, provocando finalmente la muerte celular.

Los niveles de miARN-153, que actúa junto con el miARN-7 en el control de la expresión del gen *SNCA* (que codifica la  $\alpha$ -sinucleína), están aumentados en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de enfermos de Parkinson (Gui et al., 2015). Al aumentar la cantidad del mi-ARN-153, la  $\alpha$ -sinucleína se agrega y se favorece la formación de cuerpos de Lewy, implicados en la EP.

Existen otros mi-ARN regulados a la baja tras la exposición a paraquat, como el miARN-200a, diana del gen que codifica para la proteína beta-catenina, elemento fundamental del complejo de cadherina (Aloizou et al., 2020). Las células SH-SY5Y expuestas a MPP<sup>+</sup> *in vitro* sufrieron una regulación al alza del miARN-200a, con la inhibición de la sirtuina 1 (SIRT1), involucrada en la senescencia. SIRT1 desacetila la proteína supresora de tumores p53 y por consiguiente inhibe la apoptosis mediante BAX y BCL-2, regulando la apoptosis (Salimian et al., 2018).

Las discrepancias encontradas en los ensayos realizados con pacientes y los llevados a cabo *in vitro* podrían estar relacionadas con las diferentes etapas de la enfermedad, perteneciendo los estudios con los pacientes a etapas más tardías. Además, en los modelos *in vitro* no es posible reproducir las vías de neurotransmisión que tienen relación con la EP. Las desigualdades entre los valores encontrados en el plasma y el LCR pueden atribuirse a las distintas funciones que tienen ambos fluidos, a las diferentes sustancias que se encuentran en ellos y al contacto de estos fluidos con tejidos diferentes.

El miARN-34 se reguló al alza en neuronas tratadas con paraquat, con igual efecto en modelos *in vitro* de la enfermedad (Delavar et al., 2018). Esta molécula tiene como diana al gen antiapoptótico *BCL-2*, que participa en la señalización del estrés oxidativo y en vías en las que las neurotrofinas están involucradas. Sin embargo, en ensayos en tejido cerebral de pacientes con Parkinson, los miARN-34b y miARN-34c presentaron una

regulación a la baja (Briggs et al., 2015). Estos miARN controlan la expresión de genes implicados en la enfermedad, como *SNCA*, *PARK-7* y *PINK-1*. Los dos últimos son esenciales para la eliminación de mitocondrias disfuncionales al permitir su ubiquitinación.

Por otro lado, cuando se expusieron células de neuroblastoma de ratón (neuro-2a) a paraquat se observó que el miARN-17, promotor de la proliferación y supresor de la apoptosis, sufrió una regulación a la baja (Wang et al., 2018). Esta molécula induce una regulación negativa sobre el factor de transcripción E2F1, diana de c-myc, pudiendo ser ésta la causa de la disminución de su concentración neuronal (Wang et al., 2018).

También se han detectado algunos miARN asociados al desarrollo celular que se regulan a la baja por paraquat, como miARN-30b, miARN-181b, miARN-29 y miARN de la familia let-7 (Yan et al., 2017; Aloizou et al., 2020). Los niveles de let-7g y let-7c están disminuidos en LCR de pacientes con EP (Gui et al., 2015), mientras que en cerebro humano se ha observado un incremento de los miARN let-7b y let-7e. Los niveles del miembro de la familia let-7f aumentaron en tejido cerebral de ratones *knockout* para el gen de la quinasa LRRK2. Esta familia de proteínas al completo está muy conservada, siendo fundamental en la diferenciación y muerte celular.

#### 4.6.3 Organofosforados

Como ya se ha mencionado, los pesticidas OP inhiben la AChE de forma irreversible. Distintos polimorfismos en los genes de las enzimas responsables del metabolismo de estos pesticidas provocan una variabilidad en la tasa de eliminación de estas moléculas.

El plaguicida OP Diclorvos (2,2-diclorovinil-dimetil fosfato), administrado a células PK15 de epitelio de riñón porcino, provocó una reducción de la proliferación celular al causar apoptosis, observándose un incremento de moléculas propapoptóticas como caspasa 3 y 9, reguladas por el miARN-24, y una disminución de la expresión de genes con actividad antiapoptótica, como *E2F3*, regulado por miARN-34c (Li et al., 2011).

La toxicidad de los OP no se debe únicamente a la inhibición de la AChE. El análisis de miARN mostró una regulación al alza de uno de los inductores de la respuesta al estrés oxidativo, ASK1, demostrando que moléculas de esta vía como el protooncogen *c-Jun*, el miembro 1 de la subfamilia B de homólogos de DNAJ (DNAJB1) y el factor de transcripción ATF3 estaban relacionados con los miARN-24, miARN181a, miARN-122 y miARN27b (Aloizou et al., 2020).

En un estudio sobre los niveles de miARN en suero de personas que habían sufrido una intoxicación por OP, se identificaron 29 miARN regulados al alza, entre ellos el miARN-29 y let-7g, y 8 miARN regulados a la baja, como el miARN-141-5p, que estaban relacionados con la EP (Yuan et al., 2018). Cuando se exponían a OP, las células SH-SY5Y presentaban una regulación a la baja de miARN-let-7g, al igual que el miARN-141 en neuronas de pacientes con EP (Tolosa et al., 2018). Por ello, se puede suponer que ambos miARN están implicados en procesos generales que causan lesiones neuronales que dependen de interacciones con otros compuestos, algo que no puede reproducirse en los ensayos *in vitro*. De igual manera, existe una diferencia en los resultados observados para el miARN-34 entre los ensayos *in vitro* y los realizados en tejido cerebral.

Los estudios sobre el miARN-29a mostraron una reducción de su concentración en LCR y en sangre periférica de pacientes con EP tratados con L-DOPA. Sin embargo, miARN-29b, miARN-138 y miARN-155 se encontraban elevados en las muestras de suero de los enfermos tras una exposición a organofosforados (Yuan et al., 2018).

Además de inhibir la AChE, Clorpirifós (O, O-dietil O-3,5,6-trichloropiridin-2-il fosforotioato), un insecticida OP ampliamente utilizado, provoca un aumento del estrés oxidativo con generación de ROS y la modificación de biomoléculas. Clorpirifós produce una alteración en el eje miARN-19a-AMPK, promoviendo la autofagia junto con la apoptosis. Por otro lado, se produce la inhibición de la proliferación celular y el incremento de miARN-181 inducido por Clorpirifós que regula negativamente la vía de la SIRT1/PGC-1 $\alpha$ /Nrf2 en células SH-SY5Y (Costa et al., 2020).

Por último, para dilucidar la relación de la EP con los tóxicos OP y el miARN-7, se añadió manganeso a células de neuroblastoma SH-SY5Y, que induce el desarrollo de una patología análoga a la EP de tipo idiopático. El miARN-7, regulado a la baja, tiene como diana el gen *SNCA* y el gen del factor de crecimiento FGF-20. El manganeso, a través del miARN-7, aumenta considerablemente la expresión del gen de la  $\alpha$ -sinucleína, causando finalmente un estado tóxico para las neuronas dopaminérgicas (Tarale et al., 2018).

#### 4.6.4 Triazinas (atrazina)

Las triazinas son herbicidas que inhiben la transferencia de electrones que se produce del agua a la clorofila durante la fotosíntesis. La atrazina afecta a las neuronas dopaminérgicas al disminuir la concentración de DA en el cuerpo estriado. Se estudiaron los niveles del miARN-7 en ratas expuestas a atrazina al haberse sugerido previamente

su implicación en la inhibición de la síntesis de  $\alpha$ -sinucleína (Doxakis, 2010), observándose que los niveles del miARN-7 estaban regulados a la baja en sangre periférica y al alza en la SN (Li et al., 2019). Esta diferencia podría deberse a cambios en la regulación de este miARN a lo largo de las diferentes etapas de la enfermedad, por lo que se propuso que el miARN-7 podría emplearse como marcador de diagnóstico temprano. Este miARN parece interferir en otros procesos, como la regulación del factor neurotrófico BDNF (Li et al., 2019).

Otro estudio efectuado en cerebro de rata encontró que el miARN-181a-2-3p, relacionado con el estrés oxidativo, y el gen *PRKN*, conocido también como *PARK2* que codifica la E3 ubiquitín ligasa parkina, presentaban una regulación positiva. De manera opuesta, el miARN-34a-3p, encargado de la regulación del gen *BCL-2*, mostraba una regulación a la baja (Li et al., 2019).

En estudios llevados a cabo en el pez cebra se encontró que diferentes miARN implicados en los procesos de angiogénesis y desarrollo neural estaban desregulados, entre ellos el miARN-126-3p, que presentaba una regulación negativa (Wirbisky & Freeman, 2017).

El miARN-126-3p está regulado al alza en el suero de pacientes expuestos a OP y en muestras de neuronas dopaminérgicas de enfermos de EP a las que se le realizaron miARN arrays. Sin embargo, su regulación se vio reducida en el LCR y en las células mononucleares de sangre periférica de enfermos de EP. Las dianas de esta molécula son el factor de crecimiento insulínico (IGF1) y PI3K, que son reguladas negativamente y conllevan la producción de células sensibles a neurotoxinas (Kim et al., 2014). Por ello, se concluye que la alteración de la expresión de miARN126 puede inducir EP y que la exposición a atrazina puede producir esta alteración.

#### 4.6.5 Organoclorados

Estos pesticidas bloquean la acción del neurotransmisor GABA, que hiperpolariza la membrana de las neuronas al unirse a su receptor GABA<sub>A</sub>, permitiendo la entrada de cloruro. Además, el DDT impide el paso de iones potasio y ralentiza el cierre del canal de sodio dependiente de voltaje. Otro efecto que conlleva es el aumento de la toxicidad al interferir con la ATPasa (Patro et al., 2011, Kanwar et al., 2022).

Los modelos animales expuestos a DDT muestran una regulación al alza de miARN-190. En cambio, su diana *Tp53*, un gen supresor de tumores sufrió una regulación a la baja (Kalinina et al., 2018). Este gen está implicado en la respuesta a una situación de estrés

oxidativo y su producto (p53) ejerce entre otras una acción antioxidante. Por ello, una alteración en la regulación de este miARN provoca un aumento del estrés oxidativo y la disminución del número de neuronas dopaminérgicas. Moscas expuestas a DDT mostraron una regulación a la baja de la concentración de miARN-310-3p, miARN-311-3p, miARN-312-3p y miARN-313-3p en moscas sensibles a dicho pesticida. Este resultado no se observó en moscas resistentes al DDT, deduciéndose la implicación de estas moléculas en el proceso de detoxificación del DDT (Seong et al., 2019). Otro de los miARN desregulados tras la exposición a DDT fue let-7b-5p, relacionado con la EP. Este miARN, al igual que el miARN-29a, estaba regulado negativamente en los ensayos *in vitro*, en LCR y en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con EP. Estos compuestos son metabolizados en el hígado gracias a las enzimas CYP, siendo los pesticidas o la cafeína algunos de sus sustratos. Se ha descrito que los compuestos organoclorados inducen mutaciones en los genes que codifican para las enzimas CYP, generándose diferentes polimorfismos. Esto provoca la alteración del metabolismo de sus sustratos y posiblemente el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EP (Docea et al., 2017, Aloizou et al., 2020).

#### 4.6.6 Conazoles

Los conazoles son fungicidas que bloquean la producción de ergosterol, un componente de la membrana de los hongos que tiene la misma función que cumple el colesterol en mamíferos, siendo, además, un precursor de la vitamina D<sub>2</sub>.

Se sabe que el miARN-9 está regulado positivamente en células PC12 (células derivadas del tumor feocromocitoma que se encuentran en la médula suprarrenal de la rata) tratadas con MPP<sup>+</sup> (Delavar et al., 2018). Además, miARN-9 está regulado al alza en las neuronas dopaminérgicas de los enfermos de EP. Por ello, se establece una conexión entre la EP y el miARN-9. El incremento del miARN anteriormente mencionado provoca una disminución del factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), esencial para la supervivencia neuronal.

El efecto de los triazoles se estudió en líneas hepáticas, detectándose algunos miARN con una regulación inadecuada. Entre ellos, tras una exposición tardía, estaban los miARN-1246 y miARN-20b, regulados negativamente; estos miARN están relacionados con la axogénesis neuronal (An et al., 2013). En ensayos posteriores se determinó que los miARN desregulados en etapas tempranas tras la exposición estaban implicados en la

alteración de proteínas, mientras que los que se desregulaban en etapas posteriores se relacionaban con el desarrollo y el ciclo celular (An et al., 2013, Aloizou et al., 2020).

#### 4.6.7 Rotenona

Para poder dilucidar la relación entre los miARN, la EP y el insecticida rotenona, se estudió el cuerpo estriado de ratas expuestas al tóxico que habían desarrollado parkinsonismo. Se observó un incremento de los miARN-26a y miARN-34a, junto con un descenso en los miARN-7 y let-7a (Horst et al., 2018). Este estudio fue determinante, ya que permitió correlacionar los datos de miARN obtenidos en ensayos con enfermos de EP con los de los modelos animales de EP inducidos por el tóxico, al tiempo que confirmó la importancia de los ensayos con miARN tras la exposición a rotenona en relación con la EP. La regulación al alza del miARN-34a, relacionada con la desregulación del gen *BCL-2*, se observó en ensayos *in vitro*, en muestras de sangre y en células neuronales progenitoras (Horst et al., 2018). En los ensayos con miARN-7 tras la exposición a rotenona se observó una regulación a la baja tanto en los ensayos *in vitro* con manganeso (responsable de provocar un síndrome semejante a la EP) como en cerebros de pacientes con EP de inicio tardío (Horst et al., 2018). miARN-7 provoca la desregulación del BDNF y de la  $\alpha$ -sinucleína, aumentando la agregación de esta última.

Continuando con los miARN estudiados, let-7a se encontraba reducido en los ensayos *in vitro* y en el plasma de los pacientes con EP. Por último, mediante perfiles de expresión de miARN se observó que el miARN-26a sufrió una regulación positiva en el LCR y en neuronas afectadas en la EP (Briggs et al., 2015).

### **4.7 Alteraciones genéticas y epigenéticas**

A medida que avanzan las investigaciones, parece confirmarse que los pesticidas provocan modificaciones genéticas y epigenéticas. Estas se producirían, sobre todo, en genes implicados en procesos celulares importantes como la regulación del ciclo celular y los procesos redox.

El metaanálisis publicado por Goldman et al., (2012) permitió establecer una relación entre la exposición a los pesticidas y los diferentes polimorfismos génicos encontrados. Estas modificaciones, inducidas por la exposición a los tóxicos, parece que incrementaron la susceptibilidad a desarrollar EP. Uno de los genes modificados en enfermos de EP que estuvieron en contacto con el pesticida paraquat es el de la enzima glutatión S-transferasa

(*GST*), que sufrió deleciones homocigóticas en los tipos M1 (*GSTM1*) y T1 (*GSTT1*) (Goldman et al., 2012).

La exposición a compuestos organoclorados conlleva la alteración de los genes *SLC6A3* y *ABCB1*. El gen *ABCB1* codifica una proteína transportadora transmembrana, la P-glicoproteína, implicada en el paso de moléculas xenobióticas (Kelada et al., 2006; Dutheil et al., 2010). Por otro lado, el gen *SLC6A3* es comúnmente conocido como *DAT1* y codifica el DAT.

Numerosos estudios han relacionado los cambios epigenéticos con la patogenicidad de enfermedades como la de Parkinson. Cuando células dopaminérgicas N27 se expusieron al pesticida paraquat, se produjo la acetilación de las histonas H3, afectándose la supervivencia celular al promoverse la apoptosis (Song et al., 2011). Otro pesticida que provoca modificaciones epigenéticas es la dieldrina, acetilando tanto las histonas H3 como las H4 (Song et al., 2010).

## **5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

Parece evidente que los pesticidas pueden provocar la alteración del metabolismo normal de la célula, induciendo un aumento del estrés oxidativo y alterando el sistema UPS y la función mitocondrial, entre otros efectos; en las neuronas dopaminérgicas de la SN, esto produce la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína y neurotoxicidad, siendo ambas características destacadas de la EP.

Pesticidas como paraquat, rotenona, organofosforados, organoclorados, maneb, benomil, atrazinas, piretroides o conozoles, modifican rutas moleculares de las neuronas dopaminérgicas que están relacionadas con el desarrollo de la EP.

La dificultad para realizar ensayos en humanos implica que el análisis de los procesos alterados por la exposición a pesticidas se realiza mayoritariamente post-mórtem. Esta es, probablemente, una de las causas de las contradicciones encontradas en los resultados de los experimentos *in vitro* e *in vivo*. Los experimentos *in vitro* no permiten establecer ni identificar todas las interacciones moleculares y celulares que se producen en la exposición humana a estos tóxicos, y tampoco tener en cuenta las diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad.

Los avances en el estudio de los miARN han abierto nuevas vías en la comprensión y, posiblemente, el tratamiento de diversas enfermedades. Estas moléculas juegan un papel fundamental en el desarrollo de rutas celulares responsables del correcto funcionamiento

y la supervivencia celular, y su desregulación es capaz de desencadenar problemas como los que caracterizan a las enfermedades neurodegenerativas. La exposición a pesticidas produce alteraciones en los niveles de diversos miARN, mostrando diferentes estudios de forma consistente que los más afectados en la EP fueron los miARN-181, miARN-29, miARN-30, miARN-34, miARN-7 y la familia let-7. Numerosas evidencias sugieren que los miARN pueden utilizarse como un biomarcador que permita una detección temprana de la enfermedad.

En relación con el efecto de los pesticidas, cabe destacar la relevancia que tienen diferentes variaciones génicas en la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, como las que afectan a NOS1, a la enzima GST o al gen *ABCB1*. Los estudios de epigenética indican que los pesticidas pueden alterar el patrón de metilación del ADN y de las histonas, induciéndose modificaciones en genes implicados en la señalización celular, el transporte de moléculas y la activación de caspasas.

Se necesitan estudios que permitan desarrollar nuevos pesticidas cuyo uso no comprometa la salud humana. Además, un mayor conocimiento de las moléculas alteradas en las diferentes rutas modificadas por los pesticidas permitirá desarrollar nuevas estrategias para mejorar el curso de la EP e incluso evitarla, antes de que esta enfermedad se convierta en una pandemia.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad MH, Fatima M, Ali M, Rizvi MA & Mondal AC (2021). Naringenin alleviates paraquat-induced dopaminergic neuronal loss in SH-SY5Y cells and a rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 201.
- Aloizou AM, Siokas V, Sapouni EM, Sita N, Liampas I, Brotis AG, Rakitskii VN, Burykina TI, Aschner M, Bogdanos DP, Tsatsakis A, Hadjigeorgiou GM & Dardiotis E (2020). Parkinson's disease and pesticides: Are microRNAs the missing link? *Science Total Environ.*, 744.
- An YR, Kim SJ, Oh MJ, Kim HM, Shim IS, Kim PJ, ... & Hwang SY (2013). Analysis of microRNA and gene expression profiling in triazole fungicide-treated HepG2 cell line. *Toxicology*, 303, 94-98.
- Anderson CC, Marentette JO, Rauniyar AK, Prutton KM, Khatri M, Matheson C, ... & Roede JR (2021). Maneb alters central carbon metabolism and thiol redox status in a toxicant model of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.*, 162, 65-76.
- Balestrino R & Schapira AHV (2020). Parkinson disease. *Eur J Neurol.*, 27(1),27-42.
- Bandookwala M & Sengupta P (2020). 3-Nitrotyrosine: A versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases. *Intl J Neurosci.*, 130(10), 1047-1062.
- Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, ... & Turnbull DM (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet.*, 38(5), 515-517.
- Benedico E (2002). Insecticidas organofosforados: "De la guerra química al riesgo laboral y doméstico". *Medifam.* 12. 1.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen-Steur EN & Braak E (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24(2), 197-211.
- Brann DW, Lu Y, Wang J, Zhang Q, Thakkar R, Sareddy GR, Pratap UP, Tekmal RR & Vadlamudi RK (2021) Brain-derived estrogen and neural function. *Neurosci Biobehav Rev.*, 132,793-817.

- Briggs CE, Wang Y, Kong B, Woo TUW, Iyer LK & Sonntag KC (2015). Midbrain dopamine neurons in Parkinson's disease exhibit a dysregulated miRNA and target-gene network. *Brain Res.* 1618, 111-121.
- Burke WJ, Li SW, Williams EA, Nonneman R & Zahm DS (2003). 3, 4-Dihydroxyphenylacetaldehyde is the toxic dopamine metabolite in vivo: implications for Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Res.*, 989(2), 205-213.
- Cai J, Yang J & Jones DP (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*, 1366(1-2), 139-149.
- Cerri S, Mus L & Blandini F (2019). Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? In *J Parkinson's Dis.*, 9(3), 501-515.
- Chaudhuri AD, Kabaria S, Choi DC, Mouradian MM & Junn E (2015). MicroRNA-7 promotes glycolysis to protect against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *J Biol Chem.*, 290(19), 12425-12434.
- Chaitanya GV, Steven AJ & Babu PP (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.*, 8, 31.
- Chen T, Tan J, Wan Z, Zou Y, Afewerky HK, Zhang Z & Zhang T (2017). Effects of commonly used pesticides in China on the mitochondria and ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Int J Mol Sci.*, 18(12).
- Costa C, Teodoro M, Rugolo CA, Alibrando C, Giambò F, Briguglio G & Fenga C (2020). MicroRNAs alteration as early biomarkers for cancer and neurodegenerative diseases: New challenges in pesticides exposure. *Toxicol Rep.*, 7, 759-767.
- Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE & Mann D (2000). Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A*, 59(4), 229-234.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM & Kopin IJ (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.*, 1(3), 249-254.
- Day JO & Mullin S (2021). The genetics of parkinson's disease and implications for clinical practice. *Genes*, 12(7).
- Delavar MR, Baghi M, Safaeinejad Z, Kiani-Esfahani A, Ghaedi K & Nasr-Esfahani MH (2018). Differential expression of miR-34a, miR-141, and miR-9 in MPP+-treated differentiated PC12 cells as a model of Parkinson's disease. *Gene*, 662, 54-65.
- Docea AO, Vassilopoulou L, Fragou D, Arsene AL, Fenga C, Kovatsi L, ... & Drakoulis N (2017). CYP polymorphisms and pathological conditions related to chronic exposure to organochlorine pesticides. *Toxicol Rep.*, 4, 335-341.
- Doxakis E (2010). Post-transcriptional regulation of  $\alpha$ -synuclein expression by mir-7 and mir-153. *J Biol Chem.*, 285(17), 12726-12734.
- Dutheil F, Beaune P, Tzourio C, Lorient MA & Elbaz A (2010). Interaction between ABCB1 and professional exposure to organochlorine insecticides in Parkinson disease. *Arch Neurol.*, 67(6), 739-745.
- Dwyer Z, Rudyk C, Farmer K, Beauchamp S, Shail P, Derksen A, Fortin T, Ventura K, Torres C, Ayoub K & Hayley S (2021) Characterizing the protracted neurobiological and neuroanatomical effects of paraquat in a murine model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 100, 11-21.
- Fitzmaurice AG, Rhodes SL, Lulla A, Murphy NP, Lam HA, O'Donnell KC, ... & Bronstein JM (2013). Aldehyde dehydrogenase inhibition as a pathogenic mechanism in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci.*, 110(2), 636-641.
- Fukushima T, Tawara T, Isobe A, Hojo N, Shiwaku K & Yamane Y (1995) Radical formation site of cerebral complex I and Parkinson's disease. *J Neurosci Res.*, 42(3), 385-390.
- Fukushima T, Yamada K, Isobe A, Shiwaku K & Yamane Y (1993) Mechanism of cytotoxicity of paraquat: I.NADH oxidation and paraquat radical formation via complex I. *Exp Toxicol Pathol.*, 45(5), 345-349.
- Geng L, Zhang T, Liu W & Chen Y (2018). miR-494-3p modulates the progression of in vitro and in vivo Parkinson's disease models by targeting SIRT3. *Neurosci Lett.*, 675, 23-30.
- Georgiadis G, Mavridis C, Belantis C, Zisis IE, Skamagkas I, Fragkiadoulaki I, ... & Mamoulakis C (2018). Nephrotoxicity issues of organophosphates. *Toxicology*, 406, 129-136.
- Goldstein DS, Sullivan P, Holmes C, Kopin IJ, Basile MJ & Mash DC (2011). Catechols in post-mortem brain of patients with Parkinson disease. *Eur J Neurol.*, 18(5), 703-710.
- Goldman SM, Kamel F, Ross GW, Bhudhikanok GS, Hoppin JA, Korell M, ... & Tanner CM (2012). Genetic modification of the association of paraquat and Parkinson's disease. *Mov Disord.*, 27(13), 1652-1658.
- Green DR & Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), 626-629.

- Gui Y, Liu H, Zhang L, Lv W & Hu X (2015). Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*, 6(35).
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, ... & Hirsch EC (2000). Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci.*, 97(6), 2875-2880.
- Hatcher JM, Delea KC, Richardson JR, Pennell KD & Miller GW (2008). Disruption of dopamine transport by DDT and its metabolites. *Neurotoxicology*, 29(4), 682-690.
- Horst CH, Schlemmer F, de Aguiar-Montenegro N, Domingues ACM, Ferreira GG, da Silva-Ribeiro CY, ... & Titze-de-Almeida R (2018). Signature of aberrantly expressed microRNAs in the striatum of rotenone-induced Parkinsonian rats. *Neurochem Res.*, 43, 2132-2140.
- Howells DW, Porritt M, Wong JYF, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ & Donnan GA (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol.*, 166(1), 127-135.
- Huang M, Bargues-Carot A, Riaz Z, Wickham H, Zenitsky G, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy A & Kanthasamy AG (2022). Impact of Environmental Risk Factors on Mitochondrial Dysfunction, Neuroinflammation, Protein Misfolding, and Oxidative Stress in the Etiopathogenesis of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.*, 23(18).
- Islam MS, Azim F, Saju H, Zargaran A, Shirzad M, Kamal M, Fatema K, Rehman S, Azad MAM & Ebrahimi-Barough S (2021). Pesticides and Parkinson's disease: Current and future perspective. *J Chem Neuroanat.*, 115.
- Ji H, Xu L, Wang Z, Fan X & Wu L (2018). Differential microRNA expression in the prefrontal cortex of mouse offspring induced by glyphosate exposure during pregnancy and lactation. *Exp Ther Med.*, 15(3), 2457-2467.
- Ju DT, Sivalingam K, Kuo WW, Ho TJ, Chang RL, Chung LC, Day CH, Viswanadha VP, Liao PH & Huang CY (2019) Effect of vasicinone against paraquat-induced MAPK/p53-mediated apoptosis via the IGF-1R/PI3K/AKT Pathway in a Parkinson's disease-associated SH-SY5Y cell model. *Nutrients*, 11 (7).
- Kalinina TS, Kononchuk VV, Ovchinnikov VY, Chanyshv MD & Gulyaeva LF (2018). Expression of the miR-190 family is increased under DDT exposure in vivo and in vitro. *Mol Biol Rep.*, 45, 1937-1945.
- Kanwar-Rajawat N, Bhardwaj K & Mathur N (2022). Risk of Parkinson disease associated with pesticide exposure and protection by probiotics. *Materials Today: Proceedings*, 69, A1-A11.
- Kelada SN, Checkoway H, Kardia SL, Carlson CS, Costa-Mallen P, Eaton DL, ... & Costa LG (2006). 5' and 3' region variability in the dopamine transporter gene (SLC6A3), pesticide exposure and Parkinson's disease risk: a hypothesis-generating study. *Hum Mol Genet.*, 15(20), 3055-3062.
- Ketelut-Carneiro N & Fitzgerald KA (2022). Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis-Oh My! The Many Ways a Cell Can Die. *J Mol Biol.* 434(4).
- Kim W, Lee Y, McKenna ND, Yi M, Simunovic F, Wang Y, ... & Sonntag KC (2014). miR-126 contributes to Parkinson's disease by dysregulating the insulin-like growth factor/phosphoinositide 3-kinase signaling. *Neurobiol Aging*, 35(7), 1712-1721.
- Kumar A, Leinisch F, Kadiiska MB, Corbett J & Mason RP (2016). Formation and Implications of Alpha-Synuclein Radical in Maneb- and Paraquat-Induced Models of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol.*, 53(5), 2983-2994.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW & Irwin I (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979-980.
- Langston J. W. (2017). The MPTP Story. *J Parkinson's Dis.*, 7(s1), S11-S19.
- Li B, Jiang Y, Xu Y, Li Y & Li B (2019). Identification of miRNA-7 as a regulator of brain-derived neurotrophic factor/ $\alpha$ -synuclein axis in atrazine-induced Parkinson's disease by peripheral blood and brain microRNA profiling. *Chemosphere*, 233, 542-548.
- Li H, Wu S, Ma X, Li X, Cheng T, Chen Z, Wu J, Lv L, Li L, Xu L, Wang W, Hu Y, Jiang H, Yin Y, Qiu Z & Hu X (2021). Co-editing PINK1 and DJ-1 Genes Via Adeno-Associated Virus-Delivered CRISPR/Cas9 System in Adult Monkey Brain Elicits Classical Parkinsonian Phenotype. *Neurosci. Bull.*, 37(9), 1271-1288.
- Li S, Ran XQ, Xu L & Wang JF (2011). microRNA and mRNA expression profiling analysis of dichlorvos cytotoxicity in porcine kidney epithelial PK15 cells. *DNA Cell Biol.*, 30(12), 1073-1083.
- Li S, Ritz B, Gong Y, Cockburn M, Folle AD, del Rosario I, Yu Y, Zhang K, Castro E, Keener AM, Bronstein J & Paul KC (2023). Proximity to residential and workplace pesticides application and the risk of progression of Parkinson's diseases in Central California. *Sci Total Environ.*, 864.
- Longhena F, Faustini G, Spillantini MG & Bellucci A (2019). Living in Promiscuity: The Multiple Partners of Alpha-Synuclein at the Synapse in Physiology and Pathology. *Int J Mol Sci.*, 20(1), 141.
- Maitra U, Scaglione MN, Chtarbanova S, O'Donnell JM, (2019) Innate immune responses to paraquat exposure in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Sci Rep*, 9(1), 12714.

- Masato A, Plotegher N, Boassa D & Bubacco L (2019) Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. *Mol Neurodegener.*, 14(1), 35.
- Mdeni NL, Adeniji AO, Okoh AI & Okoh OO (2022). Analytical Evaluation of Carbamate and Organophosphate Pesticides in Human and Environmental Matrices: A Review. *Molecules* 27(3), 618.
- Meiser J, Weindl D & Hiller K (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal.*, 11(1), 1-18.
- Mittra N, Chauhan AK, Singh G, Patel DK & Singh C (2020) Postnatal zinc or paraquat administration increases paraquat or zinc-induced loss of dopaminergic neurons: insight into augmented neurodegeneration. *Mol Cell Biochem.*, 467(1-2), 27-43.
- Mohammadi H, Ghassemi-Barghi N, Malakshah O & Ashari S (2019). Pyrethroid exposure and neurotoxicity: a mechanistic approach. *Arh Hig Rada Toksikol.*, 70(2), 74-89.
- Moustafa AA, Chakravarthy S, Phillips JR, Gupta A, Keri S, Polner B, Frank MJ & Jahanshahi M (2016). Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. *Neurosci Biobehav Rev.*, 68, 727-740.
- Moyano P, Sanjuan J, García JM, Anadon MJ, Naval MV, Sola E, ... & Del Pino J (2020). Dysregulation of prostaglandine E2 and BDNF signaling mediated by estrogenic dysfunction induces primary hippocampal neuronal cell death after single and repeated paraquat treatment. *Food Chem Toxicol.*, 144, 111611.
- Navarro-Yepes J, Anandhan A, Bradley E, Bohovych I, Yarabe B, de Jong A, Ovaia H, Zhou Y, Khalimonchuk O, Quintanilla-Vega B & Franco R (2016) Inhibition of protein ubiquitination by paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridinium impairs ubiquitin-dependent protein degradation pathways. *Mol Neurobiol* 53(8):5229-5251.
- Patro N, Saxena M, Kumar K, Patro IK, Srivastava UC & Kumar S (2011). Developmental neurotoxicity of pyrethroids: structural and functional retardation. *Emerg. Trends Zoology*, 1-21.
- Pitzer EM, Williams MT & Vorhees CV (2021). Effects of pyrethroids on brain development and behavior: Deltamethrin. *Neurotoxicol Teratol.*, 87.
- Powers R, Lei S, Anandhan A, Marshall DD, Worley B, Cerny RL, Dodds ED, Huang Y, Panayiotidis MI, Pappa A & Franco R (2017). Metabolic Investigations of the Molecular Mechanisms Associated with Parkinson's Disease. *Metabolites*, 7(2), 22.
- Prusiner SB, Woerman AL, Mordes DA, Watts JC, Rampersaud R, Berry DB, Patel S, Oehler A, Lowe JK, Kravitz SN, Geschwind DH, Glidden DV, Halliday GM, Middleton LT, Gentleman SM, Grinberg LT & Giles K (2015). Evidence for  $\alpha$ -synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc Nat Acad Sci U S A.*, 112(38), E5308-E5317.
- Ramsay RR, Kowal AT, Johnson MK, Salach JI & Singer TP (1987). The inhibition site of MPP+, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.*, 259(2), 645-649.
- Ravi SK, Narasingappa RB, Joshi CG, Girish TK & Vincent B (2018) Neuroprotective effects of Cassia tora against paraquat-induced neurodegeneration: relevance for Parkinson's disease. *Nat Prod Res.*, 32(12), 1476-1480.
- Repici M & Giorgini F (2019). DJ-1 in Parkinson's disease: Clinical insights and therapeutic perspectives. *J Clin Med.*, 8(9).
- Richardson JR, Fitsanakis V, Westerink RHS & Kanthasamy AG (2019). Neurotoxicity of pesticides. In *Acta Neuropathol.*, 138(3), 343-362.
- Sabarwal A, Kumar K & Singh RP (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health- Cancer and other associated disorders. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 63, 103-114.
- Saito Y (2014). Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease. *J Clin Biochem Nutr.*, 54, 138-144.
- Salimian N, Peymani M, Ghaedi K & Esfahani MHN (2018). Modulation in miR-200a/SIRT1axis is associated with apoptosis in MPP+-induced SH-SY5Y cells. *Gene*, 674, 25-30.
- Sarkar S, Malovic E, Harishchandra DS, Ghaisas S, Panicker N, Charli A, ... & Kanthasamy AG (2017). Mitochondrial impairment in microglia amplifies NLRP3 inflammasome proinflammatory signaling in cell culture and animal models of Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Dis.*, 3(1), 30.
- See WZC, Naidu R & Tang KS (2022). Cellular and Molecular Events Leading to Paraquat-Induced Apoptosis: Mechanistic Insights into Parkinson's Disease Pathophysiology. *Mol Neurobiol.*, 59(6), 3353-3369.
- Seong KM, Coates BS & Pittendrigh BR (2019). Impacts of sub-lethal DDT exposures on microRNA and putative target transcript expression in DDT resistant and susceptible *Drosophila melanogaster* strains. *Front Genet.*, 10, 45.
- Sheets LP (2000). A consideration of age-dependent differences in susceptibility to organophosphorus and pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology*, 21(1-2), 57-63.

- Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K & Shiono H (2001). Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res.*, 906(1-2), 135–142.
- Shukla AK, Pragma P, Chaouhan HS, Patel DK, Abdin MZ & Kar Chowdhuri D (2014) Mutation in *Drosophila methuselah* resists paraquat induced Parkinson-like phenotypes. *Neurobiol Aging*, 35(10), 2419.e1-2419e16.
- Song C, Kanthasamy A, Anantharam V, Sun F & Kanthasamy AG (2010). Environmental neurotoxic pesticide increases histone acetylation to promote apoptosis in dopaminergic neuronal cells: relevance to epigenetic mechanisms of neurodegeneration. *Mol Pharmacol.*, 77(4), 621-632.
- Song C, Kanthasamy A, Jin H, Anantharam V & Kanthasamy AG (2011). Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. *Neurotoxicology*, 32(5), 586-595.
- Song Y, Liu Y & Chen X (2018). MiR-212 attenuates MPP<sup>+</sup>-induced neuronal damage by targeting KLF4 in SH-SY5Y cells. *Yonsei Med J.*, 59(3),416.
- Surmeier DJ, Obeso JA & Halliday GM (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 18(2), 101–113.
- Tarale P, Daiwile AP, Sivanesan S, Stöger R, Bafana A, Naoghare PK, ... & Krishnamurthi K (2018). Manganese exposure: Linking down-regulation of miRNA-7 and miRNA-433 with  $\alpha$ -synuclein overexpression and risk of idiopathic Parkinson's disease. *Toxicol in Vitro*, 46, 94-101.
- Tolosa E, Botta-Orfila T, Morató X, Calatayud C, Ferrer-Lorente R, Martí M J, ... & Fernández-Santiago R (2018). MicroRNA alterations in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson disease patients. *Neurobiol Aging*, 69, 283-291.
- Uversky, VN. (2004). Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res.*, 318(1), 225-241.
- Vellingiri B, Chandrasekhar M, Sri Sabari S, Gopalakrishnan AV, Narayanasamy A, Venkatesan D, Iyer M, Kesari K & Dey A (2022). Neurotoxicity of pesticides – A link to neurodegeneration. *Ecotoxicol Environ Saf*, 243.
- Vilar M & Mira H (2016) Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles. *Front Neurosci.*, ,10,26.
- Wang A, Costello S, Cockburn M, Zhang X, Bronstein J & Ritz B (2011). Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol.*, 26, 547-555.
- Wang Q, Zhan Y, Ren N, Wang Z, Zhang Q, Wu S, & Li H (2018). Paraquat and MPTP alter microRNA expression profiles, and downregulated expression of miR-17-5p contributes to PQ-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Appl Toxicol.*, 38(5), 665-677.
- Westerink, RH (2014). Modulation of cell viability, oxidative stress, calcium homeostasis, and voltage-and ligand-gated ion channels as common mechanisms of action of (mixtures of) non-dioxin-like polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers. *Environ Sci Pollut Res.*, 21, 6373-6383.
- Wirbisky SE & Freeman, JL (2017). Atrazine exposure elicits copy number alterations in the zebrafish genome. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, 194, 1-8.
- Yan M, Dou T, Lv W, Wang X, Zhao L, Chang X & Zhou Z (2017). Integrated analysis of paraquat-induced microRNAs-NA5 changes in human neural progenitor cells. *Toxicol in Vitro*, 44, 196-205.
- Yang JM, Huang HM, Cheng JJ, Huang CL, Lee YC, Chiou CT, Huang HT, Huang NK & Yang YC (2018) LGK974, a PORCUPINE inhibitor, mitigates cytotoxicity in an in vitro model of Parkinson's disease by interfering with the WNT/beta-CATENIN pathway. *Toxicology*, 410, 65–72.
- Yuan S, Gao Y, Ji W, Song J & Mei X (2018). The evaluation of acute physiology and chronic health evaluation II score, poisoning severity score, sequential organ failure assessment score combine with lactate to assess the prognosis of the patients with acute organophosphate pesticide poisoning. *Medicine*, 97(21) e10862.
- Yuan Y, Ma X, Song N & Xie J (2022). Expanding Views of Mitochondria in Parkinson's Disease: Focusing on PINK1 and GBA1 Mutations. *Neurosci Bull.*, 38(7), 825–828.
- Zhan X, Li F, Chu Q & Pang H (2018). Effects of PQ's cytotoxicity on secretory vesicles in astroglia: Expression alternation of secretogranin II and its potential interaction with intracellular factors. *Biochem Biophys Res Comm.*, 497(2), 675-682.
- Zhang S, Chen S, Liu A, Wan J, Tang L, Zheng N & Xiong Y (2018). Inhibition of BDNF production by MPP<sup>+</sup> through up-regulation of miR-210-3p contributes to dopaminergic neuron damage in MPTP model. *Neurosci Lett.*, 675, 133-139.
- Zhu J, Wang S, Liang Y & Xu X (2018). Inhibition of microRNA-505 suppressed MPP<sup>+</sup>-induced cytotoxicity of SHSY5Y cells in an in vitro Parkinson's disease model. *Eur J Pharmacol.*, 835, 11-18.