



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOMEDICINA

**FUNCIÓN OLFATIVA EN UNA POBLACIÓN CON EXPOSICIÓN NO OCUPACIONAL A
MANGANESO ATMOSFÉRICO. POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE DETERIORO
OLFATIVO Y NEURODEGENERACIÓN.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARCO ANTONIO GUARNEROS RONIGER

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RENÉ DRUCKER COLÍN
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. GLORIA BENÍTEZ KING
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MÉXICO, D.F. ENERO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria, celebrada el día 24 de noviembre de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **MARCO ANTONIO GUARNEROS RONIGER** con número de cuenta **99128449** con la tesis **"FUNCIÓN OLFATIVA EN UNA POBLACIÓN CON EXPOSICIÓN NO OCUPACIONAL A MANGANESO ATMOSFÉRICO. POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE DETERIORO OLFATIVO Y NEURODEGENERACIÓN"**, realizada bajo la dirección del **DR. RENE DRUCKER COLÍN**:

PRESIDENTE:	DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN
VOCAL:	DRA. MAHARA VALVERDE RAMÍREZ
SECRETARIO:	DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON
SUPLENTE:	DRA. MIREYA ALCARAZ ZUBELDIA
SUPLENTE:	DRA. GLORIA BENÍTEZ KING

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de diciembre de 2014.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACYT por una beca doctoral (CVU228879) que recibí durante el periodo del 9 de agosto de 2010 hasta el 8 de agosto del 2014 para realizar estudios en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM), y a las siguientes agencias, International Brain Research Organization, Federation for European Neuroscience Schools, Society for Neuroscience, Association for Chemoreception Sciences y Polak Foundation, por el financiamiento para asistir a excelentes cursos y reuniones.

A los miembros de mi Comité Tutor, los doctores René Drucker Colín, Robyn Hudson y Gloria Benítez King por todo el apoyo académico durante el doctorado.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Mi constante agradecimiento a la UNAM y a mis maestros. Por facilitarme la libertad, confianza y recursos necesarios en mi proceso académico, agradezco a mi tutor de tesis, René Drucker; a mi maestra, Robyn Hudson, por el respaldo continuo y por la transmisión de ideas, sabiduría y cultura científica.

El trabajo presentado en este documento fue enriquecido por la colaboración de personas como la Dra. Gloria Benítez King (Instituto Nacional de Psiquiatría) cuyos expertos comentarios ayudaron a superar las dificultades que se fueron presentando en el camino; la Dra. Mireya Alcaraz Zubeldía (Instituto Nacional de Neurología) quien introdujo métodos interesantes y contribuyó importantemente en los aspectos teóricos; hay varios doctores a quienes agradezco su atención y colaboración: Irma Rosas (Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM), Gabriel Roldán (Facultad de Medicina, UNAM), Arturo Hernández Cruz (Instituto de Fisiología Celular, UNAM), Mahara Valverde, Gabriel Gutiérrez Ospina (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), Thomas Hummel (Universidad de Dresden), Matthias Laska (Universidad de Linköping), Han Seok-Seo (Universidad de Arkansas), Tali Weiss (Weizmann IS), Kathy-Ann Koralek (IBRO), Marina Leal, Luisa T Molina (MCE2), y Hans Distel (Universidad de Munich). A todos ellos gracias por su influencia positiva en distintos proyectos. Gracias a Ana María Sánchez Mora (Universum) y a todos mis excelentes maestros en asignaturas, seminarios y diplomados.

Al equipo del Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga, Dra. Elvira Galarraga Palacio, Dra. Lilia Espinoza Sánchez, Dr. Ernesto Armando Rodríguez Reyes, Patricia Oliva Estrella, Érica Flores Téllez, Lilia Jiménez Solís, Gabriela Valdés, María del Jesús Márquez Salazar y Sara Méndez Ibáñez, por su trabajo y atenciones.

El sentimiento de gratitud también va para las personas del laboratorio, y comienzo por Tere Torres, por su consideración, eficiencia, amabilidad y diplomacia. También, muchas gracias a la abuelita del lab, Mari; a Magda, Diana y a mis compañeros. Por excelente asistencia técnica, a Marcela Palomero Rivero (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y a Carolina Rojas Castañeda (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). A Ana María Escalante de la Unidad de Cómputo de Fisiología Celular, a Sonia Olguín del Departamento de Prensa de Biomédicas, y a los medios de comunicación que difundieron nuestro trabajo. A los estudiantes que concluyeron su servicio social en investigación sobre olfato. En el desarrollo de este trabajo, dos estudiantes fueron fundamentales: Nahum Ortiz-Romo (quasi-oriundo de la población control) y Martha López-Palacios (ambos de la Facultad de Psicología de la UNAM), por su trabajo, compañerismo y destreza para trabajar en equipo. Gracias a mis amigos. Gracias a mi familia por todo. Mi mamá, mi papá, mis tías y tíos, mi hermana y primos. Y en esta última línea, dedico la tesis a mis abuelos .

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
<i>Generalidades del olfato humano</i>	11
<i>Fisiología del olfato</i>	16
ANTECEDENTES	25
<i>La contaminación del aire afecta la percepción de olores</i>	25
<u><i>Efectos sobre funciones olfatorias</i></u>	25
<u><i>Efectos sobre la función trigeminal</i></u>	30
<u><i>Mecanismos de daño intranasal y de defensa</i></u>	32
<i>El manganeso: un contaminante atmosférico con propiedades neurotóxicas</i>	34
<u><i>Fuentes de exposición y límites permisibles</i></u>	35
<u><i>Transporte de Mn</i></u>	36
<u><i>Genes implicados en el metabolismo de Mn</i></u>	37
<u><i>Acumulación de Mn en el organismo</i></u>	37
<u><i>Efectos celulares del Mn</i></u>	38
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
HIPÓTESIS	42
OBJETIVOS	42
DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	43

MATERIALES Y MÉTODOS	44
<i>Caracterización de la prueba</i>	44
<i>Sitio de estudio</i>	44
<i>Sujetos</i>	45
<i>Procedimientos de las pruebas</i>	47
<i>Determinación del contenido de manganeso en cabello</i>	51
<i>Tratamiento y análisis de los datos</i>	53
RESULTADOS	54
DISCUSIÓN	60
<i>Caracterización de la prueba</i>	60
<i>Efectos del manganeso</i>	60
<i>Asociación entre exposición tóxica, deterioro olfativo y neurodegeneración</i>	63
CONCLUSIÓN	66
REFERENCIAS	67
ANEXOS	96
<i>Anexo 1. Nonoccupational environmental exposure to manganese is linked to deficits in peripheral and central olfactory function.</i>	
<i>Anexo 2. Reference values of olfactory function for Mexico City inhabitants.</i>	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Evaluación del sentido del olfato (p.15).
- Figura 2. Anatomía del olfato (p.16).
- Figura 3. Esquema del sistema olfatorio humano (p.17).
- Figura 4. Composición del epitelio olfatorio (p.18).
- Figura 5. Transducción de la señal olfatoria (p.20).
- Figura 6. Estructuras cerebrales implicadas en olfato (p.22).
- Figura 7. Actividad del cerebro durante tareas olfatorias (p.24).
- Figura 8. Calidad del aire (p.26).
- Figura 9. Contaminación del aire en México (p.27).
- Figura 10. Olfato de sujetos expuestos a contaminación del aire (p.28).
- Figura 11. Efectos de la contaminación sobre una función olfatoria cotidiana (p.29).
- Figura 12. Sensibilidad trigeminal en residentes de la Ciudad de México (p.31).
- Figura 13. Sitios de estudio (p.45).
- Figura 14. Resultados de función olfatoria (p.56).
- Figura 15. Correlación entre edad y función olfatoria (p.58).
- Figura 16. Concentraciones de manganeso en cabello (p.59).

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Disfunción olfatoria en neurodegeneración (p.13).
- Tabla 2. Características generales de la muestra de estudio (p.46).
- Tabla 3. Prueba de discriminación de olores (p.50).
- Tabla 4. Prueba de identificación de olores (p.51).

Resumen

El sentido del olfato es crucial en un amplio rango de actividades cotidianas y procesos fisiológicos. La pérdida severa o total de este sentido es un síntoma de diferentes enfermedades neuroendócrinas, neurológicas y desórdenes asociados al envejecimiento, y las pruebas olfativas han demostrado ser útiles en el diagnóstico de algunas de estas patologías. Las moléculas odorantes se unen a los receptores olfatorios localizados en la superficie sensorial intranasal o epitelio olfatorio, el cual está continuamente expuesto al ataque de las partículas tóxicas presentes en el aire inhalado. Los impulsos olfatorios viajan del epitelio olfatorio a los bulbos olfatorios dentro del cerebro, y de ahí son transmitidos a diferentes áreas cerebrales asociadas con el procesamiento de la memoria, la respuesta emocional y la percepción consciente del olor. Algunos contaminantes aéreos son capaces de eludir la barrera hematoencefálica y alcanzar el cerebro transportándose por rutas olfatorias. Tal es el caso del manganeso (Mn), que como contaminante atmosférico ha generado preocupación en aumento. De manera similar a otros metales, como el plomo y el mercurio, el Mn inhalado, al alcanzar el epitelio olfatorio al fondo de la cavidad nasal, se desplaza trans-sinápticamente a los bulbos olfatorios, en donde ejerce sus efectos tóxicos. Más aún, dado que el Mn tiene una alta capacidad de transporte interneuronal, llega a depositarse en zonas más centrales como los ganglios basales y la corteza prefrontal. Si bien se han descrito efectos neurológicos y conductuales del Mn en distintos contextos ocupacionales, no existen reportes disponibles acerca del efecto de la exposición atmosférica no ocupacional a Mn sobre la percepción de olores. Utilizando la batería de pruebas olfativas *Sniffin' Sticks*, se comparó el desempeño olfatorio de habitantes de un distrito minero, a <1 km de una planta de procesamiento de Mn, con sujetos no expuestos que vivían 50 km río arriba de la fuente de exposición más cercana (N=30/grupo). Los grupos fueron pareados por edad, sexo, y escolaridad, y ninguno había trabajado en actividades mineras en el pasado. Se midieron las concentraciones de Mn en cabello como biomarcador de exposición; los sujetos expuestos tuvieron concentraciones significativamente más altas que los sujetos no expuestos. Además, los sujetos no expuestos tuvieron puntajes más altos en todas las medidas olfatorias (umbral, discriminación, e identificación), lo que indica efectos adversos de la exposición a Mn en un rango de funciones olfatorias, incluyendo aquellas que requieren de una mayor mediación cognitiva.

Esto contrasta con hallazgos de estudios anteriores que indican un efecto adverso de la exposición a la contaminación de la Ciudad de México sobre el umbral pero no sobre la identificación, y sugiere que la mezcla de contaminantes atmosféricos de la ciudad consiste de sustancias tóxicas con evidentes efectos sobre la periferia del sistema, pero con una fluidez trans-sináptica menor que la del Mn. Se comprobó la utilidad de las pruebas olfatorias para evaluar, de manera no invasiva, funciones neurales en una población con exposición tóxica. La conclusión de este estudio es que la exposición no ocupacional a Mn aéreo está asociada a decrementos de la función olfatoria periférica y central.

Palabras clave: olfato humano, edad, función cognitiva, exposición a manganeso.

Los artículos derivados de este trabajo se presentan en los ANEXOS 1 y 2.

Abstract

The sense of smell is crucial in a wide range of everyday tasks and physiological processes. Severe or total loss of this sense is a symptom of different neuroendocrine, neurological, and age-related disorders, and olfactory testing has proven useful in the differential diagnosis of some of these pathologies. Odorant molecules bind to olfactory receptors located in the intranasal sensory surface or olfactory epithelium, which is continually exposed to insult from the toxic particles present in the inhaled air. Olfactory information travels from the olfactory epithelium to the olfactory bulbs in the brain, where it is subsequently relayed to different brain areas involved in memory, emotion and conscious perception. Some airborne contaminants are able to bypass the blood brain barrier and reach the brain via olfactory pathways. Such is the case of manganese, a toxic air pollutant of growing concern, as it is readily transported from the olfactory epithelium to the olfactory bulb, and unlike other metals, it is further transported transynaptically to structures deep within the brain. However, little is known regarding the possible effect of nonoccupational exposure to manganese on olfactory function. Using the *Sniffin' Sticks* test battery, we compared the olfactory performance of subjects from a manganese mining district living <1 km from a manganese processing plant, with nonexposed subjects living 50 km from the closest source of exposure (N = 30/group). Groups were matched for age, sex, and schooling, and none had ever worked in mining-related activities. Concentrations of manganese in hair were measured as a biomarker of exposure; exposed subjects had significantly higher concentrations than nonexposed subjects. They were also significantly outperformed by the nonexposed subjects on all olfactory measures (threshold, discrimination, and identification), indicating adverse effects of manganese exposure on a range of olfactory functions, including those involving higher order cognitive processes. This contrasts with previous findings showing adverse peripheral but not central effects on olfactory function of big city air pollution, which mostly consists of toxicants known to affect the olfactory epithelium but with lower transynaptic transport capacity compared with manganese. The usefulness of olfactory testing for broadly evaluating neural responses in an exposed population was demonstrated. We conclude that nonoccupational exposure to airborne manganese is associated with decrements in both peripheral and central olfactory function (for a complete report in English see p.96).

INTRODUCCIÓN

Generalidades del olfato humano

En la vida cotidiana resulta natural interpretar las sensaciones como propiedades de los objetos. Así, es común que el término *olor* se utilice para denominar tanto a las sustancias volátiles que emanan de la fuente como a la sensación que evocan. En investigación científica es importante hacer una distinción; los *odorantes* son moléculas, propiedades del mundo externo, objetivamente definibles en términos de sus características físico-químicas y capaces de ser transducidos a olores por sistemas nerviosos particulares. *Olores*, por otro lado, son constructos del sistema nervioso moldeados por las muchas influencias moduladoras de la mente (Hudson 1999, 2000).

La percepción de olores contribuye al funcionamiento normal de un amplio rango de procesos fisiológicos. En una revisión reciente se clasificaron las funciones olfatorias en tres categorías principales: 1) funciones relacionadas con la conducta ingestiva, 2) evasión de peligros ambientales, y 3) comunicación social (Stevenson 2010). Por ejemplo, el sentido del olfato humano en estado saludable es capaz de discriminar entre alimentos comestibles y aquellos en descomposición (Fallon y Rozin 1983); también, puede modular el apetito, las conductas de ingestión de alimentos, y el estado nutricional (Duffy et al. 1995; Aschenbrenner et al. 2008; Seo y Hummel 2009); advierte de posibles fuentes de amenazas microbianas (p. ej. heces, vómito, o material orgánico en descomposición) evocando disgusto, y de amenazas no microbianas (p. ej. fugas de gas, fuego, y materiales tóxicos) evocando miedo (Stevenson et al. 2010). También se ha descrito la función de este sentido químico en la selección de pareja (Jacob et al. 2002; Pause 2004) y en la comunicación entre madres e hijos durante la lactancia (Simpson et al. 2003; Zelano y Sobel 2005).

La pérdida del olfato altera negativamente la calidad de vida de las personas, pues afecta la percepción de sabores, y es causa de deficiencias de higiene y uso excesivo de perfumes, desencadena sentimientos de inseguridad social, disminución de la satisfacción sexual y depresión, e incrementa el riesgo de accidentes en el hogar (Miwa et al. 2001; Temmel et al. 2002; Santos et al. 2004; Doty 2005; Croy et al. 2012).

La utilidad de la evaluación del sentido del olfato en el diagnóstico de un amplio rango de patologías ha sido reconocida e investigada en años recientes, y particularmente en enfermedades neuroendócrinas, neurológicas, y enfermedades asociadas al envejecimiento (Hudson et al. 1994; Fernández-Ruiz et al. 2003; Velázquez-Pérez et al. 2006; Hummel et al. 2010a). De hecho, la pérdida de la función olfatoria es un síntoma de diferentes desórdenes que comúnmente afectan a personas de la tercera edad, y el interés en la disfunción olfatoria ha sido fuertemente estimulado por el hallazgo de que la anosmia (ausencia de función olfatoria) es un síntoma común de la enfermedad de Parkinson (Ansari y Johnson 1975; Doty et al. 1988; Ross et al. 2005; Haehner et al. 2009) que aparece años antes que los síntomas motores que caracterizan a la enfermedad (Haehner et al. 2007). Las pruebas olfatorias son útiles en la práctica clínica; por ejemplo, un desempeño normal en una prueba de identificación de olores en un paciente diagnosticado con enfermedad de Parkinson es excepcional, por lo que tal hallazgo debería provocar una revisión del diagnóstico. Así que las pruebas olfativas pueden ser útiles en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, al ayudar a distinguirla de otros trastornos neurodegenerativos que no cursan con anosmia (Tabla 1) (Doty et al. 1993; Wenning et al. 1995; Daum et al. 2000; Hughes et al. 2001; Hawkes 2006).

Tabla 1. Grado relativo de disfunción olfatoria en enfermedades neurodegenerativas (escala arbitraria). Adaptado de Hawkes et al. 2006.

Enfermedad	Severidad relativa de la pérdida del olfato
Enfermedad de Parkinson (idiopática)	+++
Enfermedad de Alzheimer	+++
Ataxia espinocerebelosa tipo II	+++
Demencia de cuerpos de Lewy	+++
Síndrome de Guam	+++
Atrofia de sistemas múltiples	++
Enfermedad de Huntington	++
Parkinsonismo inducido por drogas	++
Esclerosis lateral amiotrófica	+
Ataxia de Friedreich	+
Parálisis supranuclear progresiva	+
Temblor esencial	0
Degeneración corticobasal	0

El sistema olfatorio también ofrece información importante en otras enfermedades neurológicas. Recientemente se han desarrollado métodos para aislar el linaje neuronal del epitelio olfatorio de humanos. Esta técnica ha permitido estudiar las características histopatológicas asociadas al trastorno bipolar y a la esquizofrenia (Benítez-King et al. 2011).

El olfato como herramienta en la práctica clínica ha demostrado ser útil en la detección de cáncer. La detección canina de cáncer se basa en la habilidad olfatoria de los perros para detectar concentraciones muy bajas de los alcanos y compuestos aromáticos generados por los tumores. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1989, pero sólo recientemente se ha estimulado el interés por ella, después de que varios estudios encontraran que es altamente confiable en la detección de cáncer de pulmón (Williams y Pembroke 1989; Church y Williams 2001; Willis et al. 2004; McCulloch et al. 2006).

Una manera no invasiva de evaluar procesos neurales en pacientes individuales, poblaciones expuestas y grupos vulnerables es mediante el uso de pruebas olfativas (Hummel et al. 1997; Bowler et al. 2007; Zoni et al. 2007; Sorokowska et al. 2013). Un ejemplo bien establecido y ampliamente utilizado en la investigación y en la práctica clínica es la batería de pruebas *Sniffin' Sticks*, en la cual se presenta al paciente una serie de odorantes en contenedores tipo plumones con punta de fieltro como se muestra en la Figura 1, siguiendo un protocolo estándar (Hummel et al. 1997, 2007; Kobal et al. 2000). Los *Sniffin' Sticks* permiten evaluar la habilidad de los pacientes para detectar un odorante (umbral), para distinguir entre odorantes (discriminación), y para nombrarlos en un procedimiento de opción múltiple (identificación). Una ventaja de combinar estas diferentes medidas de función olfatoria es ayudar a señalar en cuáles de las rutas neurales asociadas a la percepción quimiosensorial existe daño (Hudson et al. 2006; Guarneros et al. 2009). Otra conveniencia es que el usar más de una medida de desempeño olfatorio incrementa la probabilidad de detectar una disfunción en el paciente (Dalton et al. 2006, Lötsch et al. 2008; Guarneros et al. 2011).

El desempeño de una persona en una prueba de olfato depende particularmente de la cultura y de las condiciones ambientales locales. Odorantes familiares en una cultura pueden ser desconocidos y difícilmente identificables por sujetos de una cultura diferente (Ayabe-Kanamura et al. 1998; Distel et al. 1999; Hudson 1999; Wilson & Stevenson 2003). Factores ambientales como la altitud, la temperatura y la humedad (Kuehn et al. 2008; Riveron et al. 2009), y la contaminación del aire (Hudson et al. 2006; Guarneros et al. 2009) también pueden afectar el desempeño olfatorio de las poblaciones. Estos factores hacen necesario determinar valores de referencia regionales con los cuales comparar los resultados de una evaluación clínica.

Acorde con esto, varios grupos de investigación alrededor del mundo han establecido valores de referencia locales de respuesta olfatoria que toman tales factores en cuenta (Mackay-Sim et al. 2004; Katotomichelakis et al. 2006; Schu & Yuan 2008; Silveira-Moriyama et al. 2009; Hudson et al. 2012; Neumann et al. 2012; Orhan et al. 2012).

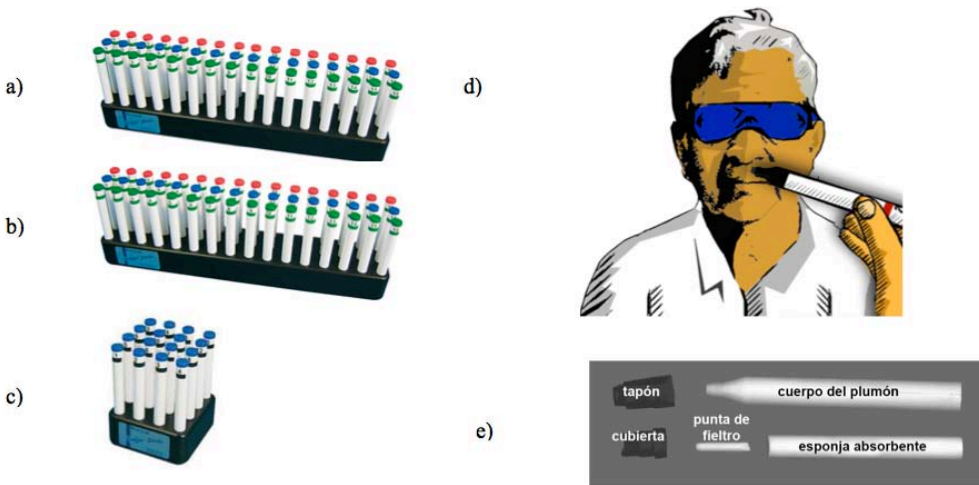


Figura 1. La batería de pruebas de función olfatoria *Sniffin' Sticks* evalúa el umbral de detección (a), la discriminación de olores (b), y la identificación de olores (c). En estas pruebas, al paciente se le presentan soluciones de odorantes en contenedores tipo plumones (d) cuyos componentes se ilustran también (e).

Fisiología del olfato

Como en otros mamíferos, el olfato en humanos comienza con la adquisición del estímulo u olfateo. Las moléculas odorantes alcanzan los receptores olfatorios en las dendritas del epitelio olfatorio al fondo de la cavidad nasal. La información es transmitida por medio del nervio olfatorio, a través de la placa cribiforme, hacia el bulbo olfatorio en el cerebro. Los impulsos enviados desde el bulbo olfatorio se transmiten por medio del tracto lateral olfatorio hacia la corteza (Figura 2), particularmente las cortezas olfatorias primaria y secundaria, que consisten principalmente de la corteza piriforme y de la corteza orbitofrontal, respectivamente (Price 1990), (Figura 3).

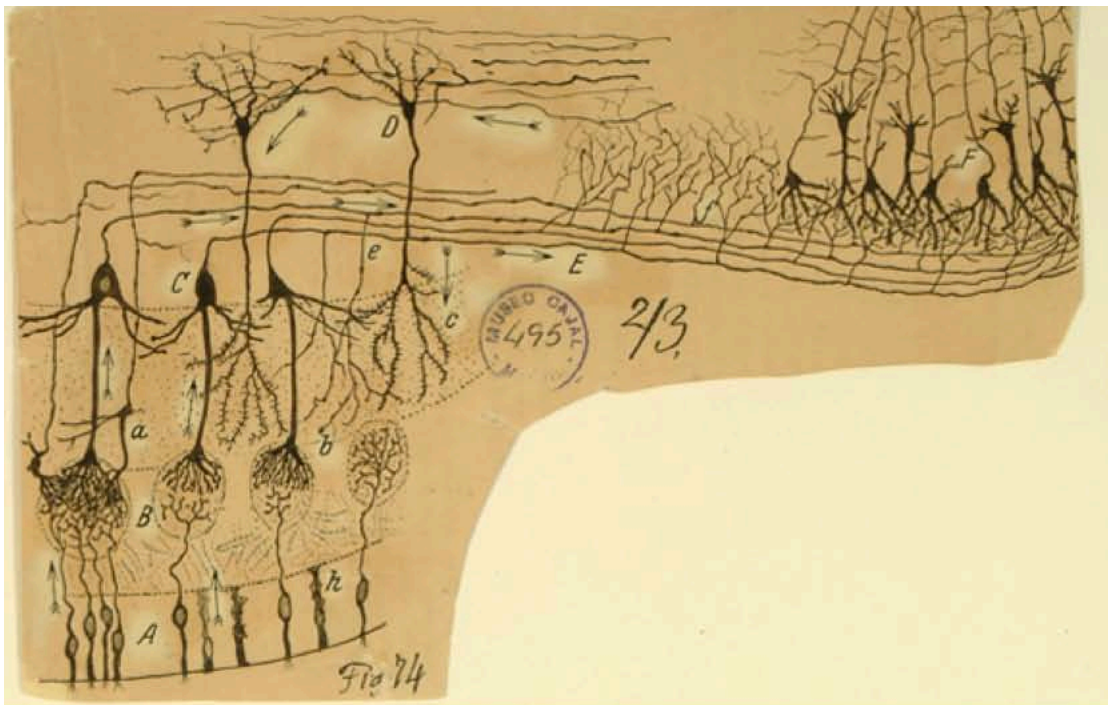


Figura 2. Anatomía del sistema olfatorio. En este dibujo, Santiago Ramón y Cajal plasmó la circuitería olfatoria y la trayectoria de los impulsos nerviosos (flechas). (A) Células bipolares del epitelio olfatorio. (B) Glomérulos olfatorios. (C) Células mitrales. (D) Células granulares. (E) Tracto lateral olfatorio. (F) Corteza olfatoria. (a) Célula en penacho, (b) dendrita de una célula mitral, (c) rama terminal de una célula granular, (e) colaterales recurrentes de una célula mitral, (h) células de soporte (Ramón y Cajal 1894). Tomado de Figueres-Oñate et al. 2014.

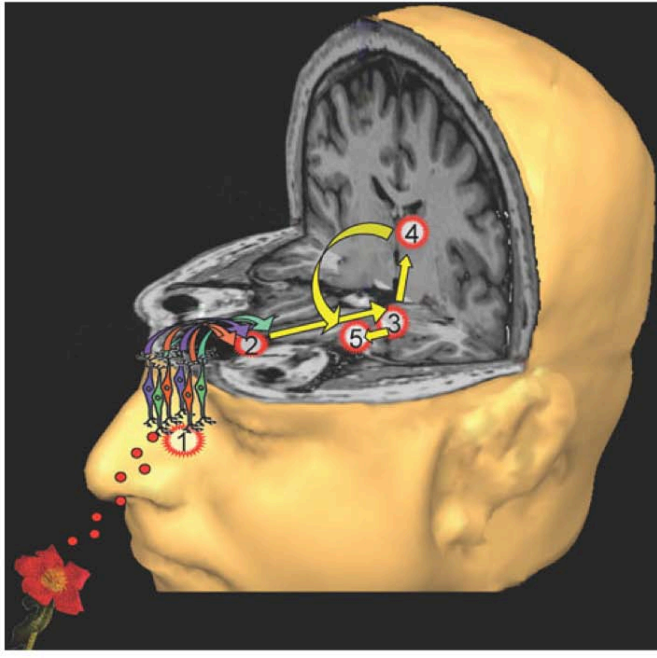


Figura 3. Esquema de la dirección de los impulsos olfatorios en el cerebro humanos. (1) Los odorantes son transducidos en el epitelio olfatorio. (2) Diferentes axones convergen a lo largo del nervio olfatorio en glomérulos comunes en el bulbo olfatorio. (3) Desde el bulbo olfatorio la información viaja a través del tracto lateral olfatorio hacia la corteza olfatoria. (4) Los impulsos se transmiten a otras áreas corticales. (5) La corteza orbitofrontal es importante en el procesamiento consciente de los olores. Tomado de Sela y Sobel 2010.

Esta organización es bilateral y simétrica, y aunque la conectividad estructural parece mayormente ipsilateral (esto es, del epitelio derecho al bulbo derecho y a la corteza derecha), los estudios funcionales en humanos sugieren que la conectividad a nivel de la corteza también incluye rutas contralaterales (Savic y Gulyas 2000; Porter et al. 2005).

Los odorantes presentes en el aire inhalado entran a la cavidad nasal, y algunos alcanzan el epitelio olfatorio localizado principalmente sobre la superficie externa de la placa cribiforme, pero también sobre la superficie de la turbina superior, la turbina media, y la porción superior del septum (Feron et al. 1998; Leopold et al. 2000; Escada et al. 2009).

El epitelio olfatorio está formado por varios tipos de células: neuronas sensoriales olfatorias, células de soporte y las células de las glándulas de Bowman, encargadas de secretar moco (Lapid y Hummel 2013). Además, están las células basales, a partir de las cuales se generan nuevas neuronas receptoras olfatorias a lo largo de la vida (Figura 4). Se han identificado cuatro linajes principales de células basales que dan lugar a las neuronas receptoras olfatorias cada uno nombrado según un gen característico que expresa: *Sox2*, *Mash1*, *Ngn1* y *Ncam* (Calof et al. 2002, Gokoffski et al. 2010).

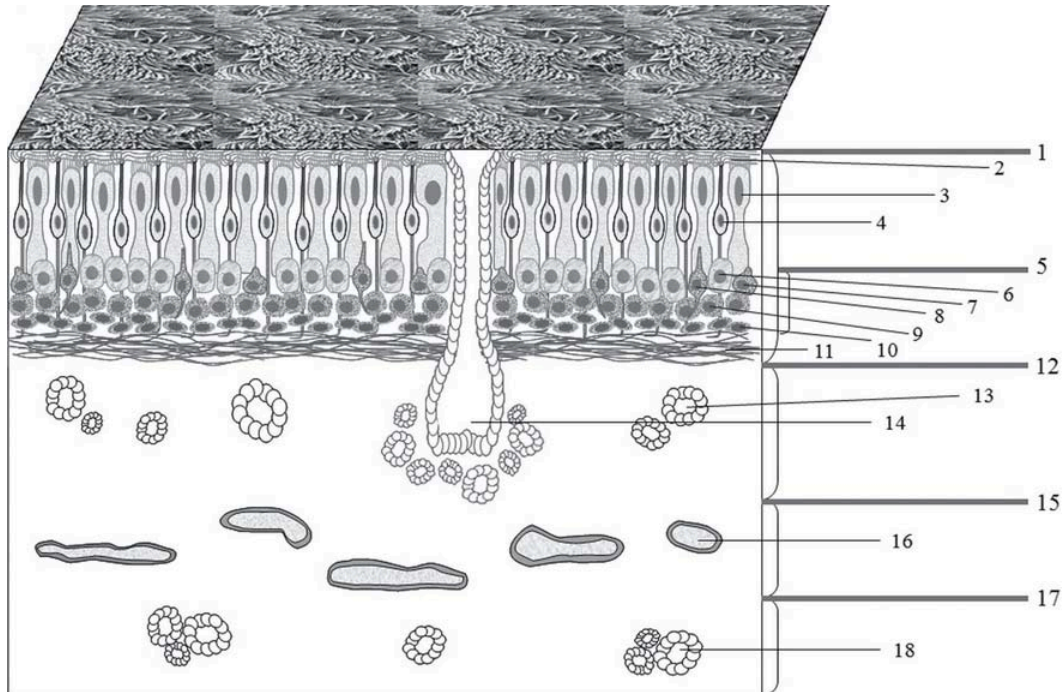


Figura 4. Representación esquemática del epitelio olfatorio. 1. Epitelio olfatorio – capa apical, 2. Cilios olfatorios (prolongaciones dendríticas), 3. Célula del epitelio respiratorio (célula de soporte), 4. Neurona sensorial olfatoria madura, 5. Lámina basal – capa de células progenitoras, 6. Precursor inmediato de las células de soporte, 7. Precursor inmediato neural, 8. Neurona sensorial olfatoria inmadura, 9. Célula basal globosa proliferando, 10. Célula basal horizontal proliferando, 11. Nervio olfatorio, 12. Capa superficial glandular de la lámina propia, 13. Glándula de Bowman, 14. Ducto de la glándula de Bowman, 15. Capa vascular de la lámina basal, 16. Vaso sanguíneo, 17. Capa glandular de la lámina propia. Tomado de Lapid y Hummel 2013.

El proceso por el cual una célula convierte un tipo de estímulo o señal en otro se denomina transducción. La transducción olfatoria es una serie de eventos en los cuales las moléculas odorantes son detectadas por receptores olfatorios, iniciando un proceso de señalización que da lugar a la experiencia de oler (Hudson 1999; Ma 2007).

La mayoría de las neuronas sensoriales olfatorias expresan receptores acoplados a proteínas G y emplean la cascada canónica de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) para transformar la energía química en señales eléctricas. Como se muestra en la Figura 5, la unión del odorante con el receptor activa una proteína G_{olf} (olfatoria) cuya estructura es similar a la de otras proteínas G, ya que consiste de tres subunidades (alfa, beta y gama) que se localizan en la superficie citoplásmica de la membrana ciliar. La proteína G_{olf} transforma guanósín difosfato (GDP) en guanósín trifosfato (GTP), y se disocia en sus tres subunidades. La subunidad alfa subsecuentemente activa a la adenilato ciclasa III (ACIII), que es una proteína con 12 dominios transmembranales. La región catalítica de la ACIII convierte ATP en cAMP, una molécula que tiene una función fundamental en el olfato como un segundo mensajero, y media la transducción de señales de los odorantes. La cAMP es una molécula pequeña y soluble en agua que activa los canales iónicos que despolarizan a la célula (Pifferi et al. 2010).

Cuando la neurona sensorial olfatoria es despolarizada, se libera el neurotransmisor glutamato en la terminal sináptica: tanto receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) como receptores no-NMDA son subsecuentemente activados por el glutamato en las dendritas de las neuronas de segundo orden (Rawson y Yee 2006).

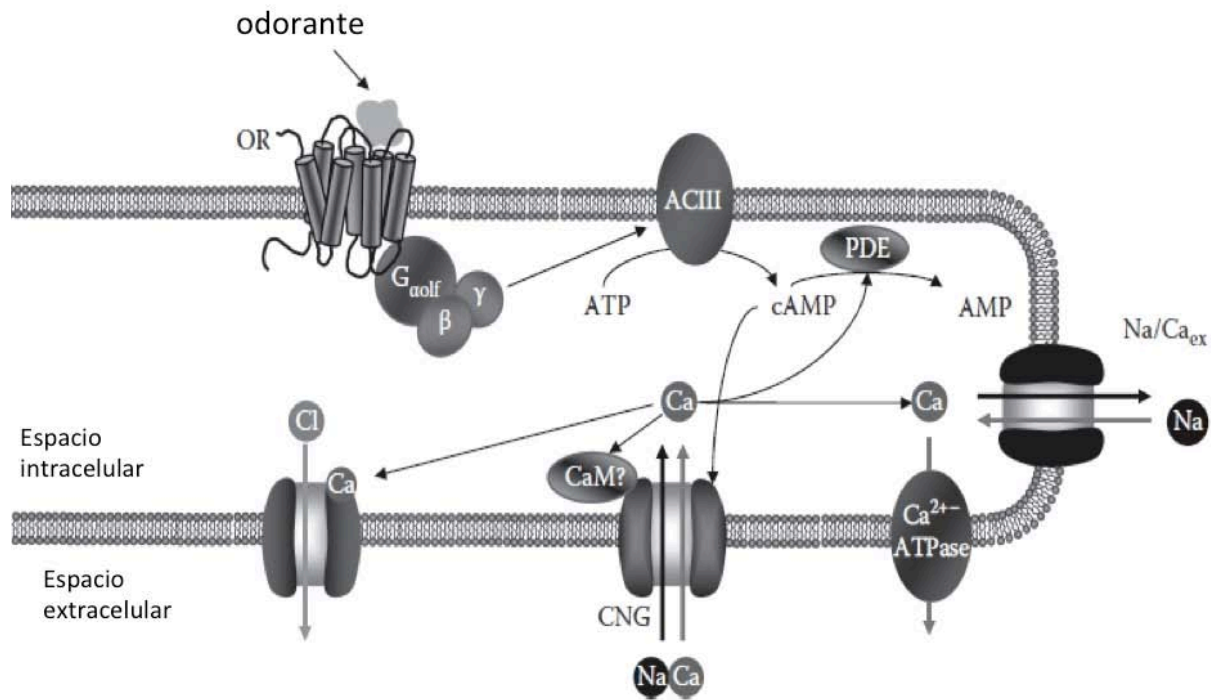


Figura 5. Mecanismos moleculares de la transducción olfatoria. La unión de las moléculas odorantes a un receptor (OR) provoca que una proteína G active a la adenilato ciclasa III (ACIII), que genera adenosín monofosfato cíclico (cAMP) a partir de adenosín trifosfato (ATP). La cAMP abre canales iónicos (CNG) que permiten la entrada de Na^+ y Ca^{2+} lo que despolariza a la neurona y produce la salida de iones Cl^- . El calcio unido a calmodulina (CaM) y a otras proteínas regula la sensibilidad de los canales iónicos a cAMP, y activa a la fosfodiesterasa (PDE) que hidroliza el cAMP a adenosín monofosfato (AMP). Las concentraciones intradendríticas de Ca^{2+} regresan a los niveles basales a través de la actividad de un intercambiador de Na^+ y Ca^{2+} y de la ATPasa de Ca^{2+} . Tomado de Pifferi et al. 2010.

Los patrones de activación de receptores olfatorios conforman señales que se envían del epitelio olfatorio al bulbo olfatorio. El bulbo olfatorio es una estructura de forma ovoide, localizada en la fosa craneal anterior, sobre la placa cribiforme del hueso etmoides, y por debajo del lóbulo frontal. En humanos saludables, el bulbo olfatorio tiene un volumen promedio de alrededor de 70 mm^3 (Buschhuter et al. 2008).

El bulbo olfatorio tiene distintos tipos de células. Por un lado, están las células mitrales y las células en penacho, que transmiten los impulsos hacia la corteza olfatoria primaria por medio del tracto lateral olfatorio. Otro tipo de células en el bulbo olfatorio son las que incrementan el contraste e inhiben las señales ruidosas que no representan información relevante para el individuo. Estas son las células periglomerulares y las células granulares, que inhiben o exacerbaban los impulsos provenientes de las neuronas sensoriales olfatorias. Los procesos que ocurren en el bulbo olfatorio son la base de la discriminación de olores, y permiten modular la transmisión de los impulsos olfatorios, así como la sensibilidad y la atención a olores (Rawson y Yee 2006).

Del bulbo olfatorio, la información es proyectada por medio del tracto olfatorio hacia la corteza olfatoria primaria. De acuerdo a la definición actual, la corteza olfatoria primaria consiste de las regiones cerebrales que reciben información directa de los axones de las células mitrales y en penacho del bulbo olfatorio. Estas zonas son el núcleo anterior olfatorio, la tectia tectal, el hipocampo, el tubérculo olfatorio, la corteza piriforme, el núcleo cortical anterior de la amígdala, la corteza periamigdalóide, y la corteza entorrinal (Carmichael et al. 1994).

Desde la corteza olfatoria primaria, la información es distribuida ampliamente en el cerebro, y más notablemente en la corteza orbitofrontal (OFC). Las proyecciones de la corteza piriforme pueden alcanzar la OFC ya sea directamente o indirectamente a través del núcleo mediodorsal del tálamo. La significancia funcional de esta ruta talámica permanece incierta, sin embargo, una hipótesis es que el tálamo permite mediar la atención a olores (Plailly et al. 2008). La OFC participa en una amplia variedad de funciones de alto orden relacionadas con integración multisensorial, procesamiento de recompensas, y aprendizaje asociativo (Gottfried et al. 2006). Una sugerencia reciente es que esta corteza tiene una función fundamental en la percepción consciente de los olores (Figura 6) (Li et al. 2010).

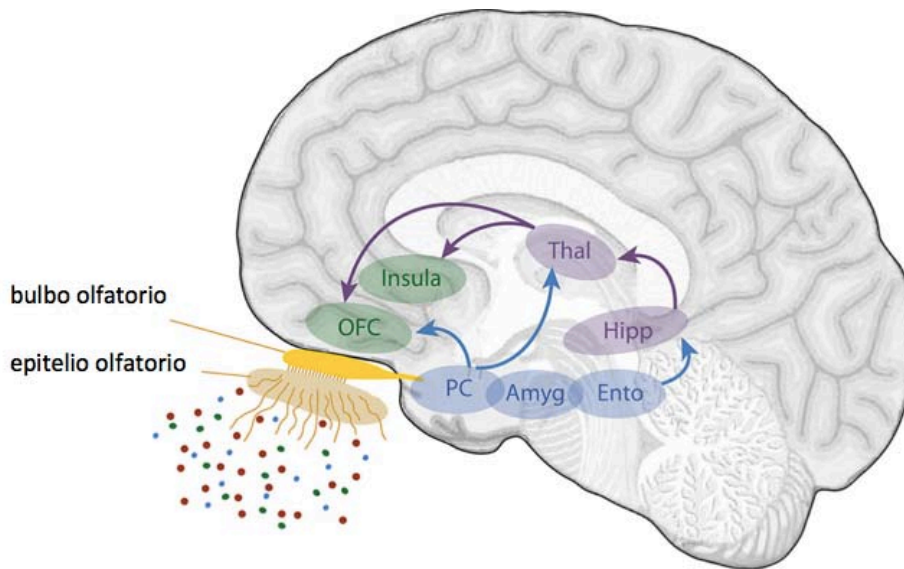


Figura 6. Vista esquemática las estructuras cerebrales implicadas en el olfato humano. Las cortezas olfatorias primaria y secundaria están representadas en azul y verde respectivamente. Amyg: amígdala, Ento: corteza entorrinal, PC: corteza piriforme, OFC: corteza orbitofrontal, Thal: tálamo. Tomado de Saive et al. 2014.

Aunque la mayoría de los estudios sobre la anatomía y la fisiología del olfato han sido llevados a cabo en animales, mediante algunas técnicas modernas los investigadores han podido medir respuestas neurales en sujetos humanos *in vivo*. A nivel periférico, la accesibilidad de las neuronas sensoriales olfatorias permite a los investigadores colocar un electrodo sobre el epitelio olfatorio y medir la actividad eléctrica combinada de miles de neuronas sensoriales olfatorias en respuesta a la presentación de estímulos odorantes por medio de la técnica conocida como electro-olfatograma (EOG) (Hummel et al. 2006; Lapid y Hummel 2013).

El EOG consiste en el registro de la actividad eléctrica del epitelio olfatorio mediante la aplicación de electrodos intranasales. El epitelio olfatorio responde a la estimulación emitiendo una variación de potencial. Las señales captadas por el EOG son generadas por la suma de las corrientes receptoras producidas por numerosas neuronas sensoriales olfatorias (Lapid y Hummel 2013). Esta técnica proporciona información general sobre la sensibilidad del epitelio a los odorantes y su adaptación

al estímulo. Aunque tiene poca resolución espacial, el EOG ha servido para mostrar la existencia de una distribución no homogénea de la quimiosensibilidad en todo el epitelio. También ha permitido demostrar que distintos receptores olfatorios pueden tener distintos umbrales de respuesta a un mismo odorante. El método consiste en insertar por la fosa nasal un electrodo tubular flexible (hilo de plata, y catéter lleno de solución conductora) que se guía hasta la región olfatoria. Cuando un odorante activa el receptor olfatorio, se genera un potencial negativo seguido de un potencial de recuperación, y esto se puede medir usando electrodos colocados en la superficie del epitelio olfatorio. La aplicación clínica del EOG ha sido escasa, en parte debido a que son muchos los pacientes que no toleran los electrodos intranasales sin anestesia tópica (Martínez-Capoccioni y Alobid 2012). Una versión no invasiva del electro-olfatograma es la que utiliza electrodos externos en lugar de electrodos intranasales. Esta técnica permite obtener información fiable, aunque los potenciales registrados están marcadamente atenuados en comparación con las mediciones intranasales (Wang et al. 1994).

La técnica de potenciales evocados olfatorios es otro método para conocer procesos centrales relacionados con el olfato, y consiste en el registro de la actividad eléctrica del bulbo olfatorio y de la corteza frontal mediante electrodos externos (potenciales evocados) (Tateyama et al. 1998; Lapid y Hummel 2013).

Los potenciales evocados olfatorios surgen de las estructuras corticales y son considerados el campo final de medición de los potenciales olfatorios; se pueden medir de forma fiable a partir de la superficie del cuero cabelludo. Algunos odorantes, incluso a baja concentración pueden inducir potenciales en el trigémino que se confunden con los potenciales evocados olfatorios. Por esta razón, se recomienda utilizar odorantes que involucren mínimamente al trigémino, como el fenil-etanol y el sulfuro de hidrógeno (Hummel y Kobal 1992 Martínez-Capiccioni y Alobid 2012).

A nivel central, los avances metodológicos en las técnicas de neuroimagen funcional, tales como la tomografía de emisión de positrones (PET) y la resonancia magnética funcional (fMRI; Figura 7) permiten visualizar la actividad del cerebro humano en respuesta a la estimulación por odorantes y durante tareas olfatorias. Por ejemplo, en un estudio de resonancia magnética en pacientes con enfermedad de Parkinson (Hummel et al. 2010a), los pacientes enfermos y controles recibieron un estímulo con olor de rosas (fenil-etanol) y uno con olor de huevo podrido (sulfuro de hidrógeno) por medio de un dispositivo (olfatómetro) que permitía entregar un estímulo olfatorio al paciente de manera controlada. Para cada estímulo, los sujetos recibieron 10 pulsos de estimulación, con duración de 1 s cada uno. Se observó que la activación de la amígdala y del hipocampo en los enfermos está reducida en comparación con sujetos controles. Los componentes del circuito corticoestriatal parece estar sobreactivados, lo que indica la presencia de procesos compensatorios que involucran al sistema dopaminérgico. Dado que no se han encontrado diferencias epiteliales entre pacientes de esta enfermedad y sujetos controles, se cree que los cambios centrales son la base de la pérdida olfatoria observada en pacientes con enfermedad de Parkinson (Hummel 2010a, 2010b).

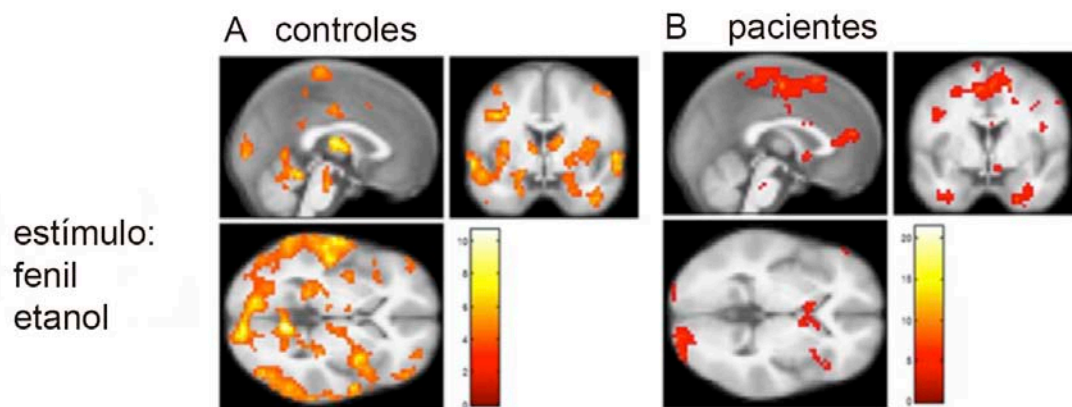


Figura 7. Patrón de activación en resonancia magnética funcional durante la exposición a un estímulo agradable (olor a rosas) en pacientes de Parkinson y sujetos controles. Los pacientes presentan patrones de activación anormales, e hipoactivación en estructuras implicadas en el procesamiento emocional de los olores. (Adaptado de Hummel et al. 2010a).

ANTECEDENTES

La contaminación del aire afecta la percepción de olores

A pesar de numerosos reportes en la literatura sobre los efectos de la exposición crónica a sustancias potencialmente dañinas en diferentes ambientes de trabajo (e.g., Cometto-Muñiz y Cain 1991; Berglund et al. 1992; Smeets y Dalton 2002; Smeets et al. 2002; Hastings y Miller 2003; Vent et al. 2004; Zibrowski y Robertson 2006; Heiser et al. 2010) y considerable evidencia de efectos patológicos de la exposición no ocupacional a la contaminación del aire sobre la estructura celular del epitelio nasal (Calderón-Garcidueñas et al. 1996, 1997, 1998, 2000, 2001, 2003, 2009) y sobre el material genético de las células epiteliales de la cavidad nasal (Valverde et al. 1997), hasta hace poco (Hudson et al. 2006) los efectos de la contaminación del aire urbano sobre la percepción de los olores permanecían sin ser descritos.

Efectos sobre funciones olfatorias

Recientemente (Guarneros et al. 2009) se comparó la función olfatoria jóvenes de la Ciudad de México y del vecino estado de Tlaxcala, el cual presenta niveles de emisiones antropogénicas a la atmósfera marcadamente menores que los de la Ciudad de México (Tovalín et al. 2010; SEMARNAT 2012, Figuras 8 y 9). Los sujetos Tx presentaron puntajes mayores que los sujetos CM para las pruebas de umbral (concentración mínima para detección) y discriminación de olores (distinguir entre pares de olores), pero no para la identificación de olores (nombrarlos correctamente con ayuda de una lista de opciones).



Figura 8. La ciudad de Tlaxcala ha sido seleccionada en varios estudios sobre la contaminación de la Ciudad de México como región control por la relativa similitud cultural y climática, además de presentar niveles de contaminantes atmosféricos marcadamente menores.

En general se acepta que las funciones cerebrales de mayor orden (tales como memoria, habla y pensamiento) están implicadas en tareas de reconocimiento de olores en mayor medida que en otras medidas de desempeño olfativo tales como el umbral de detección (Lötsch et al. 2008; Hedner et al. 2010). Esto podría explicar por qué en ese estudio (Guarneros et al. 2009) no se observaron diferencias significativas entre los grupos en la prueba de identificación, y posiblemente revela la habilidad que tiene el cerebro para compensar el déficit observado en funciones que requieren menor mediación cognitiva tales como la discriminación y, sobre todo, el umbral de detección (Figura 10).

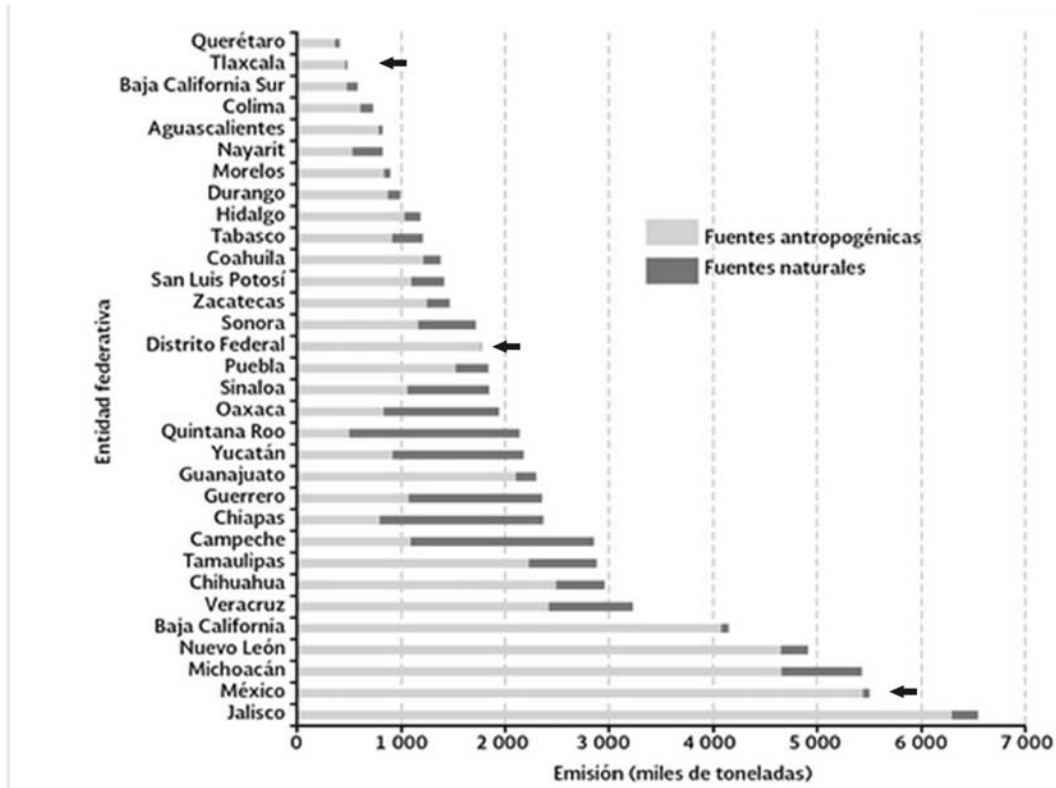


Figura 9. El reporte más reciente sobre emisión de contaminantes atmosféricos por entidad federativa coloca a Tlaxcala como la segunda entidad con menos emisiones del país. Las abundantes emisiones de la Zona Metropolitana del Valle de México (Estado de México y Distrito Federal) tienden a estancarse en el suroeste de la Ciudad de México debido a las condiciones geográficas. (Tomado de Semarnat 2012).

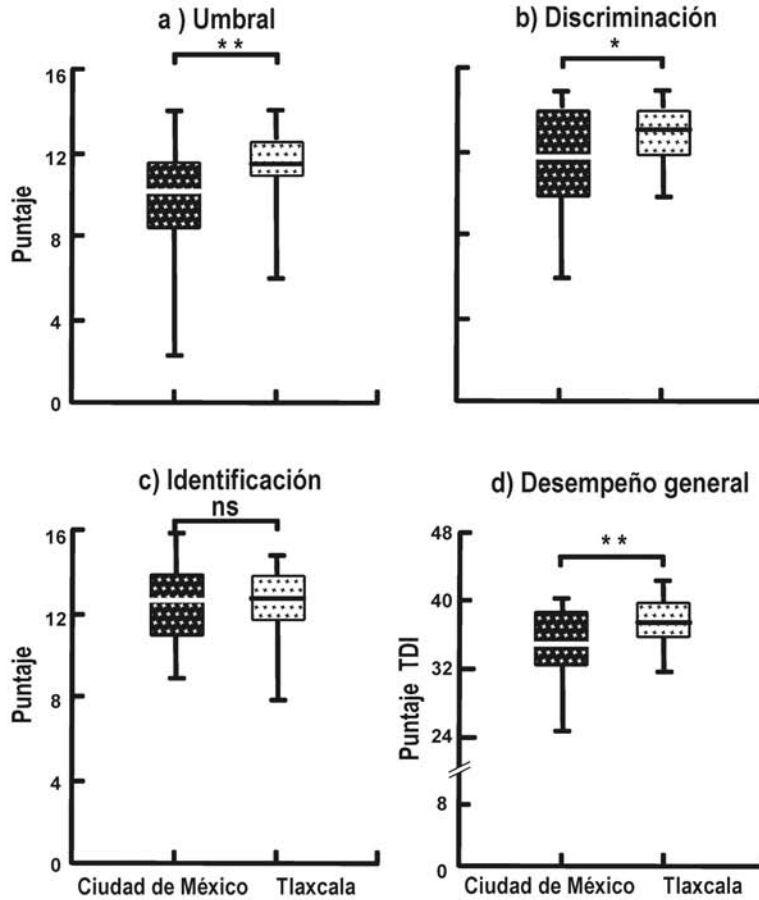


Figura 10. En un estudio previo se midió el desempeño de sujetos de la Ciudad de México y de sujetos de Tlaxcala en tres pruebas olfatorias: umbral, discriminación e identificación (a-c) así como sus puntajes TDI, que son la suma de los puntajes de las tres pruebas (d). Para cada una de las tres pruebas, los sujetos podían obtener un puntaje máximo de 16 respuestas correctas y por lo tanto un máximo puntaje TDI de 48. Diagramas de cajas y bigotes: líneas horizontales dentro de las cajas indican las medianas, los límites horizontales de las cajas dan los rangos intercuartiles, y las líneas verticales indican los rangos totales. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns = no significativo. (Pruebas *U* de Mann-Whitney; Adaptado de Guarneros et al. 2009).

También se ha recurrido a otro tipo de métodos para evaluar el efecto que la contaminación del aire tiene en el olfato. El uso de pruebas que utilizan mezclas moleculares típicas de la vida real pueden permitir una aproximación más ecológicamente relevante que las pruebas que utilizan sustancias monomoleculares (Ayabe-Kanamura et al. 1998; Distel et al. 1999; Hudson 1999; Distel y Hudson 2001; Guarneros et al. 2011).

Un estudio (Hudson et al. 2006) comparó los umbrales de detección para una preparación de jugo de naranja, y para café instantáneo, y la capacidad para discriminar entre los olores de horchata (bebida de arroz) y atole (bebida de maíz). Los hallazgos fueron consistentes, pues las personas de la región menos contaminada presentaron mayor sensibilidad olfatoria (Hudson 2006).

La contaminación del aire también parece afectar la capacidad olfatoria para advertir amenazas microbianas por medio de la evocación de disgusto (Stevenson et al. 2010). Un estudio comparó la capacidad para detectar dimetil disulfuro (DMDS), un subproducto de la descomposición de la leche (van Aardt et al. 2005), entre habitantes de una zona contaminada y de una región control. Una vez más, los altos niveles de contaminación en el aire estuvieron asociados a una mayor dificultad para detectar la presencia de DMDS diluido en una preparación de leche. Estos hallazgos aportan evidencia de daños olfatorios causados por la contaminación del aire, y la relevancia que esto puede tener en la vida cotidiana (Figura 11; Guarneros et al. 2011).

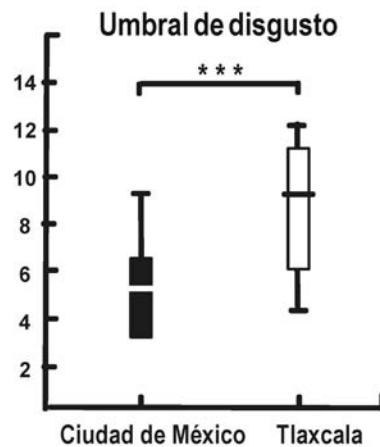


Figura 11. En un estudio previo se registró la concentración de dimetil disulfuro (un producto de la descomposición de la leche) que era percibida como desagradable cuando se presentaba la sustancia disuelta en leche a sujetos expuestos a contaminantes de la Ciudad de México y a controles de Tlaxcala. Diagramas de cajas: líneas horizontales que dividen las cajas = medianas, límites de las cajas = rangos intercuantiles, barras verticales = percentiles 10 y 90. *** $P < 0.001$, prueba U de Mann-Whitney. (Adaptado de Guarneros et al. 2011).

Efectos sobre la función trigeminal

Lo que comúnmente se conoce como *sentido del olfato* está compuesto por múltiples sensaciones predominantemente mediadas por dos rutas neurales distintas, si bien funcionalmente interconectadas; el sistema olfatorio y el sistema trigeminal (von Skramlik et al. 1925; Hudson et al. 1994, Laska et al. 1997). De hecho, la gran mayoría de estimulantes quimiosensoriales producen ambos tipos de activación: olfatoria y trigeminal (von Skramlik 1925; Doty et al. 1978; Cometto-Muñiz y Cain 1991, 1998; Hummel 2000). *Picante, caliente, acre, fresco e irritante* son descriptores comunes de sensaciones intranasales mediadas por el sistema trigeminal que consiste de terminales nerviosas trigeminales sensibles a sustancias químicas en el tercio anterior de la cavidad nasal, y sus proyecciones hacia otras regiones del sistema nervioso central como la amígdala, que procesa respuestas emocionales tales como el miedo (Hacquemand et al. 2010; Damasio y Carvalho 2013).

A pesar de estar tan estrechamente integrados, los sistemas olfatorio y trigeminal intranasal parecen haber evolucionado como adaptaciones funcionales distintas. Una función importante del sistema trigeminal intranasal es prevenir la inhalación de sustancias tóxicas por medio de la detención refleja de la respiración (Walker et al. 2001, Scheibe et al. 2006) y desencadenando otros reflejos protectores como estornudos, inflamación neurogénica local de la mucosa (Tizzano et al. 2010) y producción de lágrimas (Kjaergaard et al. 2004). Por otro lado, la principal función del sistema olfatorio es permitir el aprendizaje de los olores relevantes para la experiencia del individuo (Hudson 1999).

En un estudio (Guarneros et al. 2009) se encontró que la sensibilidad trigeminal intranasal de sujetos de la Ciudad de México se encuentra disminuida en comparación con sujetos controles del estado de Tlaxcala. Los sujetos de Tlaxcala presentaron puntajes más altos en pruebas de sensibilidad trigeminal, en las cuales tenían que distinguir la fosa nasal por la que recibían el estímulo de eucalipto

(eucaliptol, una sustancia que evoca sensaciones tanto olfatorias como trigeminales en humanos; Doty et al. 1978). La fosa nasal en la que se entregaba el estímulo era pseudoaleatorizada y simultáneamente se entregaba aire ambiental en la otra fosa. Este método (Hummel et al. 2003; Dalton et al. 2006) se basa en el bien establecido hallazgo de que aunque existe una dificultad inherente al olfato para identificar la fosa nasal en la que se recibe un estímulo puramente olfatorio, se es capaz de identificar la fosa nasal de entrada cuando hay activación trigeminal (Cometto-Muñiz y Cain 1998; Hummel et al. 2003; Wysocki et al. 2003; Dalton et al. 2006) (Figura 12).

Esto es potencialmente relevante dada la contribución del sistema trigeminal en la percepción de olores (Hudson et al. 1994; Laska et al. 1997; Boyle et al. 2007; Frasnelli et al. 2009) y en la detección oportuna de sustancias tóxicas u otros estímulos asociados con situaciones que representan una amenaza para la supervivencia, como el humo de incendio, y las fugas de gas en el hogar (Silver 1991; Croy et al. 2012).

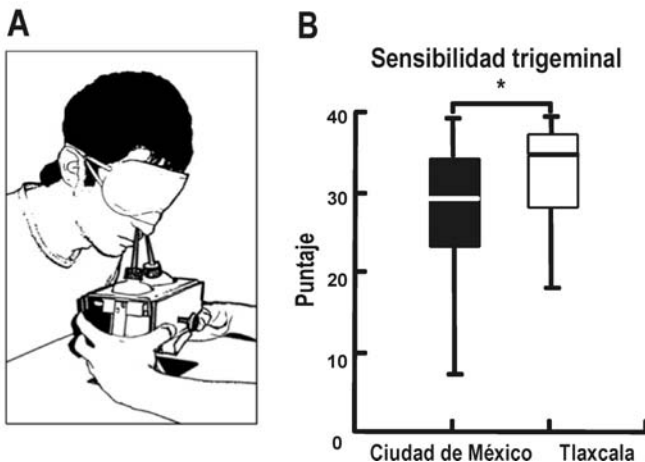


Figura 12. En un estudio previo se investigaron los efectos de la contaminación del aire en la sensibilidad trigeminal. A. Los sujetos recibían el estímulo trigeminal de eucaliptol en una fosa nasal y en la otra aire ambiental como se muestra en el panel de la izquierda. B. Habilidad de sujetos para identificar la fosa nasal que recibía el estímulo. Cajas: líneas horizontales dentro de las cajas = medianas, límites horizontales de las cajas = rangos intercuartiles, barras verticales = rangos totales. * $p < 0.05$ (Prueba *U* de Mann-Whitney). (Adaptado de Guarneros et al. 2009).

Mecanismos de daño intranasal y de defensa

El sistema cuenta con mecanismos de defensa que evitan que las neuronas olfatorias de la mucosa nasal entren en contacto directo con los agentes tóxicos del aire inspirado. El primero es el sistema intranasal, cuyas terminales nerviosas pueden detectar y responder a los irritantes aéreos. Cuando no es posible escapar de la fuente de peligro, el ritmo de la respiración se altera y pueden ocurrir estornudos y lágrimas que minimizan la entrada de irritantes a las vías respiratorias. Además, la cavidad nasal contiene epitelios escamoso y respiratorio que producen anticuerpos y proteínas antimicrobianas que protegen al sistema de agentes dañinos, así limitando el efecto de estos sobre el epitelio olfatorio. Un tercer mecanismo de defensa consiste en incrementar la producción de moco, el cual retiene muchos de los agentes que podrían dañar al sistema. Sin embargo, la eficiencia de estos mecanismos defensivos depende en grado considerable de la calidad del ambiente local del individuo. La exposición crónica a contaminantes atmosféricos puede dañar seriamente los epitelios respiratorio y olfatorio, incluso al grado de inducir el desarrollo de tumores (Harkema et al. 1987; Berglund et al. 1992; Calderón-Garcidueñas et al. 1994, 1998, 1999; Lewis y Dahl 1995; Hastings y Miller 2003).

Aunque el organismo es eficiente en limitar el daño al tejido intranasal cuando la exposición a contaminantes es breve, en el caso de exposición crónica, la mucosa puede desarrollar características anormales que reduzcan sus capacidades de defensa, causando incomodidad nasal y enfermedad. Las formas más comunes del daño que la contaminación del aire tiene dentro de la cavidad nasal son la pérdida de cohesión intercelular, el acortamiento y la pérdida parcial o total de cilios olfatorios -los cuales surgen de los botones dendríticos de las neuronas olfatorias y a lo largo de los cuales los receptores olfatorios están localizados-, necrosis, y manifestaciones cancerígenas en la población de células basales, a partir de las cuales las neuronas receptoras olfatorias se originan en el proceso de regeneración neuronal del epitelio olfatorio (Calderón-Garcidueñas et al. 1998; Schierhorn et al. 1999).

Cuando el sistema mucociliar se ve afectado, la capacidad de la mucosa para remover partículas tóxicas se reduce, lo cual afecta el resto del sistema (Halpern 1982, Boat y Carson 1990) incluyendo a las glándulas de Bowman quedan directamente expuestas al ambiente. Estas glándulas producen el moco que baña a la cavidad nasal e interviene en la eficiente regeneración del epitelio (Morrison y Constanzo 1990; Hastings y Miller 2003).

Entre los contaminantes más dañinos de la atmósfera encontramos al ozono que probablemente sea el que ha recibido mayor atención (Tyler et al. 1988; Chen et al. 2014). Es altamente reactivo e interacciona con una gran variedad de moléculas orgánicas, incluyendo grasas no saturadas, proteínas y ácidos nucleicos. Tanto en animales de laboratorio como en humanos, la exposición crónica o aguda a ozono produce daño significativo en el epitelio y en los bulbos olfatorios (Harkema et al. 1987; Calderón-Garcidueñas et al. 1996, 1998, 1999, 2002, 2009; Colín-Barenque et al. 1999).

Resulta interesante que mientras que el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas ha sido relacionado tanto a los altos niveles de contaminación del aire (e.g. Lucchini et al. 1995; Campbell 2004; Villarreal-Valderon et al. 2010) como a una disminución de las capacidades olfatorias (Doty et al. 1991; Fernández-Ruiz et al. 2003; Velázquez-Pérez et al. 2006; Haehner et al. 2007; Hummel et al. 2010b), la relación entre estos elementos aparentemente entrelazados se ha comenzado a investigar sólo recientemente (Calderón-Garcidueñas et al. 2009; Zoni et al. 2012; Lucchini et al. 2014). Un tema importante para la investigación futura es la intersección entre contaminación del aire, la disfunción olfatoria, y el desarrollo de procesos neurodegenerativos en poblaciones en las que se predice un incremento en la proporción de adultos mayores.

El manganeso: un contaminante atmosférico con propiedades neurotóxicas

Existe una creciente preocupación acerca del efecto de los contaminantes ambientales en la salud humana, no sólo en el ámbito laboral, sino también en la población general expuesta a niveles variables de contaminación atmosférica (Molina y Molina 2004; Chen y Kan 2008; Parrish y Zhu 2009). Los metales como el plomo, níquel, cadmio, mercurio y manganeso son particularmente preocupantes como contaminantes, dados sus efectos neurotóxicos, que resultan de la habilidad que tienen para alcanzar el sistema nervioso central al ser capturado por las neuronas receptoras olfatorias (Tjälve y Henriksson 1999; Dorman et al. 2006; Thompson et al. 2011).

Aunque el manganeso (Mn) es un elemento traza esencial, la exposición a altas concentraciones de este metal se ha asociado fuertemente a procesos neurotóxicos y neurodegenerativos. El Mn tiene una alta capacidad de transporte en el sistema nervioso central, ya que no solamente es transportado del epitelio olfatorio al bulbo olfatorio, la primera estación en el procesamiento central de la información olfatoria en vertebrados, sino que, a diferencia de otros metales como el cadmio y el mercurio, también se desplaza trans-sinápticamente a estructuras cerebrales más centrales, como los ganglios basales y la corteza prefrontal (Tjälve y Henriksson 1999; Aschner 2000; Dorman et al. 2006; Leavens et al. 2007). En consecuencia, la exposición a cantidades excesivas de Mn ha sido implicada en una variedad de trastornos motores y psiquiátricos (Hudnell 1999; Pal et al. 1999; Aschner et al. 2007; Bowler et al. 2007, 2012; Zoni et al. 2007), así como en disfunción olfatoria (Antunes et al. 2007; Bowler et al. 2007, 2011).

La exposición severa a Mn a través de la inhalación induce el desarrollo de un síndrome neurológico progresivo llamado manganismo, y caracterizado por desórdenes psiquiátricos en la fase inicial (“locura mangánica”), además de dolores de cabeza, fatiga, pérdida de apetito y apatía. Esto es seguido por un síndrome extrapiramidal con hipokinesia, disartria, distonia e inestabilidad postural,

impasividad facial, movimientos lentos, disminución del volumen de la voz, micrografía y balanceo sobre las puntas de los pies con ausencia de balanceo de los brazos. Varios de estos síntomas físicos aparecen en la enfermedad de Parkinson, lo cual llevó al término “parkinsonismo inducido por manganeso”. La condición es progresiva aun cuando el contacto con el metal sea interrumpido, y afecta particularmente los ganglios basales (Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Stepens et al. 2010).

Fuentes de exposición y límites permisibles

El Mn es el quinto metal más abundante de la corteza terrestre. De forma natural se encuentra con otros elementos formando silicatos, óxidos y carbonatos en más de 100 minerales (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR 2008). El estado de Hidalgo en México tiene los depósitos de Mn más grandes del país (Rodríguez-Agudelo et al. 2006). La rodocrosita (carbonato de Mn), la pirocroita (hidróxido de Mn) y la pirolusita (dióxido de Mn) son los minerales más importantes presentes en la zona minera de Hidalgo.

El Mn es un componente esencial del acero, y también se usa en la producción de baterías secas, vidrio, fuegos artificiales, sustancias de uso textil, cosméticos, pinturas, fungicidas agrícolas, agente de contraste en neuroradiología, y como potenciador del octanaje de la gasolina en varios países (Davis et al. 1998; ATSDR 2008).

En Estados Unidos la media de concentración de Mn en el aire es de $0.02 \mu\text{g}/\text{m}^3$; sin embargo en zonas mineras e industriales puede aumentar hasta $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (ATSDR 2008). Existen datos sobre la alta concentración de Mn en tejido cerebral de individuos expuestos a la contaminación de la Ciudad de México (Calderón-Garcidueñas et al. 2013), y aunque no parece haber información accesible sobre las concentraciones del metal en el aire, o sobre el origen preciso de las emisiones de

Mn a la atmósfera en esa ciudad, se sabe que el Mn es un componente de las partículas $PM_{2.5}$ (Saldarriaga-Noreña et al. 2009), cuyas concentraciones atmosféricas se han correlacionado con el tráfico vehicular (Cortez-Lugo et al. 2013).

Transporte de Mn

El Mn^{2+} tiene un radio iónico cercano al del calcio (Ca^{2+}) y su habilidad para afectar varios aspectos de la transmisión neuronal ha sido adjudicado principalmente a esta capacidad calcio-mimética (Aschner y Aschner 1991; Gavin et al. 1999). Se ha observado que el Mn entra a las terminales nerviosas por los canales de calcio durante los potenciales de acción nerviosos (Narita et al. 1990), y que tiene una vida media en el sistema nervioso central de 50 días (Rodríguez-Agudelo et al. 2006).

Una plétora de proteínas plasmáticas han sido implicadas en el transporte de Mn, incluida la transglutaminasa, la albúmina y la beta globulina. De hecho, aproximadamente el 80% del Mn en plasma está unido a beta globulina (Yokel 2002). El ingreso de Mn al cerebro a través de la barrera hematoencefálica se da por medio de la proteína transportadora de metales divalentes (DMT1), el receptor de transferrina, las proteínas transportadoras Zip8 y Zip14, el producto del gen *park9*, varios canales de calcio, los transportadores de zinc, el transportador de magnesio hip14 y el receptor de melastina 7 (Aschner 1994; Gavin et al. 1999; Yokel et al. 2002; Fitsanakis et al. 2007; Gunter et al. 2012).

Genes implicados en el metabolismo de Mn

La predisposición genética a la toxicidad del Mn ha sido correlacionada con el gen *PARK9* que codifica para un transportador de Mn (*ATP13A2*) (Dewitt et al.2013). Las mutaciones en otro exportador putativo de Mn (el producto del gen *SLC30A10*) se asocian a un marcado déficit motor que incluye un síndrome similar a PD. Se han estudiado 10 diferentes familias con problemas genéticos en el metabolismo de Mn (Tuschl et al. 2012; Stamelou et al. 2012, Quadri et al. 2012). Algunos miembros de estas familias presentan síntomas como hipermanganesemia (concentraciones de Mn en sangre mayores a los 2000 nmol/L, cuando lo normal es 320 nmol/L), distonia (temblores o torsiones repetitivos e involuntarios), policitemia (sobreproducción de glóbulos rojos), y comúnmente cirrosis hepática. La causa de la falla en el metabolismo de Mn fue identificada como una mutación autosómica recesiva en el gen *SLC30A10* (Tuschl et al. 2012) que ha sido encontrada en ocho familias, con individuos sintomáticos homocigotos e individuos no sintomáticos heterocigotos. La edad inicial de los síntomas varía entre los 2 y los 57 años. *SLC30A10* es una proteína perteneciente a la superfamilia de los transportadores de metales, responsables del transporte de Fe, Cu, Zn, y Mn. Es posible que las mutaciones heterocigóticas o mutaciones en nucleótidos individuales de *SLC30A10* interactúen con la exposición ambiental para promover y exacerbar el inicio de una enfermedad de Parkinson de otro modo considerada idiopática (DeWitt et al. 2013).

Acumulación de Mn en el organismo y en la célula

El Mn se acumula principalmente en los siguientes órganos: cerebro, tiroides, hipófisis, glándulas suprarrenales, páncreas, hígado y riñón. En ratas tratadas con manganeso se observó un incremento en la concentración de Mn de esos mismos órganos (Sakurai et al. 1985).

Las mitocondrias son, según algunos autores (Suzuki et al. 1983; Henriksson et al. 1999), los organelos en donde se acumula más Mn en el cerebro, en parte porque la entrada del metal a la mitocondria es facilitada por el transportador de Ca^{2+} , mientras que su salida del organelo ocurre mediante un mecanismo lento dependiente de Na^+ . En contraste con la mitocondria, la membrana citoplásmica contiene la proteína exportadora ferroportina-1, la cual saca Mn de la neurona (DeWitt et al. 2013; Li et al. 2013).

También se ha observado por medio de técnicas de nanoimagen fluorescente que el Mn se acumula en los aparatos de Golgi de las células dopaminérgicas. Este organelo es capaz de almacenar el excedente de Mn hasta que se excede su capacidad y es colapsado por acción de la brefeldina. Esto resulta en una redistribución del Mn, que entonces se acumula en el citoplasma y en el núcleo. Estos hallazgos sugieren que el aparato de Golgi tiene una función importante en la desintoxicación celular de Mn (Carmona et al. 2010).

En células renales el Mn parece acumularse en los microsomas, y en las células pancreáticas en el núcleo. Los núcleos y las mitocondrias de las células del hígado también concentran el metal (Sakurai et al. 1985).

Efectos celulares del Mn

Cuando el Mn es incorporado en las mitocondrias inhibe el complejo I de la cadena respiratoria, lo que conduce a una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno. Las quinonas que participan en la transferencia de electrones de la cadena respiratoria son dañadas y con esto la cadena comienza a donar electrones directamente al oxígeno molecular creando el radical superóxido, que es altamente reactivo (Eriksson et al. 2004).

En las células dopaminérgicas, el Mn induce alteraciones en la liberación de dopamina e incrementa los niveles de radicales superóxido (Drapeu y Nachsen 1984; Allinovi et al. 1996; Hamai et al. 2001; Nam y Kim 2008). También favorece el estrés oxidativo que ocurre como resultado de la oxidación de dopamina y otras catecolaminas (Erikson et al. 2004). Otro efecto adverso que se ha reportado para el Mn es la inhibición de receptores de glutamato. Esto afecta directamente las concentraciones de glutamato extracelular, pues se bloquea el reciclamiento del neurotransmisor y se favorece la excitotoxicidad (Eriksson et al. 2004).

También se ha reportado que la intoxicación por Mn en ratas tiene efectos adversos en la fertilidad y en la reproducción, y en la viabilidad de los espermatozoides, posiblemente debido al daño que ejerce el metal sobre las mitocondrias (Elbetieha et al. 2001; Wirth et al. 2007; Li et al. 2012).

El sistema tiene pocos mecanismos para hacer frente a la acumulación de Mn. La ferritina, una molécula intracelular que almacena hierro y amortigua la deficiencia y la sobrecarga de ese metal, también tiene una función en el metabolismo del Mn. Se ha observado que individuos con bajos niveles de ferritina absorben más Mn que los individuos con niveles más altos (Solís-Vivanco et al. 2009). Otra proteína, la ferroportina-1, está implicada en la movilización de Mn de adentro hacia fuera de la célula (DeWitt et al. 2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque la mayor parte de la evidencia sobre los efectos patológicos del Mn ha provenido de estudios sobre la salud de sujetos ocupacionalmente expuestos a altos niveles del metal tales como soldadores, mineros, o trabajadores en plantas de procesamiento (Mergler et al. 1999; Lucchini et al. 1995; Chu et al. 1996; Crump y Rousseau 1999; Autunes et al. 2007; Bowler et al. 2007, 2011; Zoni et al. 2007), hay evidencia de que los niveles más bajos de exposición crónica a Mn aéreo en el ambiente general también puede tener efectos tóxicos duraderos en la salud humana (Hudnell 1999; Mergler et al. 1999; Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Zoni et al. 2007; Solís-Vivanco et al. 2009; Riojas-Rodríguez et al. 2010). En particular, el debate se ha estimulado a raíz del uso del metilciclopentadienil manganeso tricarbonyl como un potenciador del octanaje de gasolinas en algunos países (Davis 1998; Hudnell 1999; Pellizzari et al. 2001; Pfeifer et al. 2004).

Si bien otros estudios se han concentrado importantemente en los efectos en las funciones motoras y cognitivas, o en un decremento de la calidad de vida (Catalán-Vázquez et al. 2010, 2012), no existe información disponible del posible efecto de la exposición atmosférica no ocupacional a Mn sobre la función olfatoria. También, además de cualquier efecto negativo en la función olfatoria *per se*, esto podría proveer una aproximación sensible y no invasiva para evaluar el impacto de la exposición a Mn sobre los procesos del sistema nervioso central de modo general. Para investigar esto, se seleccionó una región del México rural, en donde el Mn ha sido extensivamente explotado por la industria minera durante los últimos 50 años (ver Sitio de estudio), en donde previamente se han registrado altos niveles de Mn en el suelo (mayores a los 0.05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ recomendado por la *Environmental Protection Agency* de los Estados Unidos (US EPA 1997) , el agua, la vegetación, y el aire (Solís-Vivanco et al. 2009; Juárez-Santillán et al. 2010), y déficits significativos en la función motora y cognitiva de la población (Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Solís-Vivanco et al. 2009; Riojas-Rodríguez et al. 2010).

En el pasado, se encontró que residentes saludables de la Ciudad de México expuestos a los altos niveles de contaminación del aire, muestran una reducción significativa en la habilidad para detectar odorantes presentados a bajas concentraciones, pero tienen poca o ninguna reducción en la habilidad para describirlos o nombrarlos correctamente cuando son presentados a concentraciones por encima del umbral de detección olfatoria (Hudson et al. 2006; Guarneros et al. 2009, 2011). Esto sugiere que los efectos negativos de la contaminación del aire de la ciudad dañan la periferia del sistema, sin afectar procesos centrales en la misma medida (discusión en Hudson et al. 2006; Guarneros et al. 2009, 2011). Dada la habilidad del Mn para alcanzar estructuras cerebrales cruciales para el procesamiento cognitivo que subyace funciones como la memoria y el aprendizaje, y por otro lado, tomando en cuenta el importante papel que juegan tales procesos en la identificación olfatoria (Hudson 1999; Wilson y Stevenson 2003; Herz 2009), se predijo que los sujetos expuestos a Mn del presente estudio mostrarán bajos puntajes en la prueba de identificación de olores.

HIPÓTESIS

La exposición a manganeso atmosférico afecta adversamente la función olfatoria periférica y central.

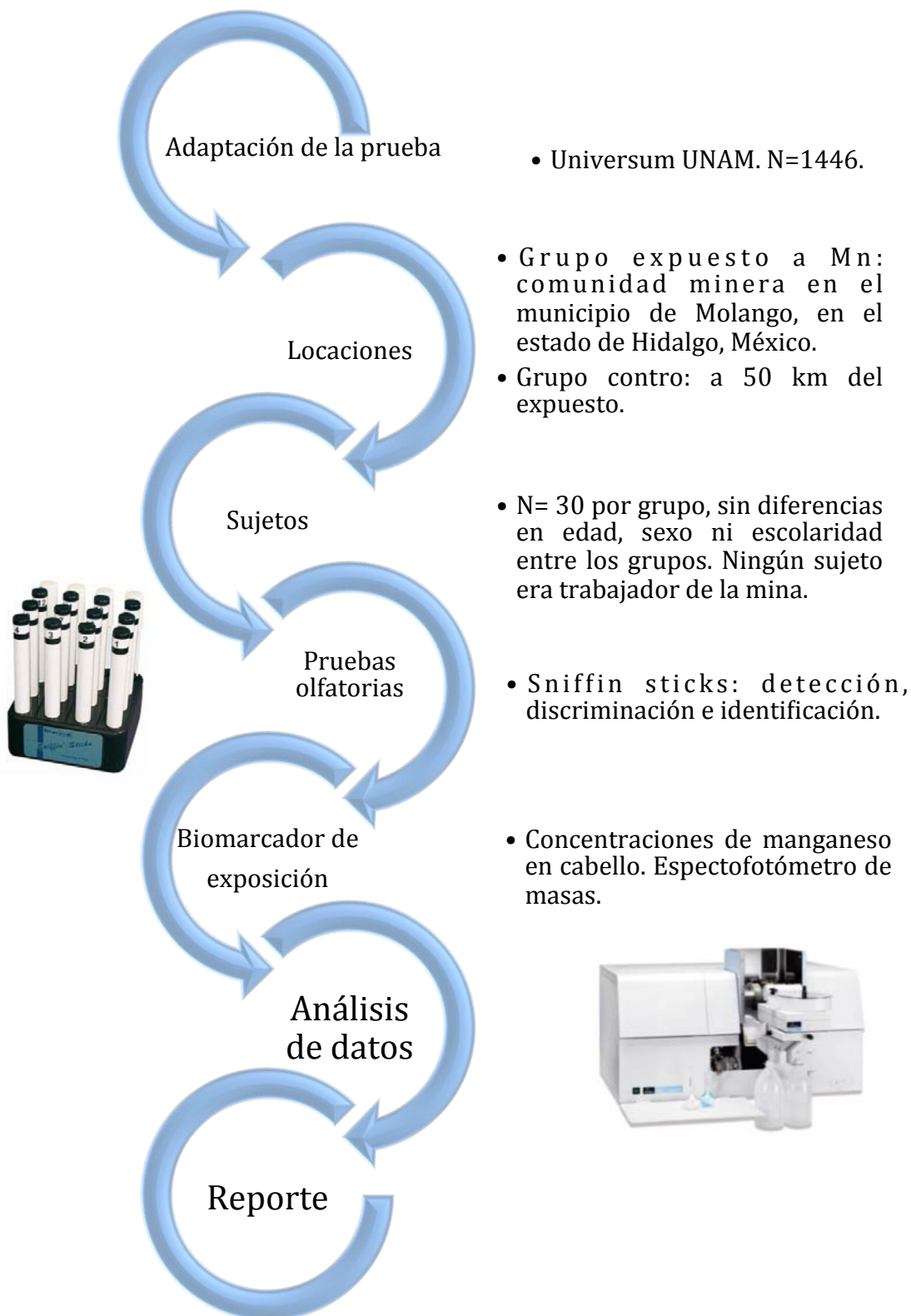
OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto de la exposición no ocupacional a manganeso atmosférico sobre la función olfatoria en humanos.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la prueba de identificación de olores *Sniffin Sticks* para llevar a cabo estudios en la población mexicana.
2. Investigar el efecto de la exposición no ocupacional a manganeso sobre la función de detección de olores.
3. Investigar el efecto de la exposición no ocupacional a manganeso sobre la función de discriminación de olores.
4. Investigar el efecto de la exposición no ocupacional a manganeso sobre la función de identificación de olores.
5. Medir las concentraciones de manganeso en cabello como biomarcador de exposición.
6. Investigar la relación entre concentración de manganeso en cabello y desempeño olfatorio.
7. Conocer los efectos del manganeso sobre la relación entre edad y desempeño olfatorio.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de la prueba

El primer paso fue evaluar la identificabilidad de los estímulos de la prueba de identificación de olores (ver abajo), desarrollada en Alemania (Hummel et al. 1997), en una muestra grande de sujetos mexicanos (N=1441, Mujeres=943, Hombres=498, Edad: rango:16-84 años, media=31.84 años) con el fin de descartar aquellos estímulos que fueran desconocidos o poco identificables para los mexicanos. Esta parte fue llevada a cabo en las instalaciones de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la Ciudad de México, y las pruebas fueron aplicadas en una cabina con ventilación en el Museo de las Ciencias (Universum, UNAM) (Anexo II).

Sitio de estudio

La parte central de este estudio se llevó a cabo en el distrito de Molango, en la Alta Sierra del estado mexicano de Hidalgo, en donde el Mn ha sido extensivamente explotado por la industria minera durante los últimos 50 años (Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Solís-Vivanco et al. 2009; Catalán-Vázquez et al. 2012). Los recursos mineros de Mn de esta zona ocupan el segundo lugar en tamaño en Latinoamérica, y el quinto lugar en el mundo (Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Catalán-Vázquez et al. 2012). Se escogió como sitio focal las localidades adyacentes de Tolago y Chiconcoac, que en conjunto tienen una población de 1269 (Secretaría de Gobernación 2010), y se localizan aproximadamente en las coordenadas 20°80'N, 98°42'O, 1900 msnm, y a <1 km de la planta de procesamiento de Mn. El sitio control fue el pueblo de Calnali, población aproximada: 15,000 habitantes, localizada en las coordenadas 20°50'N, 98°36'W; 1800 msnm, y a 50 km de Tolago/Chiconcoac y de cualquier exposición de origen minero. Los dos sitios tienen un clima templado húmedo, y las poblaciones tienen una cultura similar (Figura 13).



Figura 13. Las comunidades aledañas de Tolago y Chiconcoac han sido seleccionadas como región focal en investigaciones sobre los efectos de la exposición a Mn en la salud. La fotografía de la izquierda fue tomada en esta región, en ella se observa el depósito de Mn. Se seleccionó al pueblo de Calnali (derecha) como región control por ser un pueblo vecino con clima y cultura similar, pero sin contaminación por Mn.

Sujetos

Participaron 30 adultos de cada población con la ayuda del personal de las clínicas públicas de salud; 25 mujeres y 5 hombres. Los grupos fueron equiparados tan minuciosamente como fue posible por edad y escolaridad (Tabla 1). De acuerdo con los registros de las clínicas, todos estaban en buena salud general. Más mujeres que hombres fueron reclutadas porque la mayoría de los hombres en la comunidad expuesta son trabajadores de la mina o han migrado al extranjero en busca de trabajo. Los sujetos agricultores reportaron no estar expuestos a fertilizantes ricos en Mn como Maneb o Mancozeb. Todos los sujetos fueron no-fumadores, todos habían pasado la mayor parte de sus vidas en cada una de las respectivas comunidades, y ninguno había sido empleado en actividades mineras en el pasado (las ocupaciones se muestran en la Tabla 2).

Tabla 2 Características generales de la muestra de estudio.

	Manganeso	Control
Tamaño de muestra	30	30
Mujeres	25	25
Hombres	5	5
Edad (Media, DE)	39.9 años (15.8)	42 años (12.6)
Escolaridad (Media, DE)	6.4 años (4.4)	7.2 años (4.6)
Ocupaciones		
<i>Amas de casa</i>	17 (mujeres)	22 (mujeres)
<i>Enfermeras</i>	8 (mujeres)	1 (mujer)
<i>Estudiante</i>		1 (mujer)
<i>Comerciantes</i>	2 (hombres)	1 (mujer)
<i>Agricultores</i>		5 (hombres)
<i>Músicos</i>	2 (hombres)	
<i>Conserje</i>	1 (hombre)	

Todos los sujetos fueron no-fumadores

Los procedimientos descritos a continuación se llevaron a cabo en apego a los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración de Helsinki, y a los lineamientos para el tratamiento de sujetos humanos en investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México. El estudio fue aprobado por el Subcomité del Campo de Conocimiento en Biología Experimental y Biomedicina, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, y también se obtuvo la aprobación de las autoridades de salud locales (Desarrollo Integral de la Familia, Secretaría de Salud, Calnali, y Clínica de Salud, Secretaría de Salud, Chiconcoac). Las pruebas se llevaron a cabo en presencia del personal clínico y no involucraron intervención física o consecuencias por tratamiento. Los sujetos fueron del todo informados acerca del propósito y los procedimientos del estudio, y se aseguró el anonimato de su participación. Cada sujeto dio su consentimiento informado antes de ser evaluado.

Procedimientos de las pruebas

Los sujetos fueron evaluados en la clínica local del servicio público de salud en sus respectivas comunidades y por el mismo experimentador, quien estaba familiarizado con la cultura de la región de los sitios de estudio y tenía una amplia experiencia en el manejo de los *Sniffin' Sticks* (ver abajo). Después de obtener el consentimiento informado de los sujetos, se tomaron datos de cada paciente (edad, sexo, historia de tabaquismo, ambiente laboral, escolaridad e historial médico) (Tabla 2).

El desempeño olfatorio de los sujetos fue evaluado usando una prueba psicofísica de olfato, *Sniffin' Sticks* (ver abajo), ligeramente modificada para la población local. Dado los bajos niveles de alfabetismo, el experimentador leyó la lista de 4 opciones para cada uno de los odorantes de la prueba de identificación (ver abajo), y con repeticiones cuando el sujeto lo solicitaba.

Cada sujeto fue evaluado en una sola sesión con duración máxima de 30 min. Las pruebas fueron conducidas entre abril y mayo del 2011 para excluir posibles efectos estacionales. Además, se tomaron muestras de cabello de la mayoría de los sujetos para confirmar una mayor exposición a Mn en el grupo focal (ver abajo).

Desempeño olfatorio. Como en un estudio previo del efecto de la contaminación de la Ciudad de México sobre la función olfatoria (Guarneros et al. 2009), los odorantes fueron presentados a los sujetos –con ojos vendados- siguiendo un procedimiento descrito previamente (Hummel et al. 1997; Kobal et al. 2000). Dispositivos similares a plumones (*Sniffin' Sticks*) fueron rellenos con 4mL de odorante líquido o de odorante disuelto en propilenglicol (solvente inodoro).

En el momento de la prueba, la tapa del plumón era removida por el experimentador, el cual aproximaba la punta del plumón a 2 cm en frente de las fosas nasales del sujeto por 2–3 s. Los sujetos recibían la indicación de cuándo olfatear el estímulo, y

excepto por la prueba de identificación, se les permitía olfatear cada estímulo una sola vez (Figura 1).

Umbral. Se determinó la habilidad de los sujetos para detectar un odorante (2-fenil-etanol), que tiene un característico olor de rosas, utilizando un procedimiento de presentación de concentraciones en orden ascendente y selección forzada de una de tres alternativas. En esta prueba se utiliza una serie geométrica de dieciséis concentraciones. La concentración más alta de la prueba, 4% del odorante en propilenglicol, es sucesivamente disminuida en una proporción 2:1 para dar lugar a los 16 pasos de dilución.

En cada ensayo (paso de concentración), 3 plumones se presentaban de manera sucesiva y aleatoria; 2 de las 3 veces se presentaban plumones que contenían sólo solvente, y en 1 de 3 se presentaba el odorante. La tarea de los sujetos consistía en indicar el plumón que olía diferente (i.e. que contenía el odorante). El intervalo entre las presentaciones de plumones dentro de un triplete fue de aproximadamente 3 s, y entre tripletes de aproximadamente 20 s.

Los pasos de concentración eran presentados ascendentemente (la concentración del odorante se incrementaba) mientras el sujeto fallara. La dirección en el cambio de concentración era revertida (disminuía en vez de incrementarse) cuando el estímulo objetivo era correctamente detectado en dos ensayos sucesivos, y seguía incrementándose toda vez que el sujeto detectara el estímulo correcto en dos ensayos consecutivos. Por el contrario, la concentración se volvía a incrementar cuando el sujeto volvía a fallar en una tarea. Los pasos de concentración en los que se revierte la dirección en el cambio de la concentración se denominan puntos de retorno. La prueba termina cuando ocurre el séptimo punto de retorno.

El umbral fue definido como la concentración (el paso de concentración) promedio de los últimos 4 puntos de retorno. El puntaje para esta prueba podían variar en el rango de 0 (mínima sensibilidad/anósmico para el odorante 2-fenil etanol) a 16 (máxima sensibilidad), puntaje que, sin embargo, ningún sujeto alcanzó.

Discriminación. Utilizando un paradigma de selección forzada de una entre tres alternativas, 16 triplete de plumones rellenos con concentraciones de odorante bien por encima del umbral para normósmicos y se presentaron en el mismo orden para todos los sujetos. Dos plumones contenían el mismo odorante, y uno contenía un odorante diferente (Tabla 3). Los sujetos tenían que determinar cuál de los tres plumones olía diferente. Como en la determinación del umbral, el intervalo entre presentaciones de plumones fue de aproximadamente 3 s y entre tripletes de aproximadamente 20 s. Dado que se aplicaron 16 tripletes, el rango de puntajes para esta prueba iba de 0 a 16.

Identificación. A los sujetos se les presentaron 13 odorantes comunes (ver Procedimientos de las pruebas sobre la eliminación de 3 de los 16 odorantes originales) en el mismo orden para todos los sujetos, y se les pidió seleccionar el descriptor más apropiado de entre 4 alternativas posibles (p. ej. *Cuero de zapato* como objetivo, y *pegamento*, *pasto*, y *humo* como distractores). Debido a los bajos niveles de alfabetismo, el experimentador leyó a los sujetos la lista de alternativas. Los estímulos se presentaron a concentraciones supraumbrales para normósmicos, el intervalo entre presentación de cada pluma fue de aproximadamente 10 s, y los puntajes de los sujetos podían ir de 0 a 13 (Tabla 4).

Tabla 3. Estímulos (objetivos y distractores) utilizados en la prueba de discriminación.

#	Estímulo objetivo	Estímulos distractores
1	Butanol	2-fenil etanol
2	Isoamilacetato	Anetol
3	Anetol	Eugenol
4	Limoneno	Fenchona
5	L-5-isopropenil-2-metil-2 ciclohexanona	D-5-isopropenil-2-metil-2-ciclohexanona
6	Eugenol	Canela-Aldehido
7	Dihidro rosenoxido	Mentol
8	Acetaldehido	Isoamilacetato
9	Citronelal	Linalool
10	Piridina	Limoneno
11	Limoneno	Citronelal
12	Eucaliptol	Dipiridil
13	Dipiridil	Ciclopentadecanoato
14	Butanol	Fenchona
15	Octilacetato	Canela-Aldehido
16	Carvona	Acetaldehido

Desempeño general. Para cada sujeto, los resultados de las 3 subpruebas fueron sumados para dar un puntaje compuesto de umbral + discriminación + identificación denominado 'puntaje TDI' (por las iniciales en inglés de cada una de las tres pruebas), cuyo valor máximo era de $16 + 16 + 13 = 45$ (Hummel et al. 1997; Wolfensberger et al. 2000).

Tabla 4. Prueba de identificación. Para cada una de las 16 tareas, el estímulo odorante objetivo está indicado en negritas para distinguirlo de los tres distractores en el mismo renglón. Tres estímulos de la prueba (regaliz, aguarrás y manzana) original fueron eliminados del análisis por su baja familiaridad en la población mexicana.

1	naranja	mora azul	fresa	piña
2	humo	cuero de zapato	pegamento	pasto
3	miel	Vainilla	chocolate	canela
4	ajo	Menta	pino	cebolla
5	coco	Plátano	nuez	cereza
6	durazno	Manzana	limón	toronja
7	regaliz	ositos de goma	chicle	galletas
8	mostaza	Hule	mentol	aguarrás
9	cebolla	Col	ajo	zanahoria
10	cigarro	Café	vino	humo de vela
11	melón	Durazno	naranja	manzana
12	clavo	Pimiento	canela	mostaza
13	pera	Ciruela	durazno	piña
14	manzanilla	Frambuesa	rosa	cereza
15	anís	Ron	miel	pino
16	pan	Pescado	queso	jamón

Determinación del contenido de manganeso (Mn) en cabello

Se ha observado que los niveles de Mn en sangre u orina podrían no ser confiables para reflejar la exposición ambiental crónica. Sin embargo, dado que el cabello crece de forma relativamente lenta, y que el Mn es incorporado de la sangre al cabello durante el crecimiento capilar, el cabello refleja e integra los cambios en los niveles de Mn en el cuerpo que son producto de una exposición crónica de varios meses (Riojas-Rodríguez et al. 2010; Eastman et al. 2013). Así que se tomaron aproximadamente 0.5 g de cabello de la región occipital de los sujetos, en el extremo proximal al cuero cabelludo, de 22 mujeres y 3 hombres en el grupo expuesto, y de 20 mujeres y 3 hombres en el grupo control. El cabello fue almacenado en refrigeración en tubos de polipropileno de 5-mL, libres de metales, hasta el momento de su análisis. Las muestras de ambos grupos fueron analizadas en la misma sesión. Siguiendo un procedimiento previamente establecido (Riojas-

Rodríguez et al. 2010), las muestras fueron lavadas 3 veces por medio de agitación vigorosa en una solución detergente de 2% de Triton X-100, y enjuagadas con agua desionizada. El cabello fue posteriormente secado a 60°C, cortado en pequeñas partes para facilitar la digestión por ácido, y 300 mg fueron colocados por 30 min. a 60°C en tubos de polipropileno libres de metales con 250 µL de ácido nítrico concentrado (Suprapur; Merck, Naucalpan de Juárez). La disolución clara resultante fue analizada con un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer, AAnalyst 600; Menezes-Filho et al. 2009; Riojas-Rodríguez et al. 2010). El control de calidad del análisis fue asegurado con la medición de un material biológico de referencia (hígado bovino 1577b; National Institutes of Standards and Technology, Estados Unidos) junto con las muestras.

Tratamiento y análisis de los datos

Para la caracterización de la prueba de identificación de olores se consideraron las frecuencias de identificabilidad de los estímulos. Dado que los puntajes de desempeño no presentaron distribuciones normales en todos los casos (pruebas de Kolmogorov-Smirnov) y la mayoría estuvieron basados en frecuencias, los datos para los dos grupos están graficados como medianas y rangos intercuartiles, o como correlaciones de rango de Spearman, y comparadas por medio de pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney. Se utilizaron pruebas de dos colas utilizando el programa estadístico *SYSTAT 12*, y tomando $P < 0.05$ como el nivel de significancia. Como los grupos fueron pareados por género, los puntajes para hombres y mujeres fueron combinados.

RESULTADOS

Caracterización de la prueba de identificación

Se observó la siguiente identificabilidad en los estímulos de la prueba de identificación (N=1,446): naranja (90%), cuero de zapato (84%), canela (85%), menta (97%), plátano (98%), limón (63%), regaliz (74%), aguarrás (41%), ajo (92%), café (87%), manzana (34%), clavo (76%), piña (72%), rosa (88%), anís (91%), pescado (97%).

Las palabras “regaliz” y (su sinónimo) “orozuz”, fueron desconocidas para 97% de los individuos a quienes se les preguntó si conocían el nombre de ese producto. Además de eso, el olor de regaliz fue más comúnmente descrito como “anís” el cual es otro estímulo de la prueba de identificación. Por estas razones, el estímulo de regaliz fue eliminado del análisis. Es notorio que 74% de los sujetos lo identificaran correctamente gracias al procedimiento de selección múltiple, que les permitía descartar las opciones conocidas.

También se retiraron del análisis los estímulos de manzana y de aguarrás, ya que fueron identificados por menos del 60% de los sujetos, lo cual indica que son poco útiles para ayudar a detectar disfunción olfatoria en la población (Shu y Yuan 2008).

En el Anexo II se presenta un estudio completo sobre la descripción de los patrones demográficos asociados a función olfatoria, así como valores de referencia para una población mexicana.

Sujetos

Todos los sujetos aceptaron amablemente participar en el estudio, y no hubo diferencias significativas entre el grupo expuesto a Mn y el grupo control en edad, ni en indicadores socioeconómicos tales como empleo o años de escolaridad, o en la salud general aparente (Tabla 1).

Desempeño olfatorio

Umbral. Los sujetos del grupo control detectaron el 2-fenil etanol en la prueba de presentación de concentraciones ascendentes, en un procedimiento de selección forzada de 1 de 3 alternativas, a concentraciones significativamente más bajas que los sujetos expuestos a Mn (*U* de Mann-Whitney: $U = 312.5_{30,30}$, $P = 0.042$). Basado en las medianas de los puntajes, esto representa una diferencia de entre 2 y 4 veces en la concentración necesaria para detectar la presencia de este estímulo (Figura 14a).

Discriminación. Los sujetos del grupo control fueron más eficientes para distinguir el estímulo objetivo en las pruebas de selección forzada de 1 de 3 alternativas que los sujetos expuestos (Figura 14b). Esta diferencia también fue significativa ($U = 272_{30,30}$, $P = 0.008$).

Identificación. Aunque los odorantes de esta prueba han sido originalmente seleccionados por su familiaridad entre europeos, después de eliminar los estímulos no familiares (manzana verde, regaliz, y aguarrás, ver arriba), los sujetos control identificaron 8 de los 13 estímulos correctamente en más de 90% de los casos, y 10 de 13 en más de un 80% de los casos. En contraste, los sujetos expuestos identificaron sólo 4 de 13 correctamente (café, ajo, plátano, pescado) en más de 90% de los casos, y 8 en menos de 70% de los casos (Figura 14c). Una vez más, esta diferencia en el desempeño entre ambos grupos fue significativa (Figura 3; $U = 265.5_{30,30}$, $P = 0.005$).

Desempeño general. Como consecuencia de lo anterior, los sujetos controles tuvieron puntajes TDI (suma de los puntajes obtenidos en las pruebas de umbral, discriminación, e identificación) más elevados que los sujetos expuestos (Figura 14d; $U = 213.0_{30,30}$, $P < 0.001$) (Figura 14d).

Cuatro sujetos expuestos (13%) tuvieron puntajes por debajo del puntaje más bajo obtenido por un sujeto control, mientras que 3 sujetos controles (10%) tuvieron puntajes por encima del puntaje más alto obtenido entre los sujetos expuestos.

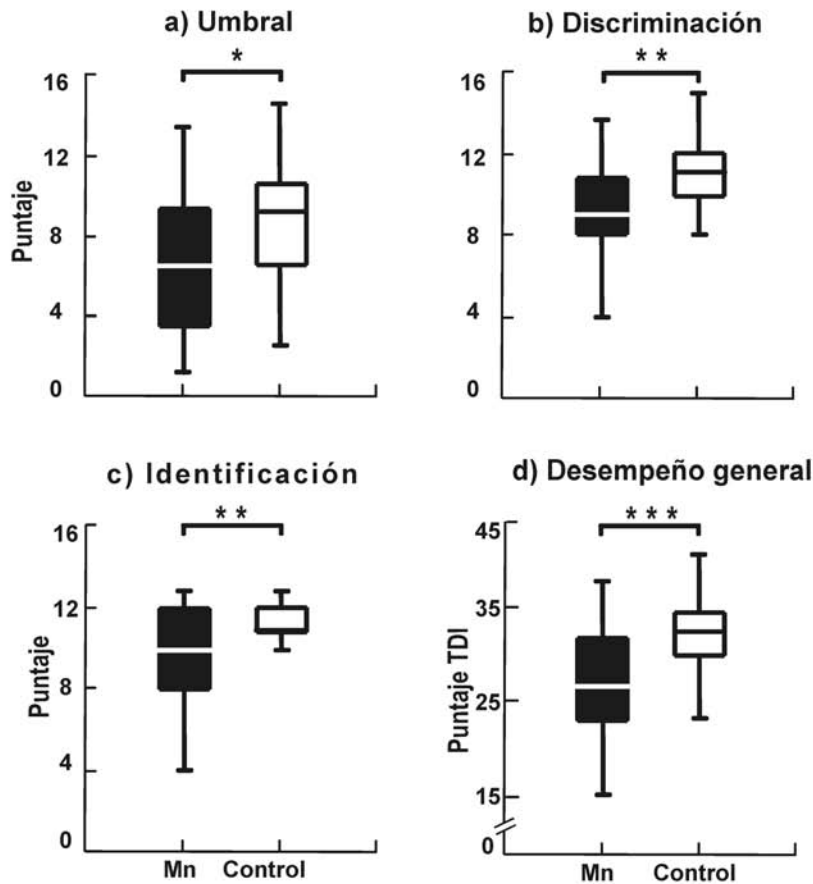


Figura 14. Desempeño de sujetos expuestos a Mn y de sujetos controles en pruebas olfatorias (a-c), así como sus desempeños generales TDI (d) que representan la suma de sus puntajes en estas pruebas. Para cada una de estas pruebas (a) y (b), los sujetos podían obtener un máximo puntaje de 16 respuestas correctas; para la prueba (c) el máximo puntaje posible era de 13, y consecuentemente el puntaje TDI máximo de 45. Diagramas de cajas y bigotes: líneas horizontales dentro de las cajas indican las medianas, los límites horizontales de las cajas dan los rangos intercuartiles, y las barras verticales dan rangos absolutos: N = 30 por grupo, * $P < 0.05$; ** < 0.01 , *** $P < 0.005$ (pruebas *U* de Mann-Whitney). Adaptado de Guarneros et al. 2013.

Interacción con la edad

En todas las pruebas de habilidad olfatoria, el desempeño se correlacionó de modo inverso con la edad de los sujetos. Para el umbral, la identificación, y el desempeño general el declive fue tendencialmente mayor en el grupo expuesto que en el grupo control. El valor de correlación más bajo se registró en la prueba de discriminación para la cual los sujetos expuestos presentaron puntajes notoriamente bajos a cualquier edad. El resultado sugiere una interacción negativa entre la edad y la exposición a Mn, que resulta en un decremento mayor en el desempeño olfatorio en relación con la edad en el grupo expuesto, lo cual sugiere un efecto acumulativo de la exposición crónica (Figura 15).

Los sujetos del grupo expuesto presentaron concentraciones significativamente más altas de Mn en cabello (MnH) que los sujetos del grupo control (Figura 3.3; $U=0.00_{25, 23}$, $P < 0.001$). Basados en las medianas de los puntaje (9.73 $\mu\text{g/g}$ contra 1.01 $\mu\text{g/g}$ respectivamente), la diferencia en la concentración de MnH entre ambos grupos fue de 9 veces (Figura 16). También se encontró una correlación tendencial negativa entre MnH y el desempeño de los sujetos dentro de cada grupo para cada una de las pruebas olfatorias; umbral, discriminación e identificación, y puntajes TDI. Aunque esto fue más claro para el grupo expuesto que para el grupo control, ninguna de las correlaciones alcanzó la significancia.

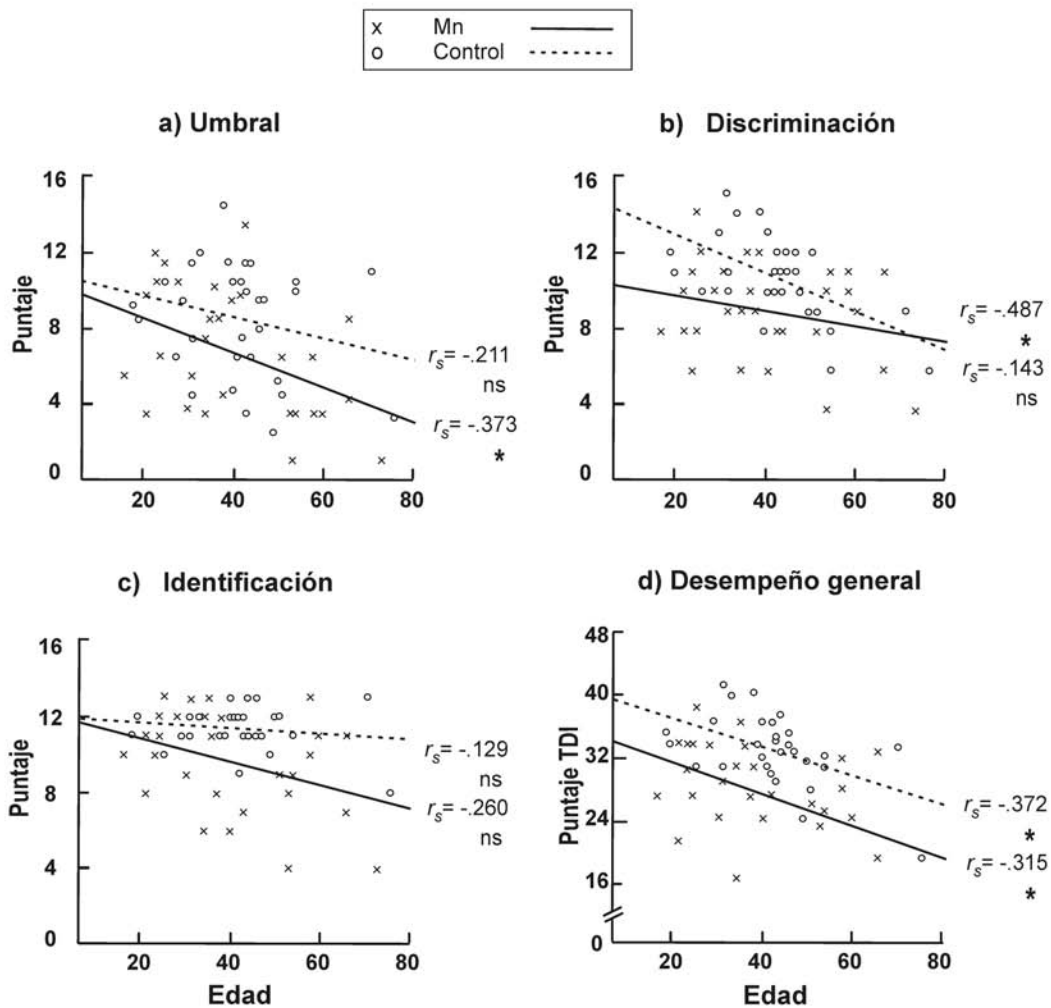


Figura 15. Correlaciones de Spearman entre la edad de los sujetos en años y las tres pruebas de desempeño olfatorio (a-c), así como los puntajes TDI que representan la suma de los puntajes en las tres pruebas olfatorias (d). Las cruces y las líneas sólidas dan los valores para los sujetos expuestos a Mn, y los círculos huecos y líneas punteadas para los sujetos del grupo control; N = 30 por grupo, coeficientes de correlación: * P < 0.05, ns = no significativo.

Contenido de Mn en cabello

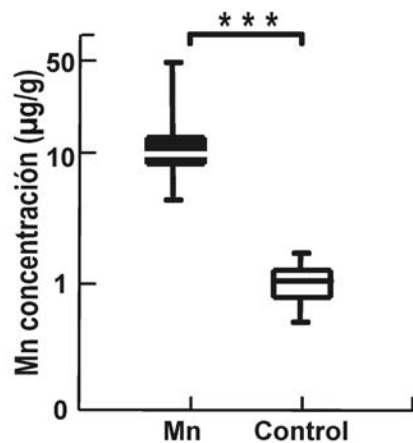


Figura 16. Concentraciones de Mn medidas en el cabello de los sujetos expuestos al metal (N = 25) y de sujetos controles (N = 23). Diagramas de cajas y bigotes: líneas horizontales dentro de las cajas indican las medianas, los límites horizontales de las cajas dan los rangos intercuartiles, y las barras verticales indican los rangos absolutos: ***P < 0.001 (pruebas U de Mann-Whitney).

DISCUSIÓN

Caracterización de la prueba

Se observó que tres de los estímulos de la prueba original de identificación *Sniffin Sticks* desarrollada originalmente para la población alemana (Hummel et al. 1997) no son identificables en la población mexicana. Esto nos permitió retirar de la prueba los estímulos que no son útiles para detectar disfunción olfatoria en la población (Shu y Yuan 2008). Con esto, se demostró la necesidad de considerar la cultura local en la evaluación clínica de la función olfatoria humana (Mackay-Sim et al. 2004; Hummel et al. 2007; Orhan et al. 2012). Esta adaptación es una referencia para futuras investigaciones sobre función olfatoria en la población mexicana.

Efectos del manganeso

Los hallazgos del presente estudio apoyan claramente la predicción de que los sujetos de la comunidad minera de Tolago/Chiconcoac, crónicamente expuestos a niveles elevados de Mn en el ambiente, mostrarían una disminución de la función olfatoria, a pesar de no haber trabajado en actividades relacionadas a la minería. Así, en comparación con los sujetos controles del cercano pueblo de Calnali, una comunidad comparable pero sin actividad minera, los sujetos expuestos a Mn tuvieron un desempeño más bajo en las 3 pruebas de función olfatoria: detección, discriminación, e identificación. Además, el declive normal de la función olfatoria con la edad (Doty et al. 1984) fue mayor para el grupo expuesto que para el grupo control. Particularmente notable fue el pobre desempeño del grupo expuesto en la prueba de identificación de olores, que evalúa la habilidad de los sujetos para reconocer y nombrar olores, y por lo tanto depende de procesos cognitivos asociados con aprendizaje, memoria, y lenguaje, importantes para un amplio rango de funciones cognitivas además del reconocimiento de olores.

Por varias razones, es posible que el Mn aéreo sea un importante causante de los déficits olfatorios observados en los sujetos expuestos. La región de Tolago/Chiconcoac presenta niveles de Mn por encima del nivel de $0.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recomendado por la *Environmental Protection Agency* de los Estados Unidos (US EPA 1997; Solís-Vivanco et al. 2009), y el aire fue señalado como la fuente más significativa de exposición a Mn en Tolago/Chiconcoac (Santos-Burgoa et al. 2001; Rodríguez-Agudelo et al. 2006). Los altos niveles de Mn atmosférico en Tolago/Chiconcoac también son consistentes con las concentraciones estadísticamente mayores de Mn en cabello en los sujetos expuestos en comparación con el grupo control. El hallazgo de tan solo una correlación débil entre MnH y función olfatoria es quizás poco sorprendente dado el pequeño tamaño de muestra y la considerable varianza en los valores de MnH, particularmente entre los sujetos expuestos a Mn (Figura 15). Factores irrelevantes para los fines de esta investigación tales como los efectos crónicos del cuidado capilar pueden afectar la acumulación de Mn considerablemente y contribuir a la magnitud de esa varianza (Smolders et al. 2009). Tampoco existe la certeza acerca de si el Mn fue el único metal, o tóxico liberado al ambiente, que contribuyó a los déficits olfatorios reportados aquí. Sin embargo en un estudio previo en la región focal de Tolago/Chiconcoac se descartó el plomo como contaminante importante en la región, al encontrarse niveles de plomo en sangre similares a los registrados en otras comunidades rurales mexicanas (Santos-Burgoa et al. 2001).

Dado que ninguno de los sujetos había trabajado anteriormente en actividades relacionadas con el Mn, estos hallazgos sugieren que la exposición crónica a este metal, aun a niveles más bajos que los observados en contextos ocupacionales, puede incluso afectar la salud de jóvenes adultos dedicados a actividades que no implican un particular riesgo de exposición laboral (Tabla 1). Los sujetos más pobres de las comunidades, muchos de los cuales trabajan al aire libre, podrían ser incluso más vulnerables a dicha intoxicación.

El conocimiento de la toxicidad de los metales fue desarrollado a través de copiosas investigaciones que comenzaron con el plomo y el mercurio y proceden actualmente con el Mn. Desafortunadamente, la implementación consecuente de medidas preventivas ha sido demasiado lenta, lo que ha derivado en importantes efectos negativos en las poblaciones expuestas. Las reconstrucciones históricas del desarrollo de la investigación han resultado en un entendimiento moderno de los efectos del plomo y el mercurio que han derivado en lecciones útiles para la prevención de la neurotoxicidad por Mn. Se requiere de mayor información acerca de los efectos neurotóxicos y neuroconductuales que ocurren por la exposición crónica a bajos niveles de Mn. Esta es quizás la lección más importante que aprender y aplicar de más de 30 años de neurotoxicología ambiental de metales (Alessio et al. 2007).

Otro tema de investigación para el futuro es cómo el estado nutricional afecta la vulnerabilidad a exposiciones tóxicas. Por ejemplo, las dietas vegetarianas proveen mayores concentraciones de magnesio, cobre y manganeso que las dietas no vegetarianas, pero se desconoce si la vulnerabilidad a la intoxicación por Mn podría depender en cierto grado de la dieta (Haddad et al. 1999).

El presente estudio también demuestra la practicidad de la evaluación olfatoria para monitorear los efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud, y sobre los procesos neurales de modo general, no sólo en pacientes neurológicos, y pacientes con enfermedades respiratorias, sino también en grupos vulnerables y poblaciones expuestas (Hummel et al. 2010b; Calderón-Garcidueñas et al. 2012; Sorokowska et al. 2013). Las pruebas olfatorias tales como los *Sniffin' Sticks* son no invasivas, rápidas y fáciles de aplicar, y confiables independientemente de la escolaridad del paciente, como lo sugiere el buen desempeño de los sujetos expuestos en las tareas olfatorias de identificación mencionadas previamente. Además, las pruebas de olfato tienen una buena aceptación por parte de los sujetos.

En conjunto, los resultados del presente estudio sugieren que la exposición crónica a Mn atmosférico, incluso fuera del ámbito laboral, puede afectar la salud de los residentes. Estos resultados también sugieren que las pruebas olfatorias estandarizadas, no-invasivas, económicas y versátiles como los *Sniffin Sticks* proveen un medio eficiente para monitorear los efectos sobre la salud general de la exposición a niveles potencialmente dañinos de contaminantes atmosféricos como el Mn. En el caso del Mn, esto es relevante no sólo en grupos ocupacionalmente expuestos, sino también en relación a otros temas de interés general como el uso de Mn en gasolinas o en pesticidas, y el debate sobre los efectos de este tipo de contaminación sobre la salud de las comunidades en general (Boudia et al. 2006; Finkelstein y Jerret 2007; Walsh 2007).

Asociación entre exposición tóxica, deterioro olfativo y neurodegeneración

La pérdida del olfato es un síntoma que suele presentarse en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, e inicia años antes que los característicos efectos cognitivos y motores. Por otro lado, diversos estudios señalan vínculos entre la exposición a la contaminación ambiental y la pérdida parcial de función olfatoria en humanos (Hudson et al. 2006; Velázquez-Pérez et al. 2006; Hummel et al. 2010a).

También se han indicado asociaciones entre la inhalación de sustancias tóxicas aéreas y el inicio de procesos neurodegenerativos (Doty 2001, 2008; Bowman et al. 2011), y que los residentes de ciudades con problemas graves de contaminación del aire presentan una acumulación significativamente mayor de la proteína beta-amiloide en el cerebro, en comparación con los residentes de ciudades menos contaminadas (Calderón-Garcidueñas et al. 2004). La presencia de esta proteína es un indicador principal de procesos neurodegenerativos que también se ha asociado a disfunción olfatoria (Wesson et al. 2010).

Aunque la prevalencia de diversos desórdenes neurológicos es comúnmente similar en las ciudades contaminadas del tercer mundo y en otras con alta calidad atmosférica, la investigación epidemiológica indica que la contaminación del aire, aunada a factores vinculados a la pobreza, agrava la prevalencia de condiciones demeciales entre sujetos relativamente jóvenes e incrementa la mortalidad entre los enfermos de mayor edad. Esto resulta en una disminución en la edad promedio de los enfermos; en las ciudades con altos índices de contaminación los jóvenes tienen un mayor riesgo de contraer algún padecimiento neurológico, y los enfermos de mayor edad presentan un mayor riesgo de muerte (Nitrini 2009; Chuang y Phalen 2012; Prince et al. 2012).

La literatura reciente indica efectos neurotóxicos de partículas aéreas, especialmente las de dimensión ultrafina, que pueden ser transportadas por rutas olfatorias y provocar alteraciones morfológicas y neuroquímicas que favorecen la aparición de patologías de tipo neurodegenerativo (ver Antecedentes – Efectos celulares del Mn) (Zoni et al. 2012).

Las fallas en genes implicados en el metabolismo de metales como *PARK 9* o *SLC30A10* (cuyos productos son transportadores de Mn) podrían explicar la susceptibilidad de los individuos a contraer síntomas parkinsónicos, pues se ha visto que las mutaciones homocigóticas en estos genes están asociadas a hipermanganesemia (altas concentraciones de Mn en sangre) y la aparición de síntomas similares a los que se observan en enfermedad de Parkinson (ver Antecedentes – Genes implicados en el metabolismo de Mn). Es posible que las mutaciones heterocigóticas o mutaciones en nucleótidos individuales de genes como *SLC30A10* o *PARK 9* interactúen con la exposición ambiental para promover y exacerbar el inicio de una enfermedad de Parkinson de otro modo considerada idiopática (DeWitt et al. 2013).

El Mn es tan solo un ejemplo de los metales que existen en ambientes de exposición. La contaminación urbana es rica en metales (Calderón-Garcidueñas et al. 2013), y varios de ellos son capaces de transportarse al cerebro por vías olfatorias, por ejemplo, el cadmio, el níquel y el mercurio (Gottofrey and Tjalve 1991, Borg-Neczak y Tjälve 1996; Tjälve et al. 1996; Henriksson et al. 1997; Tallkvist et al. 1998; Henrikson y Tjälve 1998). Así pues, parece plausible que el ingreso de agentes tóxicos por rutas olfatorias sea un factor detonante de procesos neurodegenerativos en poblaciones expuestas (Doty 2008).

Los avances en la comprensión de este fenómeno podrían influir positivamente en los métodos diagnósticos y de tratamiento, y también son potencialmente importantes para el planteamiento de iniciativas de salud pública en ciudades con mala calidad del aire, donde la proporción de adultos mayores va en aumento (Guarneros et al. 2009, 2011).

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que la exposición no ocupacional a manganeso aéreo está asociada a decrementos de la función olfatoria periférica y central.

REFERENCIAS

Alessio L, Campagna M, Lucchini R. 2007. From lead to manganese through mercury: mythology, science, and lessons for prevention. *American Journal of Industrial Medicine* 50:779-787.

Allinovi R, Vettori MV, Mutti A, Cavazzini S, Bacchini A, Bergamaschi E. 1996. Dopamine (DA) metabolism in PC12 cells exposed to manganese (Mn) at different oxidation states. *Neurotoxicology* 17: 743-750.

Ansari KA, Johnson A. 1975. Olfactory function in patients with Parkinson's disease. *Journal of Chronic Diseases* 28:493-497.

Antunes MB, Bowler R, Doty RL. 2007. San Francisco/Oakland Bay Bridge Welder Study: olfactory function. *Neurology* 69:1278-1284.

Aschenbrenner K, Hummel C, Teszmer K, Krone F, Ishimaru T, Seo HS, Hummel T. 2008. The influence of olfactory loss on dietary behaviors. *Laryngoscope* 118:135-144.

Aschner M. 2000. Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environmental Health Perspectives* 108:429-432.

Aschner M, Aschner JL. 1991. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood brain barrier transport. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 15: 333-340.

Aschner M, Gannon M. 1994. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Research Bulletin* 33: 345-349.

Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W. 2007. Manganese: recent advances in understanding transport and neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221:131-147.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2008. Toxicological profile for manganese. US Department of Health and Human Services; Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.html>.

Ayabe-Kanamura S, Schicker I, Laska M, Hudson R, Distel H, Kobayakawa T, Saito S. 1998. Differences in perception of everyday odors: a Japanese-German cross-cultural study. *Chemical Senses* 23:31-38.

Benítez-King G, Riquelme A, Ortiz-Lopez L, Berlanga C, Rodríguez-Verdugo MS, Romo F, Calixto E, Solís-Chagoyán H, Jiménez M, Montaña LM, Ramírez-Rodríguez G, Morales-Mulia S, Domínguez-Alonso A. 2013. A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *Schizophrenia Research* 143:384-389.

Berglund B, Lindvall T, Nordin S. 1992. Environmentally induced changes in sensory sensitivities. *Annals of the New York Academy of Sciences* 64:304-321.

Boat T, Carson J. 1990. Ciliary dysmorphology and dysfunction – primary or acquired? *New England Journal of Medicine* 323:1700-1702.

Borg-Neczak K, Tjälve H. 1996. Uptake of $^{203}\text{Hg}^{2+}$ in the olfactory system in pike. *Toxicology Letters* 84:107-112.

Boudia N, Halley R, Kennedy G, Lambert J, Gareau L, Zayed J. 2006. Manganese concentrations in the air of the Montreal (Canada) subway in relation to surface automobile traffic density. *Science of the Total Environment* 366:143-147.

Bowler RM, Roels HA, Nakagawa S, Drezgic M, Diamond E, Park R, Koller W, Bowler RP, Mergler D, Bouchard M. 2007. Dose-effect relationships between manganese exposure and neurological, neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders. *Occupational and Environmental Medicine* 64:167-177.

Bowler RM, Gocheva V, Harris M, Ngo L, Abdelouahab N, Wilkinson J, Doty RL, Park R, Roels HA. 2011. Prospective study on neurotoxic effects in manganese-exposed bridge construction welders. *Neurotoxicology* 32:596-605.

Bowler RM, Harris M, Gocheva V, Wilson K, Kim Y, Davis SI, Bollweg G, Lobdell DT, Ngo L, Roels HA. 2012. Anxiety affecting parkinsonian outcome and motor efficiency in adults of an Ohio community with environmental airborne manganese exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215:393-405.

Boyle JA, Frasnelli J, Gerber J, Heinke M, Hummel T. 2007. Cross-modal integration of intranasal stimuli: a functional magnetic resonance imaging study. *Neuroscience* 149:223-231.

Bowman AB, Kwakye GF, Herrero-Hernández E, Aschner M. 2011. Role of manganese in neurodegenerative diseases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 25:191-203.

Buschhüter D, Smitka M, Puschmann S, Gerber JC, Witt M, Abolmaali ND, Hummel T. 2008. Correlation between olfactory bulb volumen and olfactory function. *Neuroimage* 42:498-502.

Calderón-Garcidueñas L, Rodríguez-Alcaraz A, García R, Sánchez G, Barragán G, Camacho R, Ramírez L. 1994. Human nasal mucosal changes after exposure to urban pollution. *Environmental Health Perspectives* 102:1074-1080.

Calderón-Garcidueñas L, Osnaya N, Ramírez-Martínez L, Villarreal-Calderón A. 1996. DNA strand breaks in human nasal respiratory epithelium are induced upon exposure to urban pollution. *Environmental Health Perspectives* 104:160-168.

Calderón-Garcidueñas L, Osnaya N, Rodríguez-Alcaraz A, Villarreal-Calderón A. 1997. DNA damage in nasal respiratory epithelium from children exposed to urban air pollution. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30:11-20.

Calderón-Garcidueñas L, Rodríguez-Alcaraz A, Villarreal-Calderón A, Lyght O, Janszen D, Morgan K. 1998. Nasal epithelium as a sentinel for airborne environmental pollution. *Toxicological Sciences* 46:352-364.

Calderón-Garcidueñas L, Rodríguez-Alcaraz A, García R, Barragán G, Villarreal-Calderón A, Madden MC. 1999. Cell proliferation in nasal respiratory epithelium of people exposed to urban pollution. *Carcinogenesis* 20:383-389.

Calderón-Garcidueñas L, Devlin RB, Miller FJ. 2000. Respiratory tract pathology and cytokine imbalance in clinically healthy children chronically and sequentially exposed to air pollutants. *Medical Hypotheses* 55:373-378.

Calderón-Garcidueñas L, Valencia-Salazar G, Rodríguez-Alcaraz A, Gambling MT, García R, Osnaya N, Villarreal-Calderón A, Devlin R, Carson J. 2001. Ultrastructural nasal pathology in children chronically and sequentially exposed to air pollutants. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 24:132-138.

Calderón-Garcidueñas L, Azzarelli B, Acuña H, García R, Gambling T, Osnaya N, Monroy S, Rizapantzi M, Carson J, Villarreal-Calderón A, Rewcastle B. 2002. Air pollution and brain damage. *Toxicologic Pathology* 30:373-389.

Calderón-Garcidueñas L, Maronpot RR, Torres-Jardón R, Henríquez-Roldán C, Schoonhoven R, Acuña-Ayala H, Villarreal-Calderón A, Nakamura J, Fernando R,

Reed W, Azzarelli B, Swenberg JA. 2003. DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicologic Pathology* 31:524-538.

Calderón-Garcidueñas L, Reed W, Maronpot RR, Henríquez-Roldán C, Delgado-Chávez R, Calderón-Garcidueñas A, Dragustinovis I, Franco-Lira M, Aragón-Flores M, Solt AC, Altenburg M, Torres-Jardón R, Swenberg JA. 2004. Brain inflammation and Alzheimer's like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicologic Pathology* 32:650-658.

Calderón-Garcidueñas L, Franco-Lira M, Henríquez-Roldán C, Osnaya N, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Villarreal-Calderón R, Herrit L, Brooks D, Keefe S, Palacios-Moreno J, Villarreal-Calderón R, Torres-Jardón R, Medina-Cortina H, Delgado-Chávez R, Aiello-Mora M, Maronpot RR, Doty RL. 2009. Urban air pollution: influences on olfactory function and pathology in exposed children and young adults. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62:91-102.

Calderón-Garcidueñas L, Serrano-Sierra A, Torres-Jardón R, Zhu H, Yuan Y, Smith D, Delgado-Chávez R, Cross JV, Medina-Cortina H, Kavanaugh M, Guilarte TR. 2013. The impact of environmental metals in young urbanites' brains. *Experimental and Toxicologic Pathology* 65:503-511.

Calof AL, Bonnin A, Crocker C, Kawauchi S, Murray RC, Shou J, Wu HH. 2002. Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microscopy Research and Technique* 58:176-188.

Campbell A. 2004. Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1035:117-123.

Carmichael ST, Clugnet MC, Price JL. 1994. Central olfactory connections in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology* 346:403-434.

Carmona A, Devès G, Stéphane R, Cloetens P, Bohic S, Ortega R. 2010. Manganese accumulates within Golgi apparatus in dopaminergic cells as revealed by synchrotron x-ray fluorescence nanoimaging. *ACS Chemical Neuroscience* 1:194-203.

Catalán-Vázquez M, Schilman A, Riojas-Rodríguez H. 2010. Perceived health risks of manganese in the Molango Mining District, Mexico. *Risk Analysis* 30: 619-634.

Catalán-Vázquez M, Riojas-Rodríguez H, Pelcastre-Villafuerte BE. 2012. Risk perception and social participation among women exposed to manganese in the mining district of the state of Hidalgo, Mexico. *Science of the Total Environment* 414:43-52.

Chen B, Kan H. 2008. Air pollution and population health: a global challenge. *Environmental Health and Preventive Medicine* 13:94-101.

Chen R, Cai J, Meng X, Kim H, Honda Y, Guo YL, Samoli E, Yang X, Kan H. 2014. Ozone and daily mortality rate in 21 cities of east Asia: how does season modify the association? *American Journal of Epidemiology* (en prensa).

Chu NS, Huang CC, Calne DB. 1996. Sympathetic skin response and RR interval variation in manganese and a comparison with Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2:23-28.

Chuang JY, Phalen RF. 2012. Dementia incidence in middle income countries. *The Lancet* 380:1470.

Church J, Williams H. 2001. Another sniffer dog for the clinic? *The Lancet* 358:930.

Colín-Barenque L, Ávila-Costa MR, Fortoul T, Rugerio-Vargas C, Machado-Salas JP, Espinosa-Villanueva J, Rivas-Arancibia S. 1999. Morphologic alterations of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats. *Neuroscience Letters* 274:1-4.

Cometto-Muñiz JE, Cain WS. 1991. Influence of air-borne contaminants on olfaction and taste in health and disease. En: TV Getchell, RL Doty, LM Bartoshuk, JB Snow (Eds.). *Smell and taste in health and disease*. pp. 765-785. Nueva York: Raven.

Cometto-Muñiz JE, Cain WS. 1998. Trigeminal and olfactory sensitivity: comparison of modalities and methods of measurement. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 71:105-110.

Cortez-Lugo M, Escamilla-Núñez C, Barraza-Villarreal A, Texcalac-Sangrador JL, Chow J, Watson J, Hernández-Cadena L, Romieu I. 2013. Association between light absorption measurements of PM_{2.5} and distance from heavy traffic roads in the Mexico city metropolitan área. *Salud Pública de México* 55:155-161.

Crews L, Hunter D. 1994. Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspectives on Developmental Neurobiology* 2:151-161.

Croy I, Negoias S, Novakova L, Landis BN, Hummel T. 2012. Learning about the functions of the olfactory system from people without a sense of smell. *PloS One* 7:e33365.

Crump KS, Rousseau P. 1999. Results from eleven years of neurological health surveillance at a manganese oxide and salt producing plant. *Neurotoxicology* 20:273-286.

Dalton P, Dilks D, Hummel T. 2006. Effects of long-term exposure to volatile irritants on sensory thresholds, negative mucosal potentials and event-related potentials. *Behavioral Neuroscience* 120:180-189.

Damasio A, Carvalho GB. 2013. The nature of feelings: evolutionary and neurobiological origins. *Nature Reviews Neuroscience* 14:143-152.

Daum RF, Sekinger B, Kopal G, Lang CJ. 2000. Olfactory testing with 'sniffin' sticks' for clinical diagnosis of Parkinson disease. *Neurologist* 71:643-650.

Davis JM. 1998. Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl: health risk uncertainties and research directions. *Environmental Health Perspectives* 106: 191-201.

DeWitt MR, Chen P, Aschner M. 2013. Manganese efflux in Parkinsonism: insights from newly characterized SLC30A10 mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 432:1-4.

Distel H, Ayabe-Kanamura S, Martínez-Gómez M, Schicker I, Kobayakawa T, Saito S, Hudson R. 1999. Perception of everyday odors –correlation between intensity, familiarity and strength of hedonic judgement. *Chemical Senses* 24:191-199.

Distel H, Hudson R. 2001. Judgement of odor intensity is influenced by subjects' knowledge of the odor source. *Chemical Senses* 26:247-251.

Dorman DC, Struve MF, Clewell HJ 3rd, Andersen ME. 2006. Application of pharmacokinetic data to the risk assessment of inhaled manganese. *Neurotoxicology* 27:752-764.

Dorman DC, Struve MF, Wong BA, Marshall MW, Gross EA, Willson GA. 2008. Respiratory tract responses in male rats following subchronic acrolein inhalation. *Inhalation Toxicology* 20:205-216.

Doty RL. 2001. Olfactory deficit in Alzheimer's disease? *American Journal of Psychiatry*. 158:1533-1534.

Doty RL. 2005. Clinical studies of olfaction. *Chemical Senses* 30:207-209.

Doty RL. 2008. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Annals of Neurology* 63:7-15.

Doty RL. 2012. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology* 8:329–339.

Doty RL, Brugger WPE, Jurs PC, Orndorff MA, Snyder PJ, Lowry LD. 1978. Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiology and Behavior* 20:175-185.

Doty RL, Shaman P, Applebaum SL, Giberson R, Sikorski L, Rosenberg L. 1984. Smell identification ability: changes with age. *Science*. 226:1441-1443.

Doty RL, Deems DA, Stellar S. 1988. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage or disease duration. *Neurology* 38:1237–1244.

Doty RL, Kreiss DS, Frye RE. 1990. Human odor intensity perception: correlation with frog epithelial adenylate cyclase activity and transepithelial voltage response. *Brain Research* 527:130-134.

Doty RL, Perl DP, Steele JC, Chen KM, Pierce JDJr, Reyes P, Kurland LT. 1991. Olfactory dysfunction in three neurodegenerative diseases. *Geriatrics* 46: 47-51.

Doty RL, Golbe LI, McKeown DA, Stern MB, Lehrach CM, Crawford D. 1993. Olfactory testing differentiates between progressive supranuclear palsy and idiopathic Parkinson's disease. *Neurology* 43:962–965.

Duffy VB, Backstrand JR, Ferris AM. 1995. Olfactory dysfunction and related nutritional risk in free-living, elderly women. *Journal of the American Dietetic Association* 95:879-884.

Eastman RR, Jursa TP, Benedetti C, Lucchini RG, Smith DR. 2013. Hair as a biomarker of environmental manganese exposure. *Environmental Science and Technology* 47:1629-1637.

Elbetieha A, Bataineh H, Darmani H, Al-Hamood MH. 2001. Effects of long term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. *Toxicology Letters* 119: 193-201.

Erikson KM, Dobson AW, Dorman DC, Aschner M. 2004. Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. *Science of the Total Environment* 334-335: 409-416.

Escada PA, Lima C, da Silva JM. 2009. The human olfactory mucosa. *European Archives of Otorhinolaryngology* 266:1675-1680.

Fallon A, Rozin P. 1983. The psychological bases of food rejection by humans. *Ecology of Food and Nutrition* 13:15-26.

Fernández-Ruiz J, Díaz R, Hall-Haro C, Vergara P, Fiorentini A, Núñez L, Drucker-Colín R, Ochoa A, Yescas P, Rasmussen A, Alonso ME. 2003. Olfactory dysfunction in hereditary ataxia and basal ganglia disorders. *Neuroreport* 14:1339-1341.

Feron F, Perry C, McGrath JJ, Mackay-Sim A. 1998. New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery* 124:861-866.

Figueres-Oñate M, Gutiérrez Y, López-Mascaraque L. 2014. Unraveling Cajal's view of the olfactory system. *Frontiers in Neuroanatomy* 8:55.

Finkelstein NM, Jerret M. 2007. A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities. *Environmental Research* 104:420-432.

Firestein S. 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413:212-218.

Fitsanakis VA, Piccola G, Marreilha dos Santos AP, Aschner JL, Aschner M. 2007. Putative proteins involved in manganese transport across the blood-brain barrier. *Human and experimental toxicology* 26:295-302.

Frasnelli J, Charbonneau G, Collignon O, Lepore F. 2009. Odor localization and sniffing. *Chemical Senses* 34:139-144.

Gavin CE, Gunter KK, Gunter TE. 1999. Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity. *Neurotoxicology* 20:445-453.

Gokoffski KK, Kawauchi S, Wu HH, Santos R, Hollenbeck LWH, Lander AD, Calof AL. 2010. Chapter 10. Feedback regulation of neurogenesis in the mammalian olfactory epithelium: new insights from genetics and systems biology. En: Menini (Ed.). *Neurobiology of olfaction*. Florida: CRC Press.

Gottfried JA. 2010. Central mechanisms of odour object perception. *Nature Reviews Neuroscience* 11:628-641.

Gottfried JA, Winston JS, Dolan RJ. 2006. Dissociable codes of odor quality and odorant structure in human piriform cortex. *Neuron* 49:467-479.

Gottofrey J, Tjälve H. 1991. Axonal transport of cadmium in the olfactory nerve of the pike. *Pharmacology and Toxicology* 69:242-52.

Grabenhorst F, Rolls ET, Margot C. 2011. A hedonically complex odor mixture produces an attentional capture effect in the brain. *Neuroimage* 55:832-843.

Guarneros M, Hummel T, Martínez-Gómez M, Hudson R. 2009. Mexico City air pollution adversely affects olfactory function and intranasal trigeminal sensitivity. *Chemical Senses* 34:819-826.

Guarneros M, Drucker-Colín R, Esquivelzeta J, Hudson R. 2011. Adverse effect of air pollution on odor perception. En: Moldoveanu AM (Ed.). *Advanced topics in environmental health and air pollution case studies*. pp. 307-326. Rijeka, Croacia: In Tech.

Guarneros M, Ortiz-Romo N, Alcaraz-Zubeldia M, Drucker-Colín R, Hudson R. 2013. Nonoccupational environmental exposure to manganese is linked to deficits in peripheral and central olfactory function. *Chemical Senses* 38:783–791.

Gunter TE, Gerstner B, Gunter KK, Malecki J, Gelein R, Valentine WM, Ashner M, Yule DI. 2012. Manganese transport via the transferrin mechanism. *Neurotoxicology* 34:118-127.

Hacquemand R, Jacquot L, Brand G. 2010. Comparative fear-related behaviors to predator odors (TMT and natural fox feces) before and after intranasal ZnSO₄ treatment in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4:188.

Haddad EH, Berk LS, Kettering JD, Hubbard RW, Peters WR. 1999. Dietary intake and biochemical, hematologic, and immune status of vegans compared with nonvegetarians. *American Journal of Clinical Nutrition* 70:586S-593S.

Haehner A, Hummel T, Hummel C, Sommer U, Junghanns S, Reichmann H. 2007. Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease. *Movement Disorders* 22:839-842.

Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay-Sim A, Fleischmann J, Silburn PA, Johnston AN, Mellick GD, Herting B, Reichmann H, Hummel T. 2009. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease— a multicenter study. *Parkinsonism and Related Disorders* 15:490–494.

Halpern PB. 1982. Environmental factors affecting chemoreceptors: an overview. *Environmental Health Perspectives* 44:101-105.

Harkema RJ, Plopper C, Hyde D, George J, Wilson D, Dungworth D. 1987. Response of the macaque nasal epithelium to ambient levels of ozone. *The American Journal of Pathology* 128:29-44.

Hastings L, Miller ML. 2003. Influence of environmental toxicants on olfactory function. En: RL Doty (Ed.). *Handbook of olfaction and gustation*. Segunda Edición, pp. 575-592. Filadelfia: Marcel Dekker.

Hawkes C. 2006. Olfaction in neurodegenerative disorder. En: Hummel T, Welge-Lüssen A (Eds.). *Taste and Smell: an update*. *Advances in Otorhinolaryngology* vol 63, pp.133-151. Basilea, Suiza: Karger.

Hedner M, Larsson M, Arnold N, Zucco FM, Hummel T. 2010. Cognitive factors in odor detection, odor discrimination, and odor identification tasks. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 32:1062–1067.

Heiser C, Grupp K, Hörmann K, Stuck BA. 2010. Loss of olfactory function after exposure to barbituric acid. *Auris Nasus Larynx* 37:103-105.

Henriksson J, Tallkvist J, Tjälve H. 1997. Uptake of nickel into the brain via olfactory neurons in rats. *Toxicology Letters* 92:153-162.

Herz RS. 2009. Symposium overview: Basic processes in human olfactory cognition: current findings and future directions. *Annals of the New York Academy of Science* 1170:313-317.

Hudnell HK. 1999. Effects from environmental Mn exposures: a review of the evidence from non-occupational exposure studies. *Neurotoxicology* 20:379-397.

Hudson R. 1999. From molecule to mind: the role of experience in shaping olfactory function. *Journal of Comparative Physiology A* 185:297-304.

Hudson R. 2000. Odor and odorant: a terminological clarification. *Chemical Senses* 25:693.

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

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

Hudson L, Silva MC, Núñez JC, Gómez R, Venegas-Francke P. 2012. Valores normales de olfato, hiposmia y anosmia en población chilena sana según la batería “sniffin sticks”. *Revista Médica de Chile* 140:442–446.

Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. 2001. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson’s disease. *Neurology* 57:1497-1499.

Hummel T. 2000. Assessment of intranasal trigeminal function. *International Journal of Psychophysiology* 36:147-155.

Hummel T, Sekinger B, Wolf S, Pauli E, Kobal G. 1997. ‘Sniffin’ Sticks’: olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chemical Senses* 22:39-52.

Hummel T, Futschik T, Frasnelli J, Hüttenbrink KB. 2003. Effects of olfactory function, age, and gender on trigeminally mediated sensations: a study based on the lateralization of chemosensory stimuli. *Toxicology Letters* 140-141:273-280.

Hummel T, Mojet J, Kobal G. 2006. Electro-olfactograms are present when odorous stimuli have not been perceived. *Neuroscience Letters* 397:224-228.

Hummel T, Kobal G, Gudziol H, Mackay-Sim A. 2007. Normative data for the “Sniffin’ Sticks” including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: an upgrade based on a group of more than 3,000 subjects. *European Archives of Otorhinolaryngology* 264:237–243.

Hummel T, Fliessbach K, Abele M, Okulla T, Reden J, Reichmann H, Wullner U, Haehner A. 2010a. Olfactory fMRI in patients with Parkinson’s disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 4:125.

Hummel T, Witt M, Reichmann H, Welge-Luessen A, Haehner A. 2010b. Immunohistochemical, volumetric, and functional neuroimaging studies in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 289:119-122.

Jacob S, McClintock MK, Zelano B, Ober C. 2002. Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor. *Nature Genetics* 30:175-179.

Juárez-Santillán LF, Lucho-Constantino CA, Vázquez-Rodríguez GA, Cerón Ubila NM, Beltrán-Hernández RI. 2010. Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo, Mexico. *Bioresource Technology* 101:5836-5841.

Katotomichelakis M, Balatsouras D, Tripsianis G, Tsaroucha A, Homsoglou E, Danielides V. 2006. Normative values of olfactory function testing using the 'Sniffin' Sticks'. *Laryngoscope* 117:114–120.

Kjaergaard SK, Hempel-Jorgensen A, Molhave L, Andersson K, Juto JE, Stridh G. 2004. Eye trigeminal sensitivity, tear film stability and conjunctival epithelium damage in 182 non-allergic, non-smoking Danes. *Indoor Air* 14:200-207.

Kobal G, Klimek L, Wolfensberger M, Gudziol H, Temmel A, Owen CM, Seeber H, Pauli E, Hummel T. 2000. Multicenter investigation of 1,036 subjects using a standardized method for the assessment of olfactory function combining tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds. *European Archives of Otorhinolaryngology* 257:205-211.

Kuehn M, Welsch H, Zahnert T, Hummel T. 2008. Changes of pressure and humidity affect olfactory function. *European Archives of Otorhinolaryngology* 263:299–302.

Lapid H, Hummel T. 2013. Recording odor-evoked response potentials at the human olfactory epithelium. *Chemical Senses* 38:3-17.

Laska M, Distel H, Hudson R. 1997. Trigeminal perception of odorant quality in congenitally anosmic subjects. *Chemical Senses* 22:447-456.

Leavens TL, Rao D, Andersen ME, Dorman DC. 2007. Evaluating transport of manganese from olfactory mucosa to striatum by pharmacokinetic modeling. *Toxicological Sciences* 97:265-278.

Leopold DA, Hummel T, Schwob JE, Hong SC, Knecht M, Kobal G. 2000. Anterior distribution of human olfactory epithelium. *Laryngoscope* 110:417-421.

Lewis JL, Dahl AR. 1995. Olfactory mucosa: composition, enzymatic localization, and metabolism. En: RL Doty (Ed.). *Handbook of olfaction and gustation*. Segunda Edición, pp. 33. Filadelfia: Marcel Dekker.

Li W, Lopez L, Osher J, Howard JD, Parrish TB, Gottfried JA. 2010. Right orbitofrontal cortex mediates conscious olfactory perception. *Psychological Science* 21:1454-1463.

Li Y, Wu J, Zhou W, Gao E. 2012. Effects of manganese on routine semen quality parameters: results from a population-based study in China. *BMC Public Health* 12:919.

Li X, Xie J, Lu L, Zhang L, Zhang L, Zou Y, Wang Q, Luo X, Li S. 2013. Kinetics of manganese transport and gene expressions of manganese transport carriers in Caco-2 cell monolayers. *Biometals* 26:941-953.

Lötsch J, Reichmann H, Hummel T. 2008. Different odor tests contribute differently to the diagnostics of olfactory loss. *Chemical Senses* 33:17-21.

Lucchini RG, Selis L, Foli D, Apostoli P, Mutti A, Vanoni O, Iregren A, Alessio L. 1995. Neurobehavioral effects of manganese in workers from a ferroalloy plant after temporary cessation of exposure. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 21:143-149.

Lucchini RG, Guazzetti S, Zoni S, Benedetti C, Fedrighi C, Peli M, Donna F, Bontempi E, Borgese L, Micheletti S, Ferri R, Marchetti S, Smith DR. 2014. Neurofunctional dopaminergic impairment in elderly after lifetime exposure to manganese. *Neurotoxicology* pii: S0161-813X(14)00087-4.

Ma M. 2007. Encoding olfactory signals via multiple chemosensory systems. *Crit Rev Biochem Mol Bio* 42: 463-480.

Mackay-Sim A, Grant L, Owen C, Chant D, Silburn P. 2004. Australian norms for a quantitative olfactory function test. *Journal of Clinical Neuroscience* 11:874–879.

Martínez-Capoccioni G, Alobid I. 2012. Métodos de exploración objetiva del olfato. *Revista de Rinología* 12:29–39.

McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, Janecki T (2006). Diagnostic accuracy of canine scent detection in early and late stage lung and breast cancers. *Integrative cancer therapies* 5:30-39.

Menezes-Filho JA, Paes CR, Pontes AM, Moreira JC, Sarcinelli PN, Mergler D. 2009. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. *Neurotoxicology* 30:1207-1213.

Mergler D, Baldwin M, Bélanger S, Larribe F, Beuter A, Bowler R, Panisset M, Edwards R, de Geoffroy A, Sassine MP. 1999. Manganese neurotoxicity, a

continuum of dysfunction: results from a community based study. *Neurotoxicology* 20:327-342.

Miwa T, Furukawa M, Tsukatani T, Costanzo RM, DiNardo LJ, Reiter ER. 2001. Impact of olfactory impairment on quality of life and disability. *Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 127:497-503.

Molina LT, Molina MJ. 2004. Improving air quality in megacities: Mexico City case study. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1023:142-158.

Morrison EE, Costanzo RM. 1990. Morphology of the human olfactory epithelium. *Journal of Comparative Neurology* 297:1-13.

Nam J, Kim K. 2008. Abnormal motor function and the expression of striatal dopamine D2 receptors in manganese-treated mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31:1894-1897.

Neumann C, Tsioulos K, Merkonidis C, Salam M, Clark A, Philpott C. 2012. Validation study of the "Sniffin' Sticks" olfactory test in a British population: a preliminary communication. *Clinical Otolaryngology* 37:23–27.

Nitrini R. 2012. Dementia incidence in middle-income countries. *The Lancet* 380:1470.

Orhan KS, Karabulut B, Keles N, Deger K. 2012. Evaluation of factors concerning the olfaction using the Sniffin' Sticks test. *Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 146:240–246.

Pal PK, Samii A, Calne DB. 1999. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 20:227-238.

Parrish DD, Zhu T. 2009. Climate change. Clean air for megacities. *Science* 326:674-675.

Pause BM. 2004. Is the human skin a pheromone-producing organ? *Journal of Cosmetic Dermatology* 3:223-228.

Pellizzari ED, Clayton CA, Rodes CE, Mason RE, Piper LL, Fort B, Pfeifer G, Lynam D. 2001. Particulate matter and manganese exposures in Indianapolis, Indiana. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 11:423-440.

Pfeifer GD, Roper JM, Dorman D, Lynam DR. 2004. Health and environmental testing of manganese exhaust products from use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in gasoline. *Science of the Total Environment* 334-335:397-408.

Plailly J, Howard JD, Gitelman DR, Gottfried JA. 2008. Attention to odor modulates thalamocortical connectivity in the human brain. *Journal of Neuroscience* 33:5750-5760.

Pifferi S, Menini A, Kurabashi T. 2010. Chapter 8: Signal transduction in vertebrate olfactory cilia. En: A Menini (Ed.). *Neurobiology of olfaction*. Florida: CRC Press.

Porter J, Craven B, Khan R, Chang SJ, Kang I, Judkewitz B, Volpe J, Settles G, Sobel N. 2007. Mechanisms of scent tracking in humans. *Nature Neuroscience* 10:27-29.

Price JL. 1990. Olfactory system. Paxinos G (Ed): *The human nervous system*. pp.979-998. San Diego: Academic Press.

Prince M, Acosta D, Ferri CP, Guerra M, Yueqin H, Libre-Rodríguez JJ, Salas A, Sosa AL, Williams JD, Dewey ME, Acosta I, Jotheeswaran AT, Liu Z. 2012.

Dementia incidence and mortality in middle-income countries, and associations with indicators of cognitive reserve: 10/66 Dementia Research Group population-based cohort study. *The Lancet* 380:50-58.

Quadri M, Federico A, Zhao T, Breedveld GJ, Battisti C, Delnooz C, Severjinen LA, Di Toro Mammarella L, Mignarri A, Monti L, Sanna A, Lu P, Punzo F, Cossu G, Willemsen R, Rasi F, Oostra BA, van de Warrenburg BP, Bonifati V. 2012. Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease. *American Journal of Human Genetics* 90:467-477.

Ramón y Cajal S. 1894. Croonian Lecture: la fine structure des centres nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London* 55:444-468.

Rawson N, Yee K. 2006. Transduction and Coding. En: T Hummel, A Welge-Lüssen (Eds.). *Taste and smell: an update. Advances in otorhinolaryngology*. Basel, Karger, vol 63, pp.23-43.

Riojas-Rodríguez H, Solís-Vivanco R, Schilman A, Montes S, Rodríguez S, Ríos C, Rodríguez-Agudelo Y. 2010. Intellectual function in Mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. *Environmental Health Perspectives* 118: 1465-1470.

Riveron J, Boto T, Alcorta E. 2009. The effect of environmental temperature on olfactory perception in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 55:943–951.

Rodríguez-Agudelo Y, Riojas-Rodríguez H, Ríos C, Rosas I, Sabido-Pedraza E, Miranda J, Siebe C, Tecalac JL, Santos-Burgoa C. 2006. Motor alterations

associated with exposure to manganese in the environment in Mexico. *Science of the Total Environment* 368:542-556.

Ronnett GV, Snyder SH. 1992. Molecular messengers of olfaction. *Trends in Neuroscience* 15:508-513.

Ross W, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, Launer L, White LR. 2005. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 63:167-173.

Saive AL, Royet JP, Plailly J. 2014. A review on the neural bases of episodic odor memory: from laboratory-based to autobiographical approaches. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* doi:10.3389/fnbeh.2014.00240.

Sakurai H, Nishida M, Yoshimura T, Takada J, Koyama M. 1985. Partition of divalent and total manganese in organs and subcellular organelles of MnCl₂-treated rats studied by ESR and neutrón activation analysis. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects* 841:208-214.

Saldarriaga-Noreña H, Hernández-Mena L, Ramírez-Muñiz M, Carbajal-Romero P, Cosío-Ramírez R, Esquivel-Hernández B. 2009. Characterization of trace metals of risk to human health in airborne particulate matter (PM_{2.5}) at two sites in Guadalajara, Mexico. *Journal of Environmental Monitoring* 11:887-894.

Santos DV, Reiter ER, DiNardo LJ, Costanzo RM. 2004. Hazardous events associated with impaired olfactory function. *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery* 130:317-319.

Santos-Burgoa C, Rios C, Mercado LA, Aréchiga-Serrano R, Cano-Valle F, Eden-Wynter RA, Texcalac-Sangrador JL, Villa-Barragán JP, Rodríguez-Agudelo Y,

Montes S. 2001. Exposure to manganese: health effects on the general population, a pilot study in central Mexico. *Environmental Research* 85:90-104.

Savic I, Gulyas B. 2000. PET shows that odors are processed both ipsilaterally and contralaterally to the stimulated nostril. *Neuroreport* 11:2861-2866.

Scheibe M, Zahnert T, Hummel T. 2006. Topographical differences in the trigeminal sensitivity of the human nasal mucosa. *Neuroreport* 17:1417-1420.

Schierhorn K, Zhang M, Matthias C, Kunkel G. 1999. Influences of ozone and nitrogen dioxide on histamine and interleukin formation in a human nasal mucosa culture system. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20:1013-1019.

Secretaría de Gobernación. 2010. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México: Estado de Hidalgo. Disponible en www.inafed.gob.mx

Sela L, Sobel N. 2010. Human olfaction: a constant state of change-blindness. *Experimental Brain Research* 205:13-29.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2012. Informe de la situación del medio ambiente en México: compendio de estadísticas ambientales, indicadores clave y desempeño ambiental. Disponible en www.semarnat.gob.mx

Seo HS, Hummel T. 2009. Effects of olfactory dysfunction on sensory evaluation and preparation of foods. *Appetite* 53:314-321.

Shu CH, Yuan BC. 2008. Assessment of odor identification function in Asia using a modified "Sniffin' Stick" odor identification test. *European Archives of Otorhinolaryngology* 265:787-790.

Silveira-Moriyama L, Sirisena D, Gamage P, de Silva R, Lees AJ. 2009. Adapting the sniffin' sticks to diagnose Parkinson's disease in Sri Lanka. *Movement Disorders* 24:1229–1233.

Silver WL. 1991. Physiological factors in nasal trigeminal chemoreception. En: BG Green, JR Mason, MR Kare (Eds.). *Chemical senses, vol. 2, Irritation*. pp. 21-37. Nueva York: Marcel Dekker.

Simpson PJ, Ronnet GV, Suh KS, Moon C. 2003. Smell. En: MJ Aminoff, RB Daroff (Eds.). *Encyclopedia of the neurological sciences*. pp. 310-314 New York: Academic Press.

Sklar PB, Anholt RR, Snyder SH. 1986. The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants. *Journal of Biological Chemistry* 261:538-543.

Smeets M, Dalton P. 2002. Perceived odor and irritation of isopropanol: a comparison between naïve controls and occupationally exposed workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 75:541-548.

Smeets M, Mauté C, Dalton P. 2002. Acute sensory irritation from exposure to isopropanol (2-propanol) at TLV in workers and controls. Objective versus subjective effects. *Annals of Occupational Hygiene* 46:359-373.

Smolders R, Schramm KW, Nickmilder M, Schoeters G. 2009. Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. *Environmental Health* 8:8.

Solís-Vivanco R, Rodríguez-Agudelo Y, Riojas-Rodríguez H, Ríos C, Rosas I, Montes S. 2009. Cognitive impairment in an adult Mexican population non-

occupationally exposed to manganese. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28:172-178.

Sorokowska A, Sorokowski P, Hummel T, Huanca T. 2013. Olfaction and environment: Tsimane's of Bolivian rainforest have lower threshold of odor detection than industrialized German people. *PLoS ONE* 8:e69203.

Stamelou M, Tuschl K, Chong WK, Burroughs AJ, Mills PB, Bhatia KP, Clayton PT. 2012. Dystonia with brain manganese accumulation resulting from SLC30A10 mutations: a new treatable disorder. *Movement Disorders* 27:1317-1322.

Stepens A, Stagg CJ, Platkajis A, Boudrias MH, Johansen-Berg H, Donaghy M. 2010. White matter abnormalities in methcathinone abusers with an extrapyramidal syndrome. *Brain* 133:3676-3684.

Stevenson RJ. 2010. An initial evaluation of the functions of human olfaction. *Chemical Senses* 35:3-20.

Stevenson RJ, Oaten M, Case TI, Repacholi BM, Wagland P. 2010. Children's response to adult disgust elicitors: development and acquisition. *Developmental Psychology* 46:165-177.

Tallkvist J, Henriksson J, d'Argy R, Tjälve H. 1998. Transport and subcellular distribution of nickel in the olfactory system of pikes and rats. *Toxicological Sciences* 42:196-203.

Tateyama T, Hummel T, Roscher S, Post H, Kobal G. 1998. Relation of olfactory event-related potentials to changes in stimulus concentration. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 108:449-455.

Temmel A, Quint C, Schickinger-Fischer B, Klimek L, Stoller E, Hummel T. 2002. Characteristics of olfactory disorders in relation to major causes of olfactory loss. *Archives of Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 128:635-641.

Thompson KJ, Molina RM, Donaghey T, Savaliya S, Schwob JE, Brain JD. 2011. Manganese uptake and distribution in the brain after methyl bromide-induced lesions in the olfactory epithelia. *Toxicological Sciences* 120:172-178.

Tizzano M, Gulbransen BD, Vandenbeuch A, Clapp TR, Herman JP, Sibhatu JM, Churchill ME, Silver WL, Kinnamon SC, Finger TE. 2010. Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:3210-3215.

Tjälve H, Henriksson J. 1999. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology* 20:181-195.

Tjälve H, Henriksson J, Tallkvist J, Larsson BS, Linqvist NG. 1996. Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacology and Toxicology* 79:347-356.

Tovalín H, Herbarth O, Sierra-Vargas M, Strandberg B, Blanco S, Vega L, Sioutas C, Hicks JJ, Marroquín R, Acosta G, Guarneros M, Hernández V, Estrada-Muñiz E, Olivares I, Pérez D, Torres-Ramos Y, Ulrich F, Hudson R, Reyes E, Rodríguez T, Elizondo F, Cantellano E. 2010. Air pollutants exposure and health effects during the MILAGRO-MCMA 2006 Campaign. En: B Gurjar, LT Molina, CSP Ojha (Eds.). *Air pollution: health and environmental impacts*. pp. 203-227. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Tuschl K, Clayton PT, Gospe SM, JrGulab S, Ibrahim S, Singhi P, Aulakh R, Ribeiro RT, Barsottini OG, Zaki MS, Del Rosario ML, Dyack S, Price V, Rideout A, Gordon K, Weyers RA, Chong WKK, Mills PB. 2012. Syndrome of hepatic cirrosis, dystonia,

polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in SLC30A10, a manganese transporter in man. *American Journal of Human Genetics* 90:457-466.

Tyler WS, Tyler NK, Last JA, Gillespe MJ, Barstow TJ. 1988. Comparison of daily and seasonal exposures of Young monkeys to ozone. *Toxicology* 50:131-144.

US EPA. 1997. Manganese Integrated Risk Information System (IRIS) substance file. Cincinnati (OH): Office of Health and Environmental Assessment.

Valverde M, López MC, López I, Sánchez I, Fortoul TI, Ostrosky-Wegman P, Rojas E. 1997. DNA damage in leukocytes and bucal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30:147-152.

van Aardt M, Duncan SE, Marcy JE, Long TE, O'Keefe SF, Nielsen-Sims SR. 2005. Aroma analysis of light-exposed milk stored with and without natural and synthetic antioxidants. *Journal of Dairy Science* 88:881-890.

Velázquez-Pérez L, Fernández-Ruiz J, Díaz R, González RP, Ochoa NC, Cruz GS, Mederos LE, Góngora EM, Hudson R, Drucker-Colín R. 2006. Spinocerebellar ataxia type 2 olfactory impairment shows a pattern similar to other neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology* 253:1165-1169.

Vent J, Robinson A, Gentry-Nielsen MJ, Conley DB, Hallworth R, Leopold DA, Kern RC. 2004. Pathology of the olfactory epithelium: smoking and ethanol exposure. *Laryngoscope* 114:1383-1388.

Villarreal-Calderón R, Torres-Jardón R, Palacios-Moreno J, Osnaya N, Pérez-Guille B, Maronpot R, Reed W, Zhu H, Calderón-Garcidueñas L. 2010. Urban air pollution targets the dorsal vagal complex and dark chocolates offers neuroprotection. *International Journal of Toxicology* 29:604-615.

von Skramlik E. 1925. Über die Lokalisation der Empfindungen bei den niederen Sinnen (On the localization of sensation in the lower senses). *Zeitschrift für Sinnesphysiologie* 56:69-140.

Walker JC, Kendal-Reed M, Utell MJ, Cain WS. 2001. Human breathing and eye blink rate responses to airborne chemicals. *Environmental Health Perspectives* 109:507-512.

Walsh MP. 2007. The global experience with lead in gasoline and the lessons we should apply to the use of MMT. *American Journal of Industrial Medicine* 50:853-860.

Wang L, Hari C, Chen L, Jacob T. 2004. A new non-invasive method for recording the electro-olfactogram using external electrodes. *Clinical Neurophysiology* 115:1631-1640.

Wenning GK, Shephard BC, Hawkes CH, Lees A, Quinn N. 1995. Olfactory function in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 57:251-252.

Wesson WD, Levy E, Nixon RA, Wilson DA. 2010. Olfactory dysfunction correlates with amyloid beta burden in an Alzheimer's disease mouse model. *Journal of Neuroscience* 30:505-514.

Williams H, Pembroke A. 1989. Sniffer dogs in the melanoma clinic? *The Lancet* 1:734.

Willis CM, Church SM, Guest CM, Cook WA, McCarthy N, Bransbury AJ, Church MR, Church JC. 2004. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. *BMJ* 329: 712-720.

Wilson DA, Stevenson RJ. 2003. The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends in Neuroscience* 26:243-247.

Wirth JJ, Rossano MG, Daly DC, Paneth N, Puscheck E, Potter RC, Diamond MP. 2007. Ambient manganese exposure is negatively associated with human sperm motility and concentration. *Epidemiology* 2:270-273.

Wolfensberger M, Schnieper I, Welge-Lüssen A. 2000. Sniffin' Sticks: a new olfactory test battery. *Acta Oto-Laryngologica* 120:303-306.

Wysocki CJ, Cowart BJ, Radil T. 2003. Nasal trigeminal chemosensitivity across the adult life span. *Perception and Psychophysics* 65:115-122.

Yokel R. 2002. Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese. *Environmental Health Perspectives* 110: 699-704.

Zelano C, Sobel N. 2005. Humans as an animal model for systems-level organization of olfaction. *Neuron* 48:431-454.

Zibrowski EM, Robertson JM. 2006. Olfactory sensitivity in medical laboratory workers occupationally exposed to organic solvent mixtures. *Occupational Medicine (London)* 56:51-54.

Zoni S, Albin E, Lucchini R. 2007. Neuropsychological testing for the assessment of manganese neurotoxicity: a review and a proposal. *American Journal of Industrial Medicine* 50:812-830.

Zoni S, Bonetti G, Lucchini R. 2012. Olfactory functions at the intersection between environmental exposure to manganese and Parkinsonism. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 26:179-182.

ANEXO 1

Artículo requisito:

Guarneros M, Ortiz-Romo N, Alcaraz-Zubeldia M, Drucker-Colín R, Hudson R. 2013. Nonoccupational atmospheric exposure to manganese is linked to peripheral and central olfactory deficits. *Chemical senses* 38: 783-791.

Nonoccupational Environmental Exposure to Manganese is Linked to Deficits in Peripheral and Central Olfactory Function

Marco Guarneros^{1,2}, Nahum Ortiz-Romo¹, Mireya Alcaraz-Zubeldia³, René Drucker-Colín¹ and Robyn Hudson⁴

¹Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), AP 70–600, CP 04510, Distrito Federal, Mexico, ²Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, Distrito Federal, Mexico, ³Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur No.3877, CP 14269, Distrito Federal, Mexico and ⁴Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, CP 04510 Distrito Federal, Mexico

Correspondence to be sent to: Marco Guarneros, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70–600, CP 04510, Distrito Federal, Mexico. e-mail: marco.mexico@hotmail.com

Accepted August 9, 2013

Abstract

Manganese is of growing concern as a toxic air pollutant. It is readily transported from the olfactory epithelium to the olfactory bulb, and unlike other metals, it is transported transynaptically to structures deep within the brain. However, little is known regarding the possible effect of nonoccupational exposure to manganese on olfactory function. Using the Sniffin' Sticks test battery, we compared the olfactory performance of subjects from a manganese mining district living <1 km from a manganese processing plant, with nonexposed subjects living 50 km from the closest source of exposure ($N = 30$ /group). Groups were matched for age, sex, and schooling, and none had ever worked in mining-related activities. Concentrations of manganese in hair were measured as a biomarker of exposure; exposed subjects had significantly higher concentrations than nonexposed subjects. They were also significantly outperformed by the nonexposed subjects on all olfactory measures (threshold, discrimination, and identification), indicating adverse effects of manganese exposure on a range of olfactory functions, including those involving higher order cognitive processes. This contrasts with previous findings showing adverse peripheral but not central effects on olfactory function of big city air pollution, which mostly consists of toxicants known to affect the olfactory epithelium but with lower transynaptic transport capacity compared with manganese. We conclude that nonoccupational exposure to airborne manganese is associated with decrements in both peripheral and central olfactory function.

Key words: age, cognitive function, manganese exposure, olfactory performance

Introduction

There is growing concern about the effect of environmental contaminants on human health, not only in the workplace but increasingly in the general public exposed to varying and often largely unknown levels of environmental pollution (Molina and Molina 2004; Chen and Kan 2008; Parrish and Zhu 2009). Metals such as lead, nickel, cadmium, mercury, and manganese are particularly worrying because of their neurotoxic effects resulting in part from their ability to bypass the blood–brain barrier and reach the central nervous system, including via inhalation and uptake by the olfactory receptor neurons originating in the nasal cavity (Tjälve

and Henriksson 1999; Dorman et al. 2006; Thompson et al. 2011).

Manganese (Mn), although an essential trace element, is of particular concern as it is not only readily transported from the olfactory epithelium to the olfactory bulb, the first station in the central processing of olfactory information in vertebrates, but unlike a number of other metals such as cadmium and mercury, it is also transported transynaptically to structures deep within the brain (Tjälve and Henriksson 1999; Aschner 2000; Dorman et al. 2006; Leavens et al. 2007). Consequently, exposure to excessive amounts of Mn

has been implicated in a number of psychiatric and motor disturbances (Hudnell 1999; Pal et al. 1999; Aschner et al. 2007; Bowler et al. 2007, 2012; Zoni et al. 2007), as well as in diminished olfactory function (Antunes et al. 2007; Bowler et al. 2007, 2011).

Although most human evidence for such pathology has come from studies of occupational groups exposed to high levels of Mn such as welders, miners, or workers in processing facilities (Mergler et al. 1994; Lucchini et al. 1995; Chu et al. 1996; Crump and Rousseau 1999; Antunes et al. 2007; Bowler et al. 2007, 2011; Zoni et al. 2007), there is growing evidence that lower level chronic exposure to airborne Mn in the general environment can also have lasting toxic effects on human health (Hudnell 1999; Mergler et al. 1999; Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Zoni et al. 2007; Solís-Vivanco et al. 2009; Riojas-Rodríguez et al. 2010). In particular, interest in the effect of low-level inhalation exposure to Mn has been stimulated by the use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl as a gasoline octane booster in some countries (Davis 1998; Hudnell 1999; Pellizzari et al. 2001; Pfeifer et al. 2004).

Whereas previous studies have concentrated importantly on impaired motor and cognitive function or decreased quality of life (Catalán-Vázquez et al. 2010, 2012), no information is available regarding the possible effect of nonoccupational environmental exposure to Mn on olfactory function. And yet, apart from any negative effect on olfactory function itself, this could provide a sensitive, noninvasive indicator of the impact of Mn exposure on central nervous system processes more generally. To investigate this, we chose a region of rural Mexico where Mn has been extensively mined for the past 50 years (see Study site), where elevated levels of Mn in the soil, waterways, vegetation, and atmosphere have been recorded (Solís-Vivanco et al. 2009; Juárez-Santillán et al. 2010), and where significant deficits in motor and cognitive performance have been reported (Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Solís-Vivanco et al. 2009; Riojas-Rodríguez et al. 2010).

Previously, we found that otherwise healthy Mexico City residents, exposed to high levels of ambient air pollution, show a significant reduction in the ability to detect odorants presented at threshold concentrations, but little or no reduction in the ability to describe and to correctly name them when presented at above-threshold concentrations (Hudson et al. 2006; Guarneros et al. 2009, 2011). This suggests that the negative effects of general big city air pollution on olfactory function are due primarily to damage at the periphery of the system, leaving centrally mediated cognitive processes largely intact (discussion in Hudson et al. 2006; Guarneros et al. 2009, 2011). Given the ability of Mn to reach and accumulate in central brain structures importantly involved in cognitive processes, and the vital role of learning and memory in olfactory function (Hudson 1999; Wilson and Stevenson 2003; Herz 2009), we expected the Mn-exposed subjects of the present study to show impaired central and impaired peripheral olfactory function.

Materials and methods

Study site

The study was conducted in the Molango district in the High Sierra of the central Mexican state of Hidalgo, where Mn has been extensively mined for the past 50 years (Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Solís-Vivanco et al. 2009; Catalán-Vázquez et al. 2012). The mines and associated deposits of Mn are the second largest in Latin America and the fifth largest in the world (Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Catalán-Vázquez et al. 2012). We chose as our focal site the adjacent villages of Tolago/Chiconcoac (T/C), population 1269 in 2010 (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Mexico), located approximately 20°80'N, 98°42'W; 1900 masl, and <1 km from the Mn processing plant. Our control site was the town of Calnali, population of about 15 000, located approximately 20°50'N, 98°36'W; 1800 masl, and 50 km from T/C and from any mining activity. The two sites have a similar temperate, humid upland climate, and the populations have a similar socioeconomic level and culture.

Subjects

We recruited 30 adults from each population with the help of staff of the local public health clinics; 25 women and 5 men matched as closely as possible for age and level of schooling (Table 1). According to the records of the clinics, all were in good general health. More women were recruited than men because most men in the T/C community either worked in the mines or had left to work abroad. All subjects were nonsmokers, all had spent all their lives in each of the respective

Table 1 General characteristics of the study groups

	Manganese	Control
Sample size	30	30
Women	25	25
Men	5	5
Age, years (mean, SD)	39.9 (15.8)	42 (12.6)
Schooling years (mean, SD)	6.4 (4.36)	7.2 (4.63)
Occupations		
Homemaker	17 (women)	22 (women)
Nurse	8 (women)	1 (woman)
Student		1 (woman)
Stall keeper	2 (men)	1 (woman)
Small farmer		5 (men)
Musician	2 (men)	
Janitor	1 (man)	

All subjects were nonsmokers.

communities, and none had ever been employed in mining-related activities (occupations given in Table 1).

Procedures conformed to the declaration of Helsinki for medical research involving human subjects and to the guidelines for the treatment of human subjects in research of the Instituto de Fisiología Celular and the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico. The study was approved by the Subcomité del Campo de Conocimiento en Biología Experimental y Biomedicina, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, and we also obtained approval from the local health authorities (Desarrollo Integral de la Familia, Secretaría de Salud, Calnali, and Clínica de Salud, Secretaría de Salud, Chiconcoac). Testing was conducted in the presence of clinic staff and did not involve physical intervention or have treatment consequences. Subjects were fully informed about the purpose and procedures of the study, and anonymity was assured. All subjects gave their informed consent before being tested.

Test procedures

Subjects were tested at the local clinic of the public health service in their respective communities by the same experimenter (N.O.R.), who was familiar with the local culture and who had extensive experience with the Sniffin' Sticks method (see below). After obtaining subjects' informed consent, their age, sex, smoking history, work environment, level of schooling, and medical history were recorded (Table 1). Their olfactory performance was then evaluated using a standardized Sniffin' Sticks test (see below), which we modified slightly to fit local conditions. Three odorants (licorice, green apple, and turpentine) were dropped from the identification test, because we have repeatedly found these to be unfamiliar to Mexicans and therefore largely unidentifiable. In addition, because of low levels of literacy, the experimenter read the list of 4 options for each of the odorants to be identified (see below), and if requested by subjects, with repetitions. Each subject was tested in a single session lasting a maximum of 30 min. Tests were conducted in April and May 2011 so as to exclude possible seasonal effects between the two populations. In addition, samples of hair were taken from most subjects to confirm greater exposure to Mn in the focal group (see below).

Olfactory performance

As in a previous study of the effect of Mexico City air pollution on olfactory function (Guarneros et al. 2009), odorants were presented to blindfolded subjects following an established procedure (Hummel et al. 1997; Kobal et al. 2000). Odorants were presented in felt-tipped marker pens (Sniffin' Sticks) filled with 4 mL of liquid odorant or odorant dissolved in propylene glycol. At the moment of testing, the cap was removed by the experimenter who held the tip of the pen approximately 2 cm in front of the subject's nostrils for

approximately 2–3 s. Subjects were instructed when to sniff, and except for the identification test, they could sample each stimulus only once.

The standard Sniffin' Sticks procedure tests subjects' ability to detect an odorant (threshold), to distinguish between odorants, and to identify (name) them using a verbal checklist. One advantage of combining these different measures of olfactory function is to help identify where in the chemosensory pathway functional impairment occurs (Hudson et al. 2006; Guarneros et al. 2009, 2011). Another is that using more than one measure of olfactory function increases the likelihood of detecting olfactory loss (Dalton et al. 2006; Lötsch et al. 2008).

Threshold

Subjects' ability to detect 2-phenyl ethanol (a rose-like odor) was determined using an ascending-staircase, 3-alternative forced-choice procedure. Sixteen dilutions were presented in a geometric series starting with a 4% solution (dilution ratio 1:2 in propylene glycol). In each trial, 3 pens were presented singly in randomized order, 2 containing only solvent and the third the odorant, and subjects were asked to identify the pen that smelled different (i.e., that contained 2-phenyl ethanol). The interval between presentation of pens within a triplet was approximately 3 s and between triplets approximately 20 s. The staircase was reversed when the target was correctly identified on 2 successive trials. Threshold was defined as the mean of the last 4 of 7 staircase reversals. Subjects' scores could range from 0 (minimum sensitivity/anosmic for 2-phenyl ethanol) to 16 (maximum sensitivity) which, however, no subject achieved.

Discrimination

Again using a 3-alternative forced-choice paradigm, 16 triplets of pens containing concentrations of odorant well above threshold for normosmics were presented in randomized order, with 2 containing the same and 1 a different odorant. Subjects had to determine which one of the 3 pens smelled different. As for threshold determinations, the interval between presentation of pens within a triplet was approximately 3 s and between triplets approximately 20 s. Because 16 triplets were tested, subjects' scores could range from 0 to 16.

Identification

Subjects were presented with 13 common odorants (see Test procedures above for elimination of 3 of the original 16 odorants) in the same order for all subjects and asked to choose the most appropriate (Spanish language) descriptor from 4 plausible alternatives (e.g., shoe leather as target, and glue, grass, and smoke). As mentioned above, because of low levels of literacy, subjects were read the list of alternatives by

the experimenter. The stimuli were well above threshold for normosmics, the interval between the presentation of each pen was approximately 10 s, and subjects' scores could range from 0 to 13.

Overall performance

For each subject, results of the 3 subtests were summed to give a composite Threshold–Discrimination–Identification (TDI) score (maximum of $16 + 16 + 13 = 45$; cf. Hummel et al. 1997; Wolfensberger et al. 2000).

Manganese hair content

Mn accumulates in hair, and concentrations in hair have been suggested to provide a good general marker of Mn intoxication (Riojas-Rodríguez et al. 2010). We, therefore, took about 0.5 g of hair from the occipital region of subjects, close to the scalp: from 22 women and 3 men in the exposed group, and from 20 women and 3 men in the control group. The hair was stored under refrigeration in 5-mL metal-free polypropylene tubes until analysis. Samples from both groups were analyzed in the same session. Following a previously established procedure (Riojas-Rodríguez et al. 2010), samples were washed 3 times by vigorous agitation in a detergent solution of 2% Triton X-100 and rinsed with deionized water. The hair was then dried at 60 °C, cut into small pieces to facilitate acid digestion, and 300 mg placed for 30 min at 60 °C in metal-free polypropylene tubes with 250 µL of concentrated nitric acid (Suprapur; Merck, Naucalpan de Juárez). The resulting clear solution was analyzed using an atomic absorption spectrophotometer (Perkin-Elmer, AAnalyst 600; Menezes-Filho et al. 2009; Riojas-Rodríguez et al. 2010). Quality control of the analysis was assured by measuring a biological matrix-based reference material (bovine liver 1577b; National Institute of Standards and Technology) together with the samples.

Data treatment and analysis

Because performance scores were not always normally distributed (Kolmogorov–Smirnov tests) and most were based on frequencies, data for the 2 groups are graphed as medians and interquartile ranges or as Spearman rank correlations, and compared using nonparametric Mann–Whitney *U* tests. Two-tailed tests were performed throughout using the statistical program SYSTAT 12 and taking $P < 0.05$ as the level of significance. As the groups were matched for gender, scores for men and women have been combined.

Results

All subjects readily agreed to participate in the study, and there were no significant differences between the Mn-exposed and control groups in age, socioeconomic indicators such as

employment or years of schooling, or in apparent general health (Table 1).

Olfactory performance

Threshold

The control subjects detected 2-phenyl ethanol in the ascending-staircase, 3-alternative forced-choice procedure at significantly lower concentrations (higher scores) than the Mn-exposed T/C subjects (Figure 1a; Mann–Whitney *U* test: $U = 312.5_{30,30}$, $P = 0.042$). Based on the median scores, this represented a 2- to 4-fold difference between groups in the concentration needed to detect the presence of this stimulus.

Discrimination

The control subjects were better able to distinguish the target stimuli from the 2 alternatives in the 3-alternative forced-choice tests than the T/C subjects (Figure 1b). This difference was also significant ($U = 272_{30,30}$, $P = 0.008$).

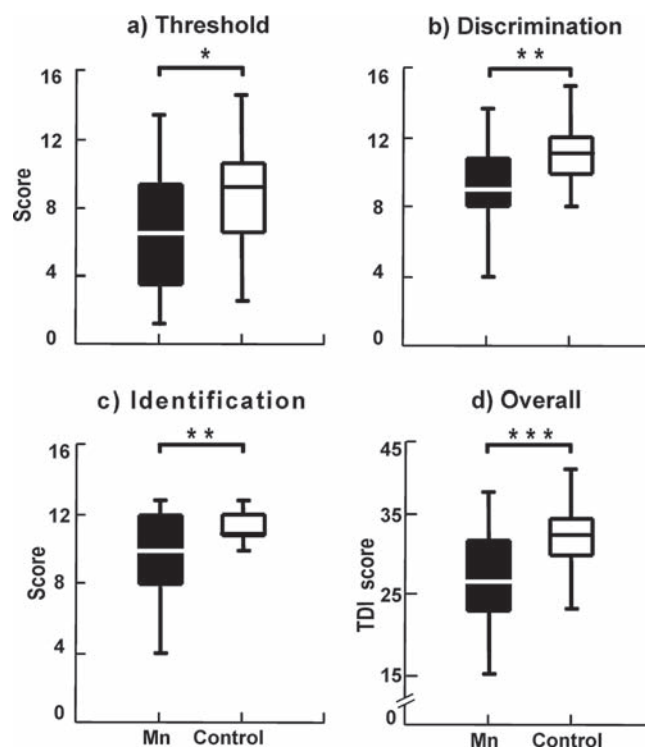


Figure 1 Performance of Mn-exposed and control subjects on the 3 tests of olfactory performance (a–c), as well as their overall TDI scores (d) representing the sum of their scores on these tests. For each of the tests (a) and (b), subjects could obtain a maximum score of 16 correct responses, for test (c), a maximum score of 13 correct responses, and consequently a maximum TDI score of 45. Box plots: horizontal lines within boxes give medians, horizontal limits of boxes give the interquartile ranges, and vertical bars give the absolute ranges; $N = 30$ per group; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$ (Mann–Whitney *U* tests).

Identification

Although the odorants in this test had been originally chosen for their familiarity for Europeans, after we eliminated the unfamiliar green apple, licorice, and turpentine stimuli (see above), the control subjects identified 8 of the 13 stimuli correctly in more than 90% of trials and 10 of 13 in more than 80% of trials. In contrast, the T/C subjects identified only 4 of 13 correctly (coffee, garlic, banana, fish) in more than 90% of trials, and 8 in less than 70% of trials. Again, the difference in performance between the 2 groups was significant (Figure 2c; $U = 265.5_{30,30}$, $P = 0.005$).

Overall performance

As a consequence of the above, the control subjects had significantly higher TDI scores than the T/C subjects, expressed as the sum of scores obtained in the threshold, discrimination, and identification tests (Figure 2d; $U = 213.0_{30,30}$,

$P < 0.001$). Whereas 4 T/C subjects (13 %) had scores below the lowest scoring control subject, 3 control subjects (10 %) had scores above the highest scoring T/C subject.

Interaction with age

On all tests of olfactory ability, performance declined with subjects' age (Figure 2). However, for threshold, identification, and overall performance (Figure 2a,c,d), the decline was greater for the T/C group than for the control group, even if only tendentially. The lack of a clear difference with age between the 2 groups in the test of olfactory discrimination (Figure 2b) was probably at least partly due to the younger Mn-exposed subjects already having scores so much lower than the age-matched control subjects that subjects in this group could not decline much further before approaching chance performance. Nevertheless, taken together the results suggest a negative interaction between age and Mn

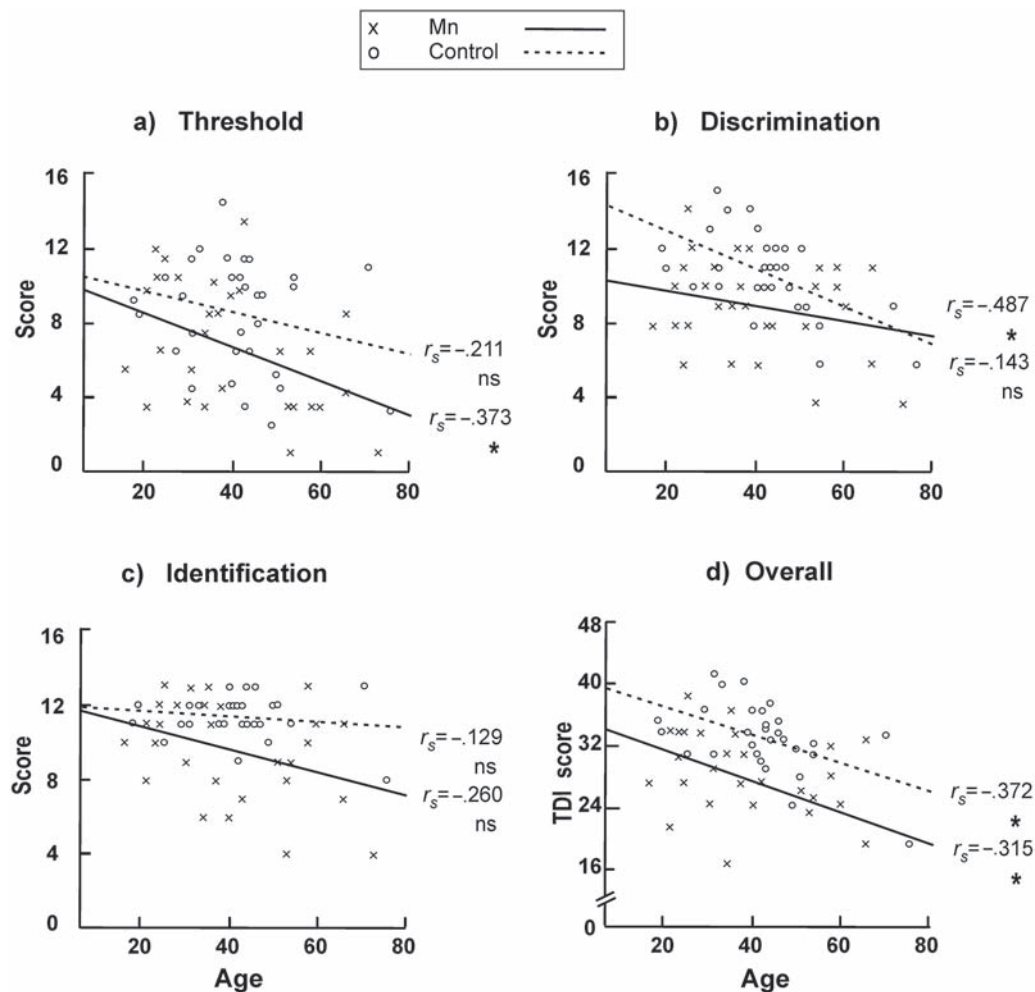


Figure 2 Spearman rank correlations between subjects' age in years and the 3 tests of olfactory performance (a–c), as well as subjects' TDI scores representing the sum of their scores on these tests (d) (cf. Figure 1). Crosses and solid lines give the values for the Mn-exposed subjects and open circles and broken lines for the control subjects; $N = 30$ per group; correlation coefficients: * $P < 0.05$, ns = not significant.

exposure, resulting in a greater decrement in olfactory performance with age in the T/C group (Figure 2d).

Manganese hair content

The T/C subjects had significantly higher concentrations of Mn in hair (MnH) than the control subjects (Figure 3; $U = 0.00_{25, 23}$, $P < 0.001$). Based on the median scores of 9.73 $\mu\text{g/g}$ versus 1.01 $\mu\text{g/g}$, this represented a 9-fold difference between the 2 groups. We also found a tendential negative correlation between MnH and the performance of subjects within each group on each of the olfactory tests of threshold, discrimination, identification, and TDI scores. Although this was clearer for the exposed than for the control subjects, none of the correlations reached significance for either group.

Discussion

The findings of the present study provide clear support for our prediction that subjects from the mining community of T/C, chronically exposed to elevated levels of Mn in the environment, would show impaired olfactory function, and despite having never worked in mining-related activities. Thus, compared with control subjects from the nearby town of Calnali, a comparable community but with no mining activity, the Mn-exposed subjects performed significantly worse on all 3 tests of olfactory function: detection, discrimination, and identification. In addition, the normal decline in olfactory function with age (Doty et al. 1984) was greater for the exposed than for the control group (see Davis 1998,

p. 195, for relevant discussion of this issue). Particularly notable was the poorer performance of the exposed group on the odor identification task. This tests the ability of subjects to recognize and name odors and is thus dependent on cognitive processes associated with learning, memory, and language, important for a wide range of cognitive functions apart from odor recognition. That the T/C subjects understood the task, were able to manage the orally presented checklist, and were motivated to perform well was shown by the fact that on 4 particularly familiar, “easy” odorants they scored over 90% correct, doing almost as well as the control subjects.

For several reasons, it is likely that airborne Mn was an important contributor to the olfactory deficits of the T/C subjects. The T/C region has been reported to have atmospheric levels of Mn above the level of 0.05 $\mu\text{g/m}^3$ recommended by the USA Environmental Protection Agency (US EPA 1997; Solís-Vivanco et al. 2009), and air was found to be the most significant source of Mn exposure at T/C (Santos-Burgoa et al. 2001; Rodríguez-Agudelo et al. 2006). High levels of atmospheric Mn at T/C are also consistent with the significantly higher levels of Mn in the hair of T/C subjects compared with the control group. The finding of only a weak correlation between MnH and olfactory performance is perhaps not surprising given our rather small sample size and the considerable variance in MnH values, particularly among the Mn-exposed T/C subjects (Figure 3). Extraneous factors such as hair type, frequency of washing, and other forms of hair care can affect the accumulation of Mn considerably and contribute to such variance (Smolders et al. 2009). In addition, we do not know if Mn was the only metal contributing to the olfactory deficits reported here. However, we note that a study exploring possible contamination from lead reported levels in blood at T/C to be similar to other rural Mexican communities (Santos-Burgoa et al. 2001).

Also supporting an effect of atmospheric exposure to Mn, inhalation is reported to be a more efficient route than digestion for uptake of Mn by the body, and the concentration of Mn in hair is a good biomarker of chronic exposure (Andersen et al. 1999; Riojas-Rodríguez et al. 2010). Olfactory loss, particularly involving more central cognitive processes, due to airborne Mn, is also consistent with the animal studies reported in the Introduction showing ready uptake of Mn by the olfactory receptor neurons in the nasal cavity and transynaptic transport to central regions of the brain.

Given that none of the subjects had ever worked in Mn-related activities, our findings suggest that chronic exposure even to presumably low levels of Mn can affect health via inhalation, and even in younger and otherwise healthy persons. Furthermore, our findings might even be conservative given that we recruited subjects from local health clinics. Thus, they were possibly more health conscious and with a higher level of education than other members of the community, as indicated by most having mainly indoor, and several professional occupations (Table 1). Poorer residents of T/C

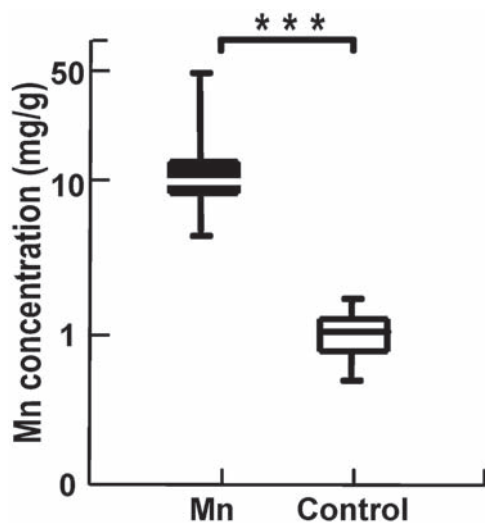


Figure 3 Concentrations of Mn measured in the hair of Mn-exposed ($N = 25$) and control subjects ($N = 23$). Box plots: horizontal lines within boxes give medians, horizontal limits of boxes give the interquartile ranges, and vertical bars give the absolute ranges: *** $P < 0.001$ (Mann–Whitney U test).

working mainly outdoors in the fields, and possibly having a poorer diet and generally lower standard of living, might be even more vulnerable.

Our findings also demonstrate the suitability of olfactory testing for monitoring the effects of atmospheric pollution on health. Olfactory tests such as the Sniffin' Sticks are non-invasive, quick, and easy to apply, and do not depend on subjects' level of literacy as shown by the good performance of the exposed subjects on the "easy" odorants mentioned above. Furthermore, in our experience, olfactory testing has good subject acceptance. In the present study, all subjects readily agreed to participate and were eager to try the (familiar-looking) pens. Despite the fact that we had to exclude 3 odorants as unfamiliar to Mexicans, fresh pens can be readily filled with any suitable (nontoxic, soluble, nonperishable) odorant in order to match stimuli to particular test populations (e.g., [Shu and Yuan 2008](#)).

Particularly notable is the ability of the Sniffin' Sticks standard test to detect and distinguish among deficits occurring at different levels in the olfactory system. Thus, using the same method in a previous study to test olfactory performance of Mexico City residents, we could show that big city air pollution has a detrimental effect on odor detection, less so on odor discrimination, and—in contrast to the present study—apparently no effect on odor identification ([Guarneros et al. 2009, 2011](#); see also [Hudson et al. 2006](#)). As we have discussed previously ([Hudson et al. 2006](#); [Guarneros et al. 2009](#)), this suggests that the air pollution of Mexico City, containing lower levels of toxic substances capable of reaching central brain structures via transsynaptic transport compared with atmospheric levels of Mn at T/C ([Tovalín et al. 2010](#)), has a detrimental effect primarily on the periphery of the olfactory system (the receptor surface in the nasal cavity).

Taken together, the results of the present study suggest that chronic exposure to atmospheric Mn even outside the workplace can affect residents' health. The results further suggest that standardized, noninvasive, inexpensive, and easily administered olfactory tests provide an efficient means of monitoring the effects on general health of exposure to potentially damaging levels of pollutants in the atmosphere such as Mn. In the case of Mn, this is relevant not only for occupationally exposed groups but also in relation to broader issues such as the use of Mn in gasoline or in pesticides, and to the debate over possible effects of this via atmospheric contamination on the health of communities in general ([Boudia et al. 2006](#); [Finkelstein and Jerrett 2007](#); [Walsh 2007](#)).

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología in the program of the Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, [228879 to M.G.].

Acknowledgements

We thank Dr Rodrigo Rodríguez, Presidente de Municipio de Calnali, Dr Samuel Pedraza, Presidente de Desarrollo Integral de la Familia de Calnali, Dr Martín Peralta de la Clínica de Salud de Chiconcoac, and the nurses of both clinics for essential logistical support, Martha Angélica López Palacios for help with data analysis, and Carolina Rojas for excellent technical assistance.

References

- Andersen ME, Gearhart JM, Clewell HJ 3rd. 1999. Pharmacokinetic data needs to support risk assessments for inhaled and ingested manganese. *Neurotoxicology*. 20(2–3):161–171.
- Antunes MB, Bowler R, Doty RL. 2007. San Francisco/Oakland Bay Bridge Welder Study: olfactory function. *Neurology*. 69(12):1278–1284.
- Aschner M. 2000. Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environ Health Perspect*. 108(Suppl 3):429–432.
- Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W. 2007. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 221(2):131–147.
- Boudia N, Halley R, Kennedy G, Lambert J, Gareau L, Zayed J. 2006. Manganese concentrations in the air of the Montreal (Canada) subway in relation to surface automobile traffic density. *Sci Total Environ*. 366(1):143–147.
- Bowler RM, Gocheva V, Harris M, Ngo L, Abdelouahab N, Wilkinson J, Doty RL, Park R, Roels HA. 2011. Prospective study on neurotoxic effects in manganese-exposed bridge construction welders. *Neurotoxicology*. 32(5):596–605.
- Bowler RM, Harris M, Gocheva V, Wilson K, Kim Y, Davis SI, Bollweg G, Lobdell DT, Ngo L, Roels HA. 2012. Anxiety affecting parkinsonian outcome and motor efficiency in adults of an Ohio community with environmental airborne manganese exposure. *Int J Hyg Environ Health*. 215(3):393–405.
- Bowler RM, Roels HA, Nakagawa S, Drezgic M, Diamond E, Park R, Koller W, Bowler RP, Mergler D, Bouchard M, et al. 2007. Dose-effect relationships between manganese exposure and neurological, neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders. *Occup Environ Med*. 64(3):167–177.
- Catalán-Vázquez M, Riojas-Rodríguez H, Pelcastre-Villafuerte BE. 2012. Risk perception and social participation among women exposed to manganese in the mining district of the state of Hidalgo, Mexico. *Sci Total Environ*. 414:43–52.
- Catalán-Vázquez M, Schilman A, Riojas-Rodríguez H. 2010. Perceived health risks of manganese in the Molango Mining District, Mexico. *Risk Anal*. 30(4):619–634.
- Chen B, Kan H. 2008. Air pollution and population health: a global challenge. *Environ Health Prev Med*. 13(2):94–101.
- Chu NS, Huang CC, Calne DB. 1996. Sympathetic skin response and RR interval variation in manganese and a comparison with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2(1):23–28.
- Crump KS, Rousseau P. 1999. Results from eleven years of neurological health surveillance at a manganese oxide and salt producing plant. *Neurotoxicology*. 20(2–3):273–286.
- Dalton P, Dilks D, Hummel T. 2006. Effects of long-term exposure to volatile irritants on sensory thresholds, negative mucosal potentials, and event-related potentials. *Behav Neurosci*. 120(1):180–187.

- Davis JM. 1998. Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl: health risk uncertainties and research directions. *Environ Health Perspect.* 106(Suppl 1):191–201.
- Dorman DC, Struve MF, Clewell HJ 3rd, Andersen ME. 2006. Application of pharmacokinetic data to the risk assessment of inhaled manganese. *Neurotoxicology.* 27(5):752–764.
- Doty RL, Shaman P, Applebaum SL, Giberson R, Siksorski L, Rosenberg L. 1984. Smell identification ability: changes with age. *Science.* 226(4681):1441–1443.
- Finkelstein MM, Jerrett M. 2007. A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities. *Environ Res.* 104(3):420–432.
- Guarneros M, Drucker-Colín R, Esquivelzeta J, Hudson R. 2011. Adverse effect of air pollution on odor perception. In: Moldoveanu AM, editor. *Advanced topics in environmental health and air pollution case studies.* Rijeka, Croatia: InTech. p. 307–326.
- Guarneros M, Hummel T, Martínez-Gómez M, Hudson R. 2009. Mexico City air pollution adversely affects olfactory function and intranasal trigeminal sensitivity. *Chem Senses.* 34(9):819–826.
- Herz RS. 2009. Symposium overview: Basic processes in human olfactory cognition: current findings and future directions. *Ann N Y Acad Sci.* 1170:313–317.
- Hudnell HK. 1999. Effects from environmental Mn exposures: a review of the evidence from non-occupational exposure studies. *Neurotoxicology.* 20(2-3):379–397.
- Hudson R. 1999. From molecule to mind: the role of experience in shaping olfactory function. *J Comp Physiol A.* 185(4):297–304.
- Hudson R, Arriola A, Martínez-Gómez M, Distel H. 2006. Effect of air pollution on olfactory function in residents of Mexico City. *Chem Senses.* 31(1):79–85.
- Hummel T, Sekinger B, Wolf SR, Pauli E, Kobal G. 1997. 'Sniffin' sticks': olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chem Senses.* 22(1):39–52.
- Juárez-Santillán LF, Lucho-Constantino CA, Vázquez-Rodríguez GA, Cerón-Ubilla NM, Beltrán-Hernández RI. 2010. Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo, Mexico. *Bioresour Technol.* 101(15):5836–5841.
- Kobal G, Klimek L, Wolfensberger M, Gudziol H, Temmel A, Owen CM, Seeber H, Pauli E, Hummel T. 2000. Multicenter investigation of 1,036 subjects using a standardized method for the assessment of olfactory function combining tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 257(4):205–211.
- Leavens TL, Rao D, Andersen ME, Dorman DC. 2007. Evaluating transport of manganese from olfactory mucosa to striatum by pharmacokinetic modeling. *Toxicol Sci.* 97(2):265–278.
- Lötsch J, Reichmann H, Hummel T. 2008. Different odor tests contribute differently to the evaluation of olfactory loss. *Chem Senses.* 33(1):17–21.
- Lucchini R, Selis L, Folli D, Apostoli P, Mutti A, Vanoni O, Iregren A, Alessio L. 1995. Neurobehavioral effects of manganese in workers from a ferroalloy plant after temporary cessation of exposure. *Scand J Work Environ Health.* 21(2):143–149.
- Menezes-Filho JA, Paes CR, Pontes AM, Moreira JC, Sarcinelli PN, Mergler D. 2009. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. *Neurotoxicology.* 30(6):1207–1213.
- Mergler D, Baldwin M, Bélanger S, Larribe F, Beuter A, Bowler R, Panisset M, Edwards R, de Geoffroy A, Sassine MP, *et al.* 1999. Manganese neurotoxicity, a continuum of dysfunction: results from a community based study. *Neurotoxicology.* 20(2–3):327–342.
- Mergler D, Huel G, Bowler R, Iregren A, Bélanger S, Baldwin M, Tardif R, Smargiassi A, Martin L. 1994. Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese. *Environ Res.* 64(2):151–180.
- Molina LT, Molina MJ. 2004. Improving air quality in megacities: Mexico City case study. *Ann N Y Acad Sci.* 1023:142–158.
- Pal PK, Samii A, Calne DB. 1999. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology.* 20(2–3):227–238.
- Parrish DD, Zhu T. 2009. Climate change. Clean air for megacities. *Science.* 326(5953):674–675.
- Pellizzari ED, Clayton CA, Rodes CE, Mason RE, Piper LL, Fort B, Pfeifer G, Lynam D. 2001. Particulate matter and manganese exposures in Indianapolis, Indiana. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 11(6):423–440.
- Pfeifer GD, Roper JM, Dorman D, Lynam DR. 2004. Health and environmental testing of manganese exhaust products from use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl in gasoline. *Sci Total Environ.* 334–335:397–408.
- Riojas-Rodríguez H, Solís-Vivanco R, Schilmann A, Montes S, Rodríguez S, Ríos C, Rodríguez-Agudelo Y. 2010. Intellectual function in Mexican children living in a mining area and environmentally exposed to manganese. *Environ Health Perspect.* 118(10):1465–1470.
- Rodríguez-Agudelo Y, Riojas-Rodríguez H, Ríos C, Rosas I, Sabido Pedraza E, Miranda J, Siebe C, Texcalac JL, Santos-Burgoa C. 2006. Motor alterations associated with exposure to manganese in the environment in Mexico. *Sci Total Environ.* 368(2–3):542–556.
- Santos-Burgoa C, Ríos C, Mercado LA, Arechiga-Serrano R, Cano-Valle F, Eden-Wynter RA, Texcalac-Sangrador JL, Villa-Barragan JP, Rodríguez-Agudelo Y, Montes S. 2001. Exposure to manganese: health effects on the general population, a pilot study in central Mexico. *Environ Res.* 85(2):90–104.
- Shu CH, Yuan BC. 2008. Assessment of odor identification function in Asia using a modified "Sniffin' Stick" odor identification test. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 265(7):787–790.
- Smolders R, Schramm KW, Nickmilder M, Schoeters G. 2009. Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. *Environ Health.* 8:8.
- Solís-Vivanco R, Rodríguez-Agudelo Y, Riojas-Rodríguez H, Ríos C, Rosas I, Montes S. 2009. Cognitive impairment in an adult Mexican population non-occupationally exposed to manganese. *Environ Toxicol Pharmacol.* 28(2):172–178.
- Thompson KJ, Molina RM, Donaghey T, Savaliya S, Schwob JE, Brain JD. 2011. Manganese uptake and distribution in the brain after methyl bromide-induced lesions in the olfactory epithelia. *Toxicol Sci.* 120(1):163–172.
- Tjälve H, Henriksson J. 1999. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology.* 20(2–3):181–195.
- Tovalín H, Herbarth O, Sierra-Vargas M, Strandberg B, Blanco S, Vega L, Sioutas C, Hicks JJ, Marroquin R, Acosta G, *et al.* 2010. Air pollutants exposure and health effects during the MILAGRO-MCMA 2006 Campaign. In: Gurjar B, Molina LT, Ojha CSP, editors. *Air pollution:*

- health and environmental impacts. Boca Raton (FL): CRC Press, Taylor & Francis Group. p. 203–227.
- US EPA. 1997. Manganese Integrated Risk Information System (IRIS) substance file. Cincinnati (OH): Office of Health and Environmental Assessment.
- Walsh MP. 2007. The global experience with lead in gasoline and the lessons we should apply to the use of MMT. *Am J Ind Med.* 50(11):853–860.
- Wilson DA, Stevenson RJ. 2003. The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends Neurosci.* 26(5):243–247.
- Wolfensberger M, Schnieper I, Welge-Lüssen A. 2000. Sniffin' Sticks: a new olfactory test battery. *Acta Otolaryngol.* 120(2):303–306.
- Zoni S, Albin E, Lucchini R. 2007. Neuropsychological testing for the assessment of manganese neurotoxicity: a review and a proposal. *Am J Ind Med.* 50(11):812–830.

ANEXO 2

Artículo:

Guarneros M, Hudson R, López-Palacios M, Drucker-Colín R. Reference values of olfactory function for Mexico City inhabitants. Archives of Medical Research (en revisión).

Reference Values of Olfactory Function for Mexico City Inhabitants

Running title: Olfactory function in Mexico City Inhabitants

Marco Guarneros^{a,b}, Robyn Hudson^c, Martha López-Palacios^a, and René Drucker-Colín^a

^aDepartamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), DF Mexico.

^bPosgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, DF Mexico.

^cDepartamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, DF Mexico.

Word count : 4,688

Address reprint requests to: René Drucker-Colín, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-600, CP 04510, Distrito Federal, Mexico; Phone and FAX: +525555500064; E-mail: drucker@servidor.unam.mx

Abstract

Background and Aims. Olfactory testing is useful in the differential diagnosis of age-related pathologies. To provide baseline reference values for clinical use in Mexico City we investigated the relation between olfactory capabilities and the principal population parameters of age, sex, and smoking habits in a large sample of healthy inhabitants.

Methods. We applied the internationally recognized and commercially available Sniffin' Sticks test battery to 916 men and women from across the adult life span. The Sniffin' Sticks test evaluates three key aspects of olfactory function: ability to detect an odor, to discriminate between odors, and to identify odors.

Results. We found a significant decline in olfactory function from the 5th decade of age, and that detection threshold was the most sensitive measure of this. We did not find a significant difference between men and women or between smokers and non-smokers. In confirmation of our previous studies of the negative effect of air pollution on olfactory function, Mexico City inhabitants had poorer overall performance than corresponding subjects previously tested in the neighboring but less polluted Mexican state of Tlaxcala.

Conclusions. While we basically confirm findings on general demographic patterns of olfactory performance from other countries, we also demonstrate the need to take into account local cultural, environmental and demographic factors in the clinical evaluation of olfactory performance of Mexico City inhabitants. The Sniffin' Sticks test battery, with some adjustment of stimuli to correspond to Mexican culture, provides an easily administered means of assessing olfactory health.

Key Words: Olfactory function, Sniffin' Sticks test, Sex, Age, Smoking, Mexico City.

Introduction

The utility of olfactory assessment in the diagnosis of a wide range of pathologies is increasingly recognized, particularly of neuroendocrine, neurological, and age-related conditions (1–7).

Indeed the loss of the sense of smell is a distinctive feature of different disorders that commonly afflict the elderly, and there has been an increase of interest in olfactory dysfunction since it was realized that anosmia is a common feature of idiopathic Parkinson's disease (PD) (8–11) that appears earlier than the movement or cognitive symptoms (12). Olfactory testing has proven useful in clinical practice; for instance, normal smell identification ability in PD patients is rare, and should prompt a revision of diagnosis (13). Likewise, the finding of anosmia in a patient diagnosed with progressive supranuclear palsy should also prompt diagnostic review (14, 15). Thus, olfactory testing may play a useful complementary role in the differential diagnosis of neurodegenerative diseases such as PD in distinguishing them from other movement disorders (16–18).

Previously, the clinical use of olfactory testing in the diagnosis of disease was hampered by the lack of comprehensive, easily administered, standardized and commercially available tests.

However, these difficulties have been largely overcome by the availability of several validated and easily administered test kits. One of the most widely used is the Sniffin' Sticks test battery, in which odorants contained in felt-tipped marker pens are presented to subjects according to a standard protocol (19–21). The standard Sniffin' Sticks procedure evaluates subjects' ability to detect an odorant (threshold), to distinguish between odorants, and to identify (name) them using a verbal check-list. One advantage of combining these different measures is to help identify where in the chemosensory and associated pathways functional impairment occurs. Another is

that using more than one measure of olfactory performance increases the likelihood of detecting olfactory and other associated functional loss (22–27).

However, performance on this test, as for all olfactory testing, depends to some degree on subjects' culture and on local environmental conditions. Odorants that are familiar and thus readily detected, discriminated and identified by subjects from one culture may be unfamiliar and so more difficult to detect, to discriminate and to identify by subjects from elsewhere (28–31).

Environmental factors such as altitude (air pressure), temperature and humidity (32, 33), and air pollution (22–25) can also affect the olfactory performance of otherwise healthy populations.

Such factors make it necessary to determine regional reference values with which to compare the results of clinical testing. Accordingly, research groups across the world employing the Sniffin' Sticks battery have found it useful to establish local norms of responding that take such factors into account (3, 34–41).

Given the increasing use of the Sniffin' Sticks test battery in research and clinical contexts, it was our aim in the present study to test a large sample of adult Mexico City inhabitants of all ages and both sexes to obtain reference data with which to compare the results of clinical testing for this population and test method. This involved obtaining a general database and analyzing the data according to the broad demographic categories of age, sex and smoking habits.

Materials and Methods

Study Population and Setting

The study was conducted at the science museum “Universum”, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City (MC), where we recruited visitors opportunistically according to their availability and willingness to participate. We obtained data from 916 subjects from 16–83 years

of age (615 women, 301 men, mean age 31.84 yrs, SD 14.31; Table 1) coming from a wide area of Mexico City. All subjects were MC residents, all had indoor occupations, all reported to be in good general health and to their knowledge not to be ill or suffering from any longer-term pathology, and none had previous experience with tests of olfactory function.

The procedure conformed to the declaration of Helsinki for medical research involving human subjects, and to the guidelines for the treatment of human subjects of the Instituto de Fisiología Celular and the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico. The study was approved by the Subcomité del Campo de Conocimiento en Biología Experimental y Biomedicina, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Since this is considered a minimal risk study according to articles 17 and 23 of the Mexican Regulations for clinical studies (42), the ethics committee approved using the verbal consent of participants. Furthermore, testing took place in a science museum where the interactive participation of visitors of all ages in such tests or demonstrations is encouraged. Testing did not involve physical intervention or have treatment consequences. Subjects were fully informed about the purpose and methods of the study and anonymity was assured.

Test Procedure

Subjects were tested in a 4 m² ventilated cabin designed for human olfactory testing. After obtaining subjects' informed consent, their age, sex, smoking history, years of schooling, occupation and city area of residence were recorded (Table 1). We only included recruits who reported not to have smoked, eaten or drunk any beverage other than water for at least 30 min before the test. Their olfactory performance was then evaluated using a slightly modified version of the standard Sniffin' Sticks test battery (see below); three odorants (licorice, green apple, and turpentine) were dropped from the identification test because we have previously found these to

be unfamiliar to Mexicans and therefore largely unidentifiable (23, 25). Each subject was tested in a single session lasting a maximum of 30 min.

Olfactory Performance

Odorants were presented to blindfolded subjects (except for the identification test, see below) and performance scored following an established procedure (19–21, 23–25). Odorants were presented in felt-tipped marker pens (Sniffin' Sticks; Figure 1) filled with 4 mL of liquid odorant or odorant dissolved in odorless propylene glycol. At the moment of testing, the cap was removed by the experimenter who held the tip of the pen approximately 2 cm in front of the subject's nostrils for approximately 2–3 s. Subjects were instructed when to sniff, and except for the identification test (see below), they could sample each stimulus only once.

Detection Threshold

Subjects' ability to detect 2-phenyl ethanol (a rose-like odor) was determined using an ascending-staircase, 3-alternative forced-choice procedure. Sixteen dilutions were presented in a geometric series starting with a 4 % solution (dilution ratio 2:1 in propylene glycol). In each trial 3 pens were presented singly in randomized order, 2 containing only the odorless solvent and the third the odorant, and subjects were asked to identify the pen that smelled different (i.e., that contained 2-phenyl ethanol). The interval between presentation of pens within a triplet was approximately 3 s and between triplets approximately 20 s. The staircase was reversed when the target was correctly identified on 2 successive trials. Detection threshold was defined as the mean of the last 4 of 7 staircase reversals. Subjects' scores could range from 0 (minimum sensitivity/anosmic for 2-phenyl ethanol) to 16 (maximum sensitivity).

Discrimination

Again using a 3-alternative forced-choice paradigm, 16 triplets of pens containing concentrations of odorant well above threshold for normosmics were presented in a fixed order (see 19 or 24 for a list of the odorants used). In each triplet 2 pens containing the same and 1 a different odorant were presented in random order. Subjects had to indicate which one smelled different. As for threshold determinations, the interval between presentation of pens within a triplet was approximately 3 s and between triplets approximately 20 s. Because 16 triplets were used for testing, subjects' scores could range from 0 to 16.

Identification

Subjects were presented with 13 common odorants (see *Test Procedure* above for elimination of 3 of the original 16 odorants) in the same order for all subjects and asked to choose the most appropriate (Spanish language) descriptor from a list of 4 plausible alternatives (e.g. shoe leather as target, and glue, grass and smoke; see 19 or 24 for a list of the stimuli used). They could sample stimuli more than once. The stimuli were well above threshold for normosmics, the interval between the presentation of each pen was approximately 10 s, and subjects' scores could range from 0 to 13.

Overall Performance

For each subject, results of the 3 subtests were summed to give a composite Threshold–Discrimination–Identification (TDI) score (maximum of $16 + 16 + 13 = 45$; cf. 40).

Data Treatment and Analysis

Data were analyzed as indicated in *Results* using SPSS 15.0 for Windows. To explore olfactory function in relation to age and for comparability with previous studies, subjects were divided into three age classes: group A: 16–35 yrs, group B: 36–55 yrs, and group C > 55 yrs (19-21; Figure

1). For a more complete visualization of the data and comparability with previous findings (23; see Discussion) the results are presented in Figure 1 as box plots. Two-tailed tests were performed taking $p < 0.05$ as the level of significance.

Results

Age

We found a clear reduction in olfactory performance with age. This was mainly due to a decline in the scores of subjects after about 50 years of age (Figures 1 and 2; one-way ANOVAs: odor detection ($F [2,800] = 11.556, p < 0.001$; post hoc Tukey tests: A vs. B, $p = 0.013$; A vs. C, $p < 0.001$; B vs. C, $p = 0.035$); odor discrimination ($F [2,800] = 4.228, p = 0.015$; A vs. C, $p = 0.014$; B vs. C, $p = 0.016$); odor identification ($F [2,800] = 4.079, p = 0.017$; A vs. C, $p = 0.043$; B vs. C, $p = 0.012$); and TDI scores ($F [2,800] = 11.798, p < 0.001$; A vs. C, $p < 0.001$, B vs. C, $p = 0.001$).

Sex

We did not find a clear relation between sex and olfactory performance. Variance in performance of the two sexes was large and individual scores for men and women overlapped strongly at all ages. No statistically significant interaction between sex and age was found on any measure (two-way ANOVAs: odor detection $F (2,797) = 2.088, p = 0.125$; odor discrimination: $F (2,797) = 0.553, p = 0.576$; odor identification: $F (2,797) = 0.700, p = 0.497$; and TDI scores: $F (2,797) = 0.838, p = 0.433$), indicating that olfactory performance across age, including the decline in later years, was similar for men and women.

Smokers

To analyze possible effects of smoking on olfactory function we divided subjects into those who reported smoking >1 cigarette a day and those who reported not smoking at all (Table 1).

Following this division, no statistically significant interaction between smoking and age was found on any measure (two-way ANOVAs: odor detection $F [2,732] = 1.630, p = 0.197$; odor discrimination: $F [2,732] = 0.332, p = 0.718$; odor identification: $F [2,732] = 0.114, p = 0.892$; and TDI scores: $F [2,732] = 0.520, p = 0.595$). To test this outcome further, we compared the performance of 32 subjects who reported smoking > 6 cigarettes a day with the performance of sex- and age-matched subjects who reported not smoking at all. We found no difference in performance between these heavier smokers and non-smokers either (t -tests: detection: $t [62] = 1.087, p = 0.281$; discrimination: $t [62] = 1.264, p = 0.211$; identification: $t [62] = -1.359, p = 0.179$; and TDI score: $t [62] = 0.798, p = 0.434$).

Reference Values

Following established practice for the Sniffin' Sticks test battery (3, 19-21), we defined normosmia as the overall (TDI) score achieved by 90 % of subjects, anosmia as test scores of < 15 (not < 16 as in previous studies using the full set of odorants. Because of the natural decline in olfactory performance even of otherwise healthy subjects, we calculated the TDI reference values for each of the three age groups separately (Table 2; Figure 2). Given that we found no effect of sex or smoking on olfactory performance, data for women and men and smokers and non-smokers have been combined.

Discussion

The results of the present study are in basic agreement with previous reports from a wide range of countries (3,19, 35, 39) and confirm the reliability and robustness of the Sniffin' Sticks test

battery and the potential usefulness of the values obtained as reference guidelines for clinical testing in MC. This was clearest for the effect of age and the notable decline in olfactory performance for both sexes from about the fifth decade of life (3, 20, 34, 43–46). It was also clearest for detection threshold (Figure 1), confirming our previous findings that in healthy subjects from MC olfactory loss is more likely to occur at the periphery presumably due to damage to the olfactory epithelium rather than to a decline in more central processes associated with the ability to remember and identify odors (22, 23). It also confirms the usefulness of the Sniffin' Sticks test battery for distinguishing between kinds of olfactory loss and identifying where, broadly, this might occur in the sensory pathway (24–27).

These results have direct implications for the use of olfactory testing in the diagnosis of age-related pathologies such as Parkinson and other neurodegenerative diseases (see Introduction, 2, 4, 47, 48). Thus, we suggest that when evaluating the olfactory performance of older patients it is more appropriate to compare their scores with reference values for similarly aged healthy subjects than with the higher scores of a healthy younger population (Figure 2, Table 2).

Also in agreement with a number of previous studies (22, 23, 37, 49–54), we did not find a convincing or consistent effect of sex on any measure of olfactory performance. Scores of men and women overlapped strongly at all ages, suggesting that should there be an effect of sex on olfactory performance as suggested by some studies (55–59), a very large sample would be necessary to detect it, thereby reducing the need or usefulness of taking this variable into account in clinical testing.

Similarly, and again in agreement with a number of previous studies (37, 45, 59–61), was the lack of an adverse effect of smoking on olfactory performance. The scores of smokers and non-smokers overlapped strongly across all ages, and even the comparison of a sub-population of heavy smokers (> 6 cigarettes/day) with age-matched non-smokers failed to report significant

differences. We therefore suggest that as for sex, smoking habits appear to be of little significance for clinical testing. Nevertheless, given the difference in olfactory performance between smokers and non-smokers reported in other studies (55, 56, 58, 60–63), more research is needed on this, and particularly taking possible socioeconomic confounds related to work place, area of residence and other aspects of life style into account.

Returning to a main reason for this study, the results confirm the need for reference data appropriate for particular cultural and geographic regions (64, 65). As mentioned in Methods, it was necessary to eliminate 3 of the odorants as unfamiliar to Mexicans (25). However, an advantage of the Sniffin' Sticks method is its versatility, given that inappropriate stimuli can be readily replaced by filling fresh pens with culturally more appropriate substances (64). In addition, the poorer performance of the MC subjects of the present study, particularly on detection threshold, in comparison to previous results for a comparable Mexican population from the less polluted neighboring state of Tlaxcala (23), confirms the effect of big city air pollution on the olfactory performance of healthy adult MC inhabitants. However, MC is one of the world's largest conurbations, with more than 20.4 million residents spread across approximately 785,400 hectares (66). As a consequence, it is also a geographically heterogeneous community, with some regions of the city more exposed to airborne contaminants than others (67). Thus, apart from the potential usefulness of olfactory testing for the diagnosis of specific ailments, this could also provide an efficient, cheap and non-invasive means of monitoring the impact of big city air pollution on general public health (23, 24). The reference values we provide here, drawn from healthy, essentially middle class residents with primarily indoor clerical-type or professional employment, should prove useful in identifying possible olfactory deficits in sub-groups of MC residents particularly exposed to adverse environmental influences.

Acknowledgements

MG received a doctoral fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (228879).

R-DC received funding from CONACYT (179927) AND PAPIIT (IN204612). The authors thank all subjects for their participation, Marcela Palomero Rivero and Carolina Rojas for excellent technical assistance and the personnel of the science museum “Universum” for logistic support.

References

1. Hudson R, Laska M, Berger T, et al. Olfactory function in patients with hypogonadotropic hypogonadism: an all-or-none phenomenon? *Chem Senses* 1994;19:57–69.
2. Fernández-Ruiz J, Díaz R, Hall-Haro C, et al. Olfactory dysfunction in hereditary ataxia and basal ganglia disorders. *Neuroreport* 2003;14:1339–1341.
3. Mackay-Sim A, Grant L, Owen C, et al. Australian norms for a quantitative olfactory function test. *J Clin Neurosci* 2004;11:874–879.
4. Velázquez-Pérez L, Fernández-Ruiz J, Díaz R, et al. Spinocerebellar ataxia type 2 olfactory impairment shows a pattern similar to other major neurodegenerative diseases. *J Neurol* 2006;253:1165–1169.
5. Hummel T, Fliessbach K, Abele M, et al. Olfactory fMRI in patients with Parkinson's disease. *Front Integr Neurosci* 2010;4:1–25.
6. Stevenson RJ. An initial evaluation of the functions of human olfaction. *Chem Senses* 2010;35:3–20.
7. Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2012;8:329–339.
8. Ansari KA, Johnson A. Olfactory function in patients with Parkinson's disease. *J Chronic Dis* 1975;28:493–497.
9. Doty RL, Deems DA, Stellar S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage or disease duration. *Neurology* 1988;38:1237–1244.
10. Ross W, Petrovitch H, Abbott RD, et al. Association of olfactory dysfunction with risk of

future Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005;20:439.

11. Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, et al. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease— a multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15:490–494.

12. Haehner A, Hummel T, Hummel C, et al. Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22:839–842, 2007.

13. Daum RF, Sekinger B, Kobal G, et al. Olfactory testing with 'Sniffin' Sticks' for clinical diagnosis of Parkinson disease. *Nervenarzt* 2000;71:643–650.

14. Doty RL, Golbe LI, McKeown DA, et al. Olfactory testing differentiates between progressive supranuclear palsy and idiopathic Parkinson's disease. *Neurology* 1993;43:962–965.

15. Wenning GK, Shephard BC, Hawkes CH, et al. Olfactory function in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;57: 251–252.

16. Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ. Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology* 2001;57:1497–1499.

17. Katzenschlager R, Zijlmans J, Evans A, et al. Olfactory function distinguishes vascular parkinsonism from Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1749–1752.

18. Hawkes C. Olfaction in Neurodegenerative disorder. In: Hummel T, Welge-Lüssen A, eds. *Taste and Smell. An Update. Adv Otorhinolaryngol.* Basel, Germany: Karger Publishers; 2006, pp 133–151.

19. Hummel T, Sekinger B, Wolf SR, et al. "Sniffin' Sticks": olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chem Senses* 1997;22:39–52.

20. Hummel T, Kobal G, Gudziol H, et al. Normative data for the “Sniffin’ Sticks” including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: an upgrade based on a group of more than 3,000 subjects. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:237–243.
21. Kobal G, Klimek L, Wolfensberger M, et al. Multicenter investigation of 1,036 subjects using a standardized method for the assessment of olfactory function combining tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257:205–211.
22. Hudson R, Arriola A, Martínez-Gómez M, et al. Effect of air pollution on olfactory function in residents of Mexico City. *Chem Senses* 2006;31:79–85.
23. Guarneros M, Hummel T, Martínez-Gómez M, et al. Mexico City air pollution adversely affects olfactory function and intranasal trigeminal sensitivity. *Chem Senses* 2009;34:819–826.
24. Guarneros M, Drucker-Colín R, Esquivelzeta J, et al. Adverse effect of air pollution on odor perception. In: Moldoveanu AM, ed. *Advanced Topics in Environmental Health and Air Pollution Case Studies*. Rijika, Croatia: InTech Publishers; 2011. pp. 307–328.
25. Guarneros M, Ortiz-Romo N, Alcaraz-Zubeldia M, et al. Nonoccupational environmental exposure to manganese is linked to deficits in peripheral and central olfactory function. *Chem Senses* 2013;38:783–791.
26. Lötsch J, Reichmann H, Hummel T. Different odor tests contribute differently to the evaluation of olfactory loss. *Chem Senses* 2008;33:17–21.
27. Hedner M, Larsson M, Arnold N, et al. Cognitive factors in odor detection, odor discrimination, and odor identification tasks. *J Clin Exp Neuropsychol* 2010;32:1062–1067.

28. Ayabe-Kanamura S, Schicker I, Laska M, et al. Differences in perception of everyday odors: a Japanese-German cross-cultural study. *Chem Senses* 1998;23:31–38.
29. Distel H, Ayabe-Kanamura S, Martínez-Gómez M, et al. Perception of everyday odors – correlation between intensity, familiarity and strength of hedonic judgement. *Chem Senses* 1999;24:191–199.
30. Hudson R. From molecule to mind: the role of experience in shaping olfactory function. *J Comp Physiol A* 1999;185:297–304.
31. Wilson DA, Stevenson RJ. The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends Neurosci* 2003; 26:243–247.
32. Kuehn M, Welsch H, Zahnert T, et al. Changes of pressure and humidity affect olfactory function. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;263:299–302.
33. Riveron J, Boto T, Alcorta E. The effect of environmental temperature on olfactory perception in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 2009;55:943–951.
34. Katotomichelakis M, Balatsouras D, Tripsianis G, et al. Normative values of olfactory function testing using the ‘Sniffin’ Sticks’. *Laryngoscope* 2006;117:114–120.
35. Shu CH, Yuan BC. Assessment of odor identification function in Asia using a modified “Sniffin’ Stick” odor identification test. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265:787–790.
36. Silveira-Moriyama L, Sirisena D, Gamage P, et al. Adapting the Sniffin’ Sticks to diagnose Parkinson’s disease in Sri Lanka. *Mov Disord* 2009;24:1229–1233.
37. Orhan KS, Karabulut B, Keles N, et al. Evaluation of factors concerning the olfaction using the Sniffin’ Sticks test. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;146:240–246.

38. Hudson L, Silva MC, Núñez JC, et al. Valores normales de olfato, hiposmia y anosmia en población chilena sana según la batería "sniffin sticks". *Rev Med Chile* 2012;140:442–446.
39. Neumann C, Tsioulos K, Merkonidis C, et al. Validation study of the "Sniffin' Sticks" olfactory test in a British population: a preliminary communication. *Clin Otolaryngol* 2012;37:23–27.
40. Wolfensberger M, Schnieper I, Welge-Lüssen A. Sniffin' Sticks: a new olfactory test battery. *Acta Otolaryngol* 2000;120:303–306.
41. Yuan BC, Lee PL, Lee YL, et al. Investigation of the Sniffin' Sticks olfactory test in Taiwan and comparison with different continents. *J Chin Med Assoc* 2010;73:483–486.
42. Secretaría de Salud. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. 2003. Available: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>. Accessed November 2014.
43. Doty RL, Shaman P, Applebaum SL, et al. Smell identification ability: changes with age. *Science* 1984;226:1441–1443.
44. Cain WS, Gent JF. Olfactory sensitivity: reliability, generality and association with aging. *J Exp Psychol. Hum Percept Perform* 1991;17:382–391.
45. Mackay-Sim A, Johnston A, Owen C, et al. Olfactory ability in the healthy population: reassessing presbyosmia. *Chem Senses* 2006;31:763–771.
46. Doty RL, Kamath V. The influences of age on olfaction: a review. *Front Psychol* 2014;5:20.
47. Chuang JY, Phalen RF. Dementia incidence in middle-income countries. *Lancet* 2012;380:1470–1471.

48. Zoni S, Bonetti G, Lucchini R. Olfactory functions at the intersection between environmental exposure to manganese and Parkinsonism. *J Trace Elem Med Biol* 2012;26:179–182.
49. Boesveldt S, Verbaan D, Knol DL, et al. Odour identification and discrimination in Dutch adults over 45 years. *Rhinology* 2008;46:131–136.
50. Laska M, Hudson R. A comparison of the detection thresholds of odour mixtures and their components. *Chem Senses* 1991;16:651–662.
51. Larsson M, Finkel D, Pedersen N. Odor identification: influences of age, gender, cognition, and personality. *J Gerontol: Psychol Sci* 2000;55B:P304–P310.
52. Schriever VA, Mori E, Petters W, et al. The “Sniffin’ kids” test – A 14 item odor identification test for children. *PlosOne* 2014;9:e101086.
53. Sorokowska A, Hummel T. Cross-cultural administration of an odor discrimination test. *Chemosens Percept* 2014; 7:85-90.
54. Tekeli H, Altundag A, Salihoglu M, et al. The applicability of the “Sniffin’ Sticks” olfactory test in a Turkish population. *Med Sci Monit* 2013;30:1221-1226.
55. Cardesín A, Alobid I, Benítez P, et al. Barcelona Smell Test-24 (BAST-24): validation and smell characteristics in the healthy Spanish population. *Rhinology* 2006;44:83–89.
56. Doty RL (1997). Studies of human olfaction from the University of Pennsylvania Smell and Taste Center. *Chem Senses* 1997;22:565–586.
57. Olofsson J, Nordin S. Gender differences in chemosensory perception and event-related potentials. *Chem Senses* 2004;29:629–637.
58. Katotomichelakis M, Balatsouras D, Tripsianis G, et al. The effect of smoking on the olfactory function. *Rhinology* 2007;45:273–280.

59. Mullol J, Alobid I, Mariño-Sánchez F, et al. Furthering the understanding of olfaction, prevalence of loss of smell and risk factors: a population-based survey (OLFACAT study). *BMJ Open* 2012;2:6 e001256.
60. Fordyce ID. Olfaction tests. *Br J Ind Med* 1961;18:213–215.
61. Venstrom D, Amoore JE. Olfactory threshold in relation to age, sex or smoking. *J Food Sci* 1968;33:264–265.
62. Frye RE, Schwartz BS, Doty RL. Dose-related effects of cigarette smoking on olfactory function. *JAMA* 1990;263:1233–1236.
63. Sugiyama K, Matsuda T, Kondo H, et al. Postoperative olfaction in chronic sinusitis: smokers versus nonsmokers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002;111:1054–8.
64. Shu CH, Yuan BC, Lin SH, et al. Cross-cultural application of the “Sniffin’ Sticks” odor identification test. *Am J Rhinol Allergy* 2007;21:570–573.
65. Seo HS, Guarneros M, Hudson R, et al. Attitudes toward olfaction: A cross-regional study. *Chem Senses* 2010;36:177–187.
66. United Nations. UN Data for Mexico. 2011; available at <http://data.un.org/>
67. SEMARNAT-INE (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales – Instituto Nacional de Ecología). Cuarto almanaque de datos y tendencias de la calidad del aire en 20 ciudades mexicanas (2000-2009). 2011; available at www.inecc.gob.mx.

Table 1 General characteristics of the study sample

	Group A 16–35 years	Group B 36–55 years	Group C >55 years
Sample size	536	211	56
Women	352	143	41
Men	184	68	15
Smokers (>1 cig/d)	122	29	6
Nonsmokers	362	170	49
*Age (mean, SD)	23.6 (4.6)	44.8 (5.6)	63.7 (7.2)
*Schooling (mean, SD)	15.08 (2.0)	14.8 (2.7)	14.4 (5.4)

* Years.

Table 2 Overall (TDI) test scores defining levels of olfactory performance for adult Mexico City inhabitants

	Group A 16–35 years	Group B 36–55 years	Group C >55 years
Normosmia	>25.4	>27.5	>22.1
Hyposmia	15.0-25.4	15.0-27.4	15.0-22.0
Anosmia	<15.0	<15.0	<15.0

Guarneros et al.

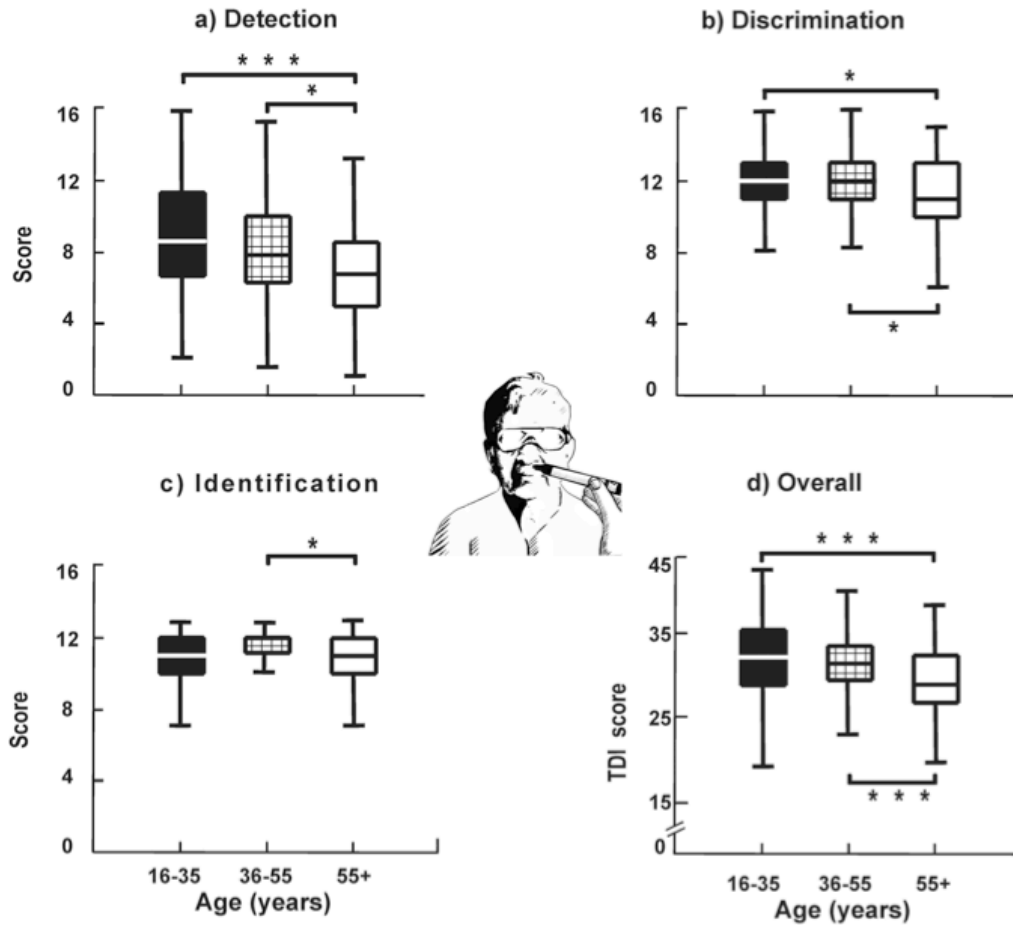


Figure 1. Performance of adult subjects of different age groups on the 3 tests of olfactory performance (a–c), and their overall TDI scores (d) representing the sum of their scores on these tests. For each of the tests (a) and (b), subjects could obtain a maximum score of 16 correct responses, for test (c), a maximum score of 13 correct responses, and consequently a maximum TDI score of 45. Box plots: horizontal lines within boxes give medians, horizontal limits of the boxes give interquartile ranges, and vertical bars give absolute ranges; n of subjects for ages 16–35 yrs = 649, for ages 36–55 yrs = 211, and for ages 55+yrs = 56; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (one-way ANOVAs, see text for statistics).

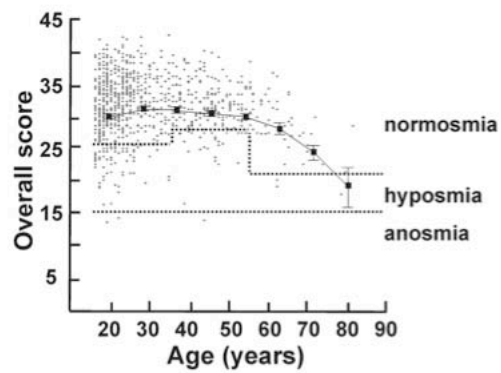


Figure 2. Overall (TDI) test scores by decade of age. Normosmia is defined as the test score achieved by 90 % of subjects in each of the three age groups in Tables 1 and 2 and Figure 1. Anosmia is defined as a score of < 15, and hyposmia as a score between anosmia and normosmia for each of the three age groups, respectively. Each point gives the TDI score of an individual subject; the curve shows the overall change in performance across age, together with means \pm SEM for each decade (cf. 3).