

**TESIS DOCTORAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**CAMBIOS EN EL UMBRAL OLFATIVO A LO LARGO DEL  
CICLO MENSTRUAL**

**M.C. EVELIA NAVARRETE PALACIOS**

Facultad de Medicina, UNAM

Profesor Titular de Fisiología General y Humana

Escuela Médico Militar. Universidad del Ejército y Fuerza Aérea

**TUTOR: Dra. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN**

Depto. de Fisiología. Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

**ASESORES: Dra. ROBYN E. HUDSON**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Depto. De Biología Celular y Fisiología

Universidad Nacional Autónoma de México

**Dr. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA**

Depto. de Investigación Fisiológica. Fac. de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A la Mente Suprema por sembrarme una idea.**

La línea de investigación y la guía correcta, firme y oportuna para la materialización de esta tesis se las debo a mi Comité Tutoral, cuyos miembros, trabajando codo a codo junto con el grupo de personal técnico del laboratorio de Fisiología de la UNAM, hicieron posible la puesta en marcha y los avances oportunos de este trabajo.

Agradezco a las autoridades de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, así como a la comunidad docente y científica de las Escuelas Médico Militar y de Graduados de Sanidad, por el tiempo y las facilidades para compartir su espacio de trabajo para la aplicación de las pruebas. A mis apreciados alumnos de segundo año de la carrera de medicina, por su entusiasta participación.

Un reconocimiento a las autoridades de la SEP, del INSEN y a los padres de familia de la población infantil que junto con sus maestros, imbuieron en los alumnos la mentalidad de apoyo a la comunidad científica, permitiendo que se involucraran en el logro de los objetivos del presente estudio de una manera activa.

A los integrantes de mi familia, que me brindaron su apoyo incondicional, resistiendo las constantes desveladas, cambios de talante y modificación de los "roles" asignados a la actividades hogareñas, y que por su entereza y fuerza de voluntad hicieron posible que yo continuara hasta el final en esta investigación. Agradezco a mi madre el haberme educado en un clima de igualdad de oportunidades y a mis hermanos que contribuyeron en el desarrollo de mis habilidades.

A mi General Ward Díaz, Comandante de la 1ª. Brigada de Ingenieros, quien con su acicate hizo posible que no olvidara yo mi objetivo científico, a pesar de vivir una intensa etapa castrense que no se compaginaba con la ciencia.

A mi Coronel Ingeniero Constructor Tirzo E. Figueroa, quien me brindó su preciado tiempo y su valiosa amistad y quien basándose en su experiencia, me permitió descubrir que la solución a los problemas está buscando opciones alternativas.

Mis infinitas gracias a mi maestra Ana María Sánchez que aceptó ser mi revisora de estilo en este manuscrito. Agradezco el apoyo económico del CONACYT y de DGAPA para el impulso de la Ciencia en México. Asimismo, agradezco a Evita por su amable y oportuno apoyo en todos los trámites administrativos del posgrado.

Y mil gracias a todos aquellos que mi memoria no cita en este momento, pero que de una u otra forma contribuyeron al alcance de los objetivos planteados para esta investigación.

## ÍNDICE

	No. página
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	04
<b>RESUMEN</b> .....	05
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	06
<b>Conceptos de umbral olfativo y discriminación olfativa</b> .....	07
<b>Origen, estructura y descripción anatomo-funcional del sistema olfativo</b> .....	09
<b>Estructura y función de las neuronas olfativas</b> .....	17
<b>Transducción de señales</b> .....	18
<b>Vías olfativas</b> .....	20
<b>Proteínas de unión de moléculas odoríferas</b> .....	24
<b>Neurotransmisores en el sistema olfativo</b> .....	25
<b>Capacidad olfativa en los vertebrados</b> .....	27
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	32
<b>La relación entre fenómenos cíclicos y la sensibilidad olfativa</b> .....	32
<b>Modulación hormonal del sistema olfativo</b> .....	33
<b>Métodos de evaluación de la función olfativa</b> .....	37
<b>Sustancias utilizadas para medir la función olfativa</b> .....	39
<b>Importancia del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, como un mecanismo regulador que modula la función olfativa</b> .....	40
<b>III. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	45
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	45
<b>V. OBJETIVO PRINCIPAL</b> .....	46
<b>VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	46
<b>VII. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	47
<b>Protocolo</b> .....	47
<b>Sujetos</b> .....	48
<b>Definición del ciclo menstrual</b> .....	49
<b>Encuesta</b> .....	49
<b>Prueba de umbral olfativo</b> .....	50
<b>Citología nasal y vaginal</b> .....	53
<b>Análisis histológicos</b> .....	55
<b>Análisis estadístico del umbral olfativo</b> .....	55
<b>Análisis estadístico de la citología nasal y vaginal</b> .....	55
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	56
<b>Umbral olfativo</b> .....	56
<b>Citología nasal y vaginal</b> .....	60
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	63

<b>X. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>68</b>
<b>XI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS:</b>	
<b>ANEXO 1.-ENCUESTA DE OLFATO.....</b>	<b>94</b>

## RESUMEN

Existe controversia sobre los efectos que tienen las hormonas sobre el umbral olfativo y el epitelio nasal así como su asociación con el ciclo menstrual. En este trabajo se investigó si el umbral olfativo y las características citológicas del epitelio nasal tienen correlación con las fases del ciclo menstrual.

La población estudiada de 332 mujeres con edades entre 13 -49 años se dividió en 4 subgrupos tomando en cuenta que se encontraban durante alguna de sus fases folicular (N=80), ovulatoria (N=21), lútea (N=144) o menstrual (N=87). Esta población fue examinada en una sola ocasión. Tres grupos control que no ciclan fueron examinados a la vez; 83 mujeres post-menopausicas entre 47-86 años de edad, 60 niñas pre-púberes entre 5-12 años y 183 hombres entre 17-30 años.

Quince mujeres que se encontraban entre 20-43 años de edad fueron examinadas durante tres ciclos menstruales consecutivos, en cada una de las 4 fases correspondientes a un ciclo menstrual. De las quince mujeres se obtuvieron frotis nasales en las fases menstrual, folicular y lútea. Los diferentes tipos de células en cada fase fueron comparadas con sus equivalentes en los frotis vaginales en las fases folicular y lútea; también fueron comparados con los frotis nasales de 20 mujeres post-menopausicas y 20 niñas pre-púberes.

El umbral de detección de un olor fue determinado usando botes de polietileno presionables conteniendo mitades logarítmicas desde  $-\log 9.5$  a  $-\log 6.0$  de acetato de amilo, presentadas en orden ascendente.

Los umbrales difirieron significativamente a lo largo del ciclo, encontrando la percepción olfativa de la concentración más baja de acetato de amilo durante la fase ovulatoria, mientras que la concentración más alta de dicha sustancia fue durante la fase menstrual. Los umbrales para todos los grupos control fueron más altos que para las mujeres que se encontraban ciclando durante la fase ovulatoria. Se encontró una correlación significativa entre las características citológicas de los frotis nasal y vaginal y entre todas las fases del ciclo, predominando células superficiales en la fase folicular, células intermedias en la fase lútea. En los frotis nasales de mujeres post-menopausicas y niñas pre-púberes predominaron células superficiales en todas las veces que fueron examinadas.

Los resultados confirman que el umbral olfativo y las células de recambio del epitelio nasal están relacionados con la fase del ciclo menstrual y así posiblemente con el estado hormonal.

## INTRODUCCIÓN

El sistema olfativo desempeña un papel de suma importancia en la percepción de estímulos relacionados con el comportamiento reproductivo y social en muchas especies de vertebrados (Guevara, 1995). El estímulo olfativo altera el curso de la pubertad, modula los ciclos estrales de las hembras (Köster, 1968; Sokolov y cols., 1992), provoca atracción entre machos y hembras (Heimer y Larsson, 1967; Mykytowycs, 1992), lleva al cortejo y causa agresividad o comportamiento territorial (Parkes y Bruce, 1962; Zuri y Halpern, 2003); en resumen, forma parte del complejo de señales que modulan la reproducción (Green y cols., 2001).

En el hombre, la disminución de la capacidad de percepción olfativa de los alimentos por un resfriado común, da lugar a una disminución de la degustación de los alimentos y a la pérdida del apetito (Hodge, 1967; Schiffman, 1983). Lo mismo sucede cuando los alimentos presentan olor o apariencia desagradables, produciendo un incremento en la frecuencia de disparo de los centros quimiorreceptores que activan el centro del vómito (Zigmond y Bloom, 1999). Algunos estudios realizados en animales, como por ejemplo las víboras, cuyo principal alimento son las lombrices de tierra. No todos los tipos de lombrices de tierra despiertan esta sensación apetitosa en las víboras machos, únicamente las que presentan una glicoproteína con un peso molecular de 20 kDa (Jiang y cols., 1990). Al presentarles las otras lombrices bañadas con agua obtenida del lavado de las lombrices apetitosas, a la cual se le adicionan quimioatrayentes, las víboras reaccionan con movimientos repetitivos de la lengua y de posición de ataque (Wang y cols., 1988), misma actitud que adoptan cuando se les presentan sus lombrices favoritas. Esto indica una gran selectividad en los receptores para las sustancias odoríferas y por consiguiente en la predilección de ciertos alimentos.

Asimismo, en las personas de edad avanzada es común encontrar una disminución de la percepción olfativa (Mirza y cols., 1997, Mulligan y cols., 2002); que pudiera estar relacionada y ser secundaria al consumo de medicamentos (Pelikan, 1978; Barron y Riley, 1992), intervenciones quirúrgicas (Monti-Graziadei y Graziadei, 1979) y exposición a la contaminación ambiental, que pueden dañar en algún momento tanto los receptores olfativos como alguna de las estructuras del sistema nervioso que se relacionan con la vía olfativa (Dalton, 2001). Hay un déficit de memoria en sujetos anósmicos que presentan una enfermedad demencial cortical tipo I como es la enfermedad de Alzheimer (Royall y cols., 2002). En cambio, otros autores describen de manera más específica que la pérdida olfativa está asociada con una declinación en los componentes de la memoria verbal, independientemente de la apolipoproteína E epsilon4 (Swan y Carmelli, 2002). Estos hechos apoyan la idea que el sentido del olfato participa en forma multirrelacionada y sirve de detector de procesos patológicos en estructuras superiores del Sistema Nervioso Central.

*Concepto de umbral olfativo y discriminación olfativa.*

La palabra umbral proviene de *lumbral* (que proviene de la palabra latina *limen*, que significa paso primero o principal o entrada de cualquier cosa) y *olfativo* (que significa perteneciente o relativo al olfato); *olfato* proviene del latín *olfactus* y se refiere al sentido con el que los animales perciben los olores. Por lo tanto, *umbral olfativo* es textualmente la entrada de la vía olfativa; pero para darle una connotación más fisiológica, en este trabajo significará el principio de la percepción de los olores. Para que esta acción se inicie, necesariamente se requiere de una sustancia odorífera (que huele).

Para que una sustancia sea odorífera se requiere que algunas de sus moléculas se mezclen con el aire del ambiente y sea transportado hasta la nariz y de este modo se pongan en contacto con el epitelio olfativo. Una sustancia es percibida cuando el número de moléculas desprendidas es suficiente para producir una sensación olfativa. Esto indica que para cada individuo el umbral olfativo lo determina la cantidad mínima de una sustancia capaz de producir una sensación olfativa. El número de moléculas en esa porción de sustancia, en cantidades logarítmicas, es diferente para cada sustancia odorífera y depende del tamaño de las moléculas (Wu-Tzong-Zeng, 1999).

Por ejemplo, el *metilmercaptano* puede percibirse a una concentración de una 25 milmillonésima parte de miligramo por cada mililitro de aire (Guyton, 1997), por lo que se utiliza mezclada con el gas natural de uso doméstico para que éste se perciba en caso de que escape de las tuberías. El tamaño de algunas moléculas odoríferas depende del número de átomos de carbono. Las diferentes configuraciones de la estructura de moléculas con el mismo número de átomos de carbono resultan en un olor diferente para cada una de ellas (Wu-Tzong-Zeng, 1999). Inclusive se describe una correlación negativa entre el umbral de detección olfativa y la longitud de la cadena de carbonos de algunos alcoholes alifáticos percibidos por ciertas especies de mamíferos, como los macacos colitas (*Macaca nemestrina*) y monos ardilla (*Saimiri sciureus*) (Laska y Seibt, 2002).

Las sensaciones que producen las sustancias odoríferas se han clasificado en las siguientes siete sensaciones olfativas primarias: alcanforado, almizclado, floral, mentolado, etéreo, picante y pútrido (Labarca y cols., 1995).

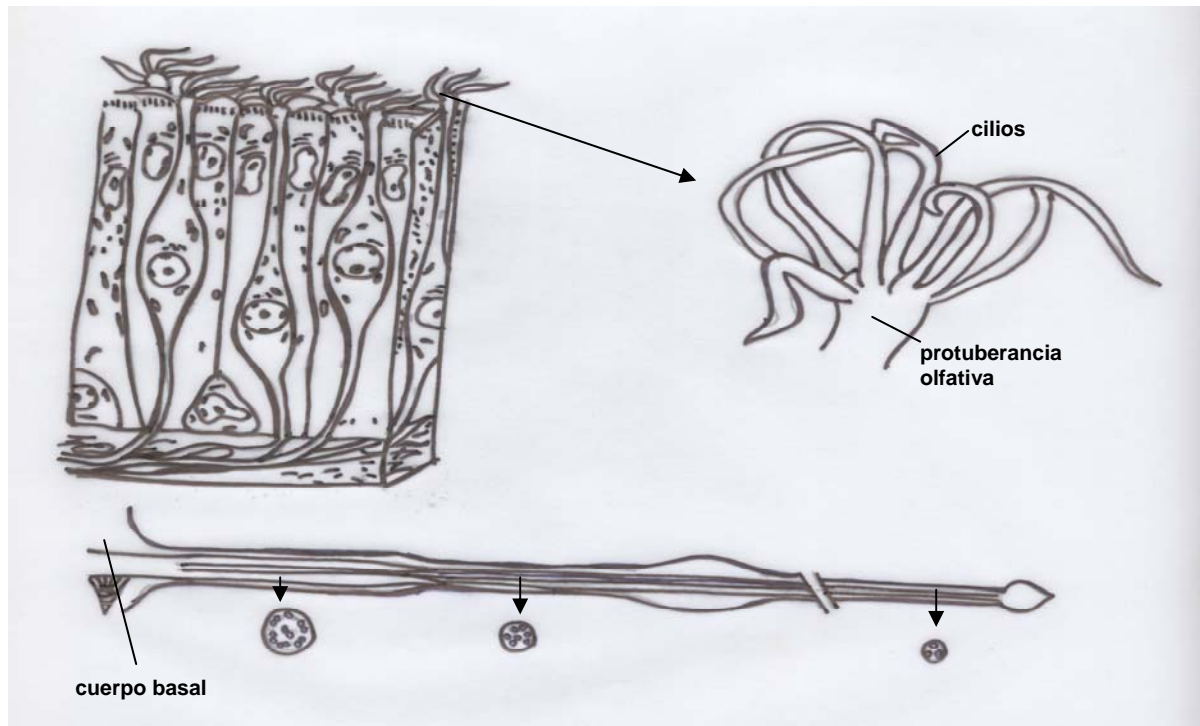
El ser humano puede percibir la diferencia entre dos o más olores, es decir, lleva a cabo una *discriminación olfativa*, y es capaz de percibir hasta 4,000 olores diferentes. Para que la discriminación ocurra, se requiere una concentración 10 veces mayor que la concentración umbral. Cuando se olfatea una sustancia olorosa durante un tiempo, llega el momento en que el organismo ya no la percibe, es decir se adapta. Se ha observado que cuando ocurre esta adaptación para ese olor, también lo está para otros de carácter semejante (adaptación cruzada), pero no para olores de cualidad muy diferente (Labarca y cols., 1995). También es necesario que después de haberse producido un proceso de adaptación a una sustancia en particular, la concentración de esa sustancia olorosa aumente en un 30% para reconocerla nuevamente (Ganong, 2005). Asimismo, el proceso de adaptación ocurre debido a la entrada de calcio a través de canales localizados en la membrana de la célula, como resultado del mecanismo de transducción olfatoria, que hace que este catión se una a la calmodulina. El complejo calcio-calmodulina se une al canal del receptor, lo que disminuye su afinidad por los nucleótidos cíclicos que lo mantienen abierto (Best y Taylor, 2003). Se describe una reacción de fosforilación que provoca una inactivación



de las cascadas enzimáticas que participan provocando adaptación olfativa y adaptación cruzada (Labarca y cols., 1995).

Para que ocurra una sensación olfativa se requieren muchos factores, ya que es importante el número de moléculas de una sustancia odorífera y que la sustancia sea ligeramente hidrosoluble, a fin de que atraviese el moco que cubre a las células receptoras en el epitelio. También debe ser ligeramente liposoluble para tener la facultad de unirse a proteínas lipofílicas, producidas por las glándulas de la cavidad nasal (Pelosi y cols., 1982; Pevsner y cols., 1988). Éstas se localizan en el fluido que rodea a las terminales dendríticas sensoriales, aumenta la frecuencia de captura de olores hidrofóbicos y sirven tanto como disolventes de las moléculas odoríferas, como medio de transporte a través de la capa de moco; lo que facilita la unión con las proteínas receptoras localizadas en la membrana celular (Vogt y cols., 1989; Gyorgyi y cols., 1988; Pevsner y cols., 1988, 1990). Mediante técnicas de clonación molecular se ha deducido la secuencia de aminoácidos de las proteínas de unión, las cuales tienen un peso molecular de 18,000 Da. Por su estructura se les incluye en la familia de proteínas que sirven como acarreadoras de moléculas lipofílicas pequeñas (Pevsner y cols., 1988). Las sustancias con alta hidrosolubilidad y liposolubilidad son consideradas sustancias con olores fuertes.

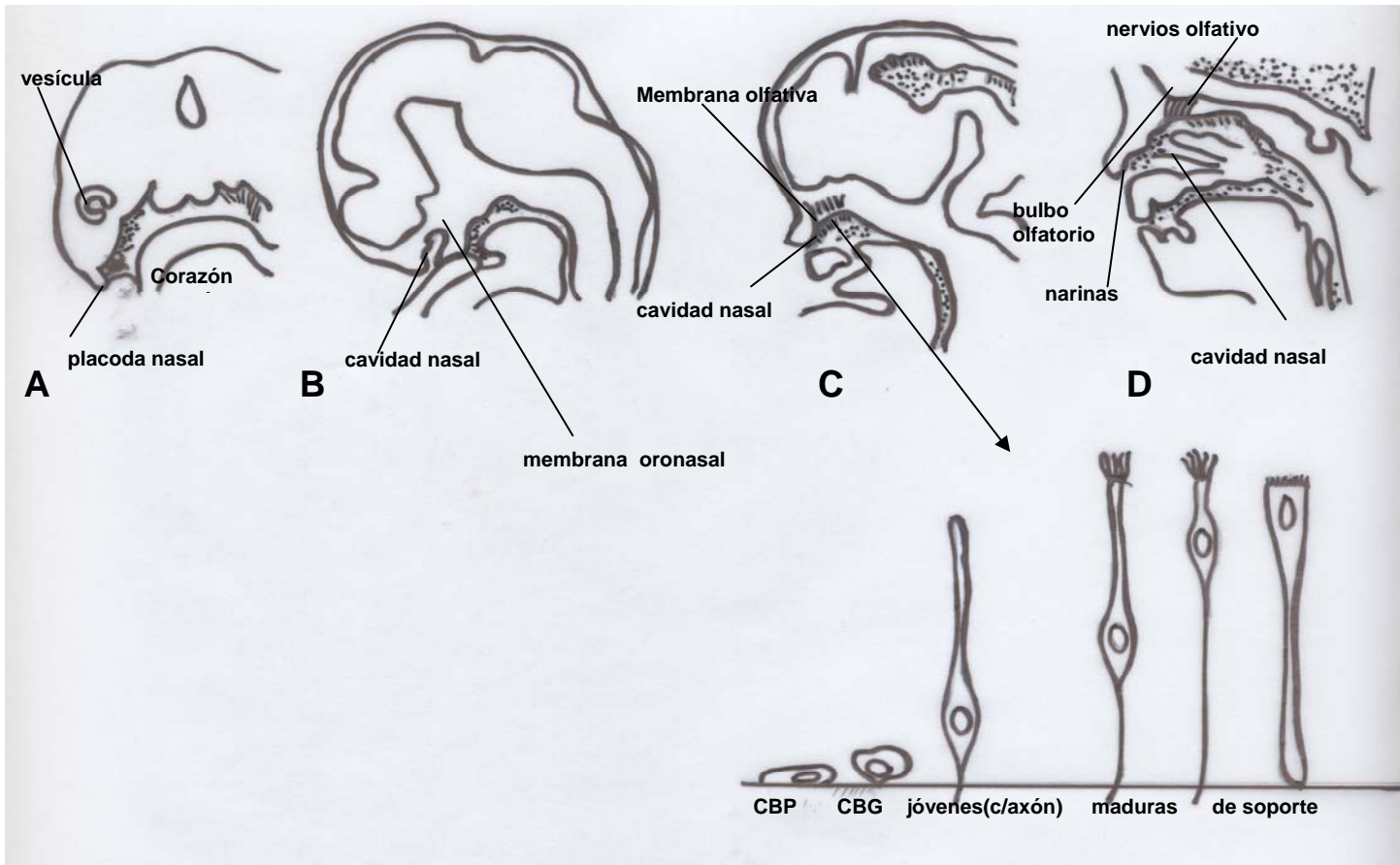
El proceso de transducción de las señales químicas ocurre en los receptores de la membrana de los cuerpos celulares y de las dendritas, ya que estas son las partes celulares directamente expuestas a los olores dentro de la cavidad nasal. Estos receptores son moléculas protéicas situadas en la membrana de los cilios de las células olfativas que participan en las señales de transducción (Mania-Farnell y Farbman, 1990) (**Fig. 1**), de los que existen tantos como el número de olores que son percibidos. Por ello, la ausencia de un tipo específico de receptor protéico dará como resultado la nula percepción de esa sustancia (Berne y Levy, 1988). Los estímulos olorosos que se reciben en un receptor localizado en la membrana en particular son enviados a grupos específicos de neuronas corticales. Es decir, que cada neurona receptora envía información a múltiples áreas corticales olfativas, siendo éstas las encargadas de combinar espacialmente dicha información para que sea captada en una sola neurona, que codifica para un olor en particular (Zou y cols., 2001).



**Fig.1.-Representación esquemática del epitelio olfativo en la que se observan los diferentes tipos celulares. A la derecha: imagen de una protuberancia olfativa localizada en el extremo apical de la neurona de mamífero, donde se observan los cilios. En la porción inferior se muestra un cilio olfativo con secciones a diferentes niveles. (Fawcett, 1995 y Farbman, 1992).**

### *Origen, estructura y descripción anatómico-funcional del sistema olfativo.*

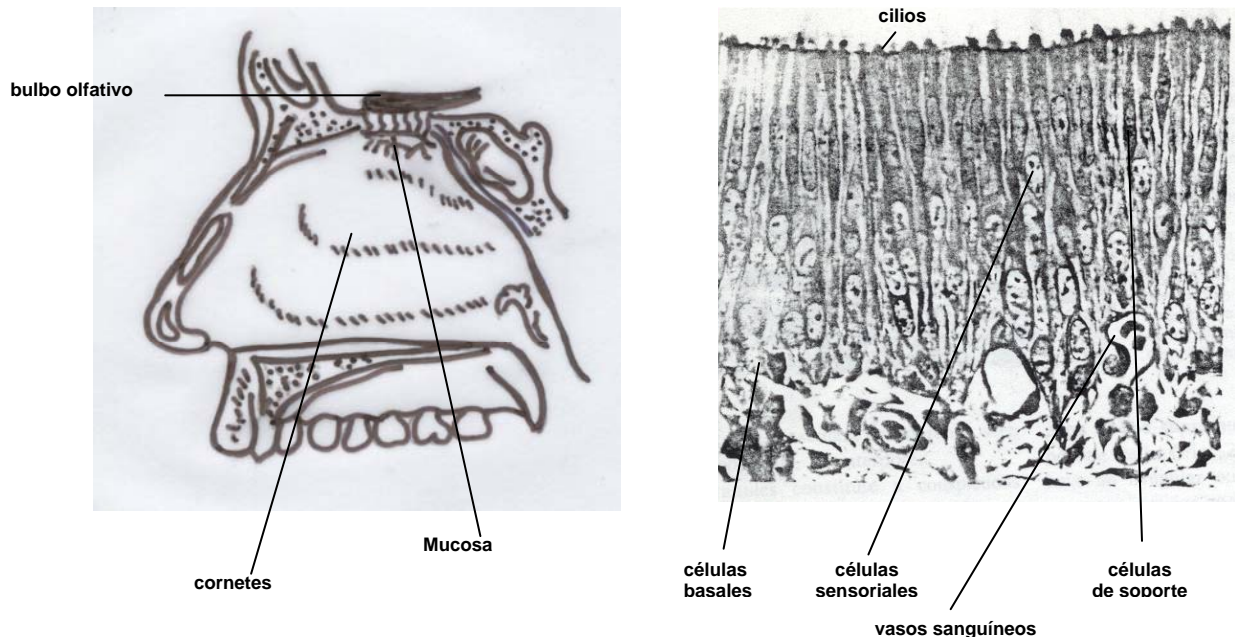
El epitelio nasal y el olfativo provienen embriológicamente del ectodermo y se desarrollan a partir de las placodas nasales que aparecen a las cinco semanas de gestación. Las placodas sufren una invaginación a las seis semanas, y dan inicio a la formación de lo que serán las cavidades nasales. Esta invaginación es progresiva y las cavidades nasales quedan conformadas a las siete semanas. En ese momento se inicia el desarrollo de la mucosa olfatoria, donde se observan los distintos tipos celulares en diversas etapas de maduración. Con la presencia de neuronas sensoriales jóvenes con axón que aún no presentan dendritas; mientras otras ya maduras si cuentan con axón y dendritas. A las 12 semanas de gestación las neuronas extienden su proceso basal (axón), que atraviesa la lámina cribosa y realiza su primera sinapsis con otras neuronas en el bulbo olfativo (Bruce, 1990) **(Fig. 2).**



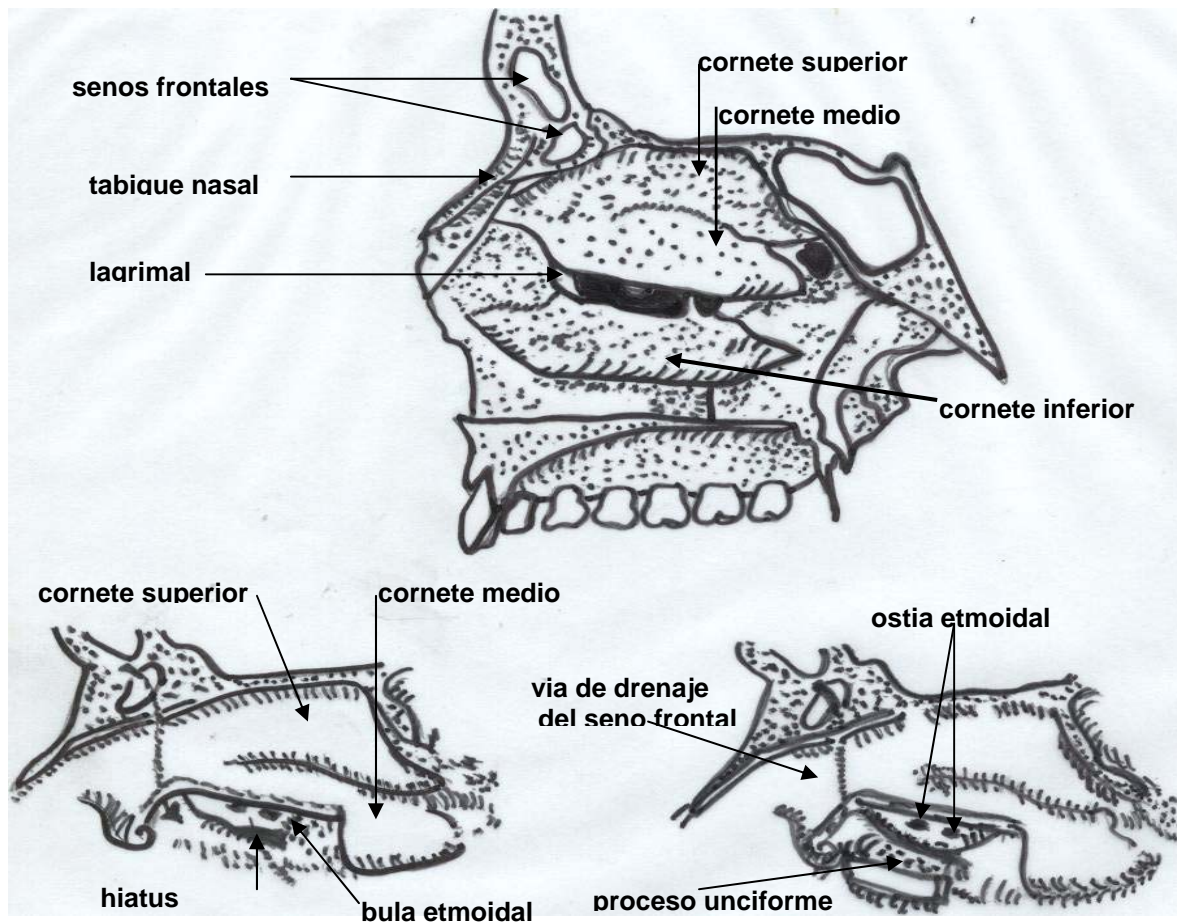
**Fig.2.- Desarrollo embrionario de las cámaras nasales del humano, en diferentes estadios de gestación. A) cinco semanas; B) seis semanas; C) siete semanas (se inicia el desarrollo de la mucosa olfativa); D) doce semanas (se encuentra establecida la primera sinapsis en el bulbo olfativo). ABAJO: epitelio olfativo. Células basales planas (CBP), células basales globosas (CBG), neuronas sensoriales jóvenes con axón y sin dendritas, neuronas sensoriales maduras que ya presentan axón y dendritas y células de soporte. (todas ellas modificadas y fusionadas). Según Bruce, 1990 y Farbman, 1992**

La cavidad nasal se divide en dos porciones: la cual está revestida por dos tipos de epitelio: la porción nasal, cuya función es incrementar la humedad y la temperatura del aire que ingresa del medio ambiente, y la porción olfativa, cuya función es percibir el olor. En la porción nasal la parte frontal de cada vestíbulo está revestida de epidermis provista de folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. Los pelos filtran de manera constante el aire que penetra en la nariz. En la parte final del vestíbulo, a nivel de la pared lateral de cada cavidad nasal, hay tres láminas óseas del hueso palatino, dispuestas una encima de otra a manera de anaqueles en forma de concha, que reciben el nombre de conchas superior, media e inferior. Mismas que están recubiertas por epitelio plano estratificado no queratinizado que denominados también en forma muy frecuente como cornetes superior,

medio e inferior, los que poseen una gran vascularización, compuesta por arterias, capilares y venas (**Fig. 2a y 2b**).



**Fig.2a.-** Corte sagital de la cavidad nasal donde se muestran los cornetes. En la porción izquierda, se representa el área de la mucosa olfativa con sus axones que atraviesan la lámina cribosa del etmoides para hacer sinapsis en el bulbo olfativo (modificado de *The Anatomy of the Nose*, Cap. 35). A la derecha: una imagen histológica de una biopsia de epitelio olfativo humano. Microscopía por contraste de fases X650. (R. Naessen, *Acta Otolaryng* 1971;71: 49-62).



**Fig. 2b.- Pared lateral de la cavidad nasal donde se muestran los cornetes o conchas nasales y su relación con algunas estructuras aledañas. (Drunheller GW *Anat Rec* 1973;176:321 citado en Graney DO. *Otorhynolaryngol* 1985;Cap.35:627-639).**

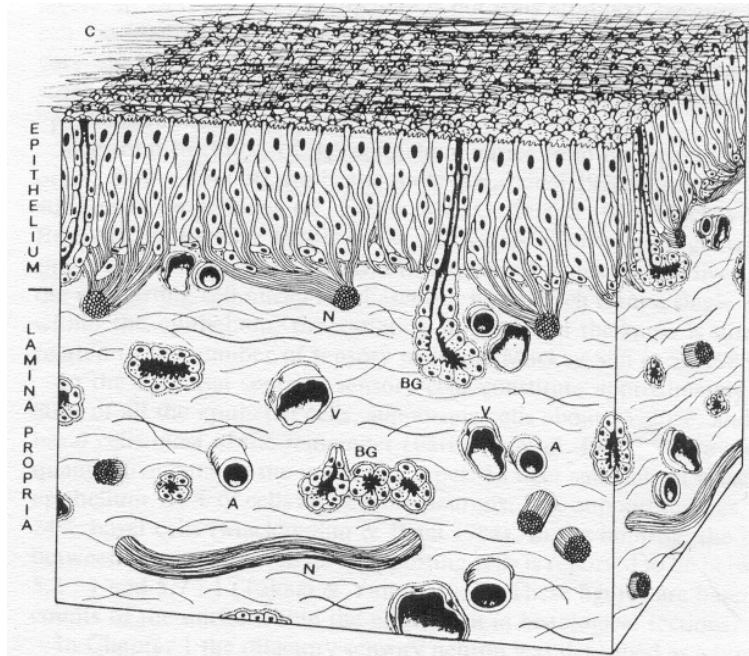
En los cornetes medio e inferior existen venas que normalmente están ocluidas; sin embargo, en algunas circunstancias (como el síndrome pre-menstrual en las mujeres) suele ocurrir vasodilatación, con aumento del volumen, seguido de vasoconstricción (Ham, 1975). Se ha considerado por esto que dichas estructuras venosas tienen semejanza con el tejido eréctil del pene, aunque se menciona también que no es un tejido eréctil verdadero, ya que el tejido del pene contiene múltiples cavidades revestidas de endotelio que normalmente se mantienen colapsadas, y que por la vasodilatación se llenan de sangre. En cambio, la lámina propia de la mucosa de los cornetes nasales es muy rica en venas de paredes delgadas provistas de fibras musculares lisas dispuestas circular y longitudinalmente. En algunas personas, la mucosa que reviste los cornetes resulta afectada por estímulos eróticos y se producen estornudos, ingurgitación de la mucosa e incluso hemorragia a este nivel

(Mackenzie, 1898). La porción olfativa está compuesta por la mucosa olfativa que a su vez se encuentra constituida por 2 capas mayores: un epitelio grueso pseudoestratificado y un tejido conectivo, la lámina propia, que se localiza en el techo de cada cavidad nasal, cerca del tabique (**Fig. 3a y 3b**).

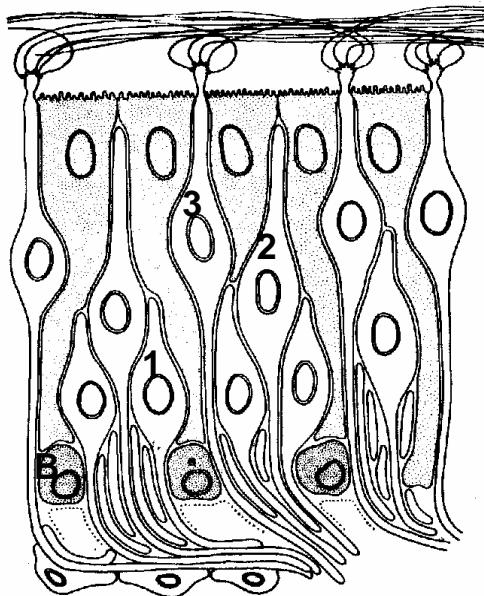
El epitelio olfativo presenta tres tipos celulares: células de soporte o sustentaculares, células sensoriales y células basales. Esta estructura es similar en todas las clases de vertebrados (Farbman, 1992). Los núcleos de esas células varían en su forma: los de las células de soporte tienen forma oval y se encuentran cerca de la superficie; los de las células sensoriales son redondos y se encuentran entre la sexta y la octava capa en lo profundo de este epitelio. Algunos núcleos de las células basales son achatados, otros son redondos o poliédricos (células basales globosas) y se encuentran a lo largo de esta membrana basal. Esta situación de los núcleos en diferentes niveles crea la ilusión visual de que las células se encuentran estratificadas en diversas capas, pero no es así, ya que todas se encuentran en contacto directo con la membrana basal, por esta razón se dice que este epitelio es pseudoestratificado (**Fig. 3b**). El grosor del epitelio varía de una especie a otra, desde 30  $\mu\text{m}$  en los topos, a más de 400  $\mu\text{m}$  en anfibios (Graziadei, 1973). Debido a que las células de soporte y las células basales forman una capa única, el grosor de este epitelio está dado por el número de neuronas sensoriales (Mackay-Sim y cols., 1988).

Para contar las células se han utilizado varios métodos; uno es el de fotomicrografías electrónicas de barrido de superficies olfativas; otro es mediante imágenes de microscopía de luz de secciones pequeñas de epitelio olfativo, entre otros. Este método también ha mostrado que hay una gran densidad de botones dendríticos olfativos maduros. Esta densidad se alcanza cuando los extremos dendríticos de las neuronas inmaduras se extienden a la superficie epitelial y llegan a los estadios finales de maduración. Esto resulta en la acumulación de una población de neuronas olfativas jóvenes y algunas neuronas maduras dentro del epitelio, que se pueden contar con base en sus cambios mitóticos (Mackay-Sim y cols. 1988).

Mediante la técnica de cuenta de núcleos dentro de secciones histológicas de epitelio se han cuantificado los tipos celulares presentes en el epitelio olfativo de diferentes animales, y se ha encontrado para todos ellos una predominancia de células sensoriales, seguidas en menor cantidad por las células de soporte o sustentaculares (Takagi y Yajima, 1965). Éstas contienen microvellosidades que terminan en la superficie del epitelio, cuyos núcleos ovales se encuentran alineados en la porción más superficial y su tallo es una delgada rodaja de citoplasma que se enrolla entre las neuronas receptoras y termina en una ligera expansión sobre la membrana basal. En las salamandras, los hallazgos morfológicos de este tipo de células sustentaculares que se enrollan entre las células receptoras, reciben el nombre de células sustentaculares Tipo II, mientras que las que no lo hacen se denominan Tipo I. La función de estas células sustentaculares o de sostén es regular el paso de sustancias entre la superficie del epitelio y el tejido conectivo subyacente (Rafols y Getchell, 1983). En algunos animales como las ranas y las salamandras, cuando el epitelio olfativo es estimulado con algunos olores irritantes, estas células emiten secreciones (Okano y Takagi, 1974; Getchell, 1977).



**Fig. 3a.- Disposición de los elementos que integran la lámina propia y el epitelio (glándulas de Bowman=BG; ramilletes de nervios olfatorios=N; arterias=A; venas=V.(Farbman, 1992).**



**Fig. 3b.- Membrana mucosa olfativa, donde se observan las etapas de maduración de las neuronas sensoriales. Se observan desde células basales (B) y células intermedias (1) en las etapas más tempranas de maduración, hasta las células maduras (3) que muestran cilios en la porción superior y otras donde hay crecimiento de los axones y dendritas(2) (Farbman, 1992).**

En cambio en los mamíferos no hay evidencias morfológicas de una actividad secretora (Jafek, 1983). Aunque la presencia de retículo endoplásmico liso en este epitelio, haría sospechar que estas células tendrían una actividad de flujos iónicos altos y la presencia de enzimas detoxificantes, ya que la abundancia de este tipo de organelos en otros sistemas celulares son evidencia de ello (Menco y Benos, 1989; Farbman, 1992).

La lámina propia del epitelio olfativo es la de un tejido conectivo fibroelástico. La mayoría de sus componentes celulares son fibroblastos y macrófagos, las porciones basales de las células sustentaculares y leucocitos. Presenta vasos de gran calibre, que permiten un flujo sanguíneo abundante que da lugar a características de tejido eréctil en sus zonas más profundas. También se observan ramilletes de fibras nerviosas pertenecientes a los nervios olfativo y trigémino (Farbman, 1992) (**Fig. 3a**).

En el interior de la nariz humana este epitelio es de color amarillento y cubre un área de entre 2.4 y 5 cm<sup>2</sup>. Lo pequeño de esta superficie es una de las razones por las que al hombre se le considera como un animal microsmático. En los perros y en otros animales, esta superficie llega a medir hasta 10 cm<sup>2</sup>, por lo que se les clasifica como animales macrosmáticos (Berne y Levy, 1988; Ganong, 1999). Recientemente esta nomenclatura ha sido cuestionada, aduciendo que estos términos son inadecuados para describir la capacidad olfativa, ya que algunos estudios sobre percepción olfativa (usando alcoholes alifáticos de diferentes longitudes en su cadena de átomos de carbono), demostraron que la rata, siendo animal macrosmático, presenta una dificultad olfativa para la percepción de este tipo de alcoholes; en cambio, los macacos *Macaca nemestrina*, animales con menor superficie olfativa, tienen una gran sensibilidad frente a alcoholes alifáticos. Con esto se demostró que la inferencia que se había hecho durante mucho tiempo, de que el tamaño de la mucosa olfativa era directamente proporcional al desarrollo funcional olfativo de las estructuras olfativas superiores, es cuestionable (Laska y Seibt, 2002).

El epitelio olfativo, tanto en seres humanos como en otros animales, está constituido por 10 a 20 millones de neuronas olfativas consideradas células receptoras, esparcidas entre células de sostén y células progenitoras. Estas últimas son células basales globosas de forma redondeada con citoplasma claro, que se diferencian de otro tipo de células basales que se encuentran en el mismo lugar, que son de forma aplanada con un citoplasma más oscuro (Graziadei y cols., 1979). Las células basales planas son descritas como “las verdaderas células basales” (Graziadei y cols., 1979), pues se dividen asimétricamente y dan origen a una célula hija oscura y una célula globosa clara (Calof y Chikaraishi, 1989). Las células basales globosas conservan su capacidad de división aún en animales adultos, y presumiblemente dan origen a los precursores de nuevas células neuronales (Moulton, 1975; Graziadei y cols., 1978). Los estudios realizados por Nagahara (1940) son los que apoyan desde entonces el reemplazamiento neuronal. Este autor clasificó las neuronas sensoriales en dos grupos: las “funcionalmente activas” y las “células de reposo”. Las funcionalmente activas son aquellas cuyos cuerpos celulares se encuentran localizados más cerca de la superficie del epitelio, mientras que los cuerpos celulares de las células de reposo se



encuentran localizados más profundamente. El experimento que puso de manifiesto el reemplazo neuronal consistió en dañar los axones de las células funcionalmente activas, lo que produjo degeneración y su desaparición en pocos días. Sin embargo, la población de células de reposo que contenían algunas células con capacidad mitótica aún bajo condiciones normales, empezaron a mostrar una actividad mitótica activa después del daño de las células funcionalmente activas. Las células hijas extendieron sus procesos proximales y distales y se diferenciaron en neuronas sensoriales aparentemente normales. Así que 90 días después de la sección nerviosa, el epitelio olfativo presentó las características que tenía antes de la intervención quirúrgica (Farbman, 1992).

Al parecer, las células basales planas oscuras son las únicas que se dividen rápidamente cuando el epitelio olfativo es lesionado después de haber practicado una axotomía o bulbectomía. Este hecho ha sido comprobado con el análisis inmunocitoquímico del epitelio olfativo de ratones (Schwartz y cols., 1991; Suzuki y Takeda, 1991). El ciclo de replicación de las células basales es entre 3 a 7 semanas (Monti-Graziadei y Graziadei, 1979). Algunos estudios *in vitro* apoyan la idea de que las células basales globosas, o quizá una subpoblación de ellas, son los precursores inmediatos de células neuronales (Calof y Chikaraishi, 1989).

El reemplazo neuronal también ha sido comprobado después de la destrucción experimental del epitelio olfativo por el lavado nasal con una solución de sulfato de zinc o por axotomía, con una total recuperación del epitelio olfativo (Schultz, 1960).

Entre 1970 y 1978 se desarrollaron diversos estudios usando métodos autoradiográficos, que proveen evidencias que las nuevas neuronas fueron producidas por mitosis en la población de células basales y que las hijas se diferencian en neuronas sensoriales funcionales. Con el uso de timidina marcada con tritio ( $[^3\text{H}]$  timidina) se observó que al inicio, estas células se encontraban en la capa basal y después de una a dos semanas, se encontraban en capas más superficiales del epitelio. Estos resultados indican que aquellas neuronas localizadas más superficialmente dentro del epitelio eran más viejas que aquellas localizadas más profundamente y que tenían procesos dendríticos más cortos. Estas células más viejas eran presumiblemente más maduras, ya que estaban marcadas con timidina, correspondiendo según la clasificación de Nagahara (1940) a células funcionalmente activas. El autor explica que las células de reposo no fueron dañadas durante la axotomía debido a que se encuentran en las capas más profundas.

En el extremo mucoso de cada neurona olfativa se proyectan de 5 a 20 cilios por cada neurona receptora, en un botón ensanchado que forma la parte apical de cada neurona olfativa (**Fig. 1**).

Los cilios son prolongaciones que miden 2  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro, y que reaccionan cuando se ponen en contacto con las moléculas odoríferas (**Fig. 1**). Se encuentran inmersos en una capa delgada de moco, de 30 a 50 micras de espesor, producido por las glándulas de Bowman que lo secretan a la superficie de la membrana olfativa (Labarca y cols., 1995).

### *Estructura y función de las neuronas olfativas.*

En los cilios olfativos y en la porción apical de las dendritas, suceden los primeros eventos de la transducción eléctrica y es allí donde el estímulo activa al receptor. En condiciones de reposo, las células son capaces de generar potenciales de acción por lo menos una vez cada 20 segundos. Según Getchell y Shepherd (1978) esta actividad espontánea, con registros extracelulares de neuronas olfativas de vertebrados, es de por lo menos una vez por segundo. Ante la presencia de una sustancia olfativa, el potencial de membrana del receptor puede disminuir hasta  $-30$  mV ó menos, generando potenciales de acción que pueden ocurrir hasta 20 veces por segundo (Aidley, 1989). La frecuencia dependerá de la sustancia olorosa que se trate, estas propiedades se deben a mecanismos de permeabilidad no selectiva a cationes, lo cual es susceptible de conducir a un potencial de receptor despolarizante, que provoca la generación de un potencial de receptor que va a activar las neuronas olfativas e inicia la respuesta electrofisiológica de ellas ante un estímulo de naturaleza excitatoria. Estos canales han sido clonados y expresados en ovocitos de anfibio y reconstituídos en bicapas de lípido. Existen sustancias odoríferas que hiperpolarizan la membrana de la célula olfativa, y disminuyen la velocidad con que descargan las fibras (Labarca y cols., 1995). El calcio modula también la apertura de los canales selectivos a cationes de los cilios olfativos. El aumento en la concentración de este catión en el centro de los cilios, reduce la afinidad por los nucleótidos cíclicos por lo que forma parte importante en el fenómeno de la adaptación.

Existen diferentes mecanismos de *adaptación* en las células receptoras olfativas que se presentan cuando los receptores se exponen a un estímulo olfativo de manera continua; de modo que éstos responden al principio con una elevada frecuencia de disparo, que va en decremento hasta que, finalmente, muchos de ellos ya no responden. Esta adaptación es específica para el olor particular que se percibe, y hay casos en que se lleva a cabo en un 50% en el primer segundo después de su estimulación. Los receptores de otros olores no presentan cambios. Para explicar la adaptación se ha propuesto un mecanismo, en el que participan un gran número de fibras centrífugas que van desde regiones olfativas del cerebro en sentido retrógrado por el haz olfativo y terminan en células inhibitoras localizadas en el bulbo olfativo, lo que suprime las señales del olfato a través del bulbo (Luskin y Price, 1983).

Esta vía también ha sido señalada en la hipótesis del vector olfativo en los desórdenes neurodegenerativos y explicaría porqué el daño a las vías olfativas son un producto del tránsito de virus, toxinas o algún otro agente genobiótico que ingresa directamente por la cavidad nasal hacia el cerebro por la vía olfativa (Turner y Esmond, 1926; citado en Doty, 1997).

### *Transducción de señales.*

Para que se lleve a cabo la transducción de un estímulo químico por una sustancia olorosa en un potencial eléctrico, se requieren además de los receptores, proteínas transportadoras o acopladoras que responden ante la presencia de cualquier molécula volátil a concentraciones extraordinariamente bajas (Kandel y Schwartz, 1981). Esta respuesta ante la gran diversidad de estímulos está mediada por genes de receptores olfativos, (Mombaerts, 2001). En el genoma de los mamíferos los genes receptores para olores forman una gran lista de familias (aproximadamente 1000 secuencias).

Los receptores están acoplados a proteínas G heterotriméricas (Jones y Reed, 1989), sobre todo a la proteína Golf que es exclusiva del sistema olfativo. Esta proteína sirve de unión entre los receptores y alguna de las dos enzimas catalíticas: la adenilatociclasa o la fosfolipasa C, que se encuentran localizadas en el interior de la membrana. Los receptores que se acoplan a la fosfolipasa C, dan como resultante productos de hidrólisis de fosfatidilinositol; mientras que la adenilciclasa produce monofosfato de adenocina cíclico (AMPC) (Ronnelt y Moon, 2002). Ambos productos de estas cascadas se unen a canales de cationes, accionan su apertura, y permiten el ingreso de sodio a las células receptoras y así producen una despolarización (Mora y Sánchez, 1992), **(Fig. 4)**. El calcio es el ión predominante en los cambios iónicos (Bertil, 1992). Los estímulos olfativos cesan por la intervención de proteincinasas y de otras enzimas que catalizan la modificación covalente de las moléculas que producen un olor.

Las cascadas que produce el segundo mensajero en el proceso de transducción olfativa contribuyen en una pequeña proporción a la gran sensibilidad para las sustancias odoríferas, ya que las respuestas de cada una de las neuronas olfativas depende de una amplia gama de factores, entre los que se citan: moléculas de transducción, canales iónicos, algunas enzimas y diversas proteínas; es decir, depende de la especificidad para cada tipo de olor. También depende de las neuronas que son activadas en el encéfalo, y es tan amplia, que se han reportado mapas sensoriales en la corteza olfativa (Zou y cols., 2001).

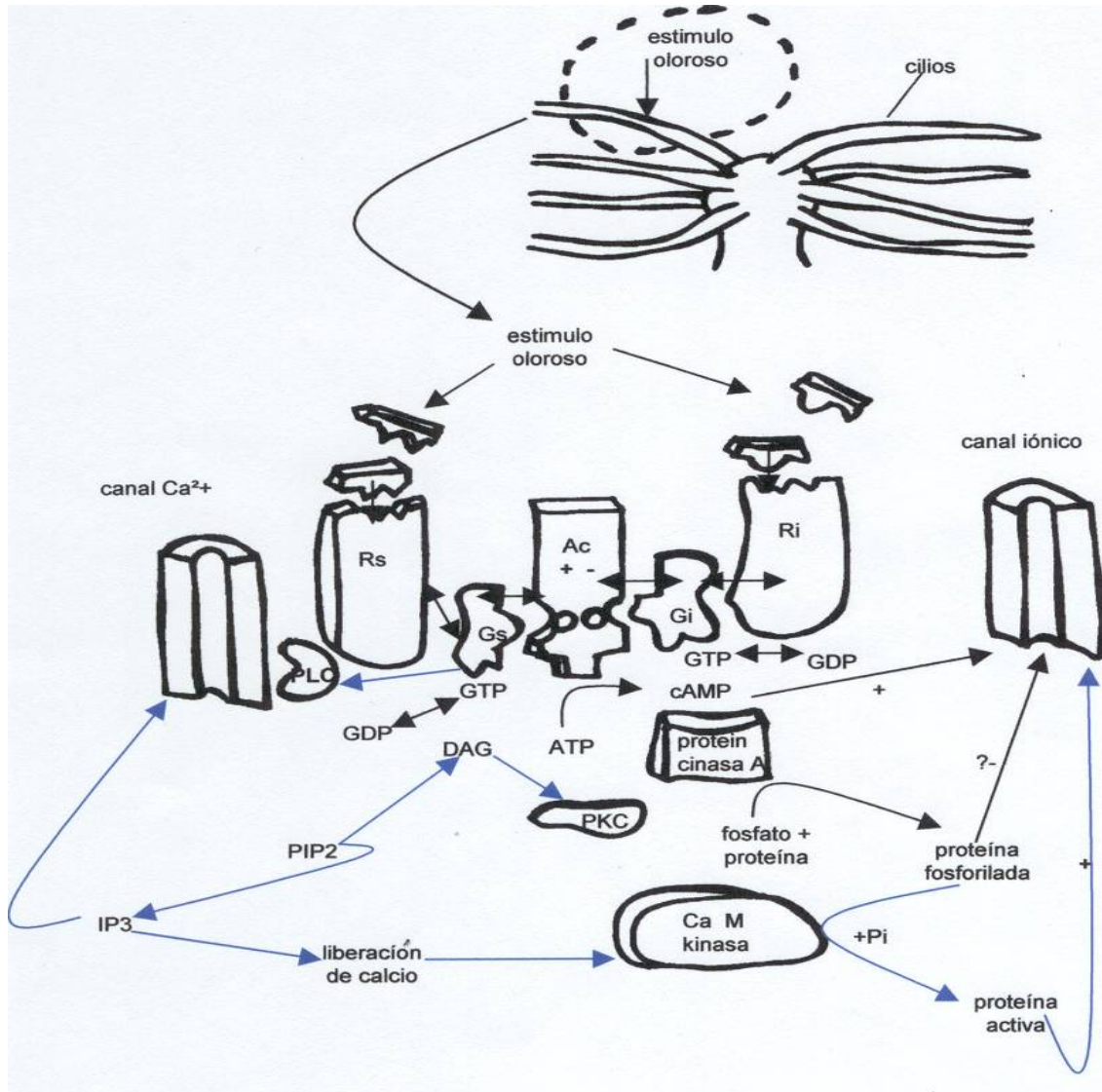


Figura 4.-Modelo del sistema de adenilato ciclasa (flechas negras); el estímulo oloroso se une a sitios de receptores de proteínas (Rs y Ri) dentro de la membrana. Los receptores activados por la unión del estímulo activan proteínas G (Gs y Gi) para convertir GDP a GTP. Las proteínas G activadas pueden estimular (+) o inhibir (-) la actividad de la adenilato ciclasa (AC) para producir AMP cíclico (cAMP) desde trifosfato de adenosina (ATP). El cAMP puede abrir directamente los canales iónicos, y también puede trabajar indirectamente a través de un paso de fosforilación de proteínas para cerrarlo(-) después de que la célula dispara.

El modelo de fosoinositol (flechas azules), sigue los mismos pasos hasta la conversión de GDP en GTP; así, la proteína G activada estimula la actividad de la enzima fosfolipasa C (PLC), la cual actúa sobre fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para producir trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG). El DAG estimula la actividad de proteincinasa C (PKC) para fosforilar proteínas (inactivas a activas), las cuales pueden entonces afectar la apertura de canales iónicos. El IP3 puede abrir directamente canales de calcio en la membrana; también causa una liberación del calcio desde los

depósitos del calcio en el citoplasma, y dicha liberación puede estar involucrada en la activación de la enzima calmodulina (CaM) cinasa, la cual fosforila proteínas que pueden afectar canales iónicos. (Modificado de Farbman, 1992).

*Vías olfativas.*

De la porción basal de las neuronas receptoras olfativas salen axones no mielinizados que forman ramilletes que atraviesan la lámina cribosa del etmoides en la base del cráneo, y establecen una primera sinapsis con células mitrales y en penacho donde convergen aproximadamente 26,000 axones de células olfativas en cada glomérulo. Se calcula que existen aproximadamente 2,000 glomérulos en el bulbo olfativo del conejo (Allison y Warwick, 1949; citado en Farbman, 1992). En estas sinapsis en el bulbo olfativo participan 25 células mitrales, 60 células en penacho (Mori, 1987) (**Fig. 5**) y células periglomerulares (Fujita y cols., 1985; Carleton y cols., 2002). Este conglomerado forma un glomérulo olfativo (**Fig. 6**). Se ha visto que hay una enorme convergencia de entradas sensoriales. Mori (1987) estima que cerca de 24 diferentes dendritas de células mitrales proyectan a un glomérulo y cada célula mitral puede recibir una entrada de 1,300 a 6,500 diferentes axones sensoriales.

Adicionalmente al sistema olfativo principal, existe un órgano olfativo accesorio llamado órgano vomeronasal, cuyos axones terminan en el bulbo olfativo accesorio. En humanos se han encontrado evidencias de la persistencia del órgano vomeronasal en un 59.1% de cadáveres y en un 28.2% de pacientes examinados mediante endoscopia nasal (Won y cols., 2000). El órgano vomeronasal (que se trata con detalle en la sección 1.4.1) ha sido relacionado con la detección de feromonas, que son sustancias responsables de los eventos de atracción sexual, apareamiento y reproducción en la mayoría de las especies de animales. El procesamiento de la información olfativa obtenida por las estructuras del sistema olfativo principal viaja por axones de células mitrales que se dirigen caudalmente y penetran en el encéfalo. Esto se lleva a cabo por medio de la estría olfativa, que se divide en intermedia y lateral. La porción intermedia llega al área olfativa medial, mientras que la lateral se dirige hacia el área olfativa lateral.

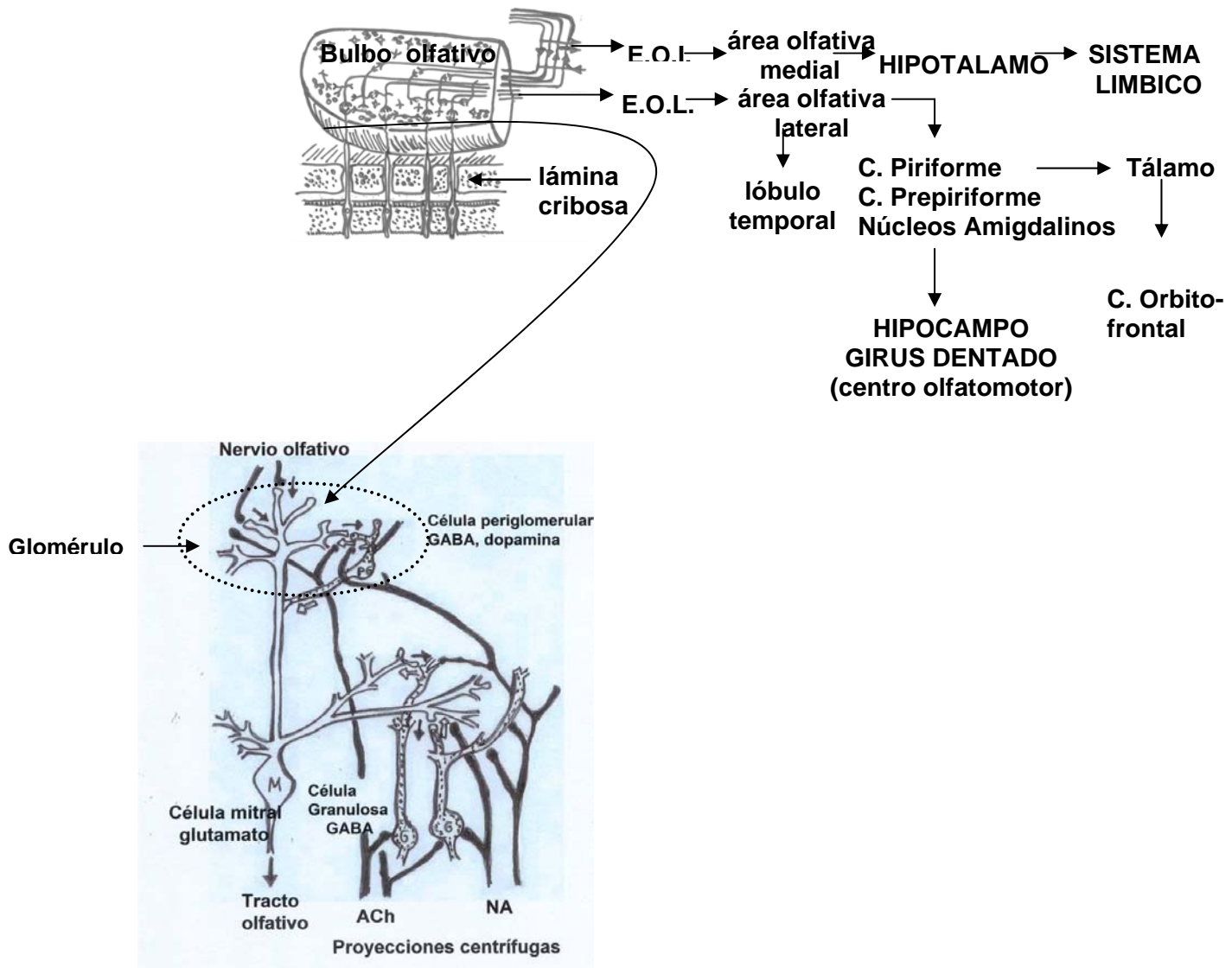


Fig.5- Imagen de la vía olfativa que comienza en el epitelio olfativo, atraviesa la lámina cribosa del etmoides y hace sinapsis en el bulbo olfativo para después enviar fibras que se conectan con el encéfalo. Abajo: se muestran las sinapsis en el bulbo olfativo con sus neurotransmisores involucrados. Donald AL. *Physiology of Olfaction*, capítulo 36:645 (modificado). Guevara-Guzmán R. (1995).

El área olfativa medial ha sido considerada como el sistema olfativo antiguo. Está constituida por núcleos septales localizados en las porciones mediobasales del encéfalo, por delante del hipotálamo (**Fig. 5**). Dichos núcleos se conectan tanto con el hipotálamo como

con otras porciones antiguas del sistema límbico, el cual es considerado el sistema encargado de la conducta instintiva y las emociones. La función del área olfativa medial está relacionada con respuestas más primitivas ante estímulos olfativos, como lamerse los labios, salivación y otras respuestas alimentarias producidas por el olor de la comida o impulsos emocionales primitivos asociados al olfato, como la urgencia del macho para copular cuando es percibida la etapa de celo mediante el olfateo de los genitales de la hembra.

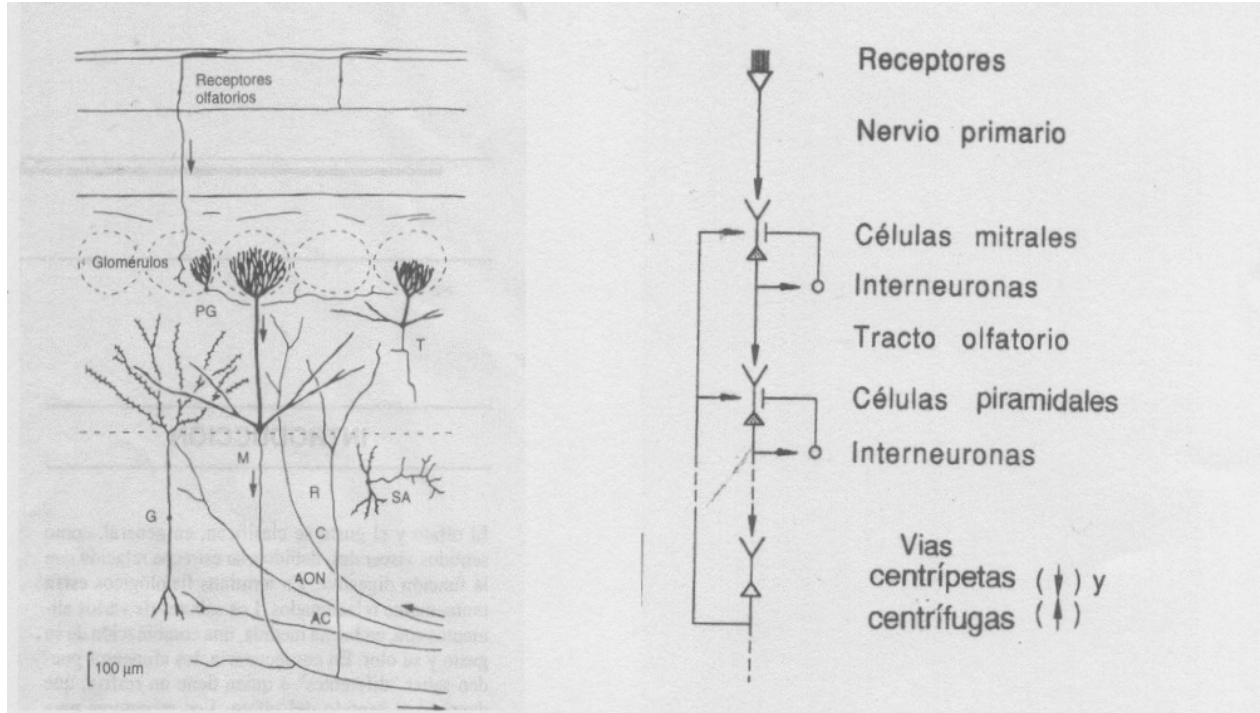
El área olfativa menos antigua, filogenéticamente hablando, es el área olfativa lateral. Está compuesta por la corteza piriforme y prepiriforme junto con la porción cortical de los núcleos amigdalinos. Desde aquí parten diversas vías hacia muchas porciones del sistema límbico, sobre todo aquellas cuya participación se relaciona con la conducta, por ejemplo el hipocampo. Recientemente se le ha asignado a esta estructura, junto con el giro dentado, un papel funcional no solamente en los procesos de aprendizaje y memoria, sino también como un centro olfato-motor. Esto se ha logrado saber mediante registros de la actividad eléctrica del giro dentado de animales de laboratorio, a quienes se les aplicó una estimulación olfativa y en respuesta a ello se obtuvo un incremento en el número de espigas de dicha estructura (Vanderwolf, 2001). También al hipocampo se le ha asignado un papel importante en el aprendizaje olfativo (Otto y Eichenbaum, 1992) y en la memoria de reconocimiento social en ratas (Bannerman y cols., 2002).

De la porción olfativa lateral parten vías que llegan a la porción anteromedial del lóbulo temporal, sin pasar por el tálamo, que se considera la única área de toda la corteza cerebral donde las señales llegan en forma directa. Para un óptimo reconocimiento del olor se requiere de la entrada de información en ambas regiones temporales, ya que los pacientes con resección de uno de los lóbulos temporales mostraron menor percepción y reconocimiento del olor (Dade y cols., 2002). Al parecer existe un mapa sensorial ya establecido en la corteza olfativa, donde existen entradas desde diferentes receptores que se superponen espacialmente en algunas neuronas, las que tienen la capacidad de integrar dos o más estímulos provenientes de varios receptores al mismo tiempo, es decir, como si estuvieran dotadas de un código para combinar olores. Las señales que provienen del mismo receptor son dirigidas hacia múltiples áreas corticales olfativas, lo que permite el procesamiento de diversas entradas provenientes de receptores únicos antes de repartirse a la neocorteza y al sistema límbico (Zou y cols., 2001).

La corteza piriforme, corteza prepiriforme, núcleos amigdalinos, hipocampo y giro dentado son estructuras mediadoras de la discriminación olfativa y la percepción consciente; tales estructuras forman parte de la vía olfativa que pasa por el tálamo y llega a los núcleos talámicos dorsomediales, siguiendo después al cuadrante posterolateral de la corteza orbitofrontal (Takagi, 1989) (**Fig. 5**), y están involucradas en procesos de aprendizaje, junto con la amígdala y el hipocampo (Hudson y Distel, 1995).

Existe un control centrífugo (del encéfalo a la periferia) de la actividad en el bulbo olfativo que sirve como mecanismo de retroalimentación de las señales que parten del bulbo olfativo al encéfalo. Este control viaja por fibras nerviosas que se originan en las estructuras olfativas del encéfalo, tales como los núcleos de la banda diagonal de Brocca, los núcleos septales mediales, las células del tubérculo olfativo (Kimura y cols., 1980) y el núcleo del Rafé (Dahlstrom y Fuxe, 1964) y se dirigen por el haz olfativo hasta llegar al bulbo olfativo. Aquí,

las fibras colinérgicas terminan al nivel de las células periglomerulares (Wenk y cols., 1977). Las fibras catecolaminérgicas terminan al nivel de las células granulosas y en menor proporción en la capa glomerular (Dahlstrom y cols., 1965) **(Fig. 6)**



**Fig.6.-** Se muestran las vías centrífugas provenientes del encéfalo y que hacen sinapsis en el bulbo olfativo. Fibras centrífugas (C) del núcleo de la banda diagonal; fibras ipsolaterales del núcleo olfativo anterior (AON) y fibras contralaterales de la comisura anterior (AC). Las neuronas incluyen: PG= células periglomerulares de axón corto; M= células mitrales, con colaterales recurrentes (R) ; T= células con penacho; G= células granulosas. (Ganong WF 1999; 10: 206). A la derecha se muestra un esquema de las vías tanto centrípetas como centrífugas. Guevara-Guzmán R y Hudson R. En Neurobiología de los Sistemas Sensoriales. UNAM. 1995; 7: 120.



### *Proteínas de unión de moléculas odoríferas.*

Al igual que en los insectos, en los vertebrados en el moco de la cavidad nasal existen ciertas proteínas, que unen moléculas olorosas mismas que son secretadas por las glándulas nasales y se encuentran en el moco que cubre los epitelios tanto nasal como respiratorio (Pevsner, 1988).

Las proteínas fijadoras de olores en los vertebrados son pequeñas (ca 20 kDa). En la mucosa nasal se han aislado varias proteínas, una de ellas la PF50 de 18 kDa exclusiva de la cavidad nasal, homóloga de otras proteínas del organismo, cuya función es transportar pequeñas moléculas lipofílicas (Ganong, 1999). Existen otras proteínas denominadas de choque, que han sido identificadas y localizadas tanto en neuronas receptoras olfativas, como en la región supranuclear de células sustentaculares del epitelio olfativo humano. Una de éstas es la *hsp70*; se ha encontrado una relación inversamente proporcional entre la cantidad de esta proteína y la edad. También en los sujetos viejos y en los que padecen la enfermedad de Alzheimer se observó un marcado decremento de la *hsp70* en neuronas receptoras olfativas (Getchell y cols., 1995). Se ha identificado otra proteína unida al calcio, la *spot 35 (S-35, calbindin-D28k)*, la cual se localiza tanto en las neuronas receptoras olfativas como en los ramilletes de los nervios olfativos. La concentración de esta proteína disminuye a medida que la edad avanza, y su decline es muy marcado en enfermos de Alzheimer (Yamagishi y cols., 1996). Asimismo, la *S-35* fue identificada por inmunofluorescencia en neuronas receptoras olfativas de cadáveres de pacientes que habían padecido demencia tipo Alzheimer. Se encontró que en estos enfermos la inmunorreactividad-apoE en neuronas receptoras olfativas por unidad de longitud de epitelio, fue aproximadamente 3.5 veces menor que la encontrada en los cadáveres de quienes no habían padecido esta enfermedad (Yamagishi y cols., 1998).

En neuronas jóvenes del epitelio olfativo se ha identificado a la proteína *B-50* conocida también como *GAP 43*, que se le asocia con el crecimiento y la maduración neuronal (Verhaagen y cols., 1989). También se menciona la presencia de las proteínas de canales *TRP*, que aunque no son selectivas del sistema olfativo, se expresan en muchos tejidos y tipos de células incluyendo células neuronales, sirven como mediadores de respuestas a factores de crecimiento nervioso, feromonas y olfacción (Minke y Cook, 2002). A estas proteínas relacionadas con canales *TRP* se les ha señalado como responsables de la producción de algunas enfermedades, como algunos tumores y desórdenes neurodegenerativos. Estas proteínas se han encontrado en neuronas de algunos axones de fetos humanos (Takahashi y cols., 1984), mientras que en cobayos y humanos adultos otras proteínas se han encontrado sólo en las dendritas y los cuerpos celulares más no en sus axones (Yamagishi y cols., 1989).

Existe un gran desacuerdo sobre si hay o no otras moléculas neuronos-específicas en neuronas sensoriales, sobre todo referente a los 3 filamentos de subunidades de proteínas, filamento pesado (200 kDa), mediano (160 kDa) y ligero (68 kDa). La importancia de demostrar estas diferencias en neurofilamentos

de proteínas radica en que con ello se verifica la inmadurez de las neuronas sensoriales; y asimismo, son de utilidad para diferenciarlas entre especies de animales y el hombre. Por ejemplo, se han encontrado receptores olfativos iguales en humanos y roedores, como es el caso del receptor OR912-13, selectivo para la detección específica de cetonas con longitud de cadena de mayor o igual a 4 átomos de carbono, y un grupo carbonilo localizado preferentemente en la posición C<sub>2</sub> ó C<sub>3</sub>, que solamente es funcional en los roedores mas no en el humano, lo que puede explicar posibles mutaciones durante la evolución de las especies (Gaillard y cols., 2002).

### *Neurotransmisores en el sistema olfativo.*

En las antenas de los insectos se ha observado que para que se lleve a cabo la transducción olfativa en la membrana celular, se necesita de un segundo mensajero, el IP<sub>3</sub>, que en estos animales está implicado en la función de detección de olores (Breer y cols., 1990). Asimismo, desde 1950, el estudio de la función neurobiológica del sistema olfativo de los insectos, ha precedido a las investigaciones en vertebrados, y es importante para la formulación de principios generales (Hanssons, 2002).

Estudios experimentales realizados en invertebrados, sobre todo en insectos, señalan a la acetilcolina como el neurotransmisor en las sinapsis de neuronas receptoras olfativas (Sanes y Hildebrand, 1976). También existen receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos en el bulbo olfativo de invertebrados (Morley y cols., 1977; Kobayashi y cols., 1978). En diversos vertebrados, por ejemplo en las ratas, la carnosina (B-alanyl-L-histidina) se considera como un posible neurotransmisor en el bulbo olfativo (Margolis, 1974). En el nervio olfativo, bulbo olfativo y membranas cerebrales de los mamíferos, se localizan receptores con un sitio de reconocimiento común para benzodiazepinas y [3H]propilbeta-carbonil-3-carboxilato ([3H]PrCC), [3H]-diazepam, [3H]flunitrazepam (Nielsen y cols., 1981). En esas mismas estructuras olfativas se ha observado una alta concentración de taurina, que actúa competitivamente con las sustancias antes señaladas, inhibiendo la unión de [3H]flunitrazepam y provocando una pequeña inhibición sobre la unión de [3H]etilbeta-carbinol-3carboxilato (Medina y De Robertis, 1984). Este efecto específico de la taurina sobre un complejo receptor ionóforo en las membranas cerebrales de la rata (Iwata y cols., 1984; Dawson y cols., 1988) podría explicar la facilitación de la excitabilidad neuronal, que se traduce como una mejor transducción de la señalización química en el sistema nervioso. En estudios recientes se menciona como posible neurotransmisor en neuronas olfativas al óxido nítrico (ON) cuya acción eleva la concentración del guanidil monosfosfato (GMP) cíclico en la célula neuronal expuesta a una estimulación prolongada (Breer y Shepherd, 1993), mediante la ON sintetasa que cataliza la oxidación de L-arginina produciendo ON y citrulina. Estos últimos neurotransmisores, actúan como neuromoduladores de la función olfativa, uno en forma competitiva y el otro comunmente relacionado con situaciones en las que se presenta estrés oxidativo. La importancia de señalar a estos neurotrasmisores radica en la protección que brindan al sistema nervioso

cuando se encuentran presentes y la funcionalidad del sistema olfativo para llevar a cabo eventos de transducción, transmisión sináptica e integración de estructuras olfativas relacionadas para el reconocimiento del olor. Ante la disminución o ausencia de algunos de los neurotransmisores ya señalados, el organismo cursa con alteraciones olfativas, dependiendo del sitio donde el neurotransmisor se encuentre alterado, provocando síntomas característicos de algunas enfermedades neurodegenerativas.

El glutamato se encuentra como neurotransmisor excitador en las sinapsis de células en penacho, mitrales y con las dendritas de neuronas receptoras olfativas (Berkowicz y cols., 1994; Chen y Shepherd, 1997). Recientemente se ha observado que la inhibición de receptores GABA(A) en el bulbo olfativo produce una disminución en las corrientes celulares postsinápticas inhibitorias, con un significativo incremento de actividad theta y gamma en las frecuencias de oscilación de las neuronas mitrales y empenachadas. En el ratón esto se traduce funcionalmente en una mejor discriminación del olor entre alcoholes monomoleculares muy relacionados (Nusser y cols., 2001). La oxitocina se sintetiza en los núcleos paraventricular, supraóptico, comisural anterior y de la estría terminal (Kendrick y cols., 1992) y se encuentra en concentraciones altas en el bulbo olfativo de las ovejas durante el parto, en la estimulación vaginocervical, en la lactancia y durante la separación de las crías de la madre (Kendrick y cols., 1992). El bulbo olfativo, la región preóptica y los núcleos de la banda diagonal de Brocca reciben fibras oxitocinérgicas desde el núcleo paraventricular y, por consiguiente, hay un incremento en la concentración de oxitocina en estos sitios durante los eventos citados anteriormente (Guevara, 1995). La exposición prolongada a olores enriquecidos, a diferencia de la exposición también prolongada para un olor que no lo es, durante un mismo periodo de tiempo para ambas circunstancias, provoca neurogénesis en la zona subventricular (Rochefort y cols., 2002). En esta zona se generan células consideradas precursores neuronales con progenie, que migran rostralmente a lo largo de una vía conocida como la vía migratoria rostral antes de que alcancen el bulbo olfativo, donde se diferencian en interneuronas locales. Esta neurogénesis mejora la memoria olfativa en los roedores (Rochefort y cols., 2002). En el bulbo olfativo existe un patrón de activación neuronal que contribuye a la representación neural de los olores, es decir, ante la estimulación por un determinado olor se activará una región determinada del bulbo olfativo (Linstner y cols., 2001). Esto depende del número de átomos de carbono que posea la molécula olorosa.

En el bulbo olfativo accesorio (BOA) de animales de laboratorio se ha observado la liberación de GABA. Cuando se cuantifica su concentración con la técnica de microdiálisis durante y después de la aplicación de tareas que requieren ser aprendidas, se evalúa el aprendizaje y la capacidad de memoria, encontrando que existe un incremento en la inhibición entre células granulosas y mitrales del BOA; así como una disminución de la relación aspartato/GABA después de que las tareas se han aprendido (Brennan y cols., 1995). Este mismo autor señala que en la rata durante el apareamiento se libera noradrenalina en el bulbo olfatorio accesorio después de la estimulación vagino-cervical.

### *Capacidad olfativa en los vertebrados.*

La clasificación de la función olfativa en los seres vivos ha dado pie a diferencias de opinión, ya que algunos autores de libros de texto dividen a los animales en macrosmáticos y microsmáticos al tomar en cuenta el tamaño de la superficie de la mucosa olfativa que poseen y el número de receptores que contiene esa superficie (Berne y Levy, 1988; Guyton, 1997). Recientemente se menciona que la clasificación basada solamente en hallazgos neuroanatómicos es inadecuada, ya que los estudios que miden la capacidad olfativa y estructuras neuroanatómicas en diferentes especies de animales, muestran que no hay una correlación significativa entre la capacidad olfativa y escala evolutiva. La capacidad olfativa depende no sólo de la escala evolutiva de cada especie, sino también de otros factores (Laska y Seibt, 2002).

Se ha planteado la posibilidad de que la capacidad olfativa de los animales depende también de la presencia del órgano vomeronasal, conocido también como órgano de Jacobson, se encuentra en la mayoría de los mamíferos terrestres, anfibios y reptiles, pero está ausente o sólo hay vestigios en peces, aves, primates superiores, y algunos anfibios acuáticos. Se han encontrado vestigios de este órgano en los fetos humanos (Kreutzer y Jafeck, 1980), y en muchos adultos se han observado sólo las cavidades donde alguna vez estuvieron presentes dichos órganos vomeronasales (Johnson y cols., 1985), pero no hay evidencia de células sensoriales. Otros autores mencionan que efectivamente este órgano vomeronasal existe en algunos humanos pero no es funcional como en las ratas, animales en los que se ha logrado tipificar familias de receptores homólogos a los de los humanos (Kouros-Mehr y cols., 2001). Recientemente, mediante endoscopía nasal, se logró encontrar evidencias de dicho órgano en el 59% de los cadáveres estudiados y en el 28% de humanos vivos, con confirmación histológica del tejido biopsado (Won y cols., 2000).

El órgano vomeronasal desempeña un papel importante en la comunicación química de muchos vertebrados terrestres, ya que participa en la percepción de estímulos relacionados con el comportamiento reproductivo y social en muchas especies de vertebrados, incluyendo el hombre (Heimer y Larson, 1967). En cricetos machos, actúa en conjunción con el sistema olfativo primario, constituyendo el sustrato neural para el apareamiento (Powers y Winans, 1975; Kaba y Nakanishi, 1995). Se ha observado que el órgano vomeronasal no es la única estructura que influencia el apareamiento en los vertebrados, ya que en algunos roedores la extirpación bilateral del bulbo olfativo abole o debilita la actividad copulatoria (Heimer y Larsson, 1967).

La vía vomeronasal se proyecta del bulbo olfativo accesorio específicamente al complejo corticomedial de la amígdala, y esta región se proyecta a su vez al núcleo medial en el hipotálamo, relacionado con la regulación neuroendócrina del comportamiento sexual (**Fig. 7**). Este sistema vomeronasal

puede ser estimulado por sustancias químicas u orgánicas denominadas feromonas (Bruce, 1959). Una feromona es un compuesto semioquímico contenido en las excreciones de un ser vivo, que al ser liberado y ponerse en contacto con el receptor del órgano vomeronasal de otro individuo, puede regular los periodos menstruales e influir en los procesos hormonales, provocando atracción entre géneros iguales o distintos, facilita el cortejo y modula la reproducción, la agresividad o el comportamiento territorial. Entre algunas de estas feromonas se encuentran la androsterona y el androsterol clasificadas también como hormonas. Ambas hormonas al igual que otras pueden ser sintetizadas químicamente en el laboratorio, siendo el exaltolide el equivalente químico del androsterol. Son percibidas como placenteras únicamente en la fase ovulatoria del ciclo menstrual (Köster, 1965; Vierling y Rock, 1967; Doty y cols., 1981).

La androsterona es capaz de afectar la longitud de los ciclos menstruales de las mujeres con ciclos menstruales normales (Köster, 1968; Sokolov y cols., 1992) y que fueron expuestas a la percepción olfativa de la androsterona durante algún tiempo. Estas feromonas se obtuvieron del sudor axilar de mujeres que se encontraban en la fase folicular de su ciclo menstrual, y produjeron una elevación brusca en la concentración de la hormona luteinizante de las mujeres receptoras con acortamiento de sus ciclos menstruales. Cuando los componentes del sudor axilar (5-alfa-16-androsteno-3-alfa-ol) de las mismas donadoras fue colectado durante la ovulación y dado a oler a las receptoras, tuvieron el efecto opuesto: las receptoras retrazaron la liberación de hormona luteinizante y alargaron sus ciclos menstruales (Stern y McClintock, 1998; Cowley y Brooksbank, 1991). Asimismo, en ratas hembras se exploró el efecto de las feromonas sobre los ciclos ováricos, encontrándose el mismo efecto antes descrito y por esa razón recibieron el nombre de feromonas preovulatorias y feromonas ovulatorias (Schank y McClintock, 1997). Hummel y cols., (1991) señalan a la androsterona como la sustancia con características más parecidas a las de una feromona. Esto coincide con otro estudio, donde se demuestra que la androsterona es percibida como placentera alrededor de la fase ovulatoria por mujeres que no tomaban píldoras anticonceptivas (Grammer, 1993). En mujeres en edad reproductiva, a la androsterona se le describe la capacidad de producir un incremento en la sensibilidad olfativa, durante exposiciones repetidas a tal sustancia en su estado volátil por intervalos cortos (Dalton y cols., 2002). La exposición al androsterol, una sustancia estructuralmente relacionada con la androsterona, provocó un cambio en el talante de las mujeres a las que les fue administrada, con la tendencia a manifestarse de una forma más amistosa y agradable a la mitad del ciclo menstrual, sin cambios en las otras fases. (Benton, 1982). Los cricetos machos son sexualmente provocados por los olores de los líquidos vaginales de las hembras. El grado de provocación depende de la fase del ciclo estral que presenta la hembra. Un elemento volátil en las secreciones, el m-dimetil disulfuro mezclado con ácidos grasos de cadena corta que comúnmente se encuentran en las secreciones vaginales de las hembras, es atractivo para los cricetos machos (Singer y cols., 1976) y también para el mono rhesus macho (Cowley y cols., 1991). Esta feromona al unirse a las células del órgano vomeronasal provoca el interés del criceto macho en la hembra, y resulta en un comportamiento de lamidos o acercamiento (Powers y Winans, 1975). Se ha estudiado la acción de

las feromonas en el comportamiento de los mamíferos terrestres, anfibios (Rosser y Keverne, 1985), reptiles de distintas especies incluyendo los queloides, en los que se midieron las corrientes de voltaje en los órganos vomeronasales, que fueron activadas ante la presencia de feromonas (Fadool y cols., 2001). Así también algunos peces producen feromonas, como por ejemplo el pez dorado, cuyas feromonas se han utilizado inclusive para medir la velocidad de dispersión de las mismas en ecosistemas oceánicos, observando excitación en el comportamiento de los animales que se encuentran en ese mismo ecosistema cuando las perciben (Baird y cols., 1996). Se han observado 2 tipos de cambios en el comportamiento de dichos animales: excitación, donde los animales se mueven en forma rápida y en círculos y terminan con la liberación de esperma como segundo tipo de comportamiento (Meredith y Moulton, 1978).

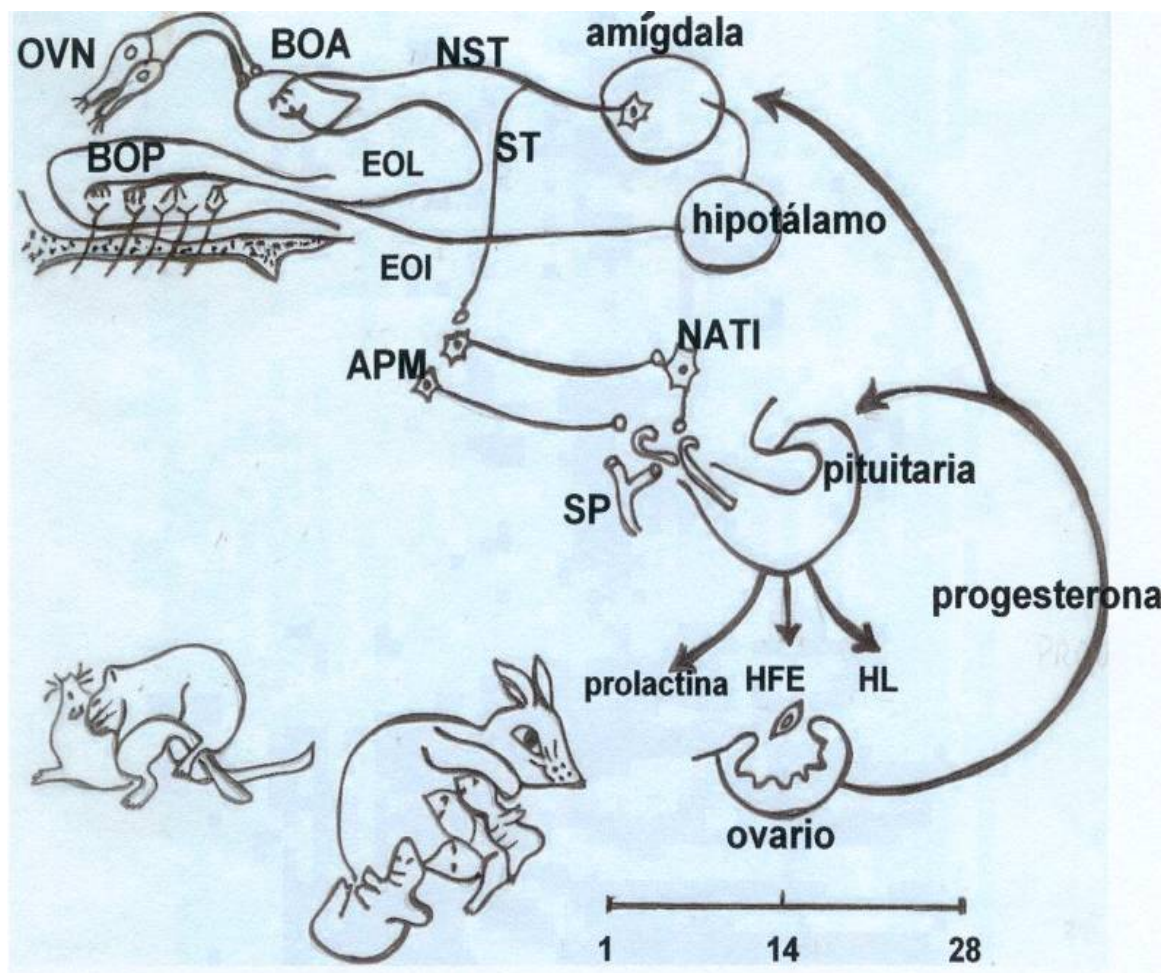


Fig.7. Comportamiento sexual de mamíferos ante un estímulo olfativo que parte desde la membrana mucosa olfativa, atraviesa la lámina cribosa y hace sinapsis en el bulbo olfativo principal (BOP). Asimismo se estimula el órgano vomeronasal (OVN). Ambos emiten proyecciones al bulbo olfativo accesorio (BOA) donde las neuronas mitrales envían sus axones a los núcleos de la amígdala, la cuál a través de la estría terminal (NST) y el área preoptica medial (APM) liberan colecistocinina (CCK) causando estimulación de neuronas arcuatas tubero-infundibulares (NATI) dopaminérgicas y a su vez del sistema portahipofisiario (SP). Se libera FSH, LH y prolactina que en el ovario estimulan la

**producción de progesterona y estrógenos, los que actúan mediante un mecanismo de retroalimentación sobre la pituitaria, regulan los ciclos estrales de las hembras, la actividad copulatoria e influyen para que se lleve a cabo el reconocimiento de las crías por su madre después del parto (Kaba H y Nakanishi, 1995; Bruce, 1960) (modificado).**

En lepidópteros (animales con alas que poseen escamas) las feromonas con las que son atraídos pueden ser alcoholes, aldehídos o ésteres insaturados con cadenas cuya longitud varía entre 8 y 16 átomos de carbono y son percibidas por los machos a niveles de nano y picogramos, pudiendo atraerlos a distancias de entre 10 a 100 metros; asimismo estas feromonas destacan dentro de las sustancias semioquímicas por su uso común en el manejo integrado de plagas agrícolas (Cuellar y Ramírez, 1999), donde se coloca la feromona dentro de trampas para atrapar a los machos y así evitar su reproducción. En los tiburones (*Squalus acanthias*), se han encontrado proteínas receptoras a cationes polivalentes que funcionan como sensores de salinidad, localizados en órganos considerados osmoreguladores entre los que se incluyen los túbulos del riñón, glándulas rectales, estómago, intestino, agallas y cerebro; que son considerados de suma importancia para la regulación de las concentraciones sanguíneas de calcio, magnesio y sodio en estos animales (Nearing y cols., 2002). En este estudio no se menciona, si estos osmoreguladores funcionan como receptores de feromonas o de alguna otra sustancia extraña en su medio ambiente, que les sirvan para la localización de sus presas en su territorio. Lo que si se ha estudiado es la acción de sustancias como el pavoninin-5 ((25R)-cholest-5-en-3beta,15 alfa,26-triol) que sirve como repelente para los tiburones, observando un comportamiento más amistoso en tales animales cuando lo perciben (Williams y cols., 2002). Aunque en este estudio no mencionan si el pavoninin-5 es una feromona, se puede inferir que probablemente haga las funciones de dichas sustancias, ya que en la definición de feromona se indica que son sustancias que al ser percibidas por algún animal provocan cambios en su comportamiento original, que pudieran ser de rechazo o acercamiento.

Las observaciones en humanos han mostrado que algunas sustancias odoríferas que son producto de secreciones corporales, y que hacen las veces de feromonas, producen cambios orgánicos en eventos cíclicos dependientes de las hormonas, que en forma normal serían controlados por el eje hipotálamo-hipófisis-órgano blanco. Entre las sustancias orgánicas que se considera que contienen feromonas se encuentran las secreciones vaginales de mujeres en las diferentes fases del ciclo menstrual y la secreción de las glándulas axilares. Los hombres expresan un placer particular durante la percepción de las secreciones obtenidas en la fase ovulatoria de la mujer (Doty y cols., 1975). No se ha podido identificar aún cuál de los más de 30 componentes de las secreciones vaginales es el responsable de producir la feromona o proveer un sustrato para la producción bacteriana de sustancias volátiles ya que la bacteria corineforme transforma precursores no olorosos a formas olorosas. El sistema vomeronasal participa también en la regulación de la liberación de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) en el cerebro (Cummings y Brunjes, 1995).

Otro ejemplo del importante papel del olfato y el órgano vomeronasal en los animales, es el efecto Bruce: una ratona preñada puede distinguir entre el olor de su pareja de apareamiento y un macho extraño. Si la hembra permanece con el macho seminal durante 4-6 hrs y después es colocada en la proximidad de un macho extraño, provoca una involución del embrión que es reabsorbido y luego se aparea con el nuevo macho (Bruce, 1959). Algunos autores suponen que la orina del macho está asociada con el bloqueo de la preñez (Parkes y Bruce, 1962) y la respuesta es mediada por el sistema vomeronasal (Kaba y Nakanishi, 1995).

En los reptiles machos, como la serpiente café (*Boiga irregularis*), el olfato desempeña un papel muy importante en el reconocimiento de feromonas, sobre todo durante la época de apareamiento (Greene y cols., 2001). Lo mismo ocurre en serpientes donde la denervación bilateral del órgano vomeronasal, elimina el comportamiento sexual (Kubie y cols., 1978). Los efectos de las lesiones de los nervios vomeronasal y olfativo de las serpientes (*Thamnophis sirtalis*) mostraron que el sistema olfativo principal es crítico para la iniciación del comportamiento de movimientos rápidos de la lengua en respuesta a una prueba de olores, y que la discriminación de los olores con significancia biológica requiere de una adecuada función del sistema olfativo accesorio (Zuri y Halpern, 2003). Este comportamiento sexual ante el reconocimiento de feromonas, produce liberación de neurotransmisores que son capaces de activar a estructuras superiores, o a aquellas que forman parte del sistema límbico para que se despierte la atracción o el rechazo entre animales de la misma especie.

La ablación del bulbo olfativo, con su concomitante daño al sistema vomeronasal, no consigue eliminar el comportamiento copulatorio normal en cobayos, ratas, ovejas y cerdos. En algunos animales en los que no existe este sistema, o existen solamente vestigios, como en el caso de los primates, otros sistemas están implicados en la excitación sexual.

Asimismo, en el humano no podemos descartar que la activación del órgano vomeronasal puede desencadenar, como se explica en la figura 7, la activación secundaria de estructuras que se relacionan con la conducta sexual humana y con la liberación de hormonas que son capaces de modificar la función e incluso la estructura de los epitelios que se ven influenciados por ellas, incluyendo los epitelios respiratorio y nasal; donde también se han localizado en el neurepitelio olfatorio fetal, la expresión y liberación de Factor Liberador de Hormona del crecimiento (GnRH) (Barni, 1999), pudiendo ser afectados por la acción hormonal directa o indirecta de otras hormonas provenientes de vías endocrinas favoreciendo las condiciones para la recepción de las moléculas olorosas, facilitando la transducción y activando secundariamente mecanismos hormonales capaces de influir en otros aparatos o sistemas.



## II. ANTECEDENTES.

### *La relación entre fenómenos cíclicos y la sensibilidad olfativa.*

A lo largo de la vida de un ser humano se han intentado estudiar los cambios en la percepción olfativa correlacionándola con algunos eventos orgánicos que son cíclicos y están bien establecidos; así como algunas funciones orgánicas están influidas por ciclos circádicos, la función olfativa también puede estarlo. Debido a que el sistema olfativo es influenciado por el sistema trigeminal en la percepción de los olores, (Hummel y Livermore, 2002), algunos autores han medido el umbral al dolor trigeminal y al olor en diferentes horas del día, y encuentran que la variabilidad del umbral olfativo se incrementa a medida que transcurren las horas del día (Lötsch y cols., 1997), mientras que la sensibilidad al dolor no presenta cambios.

Considerando al ciclo menstrual como un evento cíclico, Buselli y cols., citados por Diamond y cols., (1972), lo correlacionan con diferentes modalidades sensoriales, explorando la sensibilidad al dolor para sus investigaciones y encuentran una disminución en la percepción de estímulos dolorosos preferentemente durante la fase ovulatoria. Otra modalidad sensorial medida durante eventos cíclicos ha sido la visual; en mujeres cíclicas hay una diferencia significativa entre los valores promedio de sensibilidad visual encontrados en las diferentes fases del ciclo menstrual. Durante la ovulación se registró la sensibilidad visual más alta, tomando como base la latencia de la onda P100, encontrando que era más corta que en la fase menstrual, donde se registraron latencias más largas y amplitudes bajas de la P100 (Yilmaz y cols., 1998). Asimismo, Riley y cols. (1999) señalan umbrales altos para diferentes modalidades de estímulos nociceptivos (presión, frío, calor e isquemia) durante la fase folicular del ciclo menstrual, mientras que en el resto de las fases no se presenta dicho fenómeno. Esto lo atribuyen a la elevada concentración de beta-endorfinas en plasma que presentan las mujeres en la fase ovulatoria del ciclo menstrual (Veith y cols. 1984). En cambio, cuando se midieron los umbrales auditivos en la fase menstrual del ciclo, se observó que eran más altos (4 kHz) (Swanson y Dengerink, 1988). Se ha señalado al sistema opioide como un factor que coadyuva a la facilitación del aprendizaje y consolidación de preferencias olfativas tempranas durante el periodo más sensible de percepción olfativa, es decir, durante la ovulación (Roth y Sullivan, 2001).

El intento por establecer correlaciones entre la percepción olfativa y los eventos orgánicos bien sincronizados, ha llevado a estudiar el embarazo como uno de los eventos donde se citan preferencias olfativas bien definidas (Kolble, 2001; Bruce, 1959), asignándole el término de “placenteros” a los olores mejor aceptados por las mujeres en esta etapa de su vida reproductiva. Incluso se ha mencionado un cambio en la susceptibilidad a la náusea y a la percepción olfativa durante el embarazo (Fessler, 2001). Los patrones de respuesta electrofisiológica y psicofisiológica inducidos por estímulos olfativos son diferentes para estímulos olorosos “placenteros” y “no placenteros”, y los diferentes olores activan estructuras cerebrales diferentes, mencionando también que esta respuesta de placer o de aversión es involuntaria (Bensafi y cols., 2002). Otros autores

exploran la modalidad olfatoria y gustativa, y describen que existe una disminución en la sensibilidad gustativa durante el primer trimestre del embarazo, aunque no encuentran diferencias en la sensibilidad olfativa, y refieren que las mujeres exploradas sienten más aversión a ciertos estímulos olfativos como el ron, cigarro o café (Kolble y cols., 2001). Algunos investigadores han relacionado estas preferencias y sus variaciones olfativas durante el embarazo con las altas concentraciones de hormonas ováricas circulantes, mientras que otros no han encontrado diferencias sustanciales (Laska y cols., 1996). Bowser y Riederer (2001) por ejemplo, encuentran que las alteraciones en el Síndrome de Rinopatía Grávida se deben a la presencia de cambios secundarios en la concentración de neurotransmisores (substancia P, Oxido Nítrico), debidos posiblemente a una influencia directa de progesterona sobre los fibroblastos y acción estrogénica en los receptores específicos para estrógenos, localizados en las glándulas serosas y sus conductos secretores. También durante la preñez se estudia el comportamiento post-parto a lo largo de un ciclo de 24 horas, encontrando que el mejor reconocimiento de las crías por medio del olfato se presenta en una hora bien determinada del día (Hudson, 1999). En la mujer después del parto la capacidad para discriminar el olor corporal de sus recién nacidos aumenta a medida que transcurre el día (Bonnin y cols., 1990), esto ocurre en los cuatro primeros días posteriores al nacimiento, indicando que las variaciones en los umbrales a este olor específico están basadas en diferentes mecanismos biológicos y psicobiológicos.

#### *Modulación hormonal del Sistema Olfativo.*

Según Mair y cols., (1978), durante el ciclo menstrual hay variaciones en la sensibilidad olfativa. Sin embargo los resultados encontrados usando estímulos olfativos como androsterona, nicotina y fenil-etil-alcohol han sido contradictorios, pues van desde la ausencia de cambios en dicha sensibilidad (Amoore y cols., 1975; Hummel y cols., 1991) hasta una considerable variación en la detección de umbrales olfativos (Stevens y cols., 1988). Según Le Magnen (1952) hay un aumento en la sensibilidad olfativa durante el periodo periovulatorio y un ligero incremento durante la fase luteal y una disminución durante la menstruación. Hummel y cols., (1991) afirman que en la fase ovulatoria es cuando se perciben con más agrado ciertos olores. El talante (estado de ánimo) ha sido también asociado con las diferentes fases del ciclo menstrual. Algunas mujeres expuestas al androsterol, evaluaron su comportamiento como "sumiso", es decir, se mostraron con mejor talante y se sintieron con mejor estado de ánimo a la mitad del ciclo menstrual (Benton, 1982).

Los cambios en la sensibilidad olfativa en las diferentes fases del ciclo menstrual han sido asociados a múltiples factores, algunos de ellos relacionados con cambios específicos de las vías de procesamiento (Fukushima y cols., 2002). Por ejemplo: Schiff (1968), describe congestión nasal en mujeres que toman píldoras anticonceptivas. Por otra parte, Ammar-Kohdja (1971) reportó la presencia de rinitis hipertrófica crónica asociada con el uso de píldoras contraceptivas con alto contenido de estrógenos. Asimismo, Pelikan (1978) cita una reacción de hipersensibilidad de la mucosa nasal con el uso de

anticonceptivos. Topozada y cols. (1984) reportaron que mujeres que ingerían píldoras anticonceptivas tenían una hiperactividad glandular, incremento de mucopolisacáridos ácidos, así como mecanismos de defensa incrementados debido a una actividad fagocítica. Stubner y cols., (1999) observaron correlación entre la concentración de estrógenos y la reactividad alérgica nasal. En cambio, en mujeres menopáusicas, hay reducción en el número de glándulas de la túnica del epitelio nasal y mayor localización. También en esta etapa, los acinos serosos fueron más numerosos y los mucosos revelaron gránulos secretorios de densidad variable, y numerosas mitocondrias. La actividad de las cinco enzimas determinadas (deshidrogenasa succínica, alfa estearasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y estearasa de la colina) estaba moderadamente incrementada (Topozada, 1988). Más recientemente Ellegard y Karlsson (1994) y Paulsson y cols. (1997) no encuentran una correlación entre la congestión nasal y las fases del ciclo menstrual. Otros autores han observado que la congestión nasal presenta variaciones a lo largo del ciclo menstrual (Le Magnen, 1952; Doty y cols., 1981). Según Haeggstrom y cols., (2000) la mucosa nasal es muy sensible a la histamina alrededor del tiempo de la ovulación, cuando la cantidad de estrógenos se encuentra en concentraciones altas. La rinomanometría muestra que las calificaciones más altas que se le dan a este estudio se observaron durante la fase periovulatoria, a diferencia de las fases folicular y lútea. La sensibilidad olfativa más alta tuvo el mismo comportamiento cuando se comparó este grupo con el de mujeres que estaban usando píldoras anticonceptivas. Se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, siendo ésta más aparente en las fases folicular y periovular (Caruso y cols., 2001).

Las hormonas esteroides pueden ejercer un control de la sensibilidad olfativa dentro del Sistema Nervioso Central, como lo es en el caso de la LHRH y los estrógenos, que actúan dentro del bulbo olfativo y en algunas otras áreas centrales de procesamiento olfativo modulando su función (Kratskin, 1995) (**Fig. 8**). El órgano vomeronasal parece estar involucrado en la liberación de hormona LHRH en el cerebro y en la subsecuente liberación de LH, se le ha asignado importancia a la LHRH en la facilitación del comportamiento de monta en muchos animales, particularmente en aquellos que pueden estar en estados subóptimos para la monta por ejemplo: machos con bajos niveles de testosterona- (Meredith, 1991). Sin embargo, se han propuesto una hipótesis sobre la influencia de las hormonas en las etapas prenatal y postnatal temprana (12 días) sobre el sistema olfativo accesorio. Domínguez-Salazar (2002) trató ratas preñadas con Flutamida (bloqueador de receptores de andrógenos), o con el inhibidor de la aromatasa 1,4,6-androstatriene-3,17-diona (ATD), o con placebo para medir el papel que tienen la activación de los receptores de estradiol y andrógenos en la masculinización, durante la etapa prenatal. Para medir esta actividad, al inicio del nacimiento los machos y las hembras fueron inyectados subcutáneamente con ATD, Flutamida o el vehículo oleoso hasta el día 12 de vida postnatal. Cuando los animales alcanzaron la adultez fueron gonadectomizados, tratados con propionato de testosterona o estradiol, progesterona y examinados ante diferentes comportamientos. En los machos tratados en etapa prenatal con Flutamida se observó una disminución de la distancia anogenital, con deterioro de penetración y eyaculación, sin alteraciones en la capacidad de monta. Los animales tratados en

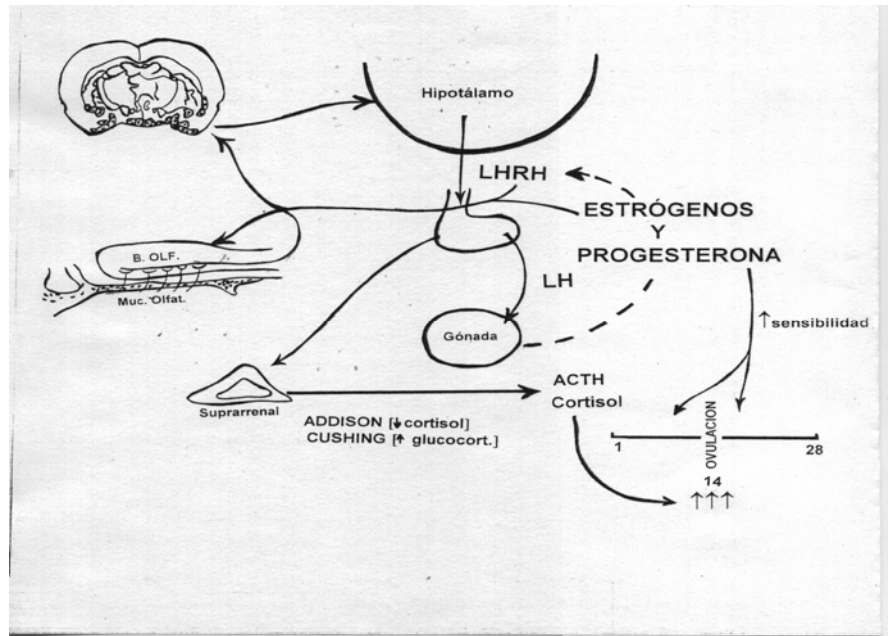
las etapas pre y neonatal con ATD aumentó la respuesta de lordosis en machos después de la inyección de estradiol y progesterona. El tratamiento perinatal no produjo efectos sobre ningún aspecto del comportamiento coital masculino en alguno de los dos sexos.

Después del tratamiento con propionato de testosterona los machos y las hembras controles prefirieron la aproximación a estímulos relacionados a hembras y se opusieron a los estímulos relacionados con los machos, mientras que los tratados con Flutamina prenatal o ATD perinatal no modificaron este patrón de preferencias de pareja. Las respuestas neuronales para olores provenientes de la etapa estral, fueron idénticos en los sistemas olfatorios accesorios de hembras y machos controles gonadectomizados y tratados con propionato de testosterona. En los tratados con Flutamida prenatal o ATD perinatal no se observaron modificaciones en este perfil de respuesta a olores estrales en alguno de los dos sexos. Este comportamiento y los hallazgos neuroanatómicos, plantean la posibilidad de que las respuestas de comportamiento masculino, observadas después del tratamiento con propionato de testosterona, frente a olores sociales son el resultado de respuestas no dependientes de las hormonas esteroides, por lo que es posible que existan factores específicos de cada especie que actúan durante la etapa perinatal en el cerebro de ratas machos y hembras, que rigen el comportamiento sexual específico frente a olores atractivos entre ambos sexos (Domínguez-Salazar y cols., 2002).

Otro factor involucrado en la capacidad olfativa ha sido citado en estudios recientes que muestran que la capacidad olfativa es proporcional al número de neuronas de proyección bulbar intactas que conectan con la corteza olfativa. En la rata normal, el marcaje retrógrado de las neuronas de proyección bulbar fluctuó entre el 20 y el 92% del total de neuronas intactas, mientras que en las ratas anósmicas estuvo entre 0 y 22% (Fukushima y cols., 2002).

En la menopausia suele presentarse una disminución de la capacidad olfativa (Mirza y cols., 1997). Algunos autores señalan que durante la etapa menstrual del ciclo femenino los umbrales olfativos se encuentran aumentados (Hummel y cols., 1991).

Lo que se observa en la mayoría de los resultados de estas investigaciones, es que en la fase del ciclo menstrual donde las concentraciones sanguíneas de hormonas gonadales se encuentran elevadas, las respuestas sensoriales estuvieron facilitadas. Sin embargo, Doty y cols., (1986) proponen que el eje hipófisis-suprarrenal es responsable de las variaciones menstruales de la sensibilidad olfativa (Doty y cols., 1986). Asimismo, Genazzani y cols., (1975) mencionan que las concentraciones plasmáticas de corticotropina (ACTH) y cortisol varían durante el ciclo menstrual, y presentan un incremento alrededor de la fase ovulatoria.



**Fig.8.** Se esquematiza la importancia del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y sus diversas secreciones en la regulación de la sensibilidad olfatoria durante la ovulación. Algunos autores asignan esos cambios a las hormonas suprarrenales; otros sugieren que el número de receptores para hormonas gonadales localizados en estructuras superiores relacionadas con la olfacción, facilitan y mejoran la integración del estímulo olfativo. (Las líneas continuas indican estimulación, las líneas discontinuas indican inhibición).

Estos hallazgos son interpretados como un indicador de que los incrementos en el cortisol plasmático aumentan la sensibilidad olfativa, aunque los estudios clínicos en enfermos que presentan patología en las glándulas adrenales indican resultados contrarios (**Fig. 8**). Por ejemplo, los pacientes con enfermedad de Addison tienen concentraciones de cortisol disminuidas, pero su sensibilidad olfativa está incrementada. En pacientes con síndrome de Cushing se observan concentraciones sanguíneas de glucocorticoides altas, pero una baja sensibilidad olfativa (Mackay-Sim y Kittel, 1991). A la progesterona se le ha atribuido también el incremento en la sensibilidad olfativa durante las fases lútea del ciclo menstrual; esta influencia se demostró mediante un estudio de realizado en 20 mujeres con ciclos menstruales regulares, expuestas a respiración de CO<sub>2</sub> tres veces a la semana durante un periodo de seis semanas. Se midieron los umbrales para CO<sub>2</sub> en las tres fases del ciclo menstrual, reportando una elevada sensibilidad para el CO<sub>2</sub> en las fases folicular y lútea, lo que se atribuyó a la elevada cantidad de progesterona circulante que se presenta en forma normal durante la fase lútea (Dutton y cols., 1989). En este trabajo no se hace mención de la influencia estrogénica en la elevada sensibilidad olfativa durante la ovulación.

Como podemos darnos cuenta, los resultados en cuanto a la correlación de la función olfatoria con concentraciones sanguíneas hormonales específicas es difícil de definir, pues los resultados reportados en estos estudios ya mencionados son contradictorios.

*Métodos de evaluación de la función olfativa.*

Normalmente, en el manejo médico de la patología del sistema olfativo se puede encontrar una disfunción olfativa que puede ser caracterizada como una pérdida total, una disminución, un incremento, o una distorsión de tal función (Jones y Rog, 1998).

Se han utilizado un sin fin de técnicas para medir la función olfativa en sus diferentes modalidades en el humano, algunas de ellas solo sirven para evaluar discriminación, otras miden la intensidad de percepción del estímulo olfativo y algunas más estandarizadas y precisas miden el umbral de percepción del olor. En la clínica algunas de estas pruebas han sido útiles para diferenciar anosmia de parosmia (Aufferman y cols., 1993).

Desde 1956 Cheesman y Townsend utilizaron *recipientes de vidrio con tapón de rosca*, que también usaron Doty y cols., en sus investigaciones de umbral de olfato en 1975 y en 1986. Se han utilizado frascos opacos para evitar que el sujeto explorado identifique el contenido de ellos. El inconveniente de esta técnica es que los recipientes deben ser cerrados completamente inmediatamente después de haber sido utilizados por el sujeto evaluado, para evitar que el olor escape y que las sustancias olorosas permanezcan en el ambiente durante todo el tiempo de la prueba, provocando confusiones. En algunas de estas pruebas de identificación del olor, se han utilizado hasta 20 o más frascos, lo que conlleva a emplear mucho tiempo para aplicarla. Una modificación de esta técnica es la de *presión de botes* (Amoore y Ollman, 1983; Cain y cols., 1988,1991; Commetto-Muñiz y Cain, 1998), que utiliza recipientes de plástico que no es necesario abrir, sino simplemente se presionan y las moléculas olorosas salen del recipiente directamente a la cavidad nasal a través de un aplicador con punta delgada que se introduce en las fosas nasales. Es una técnica muy práctica que permite transportar estos recipientes al sitio donde se llevará a cabo la prueba sin ninguna dificultad, permitiendo incluso que la sustancia olorosa permanezca en el recipiente durante varias horas sin perder sus propiedades olorosas.

La comúnmente utilizada para evaluar la discriminación de olores, es la técnica de *barras de vidrio o pedazos de papel humedecido en la solución* (Toyota y cols., 1978; Kondo y cols., 1998). Esta técnica implica tener a las soluciones olorosas dispuestas en pequeños recipientes donde el sujeto explorado debe introducir los trozos de papel para mojarlos en las distintas soluciones. Esta técnica es también muy laboriosa. Una modificación de la técnica anterior es la que utiliza *torundas de algodón* (Davidson y cols., 1998) donde generalmente utiliza alcoholes para medir intensidad de percepción del estímulo. Uno de los inconvenientes es que se evaporan fácilmente si no son utilizados de inmediato, lo que influye para la precisión de los resultados de lo que se intenta evaluar.

El *examen de matriz de confusión de olores* (Wright, 1987). En este examen se mide la reproducibilidad de la respuesta de un sujeto. Se le presentan 10 opciones y debe elegir una. El proceso se repite en varias ocasiones y el sujeto elige el mismo olor.

En el *Examen de identificación de olor de la Universidad de Pensilvania (UPSIT)* (Doty y cols., 1984), son 40 olores microencapsulados que el sujeto debe raspar y oler para identificarlos. Se le da una puntuación de acuerdo al número de los

aciertos. Por el gran número de olores que debe identificar y la labor del rascado, la prueba tiende a ser tediosa y conlleva tiempo.

Se ha reportado la utilidad de los *Potenciales provocados olfativos* (Kobal y Hummel, 1996; Pause y cols., 1996; Cui y Evans, 1997), como una técnica para valorar la integridad de la vía olfativa, midiendo el tiempo de latencia de una respuesta olfativa posterior a la aplicación de un estímulo olfativo; los electrodos se colocan en la superficie de la piel cabelluda, donde se registran los potenciales. Los aparatos utilizados son de alto costo, ya que requieren de un programa computarizado que utiliza métodos matemáticos como es la transformada de Fourier para su registro en pantalla.

En estudios clínicos y experimentales también se ha utilizado el estímulo eléctrico a la mucosa olfativa, registrando la respuesta en el tracto olfativo y en la piel cabelluda de la región fronto-temporal (Sato y cols., 1996). Como puede inferirse esta técnica es invasiva con grandes molestias para el sujeto explorado. En forma simultánea se ha registrado la variación contingente negativa, que consiste en medir la latencia y amplitud de los potenciales provocados para compararlos con grupos control, ya que es útil para valorar desórdenes como anosmia o parosmia (Aufferman y cols., 1993). Como se trata de estudios computarizados donde se utilizan programas con patentes registradas, generalmente son precisas pero de alto costo.

Basándose en algunas de las técnicas ya citadas anteriormente y realizando modificaciones a los mismos, se han diseñado nuevos instrumentos para medir la función olfativa, como el *Olfatómetro T & T* (Kondo y cols., 1998), modificado de la Técnica de discriminación de olores utilizada por Doty y adaptada a las necesidades y el nivel sociocultural de la población japonesa. Esta técnica no se puede considerar universal, ya que utiliza algunos olores característicos de comida que consumen los habitantes de aquella región.

La técnica de *barras de olor (sniffin sticks)*; los olores están localizados en la punta de una pluma de fieltro (Hummel y cols., 1997 y 2001, Wolfensberger y cols., 2000; Kolble y cols., 2001), muy parecida y con los mismos inconvenientes de la técnica de papel humedecido de Toyota. La *nariz bioelectrónica* (Tzong-Zeng, 1999) consiste en proteínas receptoras olfativas aisladas, colocadas sobre la superficie de un electrodo piezoeléctrico, que sirve como un transductor de señal. Estas narices electrónicas funcionan como sensores artificiales de olores y se han utilizado en algunas industrias para desarrollar una variedad de pruebas de identificación de olor (Thaler y cols., 2001). Aunque este dispositivo se utiliza in vitro, aún no se ha adaptado para el uso en seres humanos, pero podría servir como un detector de alta sensibilidad para olores del medio ambiente, sobre todo porque podría ser adaptado a un aparato que emita una señal de alerta ante la presencia en el medio ambiente de mínimas cantidades de sustancias nocivas para el hombre y que no son detectadas por otro tipo de dispositivo.

Existen medidas volumétricas de las estructuras olfativas con lo que puede observarse el bulbo olfativo y sus tractos, así como los lóbulos temporales. Esto se realiza por imágenes de resonancia magnética, observando la variabilidad de las mismas cuando se les pone en funcionamiento; son calculadas por medidas de correlación y diferencias de porcentaje (Yousem y cols., 2001). Aunque es muy precisa y especializada, es de alto costo.

Se han diseñado instrumentos que dosifican el estímulo aplicado, le regulan la temperatura, la presión y el tiempo de administración. Generalmente se acoplan a una computadora, que promedia el número de respuestas obtenidas mediante una transformada de Fourier. (Kendal-Reed y cols., 1998). Asimismo, mediante este análisis se han medido las respuestas magnetoencefalográficas en humanos utilizando como estímulo olfativo al acetato de amilo (Mouri y cols., 2002), ya que esta sustancia olorosa es muy conocida en forma universal.

Algunos de estos instrumentos de evaluación han sido validados utilizando como método comparativo a la prueba de UPSIT (Test de identificación del estímulo de la Universidad de Pensilvania), típica para la población Norteamericana, y se observó que algunas de las respuestas propuestas no son iguales en todas las culturas (Kondo y cols., 1998).

La *prueba de umbral olfativo* determina la mínima cantidad de una sustancia olorosa que es percibida por el sujeto explorado, generalmente se usan concentraciones crecientes de las sustancias odoríferas contenidas en los recipientes señalados (Doty y cols., 1994; Davidson y Murphy, 1997; Murphy y cols., 1998). Puede usarse un *método ascendente de límites*, que consiste en presentar la sustancia olorosa en concentraciones que van de la menor a la mayor; el sujeto explorado debe identificar en que momento inicia la percepción del olor de dicha sustancia. En otras ocasiones se utiliza el *método de escalera con elección forzada* (Doty y cols., 1984; Löstch y cols., 1997, Commetto-Muñiz y cols., 2002), en el que al sujeto se le asigna un tiempo determinado para oler cada uno de los recipientes, sin darle oportunidad de elegir el tiempo que él necesite para la identificación del olor. En algunas otras pruebas se utiliza *el método de respuestas no forzadas*, como en el caso del olfatómetro T & T , donde el sujeto puede tomarse el tiempo necesario para identificar con tranquilidad el olor y expresar su opinión con respecto al olor que está percibiendo. El *análisis de dilución del extracto del aroma*, donde examinan los umbrales de olor de 12 componentes diferentes, muestra que en la mayoría de los casos un valor de 10 es la mejor opción, ya que los valores más bajos de dilución solamente son ventajosos si la solución analizada contiene componentes con una distribución de umbrales muy estrecha (Ferreira y cols. 2002).

#### *Sustancias utilizadas para medir la función olfativa.*

Las sustancias utilizadas han sido variadas y se pueden mencionar; alcoholes de diversos tipos: B-feniletíl alcohol, metil ciclopentenolona, ácido isovalérico, gama-undecalactona, escatol (Kondo y cols., 1998); n-butíl acetato, isoamil butirato (IAB), feniletílmétiletil carbinol (PEMEC), butanol (Cain y Gent, 1991; Davidson y Murphy, 1997); alcohol isopropílico (Davidson y cols., 1998), cumeme, p-cimeme, delta-3-carene, linalool, 1,8-cineole y geranio (Commetto-Muñiz y Cain, 1998); gases como el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>S a diferentes concentraciones (Lötsch y cols., 1997) y exudados corporales y vaginales (Doty y cols., 1975). Se han usado otras sustancias como los cítricos (Pause y cols., 1996), la nicotina y el mentol (Rossenblatt y cols., 1998); canela, lima, cinamaldehído (Doty y cols., 1984); chocolate, goma de mascar, cacahuate, uva, lilas, humo, gas natural, aceite



de motor, plátano, acetato de amilo (Jordan y cols., 2001), durazno, grasa, cebolla, menta, gasolina, sandía, naranja, pizza, jabón, cuero, coco, cedro, rosa, fresa, trementina, limón, pino, queso, thinner, cerveza, cereza, gengibre, clavo, ponche de frutas (Doty, citado en Kondo y cols., 1998).

Las sustancias olorosas que se han utilizado para medir el umbral olfatorio, generalmente deben ser reconocidas fácilmente por la población en quienes se aplicará la prueba, y una de ellas ha sido el acetato de amilo, ya que esta sustancia tiene un olor a plátano fácilmente identificado a nivel universal (Jordan y cols., 2001; Mouri y cols., 2002), es un olor agradable y fácil de conseguir.

*Importancia del eje hipotálamo-hipófisis-ovario como un mecanismo regulador que modula la función olfativa.*

En la especie humana la diferenciación de las gónadas primitivas en testículos y ovarios se determina genéticamente en el momento de la fecundación. Las gónadas son activadas por gonadotropinas secretadas en la hipófisis anterior; es a partir de la adolescencia cuando aparecen los caracteres sexuales secundarios y se instala el ciclo sexual en la mujer (Harrison, 1981).

La función de las gónadas es la producción de células germinales (gametogénesis) y la producción de hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos y progesterona); hormonas que son secretadas normalmente en hombres y en mujeres. Los testículos secretan grandes cantidades de andrógenos (testosterona) y escasa cantidad de estrógenos. Se ha observado que pacientes con desórdenes endócrinos de estos órganos presentan una alteración de la función olfativa. Por ejemplo en el hipogonadismo hipogonadotrópico (Síndrome de Kallmann), un defecto endócrino de origen hipotalámico que se manifiesta como hipoplasia gonadal, se asocia a anosmia o con grave deficiencia de la función olfativa y un defecto en la secreción de GnRH (Hudson y cols., 1994). Probablemente la deficiencia en la función olfatoria en esta enfermedad también se deba a la nula producción de GnRH de las células olfatorias que expresan proteínas y genes para la producción de este factor liberador (Barni y cols. 1999). En los ovarios las hormonas secretadas predominantemente son los estrógenos y la progesterona, hormona que participa en la preparación del útero para el embarazo. Los andrógenos se secretan en pequeñas cantidades. La corteza suprarrenal secreta andrógenos y progesterona en hombres y en mujeres, y cierta cantidad de estas hormonas se convierte en estrógenos en el tejido adiposo y en otros tejidos. Cuando la edad avanza, en el varón a partir de los 50 años se presenta una disminución de la secreción de hormonas suprarrenales y testiculares, dando lugar al estado conocido como andropausia, en el cual existe un declive de todas las funciones orgánicas, incluyendo la sensibilidad olfativa (Steven y cols., 1997). Otra hormona secretada tanto en hombres como en mujeres es la inhibina, cuya función como su nombre lo indica, es la de inhibir la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) actuando sobre la hipófisis. Para un funcionamiento óptimo de las gónadas se requieren dos hormonas: FSH y hormona luteinizante (LH), que son secretadas en la hipófisis anterior. Entre la hipófisis y las gónadas se establece un mecanismo de retroalimentación que está dado por las hormonas

sexuales (andrógenos, estrógenos, progesterona e inhibina), que le darán a la mujer pospuberal una liberación cíclica de gonadotropinas (FSH, LH), necesarias en la regulación de la menstruación, ovulación, el embarazo y la lactancia, en los cuales se han estudiado los cambios en la función olfativa (Levy, 1998).

En el hombre así como en algunos machos de diferentes especies, la secreción de estas gonadotropinas presenta un ciclo circadiano, ya que su liberación varía según el régimen fotoperiódico al que se sometan, provocando un aumento en la concentración sanguínea de testosterona y de los estrógenos libres, de la fructuosa del semen, de la producción de semen, y una disminución del tiempo de reacción antes de la eyaculación. Se ha observado que la producción de semen de los verracos sometidos a días cortos es más abundante que la de los sometidos a días largos (Mazzari y cols., 1968). En ovejas y en verracos, hay variación estacional en la liberación de testosterona provocando aumento del número de espermatozoides por eyaculación en los meses de agosto a diciembre (Claus y cols., 1984).

En la mujer, entre los 7 y 10 años de edad, empieza un incremento lento y paulatino en la concentración sanguínea de gonadotropinas, que se acelera a medida que la adolescencia se acerca, para alcanzar su máxima secreción aproximadamente entre los 12 años de edad, acompañada de la presentación de la primera menstruación.

Para su estudio, el ciclo menstrual en la mujer se divide en fases folicular, preovulatoria, ovulación, luteal y menstrual. La primera, folicular, que se inicia con el crecimiento del folículo hasta aproximadamente el 6o. día, donde la teca interna de este folículo es la responsable de la secreción de estrógenos. La inhibina, activina y folistatina se producen en las células de la granulosa y actúan sobre su crecimiento. Aproximadamente el 14o. día ocurre la ovulación; unos días previos durante la fase preovulatoria, se presentan las más altas concentraciones de estrógenos que actúan sobre sus receptores específicos, generando con esto una alta sensibilidad de varios sistemas sensoriales, como el visual por ejemplo (Diamond y cols., 1972; Riley y cols., 1999), o algunos otros que ya fueron expuestos antes. Es en las etapas periovulatoria y ovulatoria donde algunos autores han reportado la mejor percepción del sistema olfativo (Doty y cols., 1981; Roth y Sullivan, 2001), aunque hay todavía algunas controversias.

El óvulo expulsado por el ovario es captado por la trompa de Falopio, el cuerpo hemorrágico es sustituido por el cuerpo lúteo (Knobil y Neill, 1994), y esto da inicio a la segunda fase del ciclo, denominada luteal, donde predomina la secreción de estrógenos, progesterona y prostaglandinas PGF<sub>2</sub>alfa al final de la fase luteal, que es fundamental para la desaparición del cuerpo lúteo; es aquí donde algunos autores encuentran un segundo incremento en la sensibilidad olfativa (Le Magnen, 1952). Si no hay embarazo, el cuerpo amarillo degenera cerca de 4 días antes de la menstruación (día 24 del ciclo).

En la mujer alrededor de los 40 años de edad, ocurre una disminución de la secreción de LH y FSH con su consecuente disminución de las concentraciones sanguíneas de estrógenos causando la menopausia (Steven y cols., 1997). Los cambios más aparentes y de rápida instalación ocurren alrededor de los 50 años. Durante esta etapa ocurre la disminución en la liberación de hormona del crecimiento (GH) por la hipófisis, que lleva a una disminución del factor de

crecimiento tipo Insulina 1 (IGF-1) por el hígado y otros órganos, para instalarse la Somatopausia. Las células adrenocorticales responsables de la producción de dehidroepiandrosterona (DHEA) disminuyen su actividad, lo que permite que se instale la adrenopausia.

La disminución de estas hormonas trae consigo un deterioro de la actividad funcional neuronal, sobre todo en estructuras superiores relacionadas con el aprendizaje (Navarrete y cols., 2000; Clark y Peck, 1979; McEwen y cols., 1991; Henderson y cols., 1994 y Paganini-Hill y Henderson, 1994); esto se explica por una disminución en la liberación de algunos neurotransmisores ante la ausencia de tales hormonas. La concentración de glutamato, un neurotransmisor excitatorio, ante la ausencia de estrógenos circulantes trae como consecuencia la acumulación de deshidrogenasa láctica, que causa muerte celular neuronal (Singer y cols., 1996). En las ratas se han mapeado receptores específicos para estrógenos y testosterona en algunas áreas que corresponden al sistema límbico y que tienen conexiones nerviosas con el sistema olfativo, como son: el área preóptica periventricular, el núcleo basal de la estría terminal, el núcleo paraventricular, hipotálamo ventrolateral, núcleo ventrolateral, núcleo dorsal medial y el área preóptica medial y el giro dentado (Stumpf y cols., 1974). Estas dos últimas forman parte del sistema olfativo antiguo. Estos receptores estrogénicos tienen distinta distribución según si se trata de machos o hembras (Brown y cols., 1996), y su presencia se ha citado no sólo en estructuras del sistema nervioso, sino también en múltiples partes del organismo. En todos los sitios donde se han localizado estos receptores, se ha observado la acción protectora de los estrógenos, incluso en algunos de ellos un cambio estructural producto de la acción de tales hormonas. Por ejemplo, en el corazón se ha observado que la administración de estrógenos cambia la estructura del ventrículo izquierdo, actuando sobre las cadenas pesadas de miosina, sobre la matriz de metaloproteínas e incrementa la presencia de receptores para estrógenos y angiotensina 2 (Xu y cols., 2003). En el colon, la acción de los estrógenos sobre sus receptores beta, actúan al igual que en las células mamarias y prostáticas, protegiendo contra la proliferación y transformación maligna, reduciendo el riesgo de presentar cáncer (Konstantinopoulos y cols., 2003). En el aparato reproductor, donde existen receptores alfa y beta estrogénicos (ovario, oviducto, útero, vagina) y solamente receptores alfa estrogénicos en menor cantidad en riñón, uréter y vejiga (Carley y cols., 2003). Asimismo, se ha reportado la presencia de receptores para estrógenos en células epiteliales de glándulas salivales de pacientes con Síndrome de Sjögren (Kassi y cols., 2003). Tanto en la piel como en la unidad pilosebácea, en folículo piloso y papila dérmica, hay predominancia de los receptores alfa estrogénicos. En la epidermis, vasos sanguíneos, matriz epitelial, fibroblastos dérmicos y células papilares dermales existe mayor número de receptores beta estrogénicos. Algunos autores consideran que los receptores beta a estrógenos, son los mediadores de la acción de estrógenos en la piel humana y el folículo piloso (Thornton y cols., 2003). En los monos rhesus se han encontrado receptores estrogénicos en el hipotálamo, relacionados con neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas (Thind y Goldsmith, 1997; Lacreuse y cols., 2002), aunque otras neuronas también los presentan. Diversas regiones del cerebro de la rata presentan receptores a estrógenos y andrógenos (Pompei y cols., 1995;

Diano y cols., 1997; Stumpf y cols., 1974). Algunas de estas estructuras forman parte del sistema límbico. La importancia de estos hallazgos, es que apoyan la influencia hormonal gonadal sobre diferentes tejidos, incluyendo el olfatorio, donde al igual que en otros tejidos donde ya se ha comprobado la acción directa de estas hormonas, puede cambiar estructuralmente al tejido donde actúan y optimiza su función.

Otra explicación del efecto que ejercen las hormonas gonadales al unirse a los receptores estrogénicos, es la existencia de un marcapaso al nivel hipotalámico, o en estructuras cerebrales (o ambos), las cuales, junto con los órganos periféricos ya nombrados (ovarios, testículos y corteza adrenal), regulan los procesos de envejecimiento de los ejes endocrinos (Steven y cols., 1997). Cuando estos ejes endócrinos se encuentran en decadencia, se ha observado que la administración supervisada de estrógenos sintéticos mejora la actividad cognoscitiva en las mujeres menopáusicas (Behl y cols., 1997). También se ha demostrado que hay un retraso en la instalación de la enfermedad de Alzheimer en mujeres tratadas con remplazamiento hormonal (Tang y cols., 1996). Este efecto protector de los estrógenos se comprobó *in vitro* en rebanadas de hipocampo, administrando 17-B estradiol; se observó una excelente protección contra la toxicidad del glutamato (Singer y cols., 1996).

En el efecto protector neuronal participan diferentes elementos, que coadyuvan junto con las hormonas gonadales, al mecanismo de prolongación de la vida neuronal; entre ellos están algunas hormonas como la GH, que aplicada en etapas tempranas del envejecimiento, incrementa la masa y fuerza muscular, la masa del hueso y la calidad de vida; asimismo, parece haber un efecto benéfico de esta hormona sobre el perfil de lípidos y una importante disminución en la grasa corporal (Eshel y cols., 1993). La GH se ha administrado en forma subcutánea para revertir la somatopausia, con buenos resultados en la prevención de la fragilidad ósea, revirtiendo el catabolismo agudo de esa etapa (Blakesley y cols., 1997). Sería interesante observar si la terapia de remplazo antes citada mejora la sensibilidad olfativa en dicha población, pues hay trabajos que demuestran cambios histoquímicos y ultraestructurales de la mucosa nasal de mujeres menopáusicas (Topozada, 1988), y de mujeres que usan píldoras anticonceptivas (Topozada y cols., 1984). Recientemente (Carmine y cols., 2004) se demostró que, las concentraciones de terapia hormonal con estradiol (E2) aplicadas localmente a la mucosa olfatoria de mujeres menopáusicas reduce el tiempo de transporte mucociliar, a diferencia de la terapia estrogénica aplicada por vía transdérmica a estas mismas mujeres, debido a la acción de receptores alfa para estradiol localizados en la mucosa olfatoria que facilitan la transducción de señales en ese tejido.

Se han publicado varios estudios relacionando a la función olfativa con la secreción cíclica de hormonas, sin haberse demostrado hasta el momento datos contundentes de esta correlación. Por ejemplo Le Magnen (1952) relaciona una alta sensibilidad olfativa en las mujeres durante su periodo periovulatorio; siendo Vierling y Rock (1967) quienes puntualizan que el más alto grado de sensibilidad olfativa coincide con la ovulación. Asimismo, Caruso y cols., (2001) coinciden en estos resultados, reportando una alta sensibilidad a los estímulos olfativos durante

las fases folicular y periovular, a diferencia de las fases lútea y menstrual donde dicha sensibilidad se encuentra disminuida.

Sin embargo Schneider y Wolf, (1955) y más tarde Amoore y cols., (1975); Doty y cols., (1975) y Sokolov y cols., (1992) en sus investigaciones no encuentran cambios en la sensibilidad olfativa durante el ciclo menstrual. Grammer y cols., (1993) y Hummel y cols., (1991), citan que en la fase ovulatoria del ciclo menstrual, las mujeres perciben con más placer ciertos olores. Una medida más exacta de este incremento en la capacidad de la percepción olfativa durante el ciclo menstrual, fue realizada por Pause y cols., (1996), quienes registran los potenciales evocados olfativos de mayor amplitud durante la fase ovulatoria del ciclo menstrual.

En cada una de estas investigaciones ya señaladas, las técnicas de estimulación y de registro de la función olfativa han sido diversas dependiendo en gran medida del objetivo de la prueba; encontrándonos con algunas técnicas que resultan muy laboriosas y poco prácticas, sobre todo si son largas, pues esto conlleva al sujeto explorado a perder la concentración y sobre todo el interés de llegar al final de la misma, obteniéndose resultados divergentes.

Después de la determinación de los tipos celulares específicos en el epitelio vaginal con respecto a las fases del ciclo menstrual y que estructura ampliamente y con gran detalle la Dra. Alonso de Ruíz (2000) en su manual, no ha habido un estudio que correlacione si los cambios cíclicos encontrados en este tejido se presentan también en otros, incluyendo al olfatorio; pues de ser así, la influencia hormonal ya establecida para el recambio cíclico del epitelio vaginal, podría aplicarse también al epitelio de la porción nasal, ayudando a contribuir para el esclarecimiento de la gran controversia que aún existe sobre el papel de las hormonas gonadales como moduladoras de la función olfativa. Es por ello que el objetivo de este trabajo es determinar si los cambios cíclicos encontrados en el umbral olfativo durante el ciclo menstrual para otras poblaciones como los asiáticos y europeos (Kondo y cols., 1998), se presentan también en nuestra población; determinando con exactitud en que fase de ese ciclo es mayor la sensibilidad olfativa. Se tomó en cuenta que las hormonas gonadales influyen en la presencia de algunos cambios anatomo-funcionales en otros tejidos del organismo, ya que estimulan la proliferación de un tipo celular específico en cada fase de ciclo menstrual (Alonso de Ruíz, 2000). Por esa razón realizamos una comparación entre tipos celulares encontrados en los epitelios nasal y vaginal de nuestra población de mujeres cíclicas, en las diferentes fases del ciclo menstrual, así como en grupos testigo. Los resultados de este estudio describen por primera vez, la existencia de cambios cíclicos en la morfología de la mucosa nasal, coincidentes con cambios en el epitelio vaginal. Asimismo, se tipificaron las células nasales predominantes en cada fase del ciclo menstrual y se encontró una correlación significativa en los epitelios nasal y vaginal durante las fases folicular y lútea del ciclo menstrual. Se pretende que la técnica sea de utilidad tanto a dichos médicos, como a la medicina especializada encargada de tratar a los pacientes que padecen de alteraciones en la función olfativa.

### III. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El epitelio vaginal es influido por las hormonas gonadales que provocan un cambio en la morfología celular para cada una de las fases del ciclo menstrual, ya bien determinado en mujeres cíclicas (Alonso de Ruíz y cols., 2000). En mujeres meopáusicas donde los ciclos menstruales han desaparecido, tales cambios morfológicos no se presentan. En las mujeres durante estados fisiológicos como el embarazo (Fessler, 2001) o la fase folicular del ciclo menstrual, donde las concentraciones de hormonas gonadales circulantes se encuentran incrementadas; la función de algunos sistemas sensoriales como los de la visión, audición y receptores táctiles se ve facilitada, mientras que existe un incremento del umbral para nociceptores (Diamond 1972; Riley y cols., 1999) cambiando su estado de facilitación a una disminución en la percepción sensorial. Este estado de las sensaciones se invierte cuando las concentraciones hormonales gonadales han disminuido (Swanson y Dengerink, 1988; Yilmaz y cols., 1998). Asimismo, algunos cambios en el comportamiento de las mujeres durante la fase folicular del ciclo, con tendencia a un incremento en la capacidad de memoria (Roth y Sullivan, 2001) y un estado de bienestar físico (Benton, 1982), así como sensaciones más placenteras (Köster, 1965; Vierling y Rock, 1967; Doty y cols., 1981), inclusive con determinación de concentraciones altas de beta-endorfinas en el plasma (Veith y cols., 1984) que son referidas sólo en las fases del ciclo menstrual donde las concentraciones sanguíneas de hormonales gonadales se encuentran incrementadas; nos llevó a pensar que probablemente todos los sistemas sensoriales incluyendo el olfato, tendrían un comportamiento cíclico y su función olfativa se vería influenciada por las hormonas gonadales circulantes. Asimismo, como en todos los epitelios, el olfativo sufre descamación importante, que es producto del recambio celular por regeneración celular local (Nagahara, 1940; Farbman, 1992; Monti-Graziadei y Graziadei, 1979), que probablemente se vería influenciada entre otros factores por influencia hormonal.

En cuanto al umbral olfativo, se ha intentado medir en las diferentes fases del ciclo menstrual con resultados no claros y aún contradictorios, por lo que se re-examinó la existencia de una posible correlación entre las fases del ciclo menstrual, la función olfativa y un recambio celular nasal en las diferentes fases del ciclo menstrual.

## **V. OBJETIVO PRINCIPAL**

Analizar en mujeres mexicanas, si el umbral olfativo en la fase ovulatoria se encuentra más bajo que durante cualquier otra fase del ciclo menstrual, y si el recambio celular de la mucosa nasal sigue un patrón cíclico como el de la mucosa vaginal.

## **VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Medir y comparar el umbral olfativo de mujeres cíclicas y de grupos testigo (mujeres post-menopáusicas, hombres y niñas pre-púberes).
2. Determinar la fase del ciclo menstrual donde el umbral olfativo se encuentre más bajo
3. Comparar y determinar la correlación que existe entre los tipos celulares de la mucosa vaginal y los de la nasal en mujeres cíclicas, durante las distintas fases del ciclo menstrual, así como de mucosa nasal de grupos testigo.

## **IV. HIPÓTESIS**

Al medir el umbral olfativo y al cuantificar el tipo celular nasal predominante en las diferentes fases del ciclo menstrual de mujeres cíclicas, presentarán un umbral más bajo durante la ovulación y un tipo celular en el epitelio olfativo distinto en cada fase del ciclo.

## VII. MATERIAL Y MÉTODO

El protocolo del presente estudio de investigación fue autorizado por los Comités de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Hospital Central Militar (SE.DE.NA.).

Todos los sujetos dieron su consentimiento por escrito. Cuando se trató de menores de edad, se requirió que sus padres firmaran el consentimiento, siendo informados previamente sobre la metodología (fig. 9).

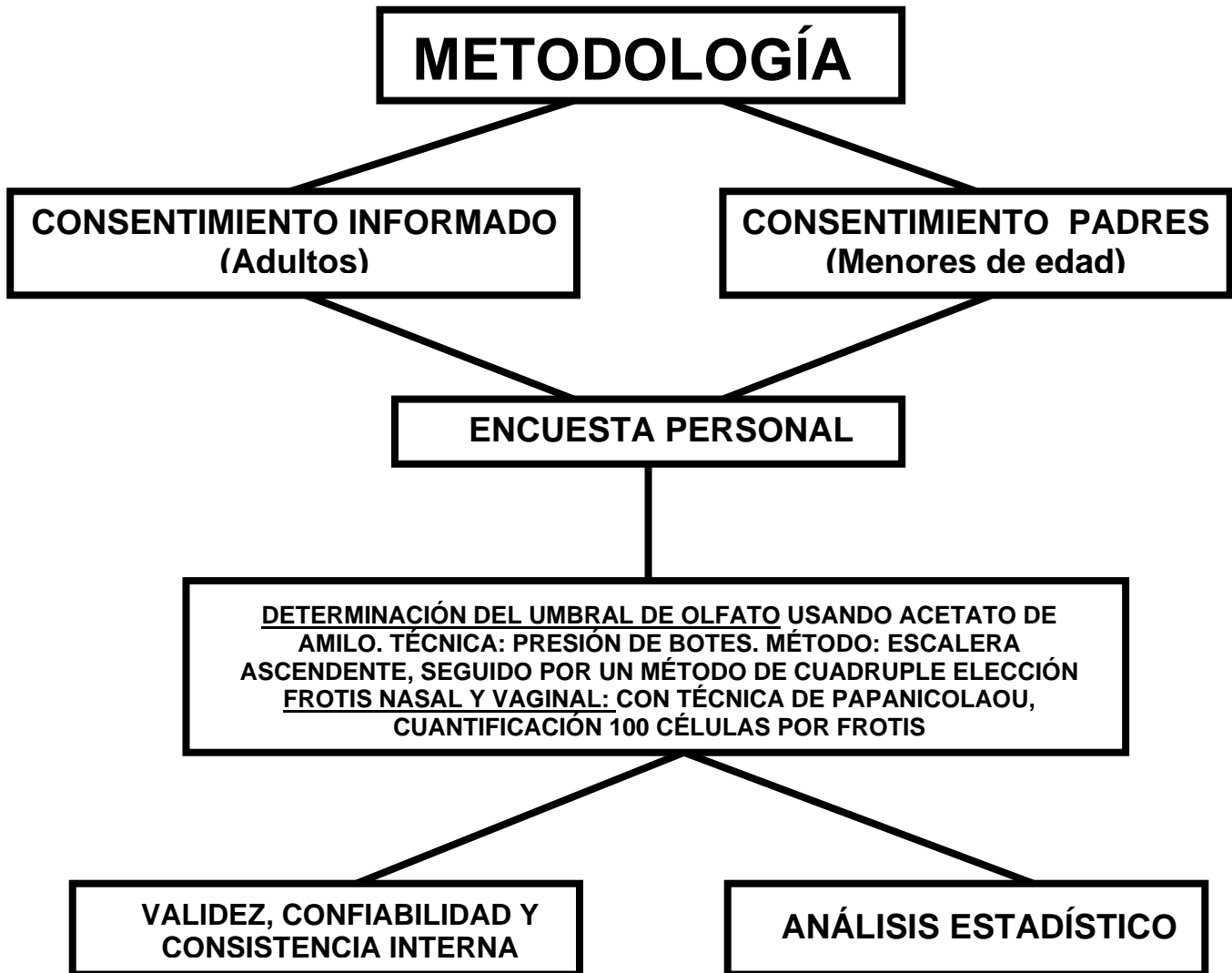


Fig. 9.-Se esquematiza la metodología que se empleó en el presente estudio.



**Sujetos:** se estudió una población total de 673 sujetos incluyendo a 490 mujeres y 183 hombres, algunos de ellos estudiantes y otros no; reclutados en la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Hospital Central Militar, en los clubes pertenecientes al Instituto Nacional de la Senectud y en escuelas primarias públicas y privadas.

Todos los participantes fueron sanos, no fumadores, habitantes de distintas zonas de la Ciudad de México. Ninguno tomaba medicamentos y en el caso de las mujeres, no usaron anticonceptivos durante los 6 meses anteriores al inicio del estudio. Los sujetos fueron instruidos para no usar perfume el día de la prueba, que no bebieran alcohol o café, que no comieran ajo, cebollas o alguna otra comida con especias. Antes de la prueba se les pidió que no consumieran golosinas ni mascararan chicle.

El grupo de mujeres que intervinieron en el estudio fue subdividido con base en la fase del ciclo menstrual. La población quedó subdividida como sigue **(Cuadro 1)**.

GRUPO 1) mujeres ciclicas, a quienes se les aplicó la prueba en una ocasión, con edades entre 13 y 49 años; las que fueron subdivididas en subgrupos de acuerdo a la fase del ciclo menstrual. Sus ciclos menstruales fueron regulares  $28.8 \pm 5.3$  días.

GRUPO 2) mujeres jóvenes, a quienes se les aplicó la prueba repetidamente con edades entre 20-43 años, cuyos ciclos fueron  $29 \pm 0.3$  días, examinadas en tres ciclos consecutivos, en cada una de las cuatro fases de un ciclo menstrual.

GRUPO 3) mujeres post-menopáusicas, con edad promedio de  $67.4 \pm 8.2$  años, con más de 6 meses transcurridos ( $19.7 \pm 4.4$  años) desde su última menstruación.

GRUPO 4) niñas pre-púberes con edad promedio de  $8.3 \pm 2.8$  que no presentaban menarca, telarquía o pubarquía.

GRUPO 5) hombres jóvenes con edad promedio de  $21 \pm 4.5$  años

Los grupos 3, 4, 5 ya que no presentan ciclos menstruales, fueron examinados en tres ocasiones, en lapsos de 14 días.

**Cuadro 1. Composición de los grupos experimentales de acuerdo a la edad**

<b>GRUPOS</b>	<b>N</b>	<b>Edad promedio años (D.E.)</b>	<b>Rango de edad en años</b>
1.- Mujeres jóvenes examinadas una vez	332	22.1 (4.7)	13-49
Fase menstrual	87	23.6 (4.8)	13-49
Fase folicular	80	22.6 (4.7)	13-45
Fase ovulatoria	21	22.7 (4.7)	13-43
Fase lútea	144	22.3 (4.7)	14-49
2.- Mujeres jóvenes examinadas repetidamente	15	26.2 (5.5)	20-43
3.- Mujeres post-menopáusicas	83	67.4 (8.2)	47-86
4.- Niñas pre-púberes	60	8.3 (2.8)	5-12
5.- Hombres jóvenes	183	21.0 (4.5)	17-30

D.E.=desviación estándar

**Definición del ciclo menstrual.**

La fase menstrual fue definida como los días 1 al 5, la fase folicular o estrogénica como los días 6-14; y la fase lútea o progestacional de los días 15 a 28 ó más allá.

Las mujeres del grupo 2 midieron su temperatura basal a nivel bucal durante cuatro minutos diariamente a la misma hora de la mañana, antes de levantarse de la cama. La temperatura fue anotada en la hoja de registro diseñada para ello. La fase ovulatoria fue definida como el día cuando la temperatura basal sobrepasó en 0.3 °C la temperatura basal anterior.

**Encuesta:** se llevó a cabo una encuesta de 34 reactivos donde se preguntó acerca del estado de salud en que se encontraba cada participante, con una retrospectión de tres meses a la fecha de la encuesta. Asimismo, se incluyó una sección de antecedentes gineco-obstétricos para determinar la fase del ciclo menstrual de cada mujer participante (**anexo no.1**).

**Prueba de umbral olfativo:** se aplicó por la mañana entre las 10:00 y las 13:00 hrs. Los sujetos se sentaron cómodamente en una silla, en un cuarto limpio, sin corrientes de aire, a temperatura ambiente (18 °- 22 °C).

En un primer paso, el umbral de detección fue estimado usando un procedimiento de escalera ascendente forzada de 8 opciones. La prueba consistió en oler acetato de amilo (sustancia con olor a plátanos dulces) (J.T. Baker, México) disuelto en agua destilada. Se eligió el acetato de amilo porque su uso es frecuente en los exámenes de olfato (Enomoto y cols., 1991; Hummel y cols., 1997; Zhao y cols., 1998) y es soluble en agua. Se usaron concentraciones desde  $-\log 9.5$  hasta  $-\log 6.0$  (volumen/volumen) en forma ascendente a mitades logarítmicas. Todas las concentraciones estaban contenidas en botes de plástico de 100 ml y contenían un volumen de 30 ml cada uno, con una tapa que termina en forma de pico con un orificio en la punta del tamaño de la cabeza de un alfiler.

La detección del umbral fue monorrinal, es decir, el sujeto acercó a alguno de los orificios nasales cada uno de los botes y lo presionó para que el olor fuera expulsado a través del orificio y penetrara en la cavidad nasal. Se inició la prueba presentando los ocho botes marcados con las letras "A" a la "H" conteniendo la solución de acetato de amilo en forma ascendente; es decir la letra "A" contenía la concentración más baja y la letra "H" la concentración más alta. Se inició con el bote que contenía la concentración más baja; el sujeto debía responder "no huele" si no encontraba olor en él, si encontraba algún olor debía responder "sí huele" y se le preguntaba "¿a que huele?", solo para corroborar que efectivamente había detectado la sustancia con olor a plátano.

Enseguida se realizó la misma exploración con cada uno de los ocho botes, hasta que el sujeto respondiera "sí huele" y reconociera el olor (**Fig.10**). El tiempo máximo que transcurrió entre la presentación de un estímulo y otro fue de 45 segundos (Doty y cols., 1986). Al mismo tiempo que el sujeto dió sus respuestas, se marcó en el cuadro de olfatometría diseñado para esta prueba (**Fig.11**), en cada casilla de la primera columna marcada con el No.1, la letra "S" (disolvente) cuando respondía "no huele"; o la letra "A" (activo) si respondía "sí huele". Al finalizar esta prueba, se aplica la segunda parte del examen.

En un segundo paso se realizó una determinación más precisa del umbral usando un procedimiento de escalera de elección forzada de 4 alternativas (Kunka y cols., 1981; Koelega, 1994; Koelega y Köster, 1974). Al sujeto se le presentaron cuatro botes, dos de ellos conteniendo la solución de acetato de amilo con la concentración a la cual el sujeto respondió por primera vez "sí huele" en la primera prueba, y dos botes más, intercalados, que contenían 30 ml. de agua destilada (**Fig.12**). Si existía una correcta identificación del olor en los cuatro botes, esa concentración era considerada el umbral para la persona (la probabilidad para un resultado falso positivo fue de  $p= 0.01$ ).



**Fig.10.-** Se introduce la punta de cada bote dentro de la fosa nasal, se presiona fuertemente empezando con la concentración más baja. El sujeto debe responder “sí huele” o “no huele”. Posteriormente, se retiran esos 8 botes y se continúa con una prueba de cuádruple elección forzada.

Si fallaba en alguno de los botes, se retiraban éstos, y se le presentaban entonces los botes conteniendo la concentración logarítmica siguiente más alta. No se les retroalimentó a los sujetos con respecto a falla o acierto en la prueba que realizaron. Esta prueba es válida, confiable y presenta consistencia interna (Doty y cols., 1989, 1995).

**OLFATOMETRÍA**

<b>1.-Log – 9.5</b>	1	2	3	4
<b>2.-Log – 9</b>	1	2	3	4
<b>3.-Log – 8.5</b>	1	2	3	4
<b>4.-Log – 8</b>	1	2	3	4
<b>5.-Log – 7.5</b>	1	2	3	4
<b>6.-Log – 7</b>	1	2	3	4
<b>7.-Log – 6.5</b>	1	2	3	4
<b>8.-Log – 6</b>	1	2	3	4

Fig.11. En la hoja de olfatometría aparecen las concentraciones de acetato de amilo para cada uno de los 8 botes. La columna con las casillas que contienen el No.1 sirve para la primera parte de la prueba. Después para la segunda parte de la prueba, se usan las cuatro casillas numeradas enfrente de cada concentración logarítmica. Sirven para anotar la letra “S” si contesta que “no huele”; o la letra “A” si contesta “sí huele”.



Fig.12.- Método de escalera de elección forzada de 4 alternativas. Al sujeto se le presentaron cuatro botes, dos de ellos conteniendo la solución de acetato de amilo con la concentración a la cual el sujeto respondió por primera vez “sí huele” en la primera prueba, y dos botes más, intercalados, que contenían 30 ml. de agua destilada. Si acierta en los cuatro botes, ese es el umbral para esa persona.

**Citología nasal y vaginal.** Al mismo grupo de mujeres y hombres a los que se les aplicó la prueba de olfato, se les tomó un frotis de mucosa nasal el mismo día de la aplicación de la prueba antes mencionada, aprovechando los criterios que ya se habían establecido para todos los candidatos. Los grupos a los que se les estudió la citología nasal quedaron como sigue (**cuadro 2**):

GRUPO 1: *Mujeres cíclicas.* Mujeres con ciclo menstrual regular ( $29 \pm 0.3$  días). Los frotis nasales fueron tomados durante la fase menstrual, y los frotis nasal y vaginal de todas las 15 mujeres una vez durante la fase folicular o estrogénica y una vez durante la fase lútea o progestacional, durante tres periodos consecutivos.

GRUPO 2: *Mujeres post-menopáusicas.* Mujeres post-menopáusicas quienes refirieron haber tenido su última menstruación por lo menos seis meses previos al estudio (promedio  $14.2 \pm 5.1$  años), fueron examinadas cada una de ellas tres veces, cada 14 días.

GRUPO 3: *Niñas pre-púberes.* Quienes no habían iniciado su menarca, fueron examinadas cada 14 días.

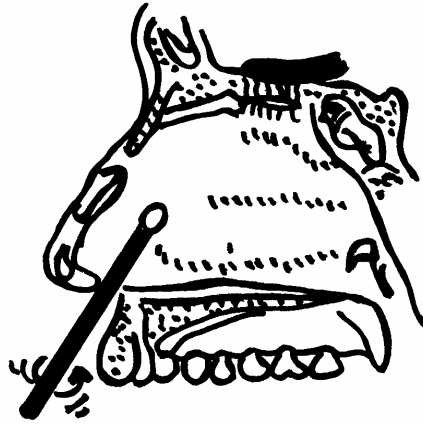
**Cuadro 2. Composición de los grupos experimentales de citología nasal de acuerdo a la edad**

<b>GRUPOS</b>	<b>N</b>	<b>Edad promedio años (D.E.)</b>	<b>Rango de edad Años</b>
1.- Mujeres jóvenes ciclando	15	26.2 (5.5)	20-43
2.- Mujeres post-menopáusicas	20	69.7 (9.6)	58-80
3.- Niñas pre-púberes	20	08.8 (2.9)	6-12

El frotis nasal fue tomado bajo las mismas condiciones ya mencionadas para la prueba de umbral olfativo. Se introdujo un hisopo (Curity® México) lo más profundamente posible dentro de cada fosa nasal (**Fig.13**), rotándolo de una manera estandarizada para obtener el número suficiente de células descamadas. El aplicador fue pasado por la superficie de un portaobjetos, el frotis se fijó con

Citospray (M.R. México), se tiñó usando el método de Papanicolaou, nuevamente fijado y cubierto con resina y un cubreobjetos.

En el grupo de mujeres cíclicas, el frotis vaginal se tomó al mismo tiempo que el nasal con el método de Papanicolaou.

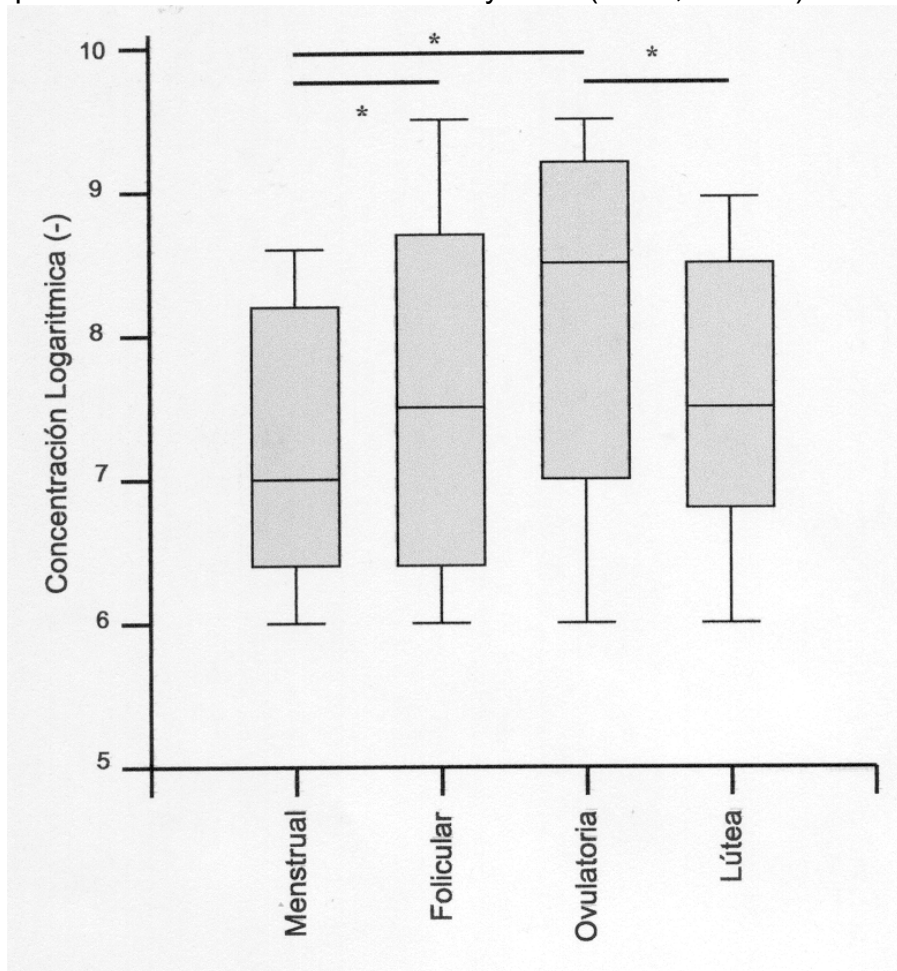


**Fig.13.-Se introdujo un hisopo en lo más profundo de la cavidad nasal, se rotó en forma circular pegado a la pared para extraer el material, que fue extendido sobre un portaobjetos y fijado con citospray para después proceder a teñirlo y tipificarlo.**

## VIII. RESULTADOS

### Umbral olfativo:

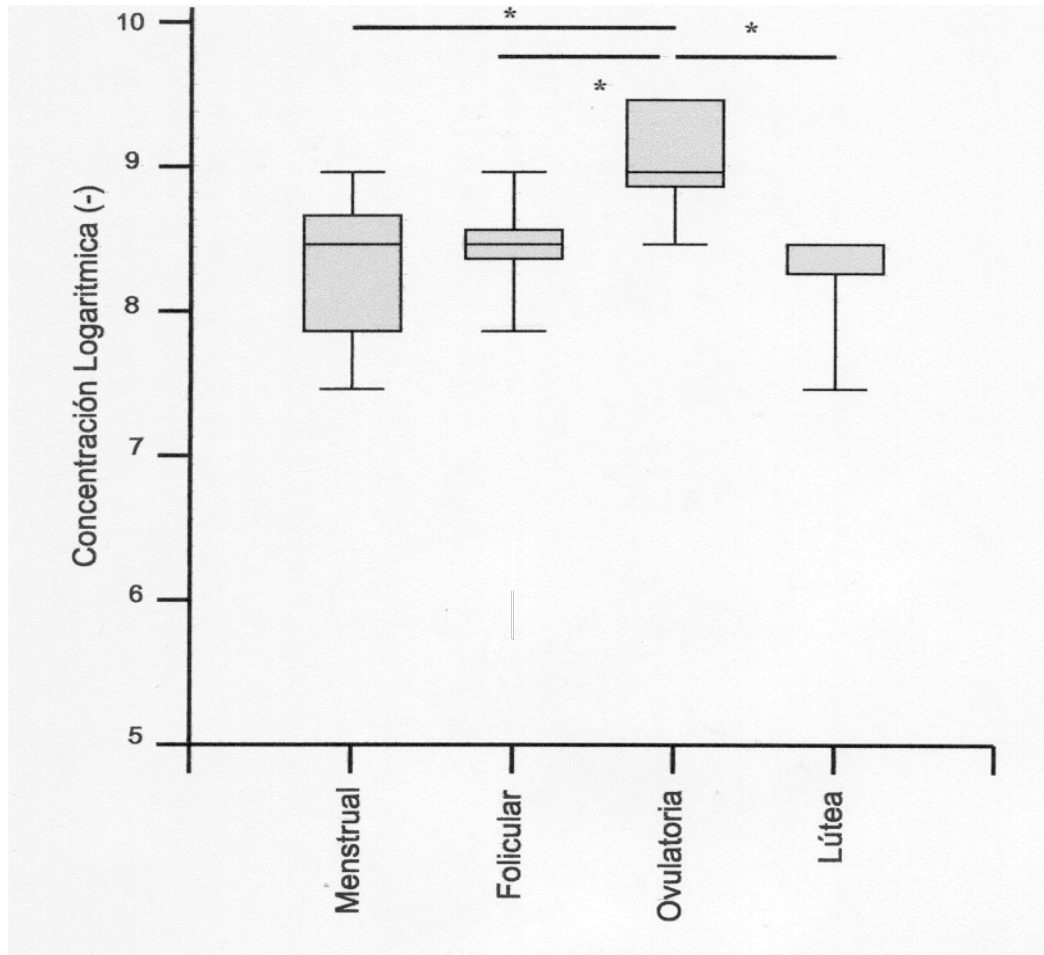
En la **figura 14** se muestra la detección de los umbrales olfativos para el acetato de amilo en el grupo de 332 mujeres del grupo No.1 examinadas en las diferentes fases del ciclo menstrual. Una mediana de  $-\log 7.0$  (rango 6.0- 8.5) durante la fase menstrual, una mediana de  $-\log 7.5$  durante las fases folicular y lútea (rangos  $6.0 \leq 9.5$  y  $6.0-9.0$ , respectivamente), y de  $-\log 8.5$  (rango  $6.0 \leq 9.5$ ) durante la fase ovulatoria (Kruskal- Wallis ANOVA;  $H= 18.4$ ,  $Df= 3$ ,  $P<0.001$ ) Los umbrales registrados durante la fase ovulatoria fueron significativamente más bajos comparados con las fases menstrual y lútea (Duna;  $P<0.05$ ).



**Fig.14.-Umbrales de detección olfativa para el acetato de amilo en un total de 332 mujeres examinadas en una de las cuatro fases del ciclo menstrual. Menstrual N=87, folicular N=80, ovulatoria N=21 y lútea N=144. Las líneas horizontales representan los percentiles 10 (décimo), 25 (veinticincoavo), 50 (cincuentavo) (mediana), 75 (setenta y cincoavo) y 90 (noventaavo). \*  $P < 0.05$ , prueba de Dunn post hoc.**



Los umbrales registrados durante la fase ovulatoria fueron significativamente más bajos comparados con las fases menstrual y lútea, y comparando la fase folicular con la fase menstrual (Dunn:  $P < 0.05$ ).

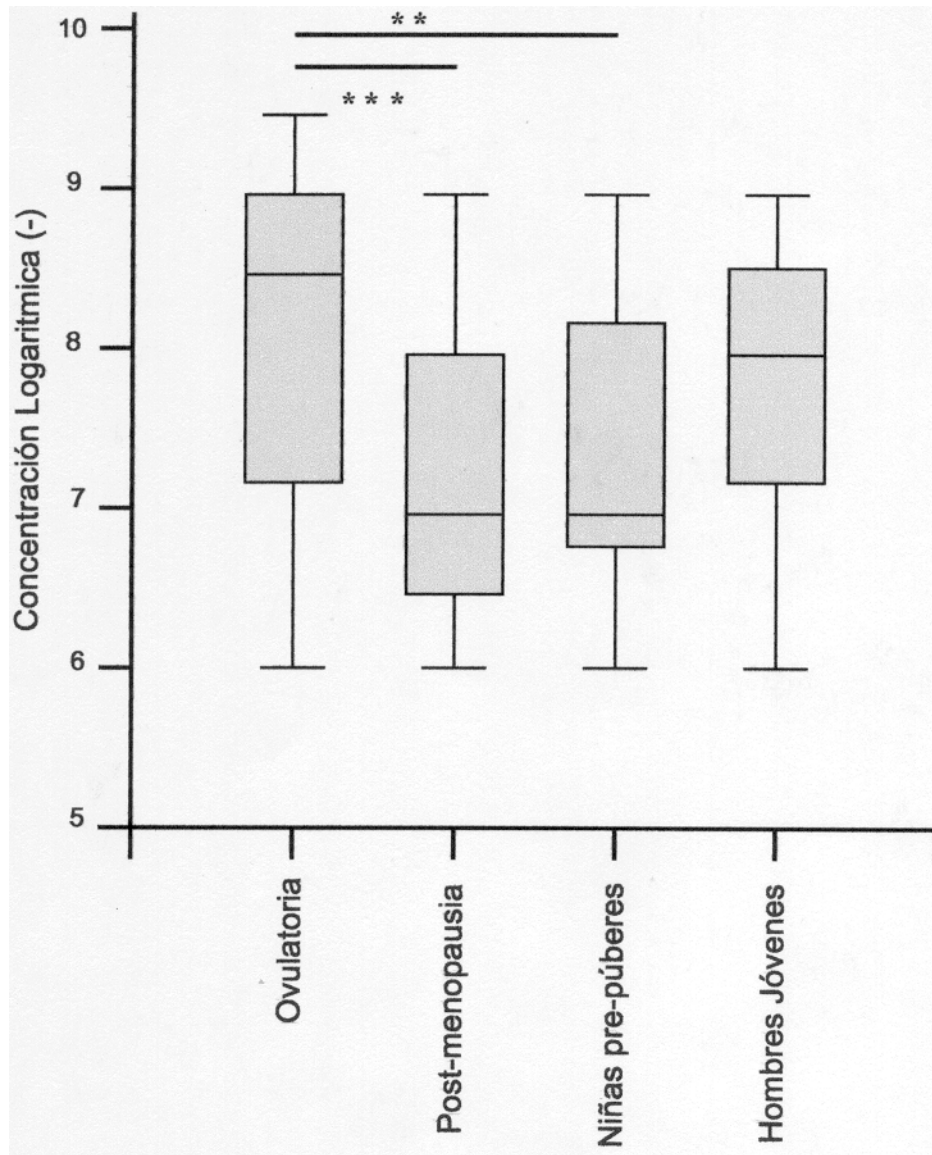


**Fig.15.- Umbrales de detección de olor para las mujeres del grupo 2 (n=15) examinadas repetidamente a lo largo del ciclo menstrual.  $X^2 = 28$ ,  $gl=2$ ,  $*p < 0.05$  Student-Newman-Keuls.**

Como se muestra en la **Figura 15**, los umbrales de detección para acetato de amilo también difirieron significativamente durante el ciclo menstrual para el examen repetitivo de las mujeres del Grupo 2 (ANOVA de medidas repetidas Friedman;  $X^2$  -valor= 39.6,  $df= 3$ ,  $P < 0.001$ ). Un media de umbral significativamente más bajo de  $-\log 9.0$  (rango  $8.5 \leq 9.5$ ) fue registrado durante la fase ovulatoria comparado con el umbral de  $-\log 8.5$  registrado durante la fase menstrual (rango  $7.5 - 9.0$ ), la fase folicular (rango  $8.0 - 9.0$ ) y fase lútea (rango  $7.5 - 8.5$ ) (Student-Newman-Keuls;  $P < 0.05$ ). Aunque los valores de umbral registrados para estas mujeres fueron más bajos que aquellos para el Grupo1, el patrón fue

similar, esto es, los umbrales más bajos fueron registrados en el momento de la ovulación.

En la **Figura 16**, se muestra que el umbral olfativo de las mujeres cíclicas del Grupo1 durante la ovulación fue significativamente más bajo que aquel de las mujeres post-menopáusicas del Grupo 3 (-log 8.5, rango 6.0 ≤ 9.5 vs. -log 7.0, rango 6.0- 9.0, respectivamente; Mann-Whitney;  $U= 322$ ,  $N_1 = 21$ ,  $N_2 =83$ ,  $P< 0.001$ ), y las niñas del Grupo 4 (-log 8.5 vs. -log 7.0, rango 6.0- 9.0; Mann-Whitney,  $U= 336$ ,  $N_1=21$ ,  $N_2= 60$ ,  $P <0.002$ ). Los umbrales fueron más bajos que para los hombres del Grupo 5 (-log 8.0, rango 6.0-9.0) aunque no significativos (Mann-Whitney,  $U = 1535$ ,  $N_1 =21$ ,  $N_2= 183$ ,  $P >0.10$ ).



**Fig.16.-Umrales de detección de olor de mujeres ciclando del grupo 1 (N=21) durante la fase ovulatoria, de las mujeres post menopáusicas (N=83) , de las niñas pre-púberes (N=60), y de los hombres jóvenes (N=183). \*\* $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$ , prueba de  $U$  de Mann Whitney.**

### Citología nasal y vaginal:

#### Grupo 1

En el **Cuadro 3**, se muestran los valores encontrados en las muestras obtenidas de la mucosa nasal en cada fase del ciclo menstrual. Aunque durante la fase menstrual las diferencias en los tres tipos celulares no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0.22$ ). En la fase folicular se observó mayor número de células superficiales ( $p < 0.0006$ ), y en la fase lútea un número significativamente grande de células intermedias con un núcleo claramente definido ( $p < 0.0001$ ).

#### Grupos 2 y 3

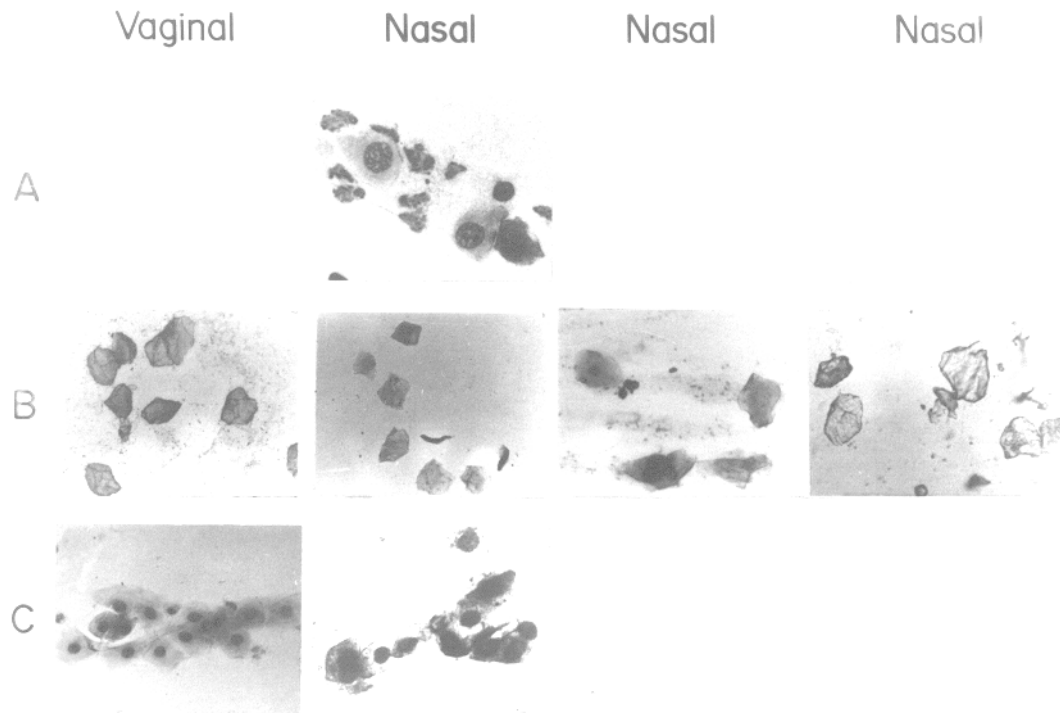
En los frotis nasales de las mujeres menopáusicas y niñas pre-púberes, las células superficiales fueron las predominantes todas las veces examinadas.

**Cuadro 3.** Grupos 1-3. Número relativo de tipos celulares (100 células por frotis) en frotis nasales de las mismas mujeres durante el ciclo menstrual, de mujeres post-menopáusicas y de niñas pre-púberes\*

CATEGORÍA CITOLÓGICA	Fase	Fase	Fase	Post-	Niñas
	Menstrual n=15	Folicular n=15	Lútea n=15	Menopausia n=20	Pre- púberes n=20
Células basales	40 (15-61)	8 (6-19)	22 (15- 27)	7 (3-14)	6 (4-9)
Células superficiales	11 (2- 35)	54 (24- 65)†	13 (5-18)	71(60-77)†	77 (67-81)†
Células intermedias	28 (6-54)	19 (14- 29)	56 (34- 73)†	21 (19-31)	20 (13-25)
Friedman = p<0.0001		p=0.22 F=1.53	p<0.0006 F=8.8	p<0.0001 F=17.8	p<0.0001

\* Los datos están dados como medianas y (rangos) de células.

† Estos valores son significativamente más altos (Friedman analisis de varianza  $p < 0.001$ )



**Fig.17- Ejemplos de los tipos celulares predominantes vistos en frotis vaginales de mujeres cíclicas (columna izquierda). Se observan durante la fase folicular (B) células superficiales y fase lútea (C) células intermedias. En frotis nasales de mujeres ciclando (segunda columna de la izquierda) durante la fase menstrual (A) células basales, la fase folicular (B) células superficiales y la fase lútea (C) células intermedias. En mujeres post-menopáusicas (tercera columna) y niñas pre-púberes (cuarta columna) examinadas en todas las fases, predominaron células superficiales (renglón B). Fotomicrografías con microscopio de luz a 400X.**

Como se muestra en el **cuadro 4**, en el frotis vaginal de las mujeres ciclicas del grupo 1, durante la fase folicular predominaron las células superficiales ( $p<0.0001$ ) y durante la fase lútea las células intermedias ( $p<0.0001$ ). Una comparación entre los números de los tres tipos celulares en los frotis nasal y vaginal obtenidos durante cada una de estas fases, mostró la abundancia relativa en los dos grupos de muestras existiendo una correlación significativa (Spearman;  $rs=0.54$ ,  $p<0.01$ ;  $rs=0.40$ ,  $p<0.05$  para las fases folicular y lútea, respectivamente).

**Cuadro 4.** Grupo 1. Número relativo de tipos celulares (100 células por frotis) en frotis nasales y vaginales del mismo grupo de mujeres ( $n=15$ ) durante las fases folicular y lútea del ciclo menstrual\*

CATEGORÍA CITOLÓGICA	Fase Folicular		Fase Lútea	
	Nasal	Vaginal	Nasal	Vaginal
Células Basales	8 (6-19)	9 (1-12)	22 (15-27)	3 (1-9)
Células Superficiales	54 (24-65)†	72 (56-81)†	13 (5-18)	10 (7-18)
Células Intermedias	19 (14-29)	16 (8-31)	56 (34-73)†	76 (69-87)†

\* Los datos están dados como mediana y (rangos) de células.

† Estos datos son significativamente más altos (Friedman análisis de varianza  $p < 0.001$ )

**Análisis histológicos:** Los frotis nasal y vaginal fueron analizados y fotografiados usando un microscopio “Polivar” con iluminación de campo con una amplificación de 400X. El análisis fue llevado a cabo a ciegas (no sabían a que grupos pertenecían cada frotis) por personal técnico experimentado en tales procedimientos. Se contaron las primeras 100 células observadas en cada uno de los frotis, anotándose estos datos en la hoja diseñada para tal efecto. Las células observadas se clasificaron para ambos tejidos (nasal y vaginal) siguiendo la descripción de Alonso de Ruíz (2000): 1) *células basales*, con un núcleo grande, claro y bien definido; 2) *células superficiales*, con bordes geométricos irregulares y 3) *células intermedias* con núcleo claramente definido.

### **Análisis estadístico**

Se llevó a cabo usando el programa para estadística computarizado *Sigma Stat/ Sigma Plot 5.0*.

**Umbral olfativo:** El análisis de los umbrales de las mujeres cíclicas del grupo 1 examinadas en diferentes fases del ciclo menstrual, se realizó con la prueba de *Kruskal-Wallis* seguida de la Prueba de *Dunn*. Los umbrales de mujeres cíclicas del grupo 2 se examinaron para buscar diferencias entre cada una de las cuatro fases del ciclo menstrual, mediante la prueba de *Fridman*, seguida por la prueba de *Student-Newman-Keuls*.

Para procesar los resultados de los grupos No.3 (mujeres postmenopáusicas), No.4 (niñas pre-púberes) y No.5 (hombres jóvenes) se utilizó la prueba de *U de Mann-Whitney*. Un nivel alfa de  $\leq 0.05$  se consideró como el nivel de significancia. Para medir la validez, confiabilidad y consistencia interna se usó el análisis de *Spearman-Brown*.

**Citología nasal y vaginal:** Los resultados de los cambios en la citología vaginal y nasal se analizaron con la prueba de *Friedman*, seguida por la de *Newman-Keuls*. Un valor de alfa de  $\leq 0.05$  se consideró como el nivel de significancia. El *coeficiente de correlación de Spearman* sirvió para comparar la abundancia relativa de los tres tipos celulares en los frotis nasal y vaginal de las mujeres del grupo 1 durante las fases folicular y lútea, respectivamente.

## IX. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio, son coincidentes con los de Le Magnen (1952), Dye, (1992), Doty y cols., (1981) y Arimondi y cols., (1993), quienes usando poblaciones con características raciales diferentes a la nuestra, encontraron una correlación positiva entre el umbral de detección del olor y la fase periovulatoria y ovulatoria del ciclo menstrual.

Es indudable que los cambios en la sensibilidad olfativa pueden deberse a diversos factores:

1) Cambios ambientales, donde existe incremento de contaminantes que modifican la función olfativa y provocan pérdida del epitelio normal, cuya magnitud está relacionada con el tiempo de exposición a tales contaminantes (Hudson y cols., 2006). Se puede encontrar desde hiperplasia de células basales y displasia media cuando el tiempo de exposición a los contaminantes es corto, hasta severa hiperplasia de células basales y metaplasia escamosa con proliferación vascular submucosa, cuando los tiempos de exposición son prolongados (Calderón-Garcidueñas y cols., 1992).

2) Cambios anatómicos en las estructuras nasales, como obstrucciones nasales por alguna patología del tabique nasal, congestión de la mucosa olfativa por infecciones de tipo viral o bacteriano, o incluso congestión de la mucosa durante la menstruación (Paulsson y cols., 1997).

3) Procesos alérgicos a diferentes sustancias químicas, que provocan un incremento en la resistencia de la mucosa olfativa por presencia de edema y lentitud en el transporte de la molécula odorífera (Doty y cols., 1988 y 1989). En la rata se han observado cambios morfológicos en el bulbo olfativo, después de una exposición a ozono por 4 horas en una proporción de 1-1.5 ppm. Se presentaron cambios citológicos y ultraestructurales como pérdida de las espinas dendríticas, secundarias y primarias de las células granulosas del bulbo olfativo, con disminución del número de botones sinápticos (Colin-Barenque y cols., 1999). Aunque se describe que el epitelio nasal puede presentar regeneración celular en periodos tan cortos como 3 a 7 semanas (Monti-Graziadei y Graziadei, 1979), después de exponerse a contaminantes ambientales (Schwartz y cols., 1991; Suzuki y Takeda, 1991), en el bulbo olfativo aún no se ha demostrado una regeneración neuronal. El bulbo olfativo es considerado como el centro modulador de la función olfativa, por presentar la llegada de fibras centrífugas provenientes de estructuras superiores del sistema nervioso, que podrían activar la liberación de neurotransmisores excitatorios o inhibitorios en esta estructura según se requiera (Guevara, 1995). Por ello la ausencia de un número suficiente de sinapsis que permita una respuesta específica en las vías de procesamiento central o periférico (Fukushima y cols., 2002), daría como consecuencia una disminución de la capacidad olfativa.

4) Otro factor involucrado es la ingesta de bebidas alcohólicas o medicamentos que causan hiposmia (amebicidas, anestésicos locales, anticoagulantes, antihistamínicos, algunos agentes antimicrobianos, drogas hipoglucemiantes, drogas antiepilépticas y algunos agentes para la higiene dental)



(Barron y Riley, 1992; Schiffman, 1983), que son capaces de modificar la sensibilidad olfativa.

5) El estado de la mucosa nasal en diferentes situaciones fisiológicas del ser humano que al mismo tiempo involucran a los factores de género. Se describen cambios en la sensibilidad olfativa durante el ciclo menstrual relacionados con la viscosidad de la capa del moco del epitelio olfativo (Mair y cols., 1978). En este problema ha habido gran discrepancia, pues el factor de género involucra necesariamente una diferencia en la influencia hormonal para los procesos fisiológicos. Según Topozada y cols. (1981) el análisis de los cambios estructurales que se producen en diferentes condiciones de la vida de la mujer, mediante estudios inmunohistoquímicos, muestra cambios del epitelio según la situación metabólica de la mucosa nasal durante las fases del ciclo menstrual, pero no encuentra cambios comparando con grupos testigo masculinos. En mujeres embarazadas donde existe una gran sensibilidad olfativa, estudios inmunohistoquímicos de la mucosa nasal muestran incremento de la reactividad glandular, actividad fagocítica incrementada y aumento en los mucopolisacáridos ácidos (Topozada, 1982).

6) La carga genética es otro factor importante que se ve reflejado en enfermedades neurodegenerativas que se acompañan con problemas de deterioro de la sensibilidad olfativa (Barz y cols., 1997). Se presume que este trastorno se debe a la disminución del factor de crecimiento de fibroblastos en el bulbo olfativo al declinar la edad, lo que provoca una importante ocurrencia de hiposmia senil (Wang y cols., 1999). Entre las enfermedades de tipo degenerativo que inician con cambios en el umbral olfativo se citan a la fibrosis quística, Parkinson, Alzheimer, psicosis de Korsakoff, meningiomas, tumores del lóbulo frontal y esclerosis múltiple, que pueden ser diagnosticadas tempranamente porque producen disfunciones olfativas (Doty y Frye, 1991; Doty y cols., 1993).

Teniendo conocimiento de estos factores que pudieran influir en la función olfatoria, se realizó una selección de la población utilizada para este estudio mediante los datos anotados en la encuesta, sobre todo para excluir a todos aquellos sujetos que presentaran alguna enfermedad que pudiera dar lugar a alteraciones en la percepción olfativa, dejando solamente a la población sana. El apartado de antecedentes gineco-obstétricos, nos permitió realizar la clasificación de la fase del ciclo menstrual en la que se encontraba cada una de las participantes del género femenino, sobre todo para calcular el inicio de los siguientes ciclos menstruales, cuando la población fue evaluada en más de una ocasión.

Tomando en consideración que algunos autores encuentran que la medicación anticonceptiva pudiera provocar en algún momento congestión nasal (Schiff, 1968; Ammar-Kohdja, 1971; Pelikan, 1978); para evitar toda influencia hormonal externa que no fuera la producida por el organismo en forma fisiológica, se excluyeron también todas aquellas mujeres que estuvieran bajo tratamiento con hormonales o algún otro medicamento.

En cuanto a la metodología utilizada, nos basamos en las experiencias ya citadas por algunos expertos que llevan mucho tiempo trabajando en investigaciones relacionadas con la función olfativa, para seleccionar la técnica de estimulación que se adaptara a nuestra población, a la modalidad de la función

olfativa que queríamos medir (umbral), y sobre todo que la prueba llenara los requisitos de validez, confiabilidad y que tuviera consistencia interna (Doty y cols., 1989, 1995). La técnica de botes presionables fue fácil de utilizar, ya que nos permitió transportarlos fácilmente y son de fácil limpieza. La sustancia olfativa utilizada fue el acetato de amilo, que no fue difícil elegirla, ya que la mayoría de las pruebas que miden umbral olfativo utilizan esta sustancia (Enomoto y cols., 1991; Hummel y cols., 1997; Zhao y cols., 1998) que es soluble en agua; sobre todo el olor a plátanos dulces que tiene esta sustancia, nos facilitó la identificación por parte de nuestra población evaluada, ya que todos han consumido plátanos al menos alguna vez permitiendo reconocerla de inmediato. El uso de un pequeño número de sustancias olorosas en una prueba de umbral evita que el sujeto caiga en errores y sufra un proceso de adaptación (Aidley, 1989). En el examen de umbral olfativo aquí aplicado, las concentraciones logarítmicas y el número de botes empleados fueron suficientes para que la población percibiera fácilmente la sustancia y la identificara de inmediato, sin llegar a presentar adaptación (Doty y cols., 1986).

A pesar de que aún existe gran controversia de los efectos directos de los estrógenos sobre la mucosa nasal, ya que no se ha podido encontrar de una manera consistente una relación entre concentraciones sanguíneas de hormonas sexuales femeninas y síntomas nasales, o los cambios en la sensibilidad olfativa durante el ciclo menstrual sean controversiales (Paulsson y cols., 1997; Doty y cols., 1985), se ha demostrado últimamente la influencia directa de estas hormonas sobre la mucosa nasal, ante el hallazgo de receptores para estradiol en dicha mucosa (Carmine y cols., 2004) mejorando el transporte mucociliar con la administración de estrógenos en forma local en la mucosa nasal. Otro dato más que coincide con el anterior, es el observado en células receptoras vomeronasales de ratas preñadas, en las cuales al administrarles estradiol sistémicamente se observó un incremento en el movimiento ciliar de células receptoras vomeronasales (Kaba y cols., 1988).

Se ha supuesto también una posible influencia de efectos endócrinos de hormonas gonadales sobre la función olfatoria en forma indirecta; es decir, que ante la administración de hormonas estrogénicas, se incremente la densidad de otro tipo de receptores que no sean necesariamente los selectivos para ellas, mejorando la función olfatoria por una vía alterna. Por ejemplo: la administración de estrógenos a cobayos incrementa la densidad de receptores muscarínicos, y la progesterona puede disminuir la densidad de receptores alfa-1 adrenérgicos (Konno y cols., 1986). Así también la hipersensibilidad a la histamina en la mucosa nasal demostrada por Haeggstrom y cols., (2000), apoyan de forma indirecta la hipersensibilidad que los receptores olfatorios presentan no sólo para esta sustancia, sino también para desencadenar procesos que interfieren en los mecanismos de transducción a nivel del receptor, sobre todo durante la menopausia donde existe una menor percepción de los olores, atribuyendo esto a una permeabilidad de las glándulas y a una hiperactividad del sistema simpático alrededor de dichas glándulas y de los vasos sanguíneos, causando un incremento en la secreción glandular y en la dilatación vascular (Topozada, 1988).

Independientemente de que la influencia hormonal en el sistema olfativo sea directa o no, nuestros resultados muestran cambios en el umbral de detección del olor coincidentes con el ciclo menstrual, siendo dicho umbral más bajo en el periodo periovulatorio en mujeres cíclicas. Los grupos control de niños, hombres jóvenes y mujeres menopáusicas que utilizamos no mostraron estos cambios, apoyando con ello que los eventos ciclicos que están influenciados por hormonas tienen relación con la función olfativa. En los hombres no se presentó una modificación en la detección del umbral del olor, y en los frotis de la mucosa nasal, predominó una sola clase de células. Aunque el umbral olfativo de los hombres jóvenes se mantuvo constante, es de notar que para este grupo se encontró un umbral olfativo más alto que el de las mujeres en la fase ovulatoria. Esto pudiera explicarse por la acción permisiva que llevan a cabo los estrógenos en diferentes tejidos del organismo, donde actúan como pro-oxidantes y antioxidantes (Lacort, 1995; Sack, 1994) produciendo una prolongación de la vida media del tejido nervioso y una neuromodulación (Compagnone y Mellon, 2000); a diferencia de los hombres, donde la cantidad estrogénica es mínima. Esta propuesta de algunos investigadores sobre la acción moduladora de las hormonas gonadales sobre la función olfativa, se ha demostrado mediante registros electrofisiológicos de potenciales relacionados a eventos (PRE), con electrodos colocados en la piel cabelluda en Fz,Pz,Cz y registrados a lo largo del ciclo menstrual, Pause y cols. (1996) observando que la transmisión neuronal se veía facilitada durante el periodo ovulatorio, presentandose un tiempo reducido de la velocidad de respuesta neuronal durante la fase folicular, concluyendo que la excitabilidad cortical se incrementa en proporción a la concentración de estrógenos (Abramovitz y Dubrovsky, 1980).

Los antecedentes de la influencia hormonal sobre la función de diversos órganos y sistemas sensoriales, y la acción cíclica ya bien demostrada en el recambio del epitelio vaginal; nos llevaron a pensar que posiblemente el epitelio nasal se encontraría también bajo esta influencia. Los cambios en las características citológicas de los frotis vaginales de nuestra población de mujeres cíclicas entre las fases folicular y lútea, corresponden con la descripción clásica y clínicamente aplicada de rutina (Papanicolaou, 1953; Alonso de Ruíz, 2000). Los frotis nasales de los dos grupos control que no ciclaban –mujeres menopáusicas y niñas pre-púberes- mostraron homogeneidad y sin cambios en las características citológicas a través de este examen. Sin embargo, aún no está claro si los cambios que encontramos en la mucosa nasal son debidos a un efecto hormonal directo; aunque algunos resultados en otro tipo de tejidos apuntan a favor de nuestros hallazgos; ya que hay evidencias de incremento de receptores alfa y beta a estrógenos en tejido cardiaco, cuando se incrementa la administración de estas hormonas, llegando inclusive a provocar cambios anatómicos y ultraestructurales del ventrículo izquierdo, y por ende en la función (Xu y cols., 2003). La influencia hormonal en el epitelio nasal ha sido demostrada con algunos estudios histoquímicos en el bulbo olfativo de las ratas, donde se utiliza el antígeno placentario humano *X-P2* (*hpax-P2*) asociado con el citocromo P-450 de la aromatasa que se encuentra presente dentro de tejidos que sintetizan estrógenos. Este antígeno X-P2 se encuentra presente en un grupo de receptores olfativos primarios de la rata, y están involucrados en el comportamiento de succión. La

mayoría de estas células poseen inmunoreactividad a *hPAX-P2*, lo que lleva a pensar que la actividad de estas células puede ser hormonalmente modulada y que *hPAX-P2* está involucrada no solamente con el receptor, sino también durante la integración cerebral por la vía secundaria de proyección neuronal de la vía olfativa (Shinoda y cols., 1990), y estos hallazgos se extienden a los humanos, ya que en mujeres gravídicas se detectó por inmunohistoquímica, la presencia de receptores para estrógenos y progesterona en las glándulas serosas y sus ductos excretores en la mucosa nasal de mujeres que presentaban rinopatía gravídica, suponiendo que la congestión nasal era secundaria a la acción de estas hormonas sobre el incremento de neurotransmisores locales, como lo son la sustancia P y el Óxido Nítrico (Bowser y Riederer, 2001).

Al existir una influencia hormonal cíclica o algunas veces estacional sobre los tejidos de seres vivos (Claus y cols., 1984), podemos inferir que la actividad funcional de órganos, aparatos y sistemas podría estar regulada a voluntad mediante la administración de cantidades precisas de hormonas sintéticas, dependiendo de la deficiencia existente, como lo reporta Hudson y cols. (1994) quienes encuentran alteraciones olfativas en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico, que se corrigen con la administración de hormonas gonadales. Asimismo, si efectivamente este recambio celular de la mucosa nasal es cíclico y dependiente de la concentración hormonal circulante, podríamos pensar que en algunas mujeres en quienes ha sido difícil la preñez o no llega a feliz término, tal vez la función olfativa se encuentre deteriorada y por ende el tejido nasal estaría disminuyendo su influencia de forma indirecta sobre otros sistemas endocrinos, al no permitir la liberación adecuada de ciertos neurotransmisores que permitan llegar a feliz término algún embarazo.

También es factible pensar que si hay sustancias olorosas que son capaces de liberar ciertos neurotransmisores en áreas específicas del S.N.C., se pueden estudiar que áreas son activadas por distintos olores y así, localizar y activar con precisión la liberación selectiva del neurotransmisor que se necesite para corregir alguna disfunción; o simplemente para contrarrestar la liberación de neurotransmisores excitatorios (Nusser y cols., 2001) corrigiendo con esto una posible causa de cuadros de cefalea repetitiva. O para prevenir el daño neurológico que causan las sustancias volátiles que se consideran tóxicas para el organismo, en los trabajadores que manejan estos elementos; y que ante la estimulación persistente pudieran causar muerte neuronal, sobre todo cuando hace falta la acción protectora de los estrógenos (Royall y cols., 2002), como en la menopausia por ejemplo.

Asimismo, el significado de los hallazgos funcionales de mejor percepción olfativa influenciada por la acción hormonal durante la fase ovulatoria del ciclo, ayuda a entender porqué en animales inferiores donde aún persiste el órgano vomeronasal, la capacidad de reconocimiento de sus crías por medio del olfato sea lo habitual; mas no así en todas las etapas de vida del humano, donde solamente en etapas tempranas post-parto y en ciertas horas del día, la mujer reconozca a sus hijos recién nacidos o a su pareja por medio del olfateo (Bonnin y cols., 1990).

Todo lo anteriormente citado, nos conduce a visualizar que la respuesta ante un estímulo olfativo es sumamente compleja, pues involucra elementos no

sólo de tipo sensorial, sino que abarca elementos neuroanatómicos y estructuras pertenecientes a otros aparatos y sistemas. Si el humano está conformado por información genética tan variada, con receptores protéicos tan vastos y específicos para cada una de las moléculas olorosas, y enriquecida con información del entorno donde se desarrolla, podemos concluir que la respuesta ante un estímulo olfativo despertará en cada uno de nosotros una respuesta distinta. Que inclusive me atrevo a decir, será tan sofisticada como su evolución se lo permita.

## **XI. CONCLUSIONES**

Los resultados del presente estudio, demuestran:

1) los umbrales olfativos en la población femenina presentan un comportamiento cíclico, que cambia según la fase del ciclo menstrual; siendo más bajo durante la fase ovulatoria y más alto durante la menstruación. Asimismo, los grupos testigo utilizados muestran que ante situaciones orgánicas donde se sabe que existe hay ausencia de hormonas gonadales circulantes (menopausia, hombres, pre-pubertad), los umbrales olfativos se encuentran altos; sugiriendo que el sistema olfativo se encuentra modulado por la concentración hormonal circulante.

2) La función olfativa es polisensorial, es decir que la respuesta obtenida ante un estímulo olfativo activa diferentes estructuras del sistema nervioso, actuando de manera indirecta en la modulación de la respuesta en otros aparatos o sistemas. Además es una respuesta endógena, pues depende de hormonas, neurotransmisores, integridad de los epitelios entre otros factores.

3) La correlación cercana encontrada por primera vez entre las fases del ciclo menstrual y las características citológicas de la mucosa nasal, así como del tracto reproductivo femenino; sugieren que la mucosa nasal y el umbral olfativo pudieran estar regulados por el estado hormonal.

4) Acerca de los mecanismos investigados, su integración podría ayudar en la identificación de posibles consecuencias funcionales y en el tratamiento de síntomas nasales comúnmente reportados en relación al ciclo reproductivo femenino, así como en el apoyo diagnóstico de algunas enfermedades que involucran al sistema nervioso y que afectan principalmente al sistema olfativo en forma inicial.

## **X. PERSPECTIVAS**

Por otra parte, ya que existe gran controversia, los hallazgos de este trabajo sugieren diversas preguntas para investigaciones futuras. Una de ellas es si los cambios citológicos en la mucosa nasal reportados aquí incluyen a la mucosa olfativa. Otra sería si los cambios citológicos a lo largo del ciclo menstrual ocurren en otros tejidos, y si es así, que tales cambios permitan finalmente revelar los mecanismos que regulan el recambio celular de una manera más general. Dado lo relativamente fácil del acceso a la mucosa nasal y de la aplicación de sustancias en ella, puede ser útil investigar más cercanamente los factores que influyen en los rápidos y marcados cambios en la citología reportada aquí. Asimismo, si pensamos que una disminución en la cantidad de estrógenos a nivel periférico influye en los tejidos como la mucosa nasal o la mucosa olfativa causando hipofunción, se pueden administrar preparados en spray nasal de hormonas gonadales, causando efecto local para mantener activa la vía olfativa evitando deterioro de la misma; esto está pensado sobre todo para las personas que por alguna razón no pueden recibir hormonales orales en forma continua. Teniendo en cuenta que el bulbo olfativo es un centro regulador entre la actividad de la mucosa olfativa y estructuras superiores que se activan ante un estímulo oloroso, se

podrían iniciar investigaciones para saber si existe al igual que en el sistema olfativo, una conexión neural directa entre este sistema y el aparato reproductor femenino, ya que como se ha investigado en ratones, los mecanismos neuroendocrinos y neurales se encuentran regulados por la acción de feromonas, actuando secundariamente en el control de la reproducción (Kaba y Nakanishi, 1995), o liberando ciertos neurotransmisores en el bulbo olfativo ante la estimulación vaginocervical artificial o coital, como ha sido demostrado en ratas; explicándose tal efecto por una actividad secretoria neuronal hipotalámica, la cuál en respuesta modifica la liberación de gonadotropinas y produce una subsecuente ovulación. También se puede investigar el mapeo de receptores a hormonas gonadales tanto en mucosa nasal como olfativa.

En las mujeres que son infértiles, se tendría que investigar si presentan alguna disfunción olfatoria, ya que como lo plantea Bruce, (1960), en animales de laboratorio se puede provocar que el desarrollo a término del óvulo fecundado sea impedido por bloqueo del embarazo, a consecuencia de una privación de la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada secundaria a estimulación por feromonas de un macho extraño. Asimismo, se puede mejorar la capacidad de apareamiento con la administración de progesterona, como lo cita Domínguez-Salazar y cols., (2002) quien observó que estas hormonas pueden incrementar la capacidad de cópula en ratas; participando también a través de la acción que ejerce el glutamato sobre los receptores NMDA, provocando una acción facilitadora de la respuesta de lordosis, que es esencial para el apareamiento en estos animales (Gargiulo y cols., 1992).

Esto podría investigarse explorando la función del sentido del olfato, para encontrar alguna deficiencia de estructuras periféricas o centrales donde se integra la percepción olfativa, para corregir la alteración en la conexión neural entre el sistema olfativo y el aparato reproductor, si este existiera. Asimismo, la detección temprana de deficiencias en la sensibilidad olfativa nos obligaría a investigar más a fondo en el campo de las alteraciones neurodegenerativas, que dan como primera manifestación una alteración en la percepción olfativa antes de que la enfermedad se manifieste como tal (Royall y cols., 2002), para llevar a cabo un mecanismo de prevención en las futuras generaciones, sobre todo en la descendencia de sujetos que se les ha diagnosticado alguna enfermedad neurodegenerativa como lo es la Enfermedad de Parkinson, Alzheimer o Esclerosis Múltiple (Doty y cols., 1988, 1993), quienes genéticamente se encuentran en riesgo de padecer la enfermedad (Becerra y Zuñiga, 1998; Markopoulou y cols., 1997; Klimek y cols., 1997) y de esta manera se prepararía psicológicamente y económicamente para poder enfrentar las alteraciones físicas y los gastos económicos que estas neurodegeneraciones implican, ya que por estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos, se ha visto que una de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes como lo es la enfermedad de Alzheimer afecta a más de tres millones de ciudadanos con un costo anual de 67.3 billones de dólares (Navarrete y cols., 2000).

Ya con la determinación de los umbrales olfativos para la población mexicana en las diferentes fases del ciclo menstrual (Navarrete-Palacios y cols., 2003), se podría iniciar el diseño de aparatos (olfatómetros) que conectados a un programa computarizado de creación nacional, determinen mediante curvas de

normalidad los umbrales olfativos en forma automatizada y mucho más rápida, para conocer quienes se encuentran fuera de los umbrales normales. Teniendo este sistema de determinación del umbral olfativo, se podría iniciar la valoración de la olfacción de una manera sistematizada, para con ello tener una perspectiva del número de población que padecerá en algún tiempo determinado tales enfermedades neurodegenerativas, para así planear programas y presupuestos nacionales tendientes a construir centros especiales de atención neurológica de tales padecimientos. Por lo que respecta a las mujeres con disfunciones en la reproducción se les determinaría la existencia de alteraciones olfativas, para dar paso a la búsqueda de tratamientos tendientes a mejorar tal función y por ende su función reproductiva; si de esta alteración padecieran.

Tomando en cuenta que el olfato es el órgano que se encuentra localizado más cercanamente al Sistema Nervioso, se puede iniciar la determinación de los mecanismos de acción de distintas sustancias sobre las mucosas nasal y olfativa, visualizando su respuesta secundaria en estructuras tanto del sistema nervioso central como periférico que estuviesen relacionadas con esta vía.

Teniendo conocimiento que a lo largo del territorio nacional encontramos diferentes climas y cantidades de elementos contaminantes; así como población de diversa etnia, cada una de ellas con diferentes costumbres en cuanto a modo de vida y alimentación, hemos iniciado el análisis de los umbrales olfativos que presentan algunas poblaciones del interior de la República, con un medio ambiente con menos contaminantes ambientales (Calderón-Garcidueñas y cols., 1992), es decir, diferente a la población del Distrito Federal que fue la que utilizamos para la investigación inicial, con resultados muy interesantes.

Asimismo, si ya en la literatura se reporta que la taurina es considerada un neurotransmisor que actúa sobre receptores neuronales mediante un mecanismo competitivo con benzodiazepinas y hormonas gonadales (Iwata y cols., 1984), investigaríamos la acción excitadora que provoca sobre receptores olfativos, para determinar si es factible su uso en pacientes con alteraciones neurodegenerativas.

Tomando en cuenta que la Capsaicina es un componente del picante ("chile"), que puede causar neurotoxicidad por incremento en la despolarización de neuronas de raíces dorsales de la rata (Dedov y cols., 2001), hemos iniciado la investigación de la acción que puede causar esta capsaicina secundariamente al consumo excesivo de picante, sobre la función olfativa en la población Mexicana.

El campo de investigación de la función olfativa es muy vasto, sobre todo considerando que la mayoría de los estudios de investigación en esta área se han realizado en grupos de población distintos al nuestro, donde la información genética es un factor que influye en la diversidad de respuestas, algunas de ellas muy diferentes a las de nuestra población Mexicana.

Si se ha citado a la plasticidad cerebral o la neurogénesis como un mecanismo que garantiza la permanencia de actividad neuronal en un área específica que se había perdido por algún daño (Carleton y cols., 2002), y que se ha logrado su recuperación funcional mediante la terapia física, repetitiva y constante; igualmente se podría iniciar en forma temprana –al nacimiento- una activación de las estructuras olfativas mediante estimulación con un sin fin de sustancias olorosas, que desarrollen la proliferación de receptores y que garanticen la función de los mismos, evitando deterioro temprano, y tal vez una



mejor resistencia a los embates de los contaminantes que existen actualmente en el medio ambiente.

Teniendo el conocimiento de que ciertos medicamentos que se utilizan para tratar algunas enfermedades infecciosas en el periodo neonatal, pudieran causar deterioro prolongado y algunas veces permanente de estructuras neuronales, -en esa etapa se encuentra en maduración el sistema nervioso- sobre todo de algunos sistemas sensoriales como el visual y auditivo; se podría investigar mediante potenciales evocados si existe daño al sistema olfativo, utilizando al acetato de amilo como estímulo oloroso; para determinar desde etapas tempranas del desarrollo, alguna alteración factible de corregir, diseñando esquemas de estimulación olfativa temprana.

La función olfativa tiene un amplio campo de acción para la investigación clínica, pues existen diversos sistemas sensoriales que se intersectan en cuanto a estructuras anatómicas se refiere, sobre todo en áreas superiores del sistema nervioso; por lo tanto nuestro organismo nos pide aún ser investigado, esperando que los más persistentes y sensibles descubran los secretos que este sistema olfativo encierra y que indudablemente nos dará grandes sorpresas.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

**Abramovitz M, Dubrovsky B.** CNV "Characteristics throughout the normal menstrual cycle". En H.H. Kornhuber and L. Deecke (Eds.). *Prog Brain Res.* 1980; 54:441-446. Amsterdam:Elsevier.

**Aidley DJ.** Cap. 16 "The organization of sensory receptors" en *The physiology of excitable cells.* 3a. ed. Cambridge University Press, 1989;346-365

**Allison AC, Warwick RTT.** "Quantitative observations on the olfactory system of the rabbit" *Brain* 1949;72:186-197

**Alonso de Ruíz P.** "Citopatología hormonal". En: Alonso de Ruíz P, Lazcano Ponce EC, Hernández Ávila M, Eds. *Cáncer Cervicouterino, Diagnóstico Preventivo y Control.*, 1° edn. México: Médica Panamericana, 2000:23-34

**Ammar-Kohdja A.** "Influence des contraceptifs oraux sur la muqueuse nasale". *Rev Lar Otol Rhinol.* 1971;92:40-42.

**Amoore JE, Popplewell JR, Whissell-Buechy D.** "Sensitivity of women to musk odor; no menstrual variation". *J Chem Ecol* 1975;1:291-297

**Amoore JE, Ollman BG.** "Practical test kits for quantitatively evaluating the sense of smell". *Rhinology* 1983;21:49-54

**Arimondi C, Vannelli GB, Balboni GC.** "Importance of olfaction in the sexual life;Morpho-functional and psychological studies in man". *Biomed Res.(India)* 1993; 4:43-52

**Auffermann H, Gerull G, Mathe F, Mrowiski D.** "Olfactory evoked potentials and contingent negative variation simultaneously recorded for diagnosis of smell disorders". *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;102(1 Pt.1):6-10

**Baird RC, Johari H, Jumper GY.** "Numerical simulation of environment modulation of chemical signal structure and odor dispersal in the open ocean". *Chem Senses* 1996;21:121-134

**Bannerman DM, Lemaire M, Yee BK, Iversen SD, Oswald CJ, Good MA, Rawlins JN.** "Selective cytotoxic lesions of the retrohippocampal region produce a mild deficit in social recognition memory". *Exp Brain Res.* 2002;142:395-401

**Barni T, Maggi M, Fantoni G, Granchi S, Mancina R, Gulisano M, Marra F, Macorsini E, Luconi M, Rotella C, Serio M, Balboni GC, Vannelli GB.** "Sex steroids and odorants modulate gonadotropin-releasing hormona secretion in

primary cultures of human olfactory cells" *J Clin Endocrinol & Metabol* 1999;84:4266-4273

**Barron S, Riley EP.** "The effects of prenatal alcohol exposure on behavioral and neuroanatomical components of olfaction". *Neurotoxicol Teratol* 1992;14:291-297

**Barz S, Hummel T, Pauli E, Majer M, Lang CJ, Kobal G.** "Chemosensory event-related potentials in response to trigeminal and olfactory stimulation in idiopathic Parkinson's disease". *Neurology* 1997;49:1424-1431

**Becerra PM, Zuñiga GC.** "Detección temprana de la enfermedad de Alzheimer en la consulta privada" *Laboratorios Wyeth* 1998:9-10

**Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widman M, Newton Ch, Holsboer F.** "Neuroprotection against oxidative stress by estrogens structure-activity relationship". *Mol Pharmacol* 1997;51:535-541

**Bensafi M, Rouby C, Farget V, Bertrand B, Vigouroux M, Holley A.** "Influence of affective and cognitive judgments on autonomic parameters during inhalation of pleasant and unpleasant odors in humans". *Neurosci Lett.* 2002;319:162-166

**Benton D.** "The influence of androstenol—a putative human pheromone—on mood throughout the menstrual cycle". *Biol Psychol* 1982;15:249-256

**Berne RM, Levy MN.** Cap.12 "Chemical senses" en *Physiology 2a.* ed. Mosby C.V. 1988;188-195

**Berkowickcz DA, Trombley PQ, Shepherd GM.** "Evidence of glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter". *J Neurophysiol* 1994;71:2557-2561

**Bertil Hille.** Cap 8 "Transduction, transport, Ca release, Intercellular coupling. Ionic channels of excitable membranes" 2o. ed. Sinauer Associates Inc. 1992;215-218

**Best WJ.** Cap 46 "Sistemas sensoriales" en *Bases Fisiológicas de la práctica médica* 13a. ed. Médica Panamericana 2003; 857-858

**Blakesley VA, Stannard BS, Takelib T, Helman LJ, LeRoith D.** "Role of the IGF-I receptor in mutagenesis and tumor promotion" *J Endocrinol* 1997;152:339

**Bonnin F, Taillard C, Montagner H.** "Daily and seasonal variations in olfactory sensitivity of mothers after parturition and their capacity to discriminate the body of their newborn". *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1990;19:165-170

**Bowser C, Riederer A.** "Detection of progesterone receptors in connective tissue cells lower nasal turbinates in women" *Laryngol Rhynol Othol* 2001,80:182-186

**Breer H, Boekhoff I, Tareilus E.** "Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction". *Nature* 1990;345:65-68

**Breer H, Shepherd G.** "Implication of the NO/c GMP system olfaction". *TINS* 1993;16:5-9

**Brennan PA, Kendrick KM, Keverne EB.** "Neurotransmitter release in the accessory olfactory bulb during and after the formation of an olfactory memory in mice". *Neuroscience* 1995;69:1075-1086

**Brown T, Yu J, Ganong M, Sharma M, MacLusky N.** "Sex differences in estrogen receptor and progesterin receptor induction in the guinea pig hypothalamus and preoptic area". *Brain Res*;1996;725:37-48

**Bruce HM.** "An exteroceptive block to pregnancy in the mouse". *Nature* 1959;184:105

**Bruce HM.** "A block to pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males". *J Reprod Fertil* 1960;1:96

**Bruce MC.** *Embriología Básica de Patten*. Interamericana, Mc Graw Hill 5ª. Edic.1990;508-512

**Cain WS, Gent JF, Goodspeed RB, Leonard G.** "Evaluation of olfactory dysfunction in the Connecticut Chemosensory Clinical Research Center". *Laryngoscope* 1988;98:83-88

**Cain WS, Gent JF.** "Olfactory sensitivity:Reliability, generality, and association with aging". *J Exp Psychol* 1991;2:382-391

**Calderón-Garcidueñas L, Osorno-Velazquez A, Bravo-Alvarez H, Delgado-Chavez R, Barrios-Marquez R.** "Histopathologic changes of the nasal mucosa in Southwest Metropolitan México City Inhabitants". *Am J Pathology* 1992;1:225-232

**Calof AL, Chikaraishi D.M.** "Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor *in vitro*". *Neuron* 1989;3:115-127.

**Carleton A, Rochefort C, Morante-Oria J, Desmaisons D, Vincent JD, Gheusi G, Lledo PM.** "Making scents of olfactory neurogenesis". *J Physiol Paris*. 2002;96:115-122.

**Carley ME, Rickard DJ, Gebhart JB, Webb MJ, Podratz KC, Spelberg TC.** "Distribution of estrogen receptors alpha y beta mRNA in mouse urogenital tissues and their expression after oophorectomy and estrogen replacement". *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2003;14:141-145

**Carmine N, Sardo Di Spiezio A, Germano G, Constantino C, Giuseppe B, Giuseppe A, Sammartino A, Vierl G.** "Comparision on intranasal and transdermal estradiol on nasal mucosa in postmenopausal women" *Menopause* 2004; 11:447-455

**Caruso S, Grillo C, Agnello C, Maiolino L, Intelisano G, Serra A.** "A prospective study evidencing rhinomanometric and olfactometric outcomes in women taking oral contraceptives". *Hum Reprod.* 2001;16:2288-2294.

**Chen WR, Shepherd GM.** "Membrane and synaptic properties of mitral cells in slices of rat olfactory bulb". *Brain Res* 1997;745:189-196

**Cheesman GH, Townsend MJ.** "Further experiments on the olfactory thresholds of pure chemical substances, using the "sniff bottle" method". *Q J Exp Psychol* 1956;8:8-14

**Clark JH, Peck EJ.** "Female sex steroids: receptors and function". *Monogr Endocrinol* 1979;14:I-XII,1-245. Review

**Claus R, Weiler V, Wagner HG.** "The influence of age and season (and light) on boar reproductive functions". *The male in form animal reproduction.* Ed. M. Courot Publ Martinus Nijhoff. 1984;161-183

**Colín-Barenque L, Avila-Costa MR, Fortoul T, Rugerio-Vargas C, Machado-Salas JP, Espinosa-Villanueva J, Rivas-Arancibia S.** "Morphologic alteration of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats" *Neurosci Letter* 1999;274:1-4

**Commetto-Muñiz JE, Cain WS.** "Trigeminal and olfactory sensitivity: comparison of modalities and methods of measurement". *Int Arch Occup Environ Health* 1998;71:105-110

**Commetto-Muñiz JE, Cain WS, Abraham MH, Gola JM.** "Psychometric functions for the olfactory and trigeminal detectability of butyl acetate and toluene". *J Appl Toxicol* 2002;22:25-30

**Compagnone NA, Mellon SH.** "Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators". *Front Neuroendocrinology* 2000;21:1-56

**Cowley JJ, Brooksbank BW.** "Human exposure to putative pheromones and changes in aspects of social behaviour". *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;39:647-659

**Cuellar JL, Ramírez LM.** "Feromona sexual como alternativa para el manejo de la palomilla de la manzana (*Cydia pomonella* L.); Lepidóptera: Tortricidae en México(RN)" *Centro de Investigación Regional del Norte Centro, Campo Experimental Sierra de Chihuahua.* Folleto Técnico 1999;10

**Cui L, Evans J.** "Olfactory event-related potentials to amyl acetate in congenital anosmia". *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1997;102:303-306

**Cummings DM, Brunjes PC.** "Migrating luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and processes are associated with a substrate that expresses S100". *Dev Brain Res* 1995;88:148-157

**Dade LA, Zatorre RJ, Jones-Gotman M.** "Olfactory learning: convergent findings from lesion and brain imaging studies in humans". *Brain*. 2002;125:86-101

**Dahlstrom A, Fuxe K.** "Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons". *Acta Physiol Scand* 1964;62 Suppl 232:1-55

**Dahlstrom A, Fuxe K, Olson L, Ungerstedt U.** "On the distribution and possible function of monoamine nerve terminals in the olfactory bulb of the rabbit". *Life Sci* 1965;4:2071-2071

**Dalton P.** "Evaluating the human response to sensory irritation: implications for setting occupational exposure limits". *AIHAJ*. 2001;62:723-729

**Dalton P, Doolittle N, Breslin PA.** "Gender-specific induction of enhanced sensitivity to odors". *Nat Neurosci*. 2002;5:199-200.

**Davidson TM, Murphy C.** "Rapid clinical evaluation of anosmia". *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:591-594

**Davidson TM, Freed C, Healy MP, Murphy C.** "Rapid Clinical Evaluation of Anosmia in Children: The alcohol sniff test". *Ann N Y Acad Sci* 1998;855:787-791

**Dawson VL, Dawson TM, Wamsley JK.** 1988. "Autoradiographic localization of drug and neurotransmitter receptors in the olfactory bulb". En: "*Neurobiología de los sistemas sensoriales*" Cap.6 La neurotransmisión en las neuronas receptoras olfatorias. UNAM 1995

**Dedov VN, Mandadi S, Armati PJ, Verkhatsky A.** "Capsaicin-induced depolarisation of mitochondria in dorsal root ganglion neurons is enhanced by vanilloid receptors" *Neuroscience* 2001;103:219-226

**Diamond M, Diamond L, Mast M.** "Visual sensitivity and sexual arousal levels during the menstrual cycle". *J of Nerv Ment Dis* 1972;155:170-176

**Diano S, Naftolin F, Horvath T.** "Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor-containing neurons in the rat hypothalamus, septum and amygdala: a morphological and biochemical study". *Endocrinology* 1997;138:778-789

**Dominguez-Salazar E, Portillo W, Baum MJ, Bakker J, Paredes RG.** “Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system”. *Physiol Behav.* 2002;75:337-346.

**Donald AL.** “Otolaryngology” Cap. 35 “Anatomy of the nose” Cap.36 “Physiology of Olfaction” 627-664

**Doty RL, Ford M, Preti G.** “Changes in the intensity and pleasantness of human vaginal odors during the menstrual cycle”. *Science* 1975;190:1316-1317

**Doty RL, Hall JW, Flickinger GL, Lowry LD.** “Endocrine, cardiovascular and psychological correlates of olfactory sensitivity changes during the human menstrual cycle”. *J Comp Physiol Psychol* 1981;95:45-60

**Doty RL, Shaman P, Dann M.** “Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test: A standardized Microencapsulated Test of Olfactory Function”. *Physiol Behav* 1984;32:489-502

**Doty RL, Newhouse MG, Azzalina JD.** “Internal consistency and short-term test-retest reliability of the University of Pennsylvania Smell Identification Test”. *Chem Senses* 1985;10:297-300

**Doty RL, Gregor TP, Settle RG.** “Influence of intertribal interval and sniff-bottle volume on phenyl ethyl alcohol odor detection thresholds”. *Chem Senses.* 1986;11:259-264

**Doty RL, Deems DA, Stellar S.** “Olfactory dysfunction in Parkinson’s disease: A general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration”. *Neurology* 1988;38:1237-1244

**Doty RL, Frye RE, Agrawal U.** “Internal consistency reliability of the fractionated and whole University of Pennsylvania Smell Identification Test”. *Percept Psychophys* 1989;45:381-384

**Doty RL, Frye E.** “The nasal cycle: relationship to ultradian rhythms and unilateral olfactory thresholds”. *Chem Senses* 1991;16:524

**Doty RL, Golbe LY, McKeown DA, Stern MB, Lehrach CM, Crawford D.** “Olfactory testing differentiates between progressive supranuclear palsy and idiopathic Parkinson’s disease”. *Neurology* 1993;43:962-965

**Doty RL, Smith R, McKeown DA, Raj J.** “Tests of human olfactory function: principle components analysis suggests that most measure a common source of variance”. *Percept Psychophys* 1994;56:701-707

**Doty RL, McKeown DA, Lee WW, Shaman P.** "A study of the Test-retest Reliability of Ten Olfactory Tests". *Chem Senses* 1995;20:645-656

**Doty RL.** "Studies of human olfaction from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center". *Chem Senses* 1997;22:565-586

**Drumheller GW.** "Topology of the lateral nasal cartilages: the anatomical relationships of the lateral nasal to the greater alar cartilage, lateral crus" *Anat Rec* 1973;176:321

**Dutton K, Blanksby BA, Morton AR.** "CO<sub>2</sub> sensitivity changes during the menstrual cycle". *J Appl Physiol* 1989;67:517-522

**Dye L.** En: *J.T.E. Richardson (Ed). Cognition and the menstrual cycle.* New York: Springer Verlag. 1992:67-97

**Ellegard E, Karlsson G.** "Nasal congestion during the menstrual cycle". *Clin Otolaryngol.* 1994;19:400-403.

**Enomoto S, Kashiwayanagi M, Kurihara K.** "Liposomes having high sensitivity to odorants". *Biochim Biophys* 1991;1062:7-12

**Eshel Y, Shai Y, Vorherr T, Carafoli E, Salomon Y.** "Synthetic peptides corresponding to the calmodulin-binding domains of skeletal muscle myosin light chain kinase and human erythrocyte Ca<sup>2+</sup> pump interact with and permeabilize liposomes and cell membranes". *Biochemistry* 1993;32:6721-6728

**Fadool DA, Wachowiak M, Brann JH.** "Patch-clamp analysis of voltage-activated and chemically activated currents in the vomeronasal organ *Sternotherus odoratus* (stinkpot/musk turtle)". *J Exp Biol* 2001; 204(Pt 24):4199-4212

**Farbman AI.** *Cell Biology of Olfaction.* Cambridge University Press 1992

**Fawcett DW.** *Histología.* Interamericana 12a. edic. 1995

**Ferreira V, Pet'ka J, Aznar M.** "Aroma extract dilution análisis. Precision and optimal experimental design" *J Agric Food Chem* 2002;50(6):1508-1514

**Fessler DM.** "Luteal phase immunosuppression and meat eating". *Riv Biol.* 2001;94:403-426

**Fujita S, Mori k, Imamura K, Obata K.** "Subclasses of olfactory receptor cells and their segregated central projections demonstrated by a monoclonal antibody". *Brain Res* 1985;326:192-196



**Fukushima N, Oikawa S, Yokouchi K, Kawagishi K, Moriizumi T.** “The minimum number of neurons in the central olfactory pathway in relation to its function: a retrograde fiber tracing study”. *Chem Senses*. 2002;27:1-6

**Gaillard I, Rouquier S, Pin JP, Mollard P, Richard S, Barnabe C, Demaille J, Giorgi D.** “A single olfactory receptor specifically binds a set of odorant molecules”. *Eur J Neurosci*. 2002;15:409-418

**Ganong WF.** *Manual de Fisiología Humana*. El Manual Moderno (Ed). 19a. Edic. 1999, 20<sup>a</sup>. Ed.2005

**Gargiulo PA, Muñoz V, Donoso AO.** “Inhibition by N- Methyl-D-Aspartic Acid (NMDA) receptor antagonist of lordosis behavior induced by estrogen followed by progesterone or luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the rat”. *Physiol Behav* 1992;53:737-739

**Genazzani AR, Lemarchand-Beraud T, Aubert ML, Felber JP.** “Patter of plasma ACTH, HGH, and cortisol during the menstrual cycle”. *J Endocrinol Metab* 1975;41:431-437

**Getchell TV.** “Analysis of intracellular recordings from salamander olfactory epithelium”. *Brain Res*. 1977;123:275-286

**Getchell TV, Shepherd GM.** “Responses of olfactory receptor cells to step pulses of odor at different concentrations in the salamander”. *J Physiol (London)* 1978;282:521-540

**Getchell TV, Rama Krishna NS, Dhooper NT, Sparks DL, Getchell ML.** “Human olfactory receptor neurons express heat shock protein 70: age-related trends”. *Ann Otol Rhinol Laringol* 1995;104:47-56

**Grammer K.** “5-alfa-androst-16-en-3 alfa-on: a male pheromone?. A brief report”. *Ethology and Sociobiology* 1993;14:201-208

**Graziadei PPC.** “The ultrastructure of vertebrates olfactory mucosa”. En: *The Ultraestructure of Sensory Organs*. Ed. I. Friedmann. North Holland, Amsterdam 1973; 267-305

**Graziadei PPC, Levine RR, Monti Graziadei GA.** “Regeneration of olfactory axons and synapse formation in the forebrain after bulbectomy in neonatal mice”. *Proct Natl Acad* 1978;75:5320-5324

**Graziadei PPC, Levine RR, Monti Graziadei GA.** “Regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse”. *Neuroscience* 1979;4:713-727

**Greene MJ, Stark SL, Mason RT.** “Pheromone trailing behavior of the brown tree snake, *Boiga irregularis*”. *J Chem Ecol*. 2001;27:2193-2201

**Guevara-Guzmán R.** “Participación del bulbo olfatorio en la modulación de las conductas reproductiva y maternal”. *Neurobiología de los Sistemas Sensoriales* 1ª. Ed. 1995 UNAM Cap 7,8; 1995:119-146

**Guyton AC.** *Manual de Fisiología Humana*. Interamericana (Ed). 1997

**Gyorgyi TK, Roby-Shemkowitz AJ, Lerner MR.** “Characterization and cDNA cloning of the pheromone binding protein from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*”. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9851-9855

**Haeggstrom A, Ostberg B, Stjerna P, Graf P, Halle H.** “Nasal mucosal swelling and reactivity during a menstrual cycle”. *J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2000;62:39-40.

**Ham AW.** *Tratado de Histología*. Interamericana 7a. edic. 1975

**Hanssons BS.** “A bug’s smell- research into insect olfaction”. *Trends Neurosci.* 2002;25:270-274

**Harrison .** *Medicina Interna*. Ediciones Científicas, La Prensa Médica Mexicana 5a.edic. 2/a. Reimpresión 1981

**Heimer L, Larsson K.** “Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic anterior hypothalamic continuum”. *Brain Res* 1967;3:248-263

**Henderson VW, Paganini-Hill A, Emanuel CK, Dunn ME, Buckwalter JG.** “Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer’s disease cases and nondemented control subjects”. *Arch Neurol* 1994;51:896-900

**Hodge JE.** “The Chemistry and Physiology of Flavors” Japanese version, Kenpakusya, Tokio. *Symposium on Foods*: Chapter XXII. Ed. Schultz HW 1967:468-469. (Citada en Yoshii F, Hirono Sh. “Construction of a Quantitative Three-dimensional Model for Odor Quality using Comparative Molecular Field Analysis” *Chem Senses* 1996;21:201-210).

**Hudson R, Laska M, Berger T, Heye B, Schopohl J, Danek A.** “Olfactory function in patients with hypogonadotropic hypogonadism: an all-or-none phenomenon?”. *Chem Senses* 1994;19:57-69

**Hudson R, Distel H.** “Procesamiento central de la información olfatoria”. Cap.7 en *Neurobiología de los Sistemas Sensoriales* 1ª. ed.1995 UNAM

**Hudson R.** “From molecule to mind: the role of experience in shaping olfactory function”. *J Comp Physiol A* 1999;185:297-304

**Hudson R, Arriola A, Martínez-Gómez M, Distel H.** “Effect of air pollution on olfactory function in residents of México, City”. *Chemical Senses* 2006;31:79-85

**Hummel T, Gollisch R, Wildt G, Kobal G.** “Changes in olfactory perception during the menstrual cycle”. *Experientia* 1991;47:712-715

**Hummel T, Sekinger B, Wolf SR, Pauli E, Kobal G.** “Sniffin Sticks”: Olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold”. *Chem Senses* 1997;22:39-52

**Hummel T, Konnerth CG, Rosenheim K, Kobal G.** “Screening of olfactory function with a four-minute odor identification test:reliability, normative data, and investigations in patients with olfactory loss”. *Ann Otol Laryngol.* 2001;110:976-981

**Hummel T, Livermore A.** “Intranasal chemosensory function of the trigeminal nerve and aspects of its relation to olfaction”. *Int Arch Occup Environ Health* 2002;75:305-313

**Iwata H, Nakayama K, Matsuda T, Baba A.** “Effect of taurine on a benzodiazepine-GABA- chloride ionophore receptor complex in rat brain membranes”. *Neurochem Res* 1984;9:535-544

**Jafek BW.** “Ultrastructure of human nasal mucosa”. *Laryngoscope* 1983;93:1576

**Jiang XC, Inouchi J, Wang D, Halpern M.** “Purification and characterization of a chemoattractant from electric shock-induced earth-worm secretion, its receptor binding, and signal transduction through the vomeronasal system of garter snakes”. *J Biol Chem* 1990;265:8736-8744

**Johnson A, Josephson R, Hawke M.** “Clinical and histological evidence for the presence of the vomeronasal (Jacobson’s) organ in adult humans”. *J Otolaryngol* 1985;14:71-79

**Jones DT, Reed RR.** “Golf;An olfactory neuron specific. G protein involved in odorant signal transduction”. *Science* 1989;244:790-795

**Jones N, Rog D.** “Olfaction: a review”. *J Laryngol Otol* 1998;112:11-24

**Jordan MJ, Tandon K, Shaw PE, Goodner KL.** “Aromatic profile of aqueous banana essence and banana fruit by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-olfactometry (GC-O)”. *J Agric Food Chem.* 2001;49:4813-4817

**Kaba H, Rosser AE, Keverne EB.** “Hormonal enhancement of neurogenesis and its relationship to the duration of olfactory memory”. *Neuroscience.* 1988;24:93-98.

**Kaba H, Nakanishi Sh.** “Synaptic mechanisms of olfactory recognition memory”. *Rev Neurosci* 1995;6:125-141

**Kandel EP, Schwartz JH.** Cap. 9 “Morphology of chemical synapses and patterns of interconnection” en *Principles of Neural Science*. 1981 Elsevier/North-Holland.

**Kassi E, Moutsatsou P, Sekeris CE, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN.** “Oestrogen receptors in cultured epithelial cells from salivary glands of Sjögren’s syndrome patients”. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:1120-1122

**Kendal-Reed M, Walker JC, Morgan WT, LaMacchio M, Lutz RW.** “Human responses to propionic acid. I. Quantification of within- and between-participant variation in perception by normosmics and anosmics”. *Chem Senses* 1998;23:71-82

**Kendrick KM, Keverne EB, Hinton MR, Goode JA.** “Oxytocin, aminoacid and monoamine release in the region of the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of the sheep during parturition and suckling”. *Brain Res* 1992;569:199-209

**Kimura H, Mc Geer PL, Peng F, Mc Geer EG.** “Choline acetyltransferase-containing neuron in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry”. *Science* 1980;208:1057-1069

**Klimek ML, Roho G, Young L, Succhowersky O, Trew M.** “Multidisciplinary approach to management of hereditary neurodegenerative disorder:Huntington disease. *Axone* 1997;19:34-38

**Knobil E, Neill JD.** Cap 13 “The corpus luteum and its control”. Cap 60 “Reproductive senescence:phenomena and mechanisms in mammals and selected vertebrates”. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994;(1):489-506. (2):2366-2367

**Kobal G, Hummel T.** “Human electro-olfactograms and brain responses to olfactory stimulation”. En: *The Human Sense of Smell* (Laing DG, Doty RL, Breeipohl W Eds.). Springer-Verlag, Berling 1996:135-215

**Kobayashi RM, Palkovits M, Hruska RE, Rotschild, Yamamura HI.** “Regional distribution of muscarinic cholinergic receptors in rat brain”. *Brain Res* 1978;154:13-23

**Koelega HS.** Sex differences in olfactory sensitivity and the problem of the generality of smell acuity”. *Persceptual and Motor Skills* 1994;78:203-213

**Koelega HS, Köster EP.** “Some experiments on sex differences in odor perception” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1974;237:234-246.

**Kolble N, Hummel T, von Mering R, Huch A, Huch R.** “Gustatory and olfactory function in the first trimester of pregnancy”. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;99:179-183

**Kondo H, Matsuda T, Hashiba M, Baba Sh.** “A study of the relationship between the T & T olfactometer and the University of Pennsylvania Smell Identification Test in a Japanese Population”. *Am J Rhinol* 1998;5:353-358

**Konno A, Terada N, Okamoto Y.** “Effects of female hormones on the muscarinic and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors of the nasal mucosa. An experimental study in guinea pigs”. *J Otorhinolaryngol* 1986;48:45-51.

**Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vandoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG.** “Oestrogen receptor beta (Erbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour’s dedifferentiation” *Eur J Cancer* 2003;39:1251-1258

**Köster EP.** *Int rhin* (Leiden) 1965;3:57; citado en Hummel T et al. “Changes in olfactory perception during the menstrual cycle”. *Experientia* 47(1991)

**Köster EP.** “Olfactory sensitivity and ovulatory cycle duration”. *Olfactology* 1968;1:43-51

**Kouros-Mehr H, Pintchovski S, Melnyk J, Chen YJ, Friedman C, Trask B, Shizuya H.** “Identification of non-functional human VNO receptor genes provides evidence for vestigiality of the human VNO”. *Chem Senses.* 2001;26:1167-1674.

**Kratskin IL.** “Functional anatomy, central connections, and neurochemistry of the mammalian olfactory bulb”. En: Doty RL(Ed). *Handbook of olfaction and gustation.* New York: Maarcel Dekker. 1995:103-126

**Kreutzer EW, Jafek BW.** “The vomeronasal organ of Jacobson in the human embryo and fetus”. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1980;88:119-123

**Kubie JL, Vagvolgyi A, Halpern M.** “The roles of the vomeronasal and olfactory systems in the courtship behavior of male garter snakes”. *J Comp Physiol Psychol* 1978;92:627-641

**Kunka M, Doty RL, Settle RG.** “An examination of intertrial interval and gender influences on sucrose detection thresholds established by a modified staircase procedure”. *Perception* 1981;10:35-38

**Labarca P, Delgado R, Jorquera O.** “Transducción química en la neurona olfatoria de los vertebrados”. Cap 5 en *Neurobiología de los Sistemas Sensoriales* 1ª. Ed. 1995 UNAM.

**Lacort M, Leal AM, Liza M, Martin C, Martínez R, Ruíz-Larrea MB.** “Protective effects of estrogens and catecholestrogens against peroxidative membrane damage in vitro”. *Lipids* 1995;30:141-146

**Lacreuse A, Wilson ME, Herndon JG.** “Estradiol, but not raloxifene, improves aspects of spatial working memory in aged ovariectomized rhesus monkeys”. *Neurobiol Aging* 2002;23:589-600

**Laska M, Koch B, Heid B, Hudson R.** “Failure to demonstrate systematic changes in olfactory perception in the course of pregnancy: a longitudinal study”. *Chem Senses* 1996; 21:567-571

**Laska M., Seibt A.** “Olfactory sensitivity for aliphatic alcohols in squirrel monkeys and pigtail macaques”. *J Exp Biol.* 2002;205:1633-1643

**Le Magnen.** “Les phenomenes olfacto-sexuales chez l’homme”. *J Archs SCI Physiol* 1952;6:125-160

**Levy E.** “Physiological and sensorial determinism of maternal behavior in mammals”. *Fertilite Contraception Sexualite* 1998;26:718-727 (Abstract)

**Linster C, Johnson BA, Yue E, Morse A, Xu Z, Hingco EE, Choi M, Messiha A, Leon M.** “Perceptual correlates of neural representations evoked by odorant enantiomers”. *J Neurosci.* 2001;21:9837-9843.

**Löstch J, Nordin S, Hummel T, Murphy C, Kobal G.** “Chronobiology of nasal chemosensitivity: Do odor or trigeminal pain. Thresholds follow a circadian rhythm?”. *Chem Senses* 1997;22:593-598

**Luskin MG, Price JL.** “The topographic organization of associational fibers of the olfactory system of the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb”. *J Comp Neurol* 1983;216:264-291

**Mackay-Sim A, Breihpohl W, Kremer M.** “Cell dynamics in the olfactory epithelium of the tiger salamander: a morphometric analysis”. *Exp Brain Res* 1988;71:189-198

**Mackay-Sim A, Kittel PW.** “On the life span of olfactory receptor neurons”. *Eur J Neurosci* 1991;3:209-215

**Mackenzie JN.** “The physiological and pathological relations between the nose and the sexual apparatus of man”. *Johns Hopkins Hosp. Bull* 1898;9:10 (Citado en Ham, 1975)

**Mair RG, Bouffard JA, Engen T, Morton TH.** “Olfactory sensitivity during the menstrual cycle”. *Sensory Processes* 1978;2:90-98

**Mannia-Farnell B, Farbman AI.** "Olfactory bulb influence on G-protein expression in rat olfactory epithelium" *Soc Neuroscience Abstr* 1988;14:428

**Margolis FL.** "Carnosine in the primary olfactory pathway". *Science* 1974;184:909-911

**Markopoulou K, Larsen KW, Wszolek EK, Denson MA, Lang AE, Pfeiffer RF, Wszolek ZK.** "Olfactory dysfunction in familial parkinsonism" *Neurology* 1997;49:1262-1267

**Mazzari G, du Mesnil du Buisson F, Ortavant R.** "Action de la temperature et de la lumiere sur la spermatogenese, la production et le pouvoir fécondant du sperme de verrat" 1968 6/a. Cong. Intern. Reprod. Insém. Artif. Paris,1:305-308

**McEwen BS, Corini H, Danielsson A, Frankfurt M, Gould E, Mendelson S, Schumacher M, Segarra A, Wooley C.** "Steroid and thyroid hormones modulate a changing brain". *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40:1-14

**Medina JH, De Robertis E.** "Taurine modulation of the benzodiazepine-gamma-aminobutyric acid receptor complex in brain membranes". *J Neurochem* 1984;42:1212-1217

**Menco BPM, Benos DJ.** "Freeze-substitution and freeze-etch cytochemistry on cilia and microvilli of the rat's olfactory epithelium". *J Cell Biol.* 1989;109:254

**Meshulam RI, Moberg PJ, Mahr RN, Doty RL.** "Olfaction in neurodegenerative disease: A meta analysis of olfactory functioning in Alzheimer's and Parkinson's diseases". *Arch Neurol* 1998;55:84-90

**Meredith M, Moulton DG.** "Patterned response to odor in single neurons of goldfish olfactory bulb: influence of odor quality and other stimulus parameters". *J Gen Physiol* 1978;71:615-643

**Meredith M.** "Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts". *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;39:601-614

**Minke B, Cook B.** "TRP channel proteins and signal transduction". *Physiol Rev.* 2002; 82:429-472

**Mirza N, Kroger H, Doty RL.** "Influence of age on the "nasal cycle". *Laryngoscope* 1997;107:62-66

**Mombaerts P.** "The human repertoire of odorant receptor genes and pseudogenes". *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001;2:493-510.

**Monti-Graziadei GA, Graziadei PPC.** “Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy”. *J Neurocytol* 1979;8:197

**Mora N, Sanchez C.** “Fisiología del olfato”. Cap 20 en TresGuerres JA *Fisiología Humana* 1ª. Ed. 1992. Mc GrawHill 328-340

**Mori K.** “Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb”. *Prog Neurobiol.* 1987;29:275-320

**Morley B, Lorden JF, Brown GB, Kemp Ge, Bradley RJ.** “Regional distribution of nicotine acetylcholine receptors in rat brain”. *Soc. Neurosci Abs* 1977;3:458

**Moulton DG.** “Cell renewal in the olfactory epithelium of the mouse”. En: *Olfaction and Taste.* V Eds; D.A. Denton & JP Coghlan Academic Press, N.Y. 1975;111-114

**Mouri T, Shiraishi K, Kato T.** “Magnetoencephalographic responses to odor and non-odor by fast Fourier transformation analysis in humans”. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho.* 2002;105:142-151

**Mulligan C, Moreau K, Brandolini M, Livingstone B, Beaufreere B, Boirie Y.** “Alterations of sensory perceptions in healthy elderly subjects during fasting and refeeding. A pilot study”. *Gerontology* 2002;48:39-43.

**Murphy C, Bacon AW, Bondi MW, Salmon DP.** “Apolipoprotein E status is associated with odor identification deficits in nondemented older persons”. *Ann N Y Acad Sci* 1998;855:744-750

**Mykytowycs R.** “The role of skin glands in mammalian communication”. En: *Cell Biology of olfaction* cap. 4 “Vomeronasal organ”. Developmental and cell biology series. Eds; PW Barlow, D Bray, PB Green, JMW Slack Cambridge University Press 1992;118-129

**Naessen R.** “An enquiry on the morphological characteristics and possible changes with age in the olfactory region of man”. *Acta Otolaryngol* 1971;71:49-62

**Nagahara Y.** “Experimentelle Studien über die histologischen Veränderungen des Geruchsorgans nach der Olfactoriusdurchschneidung. Beiträge zur Kenntnis des feineren Baus des Geruchsorgans”. *Japan J Med Sci V Pathol* 1940;5:165-199

**Navarrete E, Prospero O, Hudson R, Guevara R.** “Enfermedades Neurodegenerativas que cursan con demencia”. *Gac Med Mex* 2000;136:573-584

**Navarrete-Palacios E, Hudson R, Reyes-Guerrero G, Guevara-Guzmán R.** “Correlation between cytological characteristics of the nasal epithelium and menstrual cycle”. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:460-463



**Navarrete-Palacios E, Hudson R, Reyes-Guerrero G, Guevara-Guzmán R.** "Lower olfactory threshold during the ovulatory phase of the menstrual cycle". *Biol Psychol* 2003;63:269-279

**Nearing J, Betka M, Quinn S, Hentschell H, Elger M, Baum M, Bai M, Chattopadhyay N, Brown EM, Hebert SC, Harris HW.** "Polivalent cation receptor proteins (CaRs) are salinity sensors in fish". *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9231-9236

**Nielsen M, Schou H, Braestrup C.** "[3H]propyl beta-carboline-3-carboxylate binds specifically to brain benzodiazepine receptors". *J Neurochem* 1981;36:276-285

**Nordin S, Murphy C.** "Impairment of sensory and cognitive olfactory function in questionable Alzheimer's disease". *Neuropsychology* 1996;10:113-119

**Nusser Z, Kay LM, Laurent G, Homanics GE, Mody I.** "Disruption of GABA(A) receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network". *J Neurophysiol.* 2001;86:2823-2833.

**Otto T, Eichenbaum H.** "Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal entorhinal cortices in an odor-guided delayed- nonmatching-to-sample task". *Behav Neurosc* 1992;106:762-775

**Okano M, Takagi SF.** "Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium". *J Physiol (Lond.)* 1974;242:353-370

**Paganini-Hill A, Henderson VW.** "Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women". *Am J Epidemiol* 1994;140:256-261

**Papanicolaou GN.** *Atlas of Exfoliative Cytology.* Cambridge., Mass; Harvard Univ. Press,1953;Suppl. 1,1956; Suppl. 2, 1960

**Parkes AS, Bruce HM.** "Pregnancy-block in female mice placed in boxes soiled by males". *J Reprod Fertil.* 1962;4:303-308

**Paulsson B, Gredmark T, Burian P, Bende M.** "Nasal mucosal congestion during the menstrual cycle". *J Laryngol Otol.*1997;111:337-339.

**Pause BM, Sojka B, Krauel K, Fehm-Wolfsdorf G, Ferstl R.** "Olfactory information processing during the course of the menstrual cycle". *Biol Psychol.* 1996;44:31-54.

**Pelikan Z.** "Possible immediate hypersensitivity reaction of the nasal mucosa to oral contraceptives". *Ann Allergy.* 1978;40:211-219.

**Pelosi P, Baldaccini NE, Pisanelli AM.** "Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine". *Biochem J* 1982;201:245-248

**Pevsner J, Reed RR, Feinstein PG, Snyder SH.** "Molecular cloning of odorant-binding protein: member of a ligand carrier family". *Science* 1988;241:336-339

**Pevsner J, Hou V, Snowman AM, Snyder SH.** "Odorant-binding protein" *J Biol Chem.* 1990;265:6118-6125

**Pompei P, Riffina F, Mc Ewens B.** "Effect of adrenal steroids on preproneurokinin- A gene expression in discrete regions of the rat brain". *Brain Res Mol Brain Res* 1995;33:209-216

**Powers JB, Winans SS.** "Vomer nasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster". *Science* 1975;187:961-963

**Rafols JA, Getchell TV.** "Morphological relations between the receptor neurons, sustentacular cells and Schwann cells in the olfactory mucosa of the salamander". *Anat Rec* 1983;206:87-101

**Riley JL 3<sup>rd</sup>, Robinson ME, Wise EA, Price DD.** "A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle". *Pain* 1999;81:225-235

**Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM.** "Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory". *J Neurosci.* 2002;22:2679-2689.

**Ronnett GV, Moon C.** "G proteins and olfactory signal transduction". *Annu Rev Physiol.* 2002;64:189-222

**Rossenblatt MR, Olmstead RE, Iwamoto-Schaap P, Jarvik M.** "Olfactory thresholds for nicotine and menthol in smokers (abstinent and nonabstinent) and nonsmokers". *Physiol Behav* 1998;3:575-579

**Rosser AE, Keverne EB.** "The importance of central noradrenergic neurons in the formation of an olfactory memory in the prevention of pregnancy block". *Neuroscience* 1985;15:1141-1147

**Roth TL, Sullivan RM.** "Endogenous opioids and their role in odor preference acquisition and consolidation following odor-shock conditioning in infant rats". *Dev Psychobiol.* 2001;39:188-198.

**Royall DR, Chiodo LK, Polk MS, Jaramillo CJ.** "Severe dysosmia in specifically associated with Alzheimer-like memory deficits in nondemented elderly retirees". *Neuroepidemiology.* 2002;21:68-73

**Sack MN, Arder DJ, Cannon III RO.** "Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women". *Lancet* 1994;343:269-270

**Sanes J, Hildebrand J.** "Acetylcholine and its metabolic enzymes in developing antennae of the moth, *Manduca sexta*". *Dev Biol* 1976;52:105-120

**Sato M, Kodama N, Sasaky T, Ohta M.** "Olfactory evoked potentials:experimental and clinical studies". *J Neurosurg* 1996;85:1122-1126

**Schank JC, McClintock MK.** "Ovulatory pheromone shortens ovarian cycles of female rats living in olfactory isolation". *Physiol Behav* 1997;62:899-904

**Schwartz LM, Chikaraishi DM, Kauer JS.** "Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography". *J Neurosci* 1991;11:3556-3564

**Schiff M.** "The "pill" in otolaryngology". *Transactions Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1968;72:76-84

**Schiffman SS.** "Taste and smell in disease ". *N Engl J Med* 1983 ;308:1275

**Schiffman SS.** "Taste and smell losses in normal aging and disease ". *JAMA* 1997;278:1357-1362

**Schneider RA, Wolf S.** "Olfactory perception threshold for citral utilizing a new type olfactorium". *J Appl Physiol* 1955;8:337-342

**Schultz EW.** "Repair of the olfactory mucosa with special reference to regeneration of olfactory cells (sensory neurons). *Amer J Path* 1960;37:1-19

**Shinoda K, Yagi H, Osawa Y, Shiotani Y.** "Involvement of specific placental antigen X-P2 in rat **olfaction**: an immunohistochemical study in the olfactory bulb". *J Comp Neurol* 1990;294:340-344

**Singer AG, Agosta WC, O'Connell RJ, Pfaffman C, Boowen DV, Field FH.** "Dimethyl disulfide:an attractant pheromone in hamster vaginal secretion". *Science* 1976;191: 948-949

**Singer C, Rogers K, Strickland T, Dorsa D.** "Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity". *Neurosci Lett* 1996;212:13-16

**Sokolov VE, Voznessenskaya VV, Zinkevich EP.** "Olfactory cues and ovarian cycles". En: Doty RL and Müller- Schwarze (Eds). *Chemical Signals in Vertebrates VI.* New York: Plenum Press 1992:267-270

**Stern K, McClintock MK.** "Regulation of ovulation by human pheromones". *Nature* 1998;392:177-179

**Stevens JC, Cain WS, Burke RJ.** "Variability of olfactory thresholds". *Chem Senses* 1988;13:643-653

**Steven LY, Schwob JE, Sheehe PR, Youngentob LM.** "Odorante threshold following Methyl Bromide-Induced lesioned of the Olfactory Epithelium". *Physiol Behav* 1997;62:1241-1252

**Strategic Services Division. 1999** File : ///AI/p1256.htm Phone Number (314)539-1600 (U.S.A.)

**Stubner UP, Gruber D, Berger UE.** "The influence of female sex hormones on nasal reactivity in seasonal allergic rhinitis". *Allergy*. 1999;54:865-871

**Stumpf WE, Sar M, Keefer DA.** *Atlas of estrogen target cells in rat brain*. En: Anatomical Neuroendocrinology, eds. WE Stumpf and LD Grant (Karger Basel) 1974;104

**Suzuki Y, Takeda M.** "Basal cells in the mouse olfactory epithelium after axotomy: immunohistochemical and electron microscopic studies". *Cell Tissue Res* 1991;266:239-245

**Swan GE, Carmelli D.** "Impaired olfaction predicts cognitive decline in nondemented older adults". *Neuroepidemiology*. 2002;21:58-67

**Swanson SJ, Dengerink HA.** "Changes in pure-tone thresholds and temporary threshold shifts as a function of menstrual cycle and oral contraceptives". *J Speech Hear Res* 1988;31:569-574

**Takagi SF, Yajima T.** "Electrical activity and histological change in the degenerating olfactory epithelium". *J Gen Physiol* 1965;559-569

**Takagi SF.** *Human Olfaction*. Univ. Tokyo Press, Tokyo 1989 (citado en Hudson R, Distel H.) Cap.7 "Procesamiento Central de la información olfatoria". *Neurobiología de los sistemas sensoriales*. UNAM 1995;119-134

**Takahashi S, Iwanaga T, Takahashi Y, Nakano Y, Fujita T.** "Neuron-specific enolase and S-100 protein in the olfactory mucosa of human fetuses". *Cell Tissue Res* 1984;238:231-234

**Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R.** "Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease" *Lancet* 1996;348:429-432

**Thaler ER, Kennedy DW, Hanson CW.** "Medical applications of electronic nose technology: review of current status". *Am J Rhinol*. 2001;15:291-295

**Thind K, Goldsmith P.** "Expression of estrogen and progesterone receptors in glutamate and GABA neurons of the pubertal female monkey hypothalamus". *Neuroendocrinology* 1997;65:314-324

**Thornton MJ, Taylor AH, Mulligan K, Al-Azzawi F, Lyon CC, O'Driscoll J, Messenger AG.** "The distribution of estrogen receptor beta is distinct to that of estrogen receptor alpha and the androgen receptor in human skin and the pilosebaceous unit". *J Investig Dermatol Symp Proc* 2003;8:100-103

**Toppozada H, Michaels L, Toppozada M.** "The human nasal mucosa in the menstrual cycle. A histochemical and electron microscopic study". *J Laryngol Otol.* 1981;95:1237-1247.

**Toppozada H, Michaels L, Toppozada M, El-Ghazzawi I, Talaat M, Elwany S.** "The human respiratory nasal mucosa in pregnancy". *J Laryngol Otol.* 1982;96:613-626

**Toppozada H, Toppozada M, El-Ghazzawi I, Elwany S.** "The human respiratory nasal mucosa in females using contraceptive pills. An ultramicroscopic and histochemical study" *J Laryngol Otol* 1984;98:43-51.

**Toppozada H.** "The human nasal mucosa in the menopause (A histochemical and electron microscopic study)". *J Laryngol Otol* 1988;102:314-318.

**Toyota B, Kitamura T, Takagi SF.** "Olfactory disorders, olfactometry and therapy". *Igaku-Shoin, Tokyo* 1978:5-83

**Turner AL, Esmond RF.** "Study of the paths of infection of the brain, meninges and venous blood sinuses from neighboring peripheral foci of inflammation. III. Nasal mucous polypi; intra-nasal operation on the ethmoidal air cells; purulent leptomeningitis; death; autopsy". *J Laryngol Otol* 1926; 41:717-731

**Tzong-Zeng Wu.** "A piezoelectric biosensor as an olfactory receptor for odour detection: electronic nose". *Biosens Bioelectron* 1999;14:9-18

**Vanderwolf CH.** "The hippocampus as an olfacto-motor mechanism: were the classical anatomist right after all?". *Behav Brain Res.* 2001;127:25-47

**Veith JL, Anderson J, Slade SA, Thompson P, Laugel GR, Getzlaf S.** "Plasma beta-endorphin, pain thresholds and anxiety levels across the human menstrual cycle". *Physiol Behav* 1984;32:31-34

**Verhaagen J, Oestreicher AB, Gispen WH, Margolis FL.** "The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats". *J Neurosci* 1989;9:683-691

**Vierling JS, Rock J.** "Variation in olfactory sensitivity to exaltolide during the menstrual cycle". *J Appl Physiol* 1967;22:311-315

**Vogt RG, Köhne AC, Dubnau JT, Prestwich GD.** "Expression of pheromone binding proteins during antennal development in the Gypsy moth *Lymantria dispar*". *J Neurosci* 1989;9:3332-3346

**Wang D, Chen P, Jiang XC, Halpern M.** "Isolation from earth-worms of a proteinaceous chemoattractant to garter snakes". *Arch Biochem Biophys* 1988;267:459-466

**Wang Y, Guan G, Dong Z, Yang Z.** "Effects of rhidosin on expression of fibroblast growth factor on olfactory bulb in rats and its relation with senile hyposmia". *Chin Med J (Engl)*. 1999;112:731-734.

**Wenk H, Meyer U, Bigl V.** "Centrifugal cholinergic connections in the olfactory system of rats". *Neuroscience* 1977;2:797-800

**Williams JR, Chai D, Gong H, Zhao W, Wright D.** "Studies toward the synthesis of the shark repellent pavoninin-5". *Lipids* 2002;37:1193-1195

**Wolfensberger M, Schnieper I, Welge-Lussen A.** "Sniffing´Sticks: a new olfactory test battery". *Acta Otolaryngol* 2000;120:303-306

**Won J, Mair EA, Bolger WE, Conran RM.** "The vomeronasal organ: An objective anatomic analysis of its prevalence". *ENT-Ear Nose Throat J* 2000;79:600-605

**Wright HN.** "Characterization of olfactory dysfunction". *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987;113:163-168

**Wu Tzong-Zeng.** "A piezoelectric biosensor as an olfactory receptor for odour detection: electronic nose". *Biosens Bioelectron* 1999;14:9-18

**Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, Davidge ST.** "Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart". *Cardiovasc Res* 2003;57:388-394

**Yamagishi M, Hasegawa S, Nakano Y, Takahashi S, Iwanaga T.** "Immunohistochemical analysis of the olfactory mucosa by use of antibodies to brain proteins and cytokeratin". *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989;98:384-388

**Yamagishi M, Takami Sh, Getchell TV.** "Ontogenic expression of dpot 35 protein (calbindin-D28K) in human olfactory receptor neurons and its decrease in Alzheimer´s disease patients" *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996; 105:132-138

**Yamagishi M, Getchell ML, Takami S, Getchell TV.** "Increased density of olfactory receptor neurons immunoreactive for apolipoprotein E in patient with Alzheimer´s disease". *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107:421-426

**Yilmaz H, Erkin EF, Mavioglu H, Sungurtekin U.** "Changes in pattern reversal evoked potentials during menstrual cycle". *Int Ophthalmol* 1998;22:27-30

**Yousem DM, Oguz KK, Li C.** "Imaging of the olfactory system". *Semin Ultrasound CT MR*. 2001;22:456-472.

**Zhao H, Ivic L, Otaki JM, Hashimoto M, Mikoshiba K, Firestein S.** "Functional expression of a mammalian odorant receptor". *Science* 1998;279:237-241

**Zigmond MJ, Bloom FE.** "Chemical senses: taste and olfaction". En: *Fundamental Neuroscience*. Eds; D.A. Denton & JP Coghlan Academic Press 1999;737-759

**Zou Z, Horowitz LF, Montmayeur JP, Snapper S, Buck LB.** "Genetic tracing reveals a stereotyped map in the olfactory cortex". *Nature*. 2001;414:173-179.

**Zuri I, Halpern M.** "Differential effects of lesions of the vomeronasal and olfactory nerves on garter snake (*Thamnophis sirtalis*) responses to airborne chemical stimuli". *Behav Neurosci* 2003;117:169-183

ANEXO 1

OLFATOMETRÍA

			Fecha				
Apellido paterno		Apellido materno		Nombre (s)		Clave	
Calle			Nº Ext.	Nº Int.	Edificio	Unidad Habitacional	
Colonias / Barrio / Sector		Delegación / Municipio		Ciudad		Teléfono	

Tiempo de residencia en esta zona  Sexo  M  F Edad     Fecha de Nacimiento

Estado Civil : 1  Soltero (a) 4  Divorciado (a)  
 2  Casado (a) 5  Separado (a)  
 3  Viudo (a) 6  Unión Libre

Numero de años estudiados a partir de la primaria   Profesión u Ocupación

• ¿Está bajo algún tratamiento médico?  Si  No ¿Cual?

• ¿Para que padecimiento?

• ¿Desde hace cuanto tiempo?

• Médico que la atiende. Homeópata  Halópata  Empírico

• ¿Existen en su familia personas con alguna de las siguientes enfermedades?

Tumores  Si  No

Cáncer  Si  No

Enfermedades mentales  Si  No

Epilepsia  Si  No

Alzheimer  Si  No

Otras

• ¿Está tomando anticonceptivos?  Si  No

• ¿Cual?

• ¿Si es oral hace cuantos días inicio su ultima caja?

• ¿Si es inyectable hace cuantos días fue su ultima aplicación?

• ¿Esta recibiendo algún apoyo hormonal?  Si  No

• ¿Cuál?

• Edad de la primera menstruación

• Anote la fecha de inicio de su ultima menstruación

• Anote cada cuantos días la presenta

• ¿A que edad inició sus relaciones sexuales? :

• ¿A que edad fue su primer embarazo?

• Numero de : Embarazos  Abortos  Cesárea

• ¿Esta embarazada?  Si  No

• ¿Cuántas semanas de embarazo tiene?

• ¿Cuántos embarazos ha tenido?

• ¿Padece de alguna enfermedad en el útero o en los ovarios?  Si  No

• ¿Cuál?

• ¿Ha tenido alguna operación en el útero o en los ovarios?  Si  No

• ¿Cuál?



- ¿Fuma? **Si No**
- ¿Cuántos cigarros fuma diariamente?:
- ¿Dejó usted de fumar? **Si No**
- ¿Cuándo dejó de fumar?
- ¿Su sensibilidad olfatoria cambió cuando dejó de fumar? **Si No**  
 Si su respuesta es "si" como cambió:  
 Mejoró totalmente  Mejoró medianamente  Ni mejoró, ni empeoró   
 Empeoró medianamente  Empeoró totalmente
- Consume :

Marihuana **Si No**

Cocaína **Si No**

Derivados benzénicos **Si No**

• Con las siguientes preguntas queremos conocer si ha tenido algún problema EN LOS ÚLTIMOS TRES MESES. Conteste, si ud. ha padecido del problema o si usted ha notado que lo presenta. PUEDE MARCAR MAS DE UNA RESPUESTA Y UN PROMEDIO DEL NUMERO DE DÍAS. ANOTE EN EL CUADRO QUE SIGUE POR CUANTOS DÍAS LO HA PADECIDO.

- tos   silbidos y chiflidos
- congestión y flemas   dificultad para respirar
- opresión en el pecho
- ardor en los ojos
- comezón en los ojos
- ojos rojos
- irritación y ardor en la nariz   comezón en la nariz
- estornudos   le fluye moco en la nariz
- sangrado en la nariz
- irritación o ardor en la garganta   ronquera
- Pérdida de la memoria (olvidos frecuentes de objetos, nombres de personas, fechas importantes o citas recientemente programadas)
- Dificultad para realizar mentalmente operaciones matemáticas sencillas.
- Disminución o ausencia en la percepción de olores
- Disminución o ausencia en la percepción de sabores

1.-	Log - 9.5	1	2	3	4
2.-	Log - 9	1	2	3	4
3.-	Log - 8.5	1	2	3	4
4.-	Log - 8	1	2	3	4
5.-	Log - 7.5	1	2	3	4
6.-	Log - 7	1	2	3	4
7.-	Log - 6.5	1	2	3	4
8.-	Log - 6	1	2	3	4