



Universidad Nacional Autónoma de México



**Facultad de Psicología
División de Estudios Profesionales**

La exposición al manganeso produce daños en el sistema olfativo. Un estudio en poblaciones adyacentes a minas del Estado de Hidalgo.

T E S I S

Que para obtener el título de:

Licenciado en Psicología

Presenta:

Nahum Ortiz Romo

Director:

Dr. René Drucker Colín

Comité:

**Dr. Óscar Prospero García
Dr. Antonio Paulino Zainos Rosales
Dr. Octavio César García González
Dr. Rodrigo Pedroza Llinás**

México, D.F.

Noviembre, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Con todo cariño para mi mamá, porque es incontable todo lo que le debo.

A mi papá, por su apoyo y su ejemplo.

A mis hermanos, les agradezco por la ayuda que me han brindado toda la vida.

Gracias a Eri, por su compañía y colaboración.

Al Dr. Marco Guarneros, a la Dra. Robin Hudson y a la Dra. Mireya Alcaraz, porque sin ellos ésta tesis no sería posible.

Especialmente al Dr. Drucker, por todo el apoyo, tanto profesional, como personal que me ha ofrecido.

Gracias al Dr. Octavio García, por su empeño y su guía.

Agradezco su tiempo, sus consejos y su profesionalismo al Dr. Antonio Zainos, al Dr. Óscar Prospero y al Dr. Rodrigo Pedroza.

Índice:

1) Resumen	2
2) Introducción	3
2.1) Descripción del manganeso	5
2.1.1) Papel que desempeña el Mn en el organismo.	6
2.1.2) Efectos de la exposición anormal al Manganeso	6
2.1.3) Efectos del Mn en trabajadores expuestos.	7
2.1.4) Entrada y transporte del Mn al SNC	7
2.2) Mecanismo de toxicidad del manganeso	10
2.2.1) Entrada del manganeso a la célula	10
2.2.2) Respiración mitocondrial	10
2.2.3) Estrés oxidativo.	11
2.2.4) El papel del glutamato en la toxicidad de Mn	12
2.2.5) Toxicidad en neuronas dopaminérgicas	13
2.3) Procesamiento de olores	14
2.3.1) Corteza olfativa	16
2.3.2) La discriminación e identificación de olores como procesos sintéticos	17
2.3.3) La capacidad olfativa disminuye con la edad	19
2.4) Riesgos del Mn como contaminante en el aire	20
2.5) Efectos del Mn en poblaciones expuestas.	22
2.6) Los “Sniffin’ Sticks”, una prueba confiable para medir el desempeño del sistema olfativo.	24
2.7) Estudios de medición del manganeso en cabello (MnC)	24
2.8) Investigaciones sobre el efecto del manganeso en el sentido del olfato	26
3) Justificación	26
4) Objetivos	27
5) Hipótesis	27
6) Materiales y métodos	28
8) Resultados	35
9) Discusión	40
10) Conclusión	42

1) Resumen

El manganeso (Mn) es un elemento natural que se encuentra en varios tipos de suelo y es fundamental para la fabricación de diversos productos que utilizamos en la vida diaria, incluyendo el acero, baterías y gasolinas. Además, es un metal de transición que en condiciones normales es necesario para diversos procesos fisiológicos en el organismo, como la formación de metaloproteínas, la regulación de la energía celular y co-factor en varios procesos enzimáticos. No obstante, es de creciente preocupación el papel que ocupa como contaminante tóxico del aire debido a que ingresa sin resistencia del epitelio olfativo al bulbo olfatorio y, a diferencia de otros metales como el cadmio y el níquel, es transportado trans-sinápticamente a estructuras profundas dentro del cerebro. Ha sido documentado que la exposición de forma tanto ocupacional como no ocupacional al Mn produce problemas psiquiátricos y neurológicos. Además se ha descrito que la exposición al Mn ocupacional provoca un bajo desempeño en la capacidad de percibir e identificar olores; sin embargo, poco se sabe acerca del posible efecto de la exposición no ocupacional al Mn en la función olfativa. Usando una batería estandarizada de pruebas olfativas comparamos el desempeño olfativo de sujetos de una comunidad minera a menos de un kilómetro de una planta de procesamiento de manganeso, con sujetos no expuestos de una comunidad a 50 km de la fuente de exposición más cercana (N=30/grupo). Los grupos fueron pareados por edad, género y nivel educativo, y ninguno de ellos fue trabajador en actividades mineras. Se midieron las concentraciones de Mn en cabello como un biomarcador de exposición; los sujetos expuestos tuvieron concentraciones significativamente más altas que los sujetos no expuestos. También fueron significativamente superados por los sujetos no expuestos en todas las medidas olfativas (umbral, discriminación e identificación de olores), lo que indica efectos adversos de la exposición a Mn en un rango de funciones olfativas, incluyendo aquellas involucradas en procesos cognitivos de alto orden. Esto contrasta con hallazgos previos que muestran efectos adversos periféricos pero no centrales en la función olfativa provocados por la contaminación del aire de la Ciudad de México, que consiste principalmente en contaminantes con efectos conocidos sobre el epitelio olfatorio pero con una menor capacidad de movimiento trans-sináptico en comparación con el Mn. Los resultados de la tesis permiten concluir que la exposición atmosférica no ocupacional a Mn atmosférico está asociada con decrementos en la función olfativa periférica y central.

2) Introducción

El manganeso (Mn) se encuentra en el medio tanto en formas orgánicas como en inorgánicas. En la manera inorgánica es un ingrediente esencial del acero, también se usa en la producción de baterías secas, vidrio, fuegos artificiales, industria textil y fertilizantes (Agencia de Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, ATSDR 2008).

El Mn es un metal esencial en varios tejidos biológicos, es necesario para la actividad regular del organismo y en una variedad de procesos fisiológicos incluidos el metabolismo de macromoléculas (aminoácidos, lípidos, proteínas y carbohidratos), el funcionamiento normal del sistema inmune, la regulación de la energía celular mediante complejos formados con ATP y fosfato inorgánico, el crecimiento normal de los huesos y de tejido conectivo. El Mn es parte importante de metaloenzimas como la arginasa (enzima que interviene en la degradación de la arginina para formar ornitina), y funciona como factor para otras enzimas como la antioxidante manganeso superóxido dismutasa. En circunstancias normales juega un papel en la síntesis y metabolismo de varios neurotransmisores como dopamina y serotonina por medio de sus actividades en las enzimas monoamina oxidasa y catecolamina metil-transferasa (Schneider et al., 2006).

Sin embargo la sobre-exposición al Mn ocasiona problemas psiquiátricos (llanto y risa excesivos, anormalidades en el sueño, irritabilidad, apatía y anorexia) y neurológicos (perturbaciones en la marcha, disartria, torpeza, calambres musculares, temblores cinéticos, y expresiones faciales enmascaradas), inclusive puede derivar en síntomas extrapiramidales similares a la enfermedad de Parkinson, tales como distonía irreversible e hiperflexión de los músculos (Cotzias et al., 1968; Chu et al., 1996; Davis et al., 1998). Lo anterior se debe a que el Mn no solamente es transportado sin resistencia 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 es transportado trans-sinápticamente a estructuras profundas del cerebro (Sloot et al., 1994; Roels et al.,

1997; Takeda et al., 1997; Tjälve y Henriksson, 1999; Aschner et al., 2007; Dorman et al., 2006; Leavens et al., 2007; Thompson et al., 2011).

Aunque no se conoce exactamente el mecanismo neurotóxico del Mn, se ha demostrado que promueve la destrucción de neuronas dopaminérgicas en diversas partes del encéfalo, de las cuáles el bulbo olfatorio y el cuerpo estriado son las más afectadas; el mecanismo propuesto involucra la autooxidación de catecolaminas intracelulares, inhibiendo así la síntesis de ATP, lo que conduce a una mayor producción de radicales libres, especies reactivas de oxígeno y otros metabolitos citotóxicos, además de una disminución de los mecanismos celulares de defensa antioxidante (Eriksson et al., 1992; Burton y Guilarte, 2009; Martínez y Gavin, 2013). También se indica que existe una reducción del transporte de glutamato y una alteración en el ciclo de glutamato-glutamina en corteza, estriado, tálamo-hipotálamo y bulbo olfatorio (Erikson et al., 2002, 2007; Bagga et al., 2012).

Es de particular importancia estudiar los efectos del Mn sobre el sentido del olfato debido a que el Mn posee la habilidad de sortear la barrera hematoencefálica y alcanzar el sistema nervioso central, principalmente por medio de la inhalación y reclutamiento por parte de las neuronas olfativas receptoras que se originan en la cavidad nasal (Tjälve y Henriksson, 1999; Vitarella et al., 2000; Dorman et al., 2006; Thompson et al., 2011). Actualmente existen estudios que demuestran que en grupos de personas expuestas ocupacionalmente a altos niveles de Mn, tales como soldadores y mineros ocurre un incremento de los umbrales olfativos (Sjögren et al., 1996), así como una disminución de la capacidad para identificar olores (Bowler et al., 2007; Antunes et al., 2007). Y aunque es creciente la evidencia de que la exposición crónica de menor intensidad a Mn en el ambiente, también puede tener efectos tóxicos persistentes 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; Lucchini et al., 2012), poco se han descrito los efectos que ocasiona la toxicidad del Mn en el sentido del olfato, a pesar de ser la principal entrada del tóxico al sistema nervioso central (SNC) (Zoni et al. 2012)

2.1) Descripción del manganeso

El Mn es un elemento natural que se encuentra en diferentes tipos de suelo y rocas. En la tabla periódica tiene un número atómico de 25 y se encuentra en el grupo 7. El Mn puro es un metal plateado, sin embargo no se encuentra de esta manera en el ambiente. Se presenta combinado con otras sustancias como el oxígeno, sulfuro y cloro. Es un metal de transición necesario para diversas funciones orgánicas. (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de Estados Unidos “ATSDR” por sus siglas en inglés, 2008).

Existe en distintas formas químicas y físicas en la tierra, el agua y partículas suspendidas en la atmósfera. De importancia ambiental son Mn^{+2} , Mn^{+4} y Mn^{+7} . En tejido viviente se encuentran Mn^{+2} , Mn^{+3} y posiblemente Mn^{+4} (Aschner et al., 2007).

Según la ATSDR el Mn es un nutriente esencial que comprende el 0.1% de la corteza terrestre, es el duodécimo elemento más abundante y el décimo quinto metal, de forma natural se encuentra con otros elementos formando silicatos, óxidos y carbonatos en más de 100 minerales, siendo el más común el dióxido de manganeso (MnO_2 , conocido como pirolusita. (ATSDR, 2008).

Se encuentra en el medio tanto en formas orgánicas como en inorgánicas. En la manera inorgánica es un ingrediente esencial del acero, también se usa en la producción de baterías secas, vidrio, fuegos artificiales, industria textil y como fertilizante. Además se utiliza como pigmento inorgánico en cosméticos y pinturas, llamado “violeta de manganeso”. En la forma orgánica se utiliza como fungicida, aditivo en la gasolina, inhibidores de humo y como agente para imágenes médicas (ATSDR, 2008).

Otro uso se da con una sustancia llamada Mn tricarbonil metilciclopentadienil o MMT la cual se utiliza como aditivo para aumentar el octanaje en las gasolinas; éste compuesto se empezó a utilizar en los años setenta y se ha ido disminuyendo su uso hasta la fecha (Pellizari et al., 2001). En el presente en Estados Unidos la EPA (Agencia de Protección Ambiental) solo permite la concentración de 1/32 g. por galón, pero continúa la discusión sobre el daño que puede producir éstas emisiones en los seres vivos (Davis et al., 1998).

En los 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 desde $0.22\mu\text{g}/\text{m}^3$ hasta $0.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ (ATSDR, 2008).

2.1.1) Papel que desempeña el Mn en el organismo.

El Mn es un metal esencial en varios tejidos biológicos, es necesario para el funcionamiento normal y una variedad de procesos fisiológicos incluyendo: metabolismo de aminoácidos, lípidos, proteínas y carbohidratos; funcionamiento normal del sistema inmune; regulación de la energía celular mediante complejos formados con ATP y fosfato inorgánico; crecimiento normal de los huesos y tejido conectivo. El Mn es parte importante de metaloenzimas como la arginasa y funciona como co-factor para otras enzimas. En circunstancias normales juega un papel en la síntesis y metabolismo de varios neurotransmisores como dopamina y serotonina por medio de sus actividades en las enzimas monoamina oxidasa y catecolamina metil transferasa (Golub et al., 2005; Schneider et al., 2006).

2.1.2) Efectos de la exposición anormal al Manganeseo

La deficiencia de Mn en humanos y otras especies está asociada a pérdida de peso, problemas de crecimiento, defectos esqueléticos, tolerancia anormal a la glucosa y problemas de coagulación (Erikson et al., 2005, 2007; Schneider et al., 2006).

Los primeros estudios sobre la exposición ocupacional excesiva al Mn incluyen problemas neurológicos, reproductivos y respiratorios. El Manganismo es caracterizado por varios desórdenes psiquiátricos y del movimiento, regularmente consiste en dos o tres fases. La primera fase son los efectos psiquiátricos que incluyen problemas de llanto y risas excesivas, anormalidades en el sueño, irritabilidad, apatía y anorexia; a estos síntomas algunas veces se les ha nombrado "locura mangánica". La segunda fase consiste en signos neurológicos y neuromusculares como: perturbaciones en la marcha, disartria, torpeza, calambres musculares, temblores cinéticos, expresiones

faciales enmascaradas. Además una etapa final de Mn intoxicación puede implicar síntomas de distonía irreversible e hiperflexión de los músculos, pero éstos problemas no suelen aparecer hasta varios años después del inicio de la exposición (Cotzias et al., 1968; Chu et al., 1996; Davis et al., 1998).

2.1.3) Efectos del Mn en trabajadores expuestos.

Diversas investigaciones se han realizado con trabajadores que se encuentran directamente expuestos a la toxicidad del manganeso, ya sean soldadores, mineros o trabajadores del acero. En estos estudios se ha encontrado que existe un deterioro psiquiátrico, motor y cognitivo considerable en los sujetos expuestos (sin sintomatología aparente), al ser comparados con controles. Los problemas psiquiátricos descritos incluyen ansiedad, (Bowler et al., 2007), problemas de sueño, disfunción sexual, dolores de cabeza, depresión y fatiga (Lucchini et al., 1995; Bowler et al, 2007). En cuanto a las afectaciones motoras se han encontrado deficiencias en el desempeño de las pruebas de “Sistema de análisis de temblor asistido por computadora”, “Temblor en las manos”, “Test de Balance Corporal” (Bowler et al. 2007), “Golpeteo de dedos” (Lucchini et al. 1995), Prueba de “Pegboard” en ambas manos y el “Test motor de Luria-Nebraska” (Sjögren et al. 1996). Referente a la evaluación cognitiva se encontraron déficits en memoria de trabajo, concentración, memoria y habilidades verbales (Lucchini et al. 1995; Bowler et al. 2007). Además se observaron efectos sobre las funciones cognitivas más complejas, tales como tareas aritméticas de la prueba de las adiciones y la tarea de codificación de la prueba de pares símbolo- dígitos (Lucchini et al. 1995).

2.1.4) Entrada y transporte del Mn al SNC

Cuando se administra por inhalación el Mn no solamente es transportado sin resistencia 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 es transportado trans-sinápticamente a

estructuras profundas del cerebro (Sloot et. al. 1994; Roels et. al. 1997; Takeda et. al.1997; Leavens et al. 2007; Thompson et. al. 2011).

Con la intención de determinar la respuesta del organismo a la inhalación de Mn, Vitarella (1999), administró fosfato de manganeso por vía nasal a cuatro grupos de ratas macho adultos en diferentes concentraciones, 0, 0.03, 0.3 o 3 mg Mn/m³ respectivamente. Los animales fueron expuestos seis horas al día durante dos semanas, y posteriormente se analizó el contenido de Mn en los siguientes tejidos: plasma, eritrocitos, bulbo olfatorio, cuerpo estriado, cerebelo, pulmones, hígado, fémur y el músculo esquelético. Los resultados arrojaron que comparado con los controles se encontró un aumento en los niveles de Mn en el bulbo olfatorio, fémur, pulmones y el músculo esquelético, luego de la exposición a 3 mg Mn/m³; en tanto, la concentración de 0.3 mg Mn/m³ tuvo un efecto en el bulbo olfatorio, estriado y pulmones. El estudio indica que el bulbo olfatorio es la zona que más acumula manganeso.

Así mismo Roels (1997), observó la absorción y distribución cerebral del Mn mediante un estudio con ratas macho adultas. Dividió a las ratas en tres grupos, a uno de ellos se le administró MnCl₂, al siguiente MnO₂, y al último solución salina. Luego cada uno de los grupos anteriores lo fraccionó en tres partes conforme a la vía de administración: al primero se le aplicó de manera oral, al segundo por inyección intraperitoneal y al tercero mediante la instalación intracraneana. A cada uno de los nueve grupos les fue aplicado el tratamiento una vez a la semana por un periodo de cuatro semanas. Cuatro días después de la última dosis, las ratas fueron sacrificadas y se midió el volumen de Mn en los siguientes tejidos: sangre, hígado, corteza, cerebelo y estriado. Como resultado de lo anterior se encontró que hubo aumento significativo de Mn en la corteza (g., 22%; intraperitoneal, 36%,; intracraneana, 48%), en comparación con los controles. La aplicación oral de MnCl₂ no tuvo gran incremento en el estriado, mientras que la aplicación intracraneana tuvo un incremento de 205% en el estriado de forma paralela a un incremento en la sangre. Se concluye que cualquiera que sea la forma de administración, la absorción de Mn en el cuerpo estriado fue consistentemente mayor cuando se aplica por inhalación que cuando se da de manera oral.

Para estudiar el transporte neuronal del Mn, Takeda (1997) inyectó ⁵⁴Mn dentro del cerebro y lo analizó por autorradiografía. Un día después de aplicar ⁵⁴MnCl₂ en el

estriado encontró una fuerte concentración de Mn en el tálamo, hipotálamo y sustancia nigra. Posteriormente inyectó la misma sustancia en un solo lado del bulbo olfatorio y describió que el ^{54}Mn fue distribuido en la corteza piriforme ipsilateral, áreas de la amígdala (corteza olfativa primaria), y luego a las corteza entorrinal (corteza olfativa secundaria). Estos resultados sugieren que el Mn está sujeto a un transporte generalizado en los circuitos neuronales. Además el Mn solamente puede ser tomado por las neuronas piriformes para después salir a las terminales neuronales olfativas secundarias y ser transportado a la corteza entorrinal.

Por último un estudio se han encontrado evidencias del transporte axonal anterior del Mn en los ganglios basales. Microinyecciones de ^{54}Mn en la sustancia nigra y el estriado revelaron que existe acumulación y retención de Mn en ciertas regiones específicas del cerebro. Concluyen que tanto las células gliales como la vías nigro-estriada como las estriado-nigras son blancos de la neurotoxicidad al Mn y las áreas afectadas son globo pálido, estriado, tálamo y sustancia nigra (Sloot et al. 1994).

Tabla 1. Regiones en donde se acumula el Mn según los autores.

	<i>BO</i>	<i>S. Nigra</i>	<i>Globo Pálido</i>	<i>Estriado</i>	<i>Tálamo</i>	<i>Hipotálamo</i>	<i>Cx Piriforme</i>	<i>Cx Entorrinal</i>
Vitarrella	X			X				
Roels				X				
Takeda		X			X	X	X	X
Sloot		X	X	X	X			

2.2) Mecanismo de toxicidad del manganeso

2.2.1) Entrada del manganeso a la célula

Varios estudios revelan que el Mn es transportado dentro de la célula por mecanismos similares al hierro (Fe^{++}) y junto con otros metales divalentes de transición compite por la absorción en la células.

Existen dos formas de transporte de Mn y Fe^{++} , uno de ellos dependiente de la transferrina y el otro independiente de transferrina. El dependiente propone que el complejo transferrina- Mn^{+3} (Tf-Mn^{+3}) inicialmente se une al receptor de transferrina (TfR) en la superficie celular, similar al proceso que sigue el Fe^{++} . Después de la unión de la Tf-Mn^{+3} a la TfR, vesículas endosómicas que se forman en la superficie celular se internalizan y posteriormente se acidifican por medio de iones hidrógeno de la bomba ATPasa, produciendo la liberación del metal del complejo TF / TfR. Dentro de las vesículas presumiblemente el Mn^{+3} se convierte en Mn^{+2} aunque una reductasa específica responsable de esta reacción no ha sido identificada. El Mn^{+2} subsecuentemente se transporta a través de la membrana endosómica por medio de la proteína transportadora de metales divalentes 1 (DMT1).

En la ruta independiente de transferrina, el Mn^{+2} es absorbido directamente por los receptores DMT1 que se encuentran en la superficie celular. También existe un transporte de Mn regulado por voltaje y operado por canales de Ca^{+2} así como también por los canales Ca^{+2} ionotrópicos receptores de glutamato, para esto se requieren señales externas para iniciar la entrada a la célula, tales como pueden ser la despolarización de la membrana por medio del agotamiento de el Ca^{+2} almacenado, o la unión del glutamato con su receptor (Roth et al., 2006).

2.2.2) Respiración mitocondrial

El Mn usa los canales de calcio como puerta de entrada a la mitocondria. En las mitocondrias, la mayor parte de Mn está unido a la membrana mitocondrial interna, o

proteínas de la matriz, lo cual permite al Mn interactuar directamente con proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa. También está demostrado que *in vitro* interfiere con la síntesis de ATP particularmente inhibiendo la función de la F₁ATPasa. El Mn se ha asociado con la supresión de las corrientes de calcio dependientes de ATP en los astrocitos, lo que sugiere que Mn promueve el potencialmente perjudicial secuestro mitocondrial de calcio (Gavin et al., 1992).

2.2.3) Estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son radicales libres producidos normalmente durante el metabolismo del oxígeno, y se producen en exceso durante el curso de la isquemia a través de una variedad de mecanismos. Las ERO son capaces de inducir daño y en casos severos la muerte celular a través de alteraciones mitocondriales que llevan a la liberación de citocromo c, mediante la activación de la vía de JNK o por la activación de factores de transcripción. La capacidad para controlar ERO es por lo tanto crítico en enfermedades neurodegenerativas porque produce daño neuronal cuando el equilibrio "oxidante anti-oxidantes" se altera a favor de estrés oxidativo (Swamy et al., 2010).

Las EROS están íntimamente ligadas con la actividad mitocondrial, y existe mucha evidencia del rol que desempeñan en la neurotoxicidad inducida por Mn. Desole (1994) administró Mn a ratas durante siete días y encontró que existía una elevación en la concentración estriatal de los niveles de antioxidantes como el glutatión (GSH) y ácido ascórbico, lo cual es un signo de la presencia de niveles elevados de ERO. Un estudio posterior de Dobson (2003), menciona la aparición de marcadores de estrés oxidativo después de exponer a ratas al Mn por medio de inhalación, éstos fueron el decremento de GSH e incremento de metalotioneínas.

2.2.4) El papel del glutamato en la toxicidad de Mn

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC de los mamíferos. Tiene el potencial para participar en la patogénesis de muchas enfermedades del SNC, ya sea debido a la excesiva liberación, la absorción reducida o la alteración de los receptores (Swamy et al., 2010).

La excitotoxicidad neuronal se refiere a la lesión y muerte de las neuronas derivadas de la exposición prolongada a glutamato asociada a una excesiva afluencia de iones en la célula. La sobrecarga de calcio resultante es particularmente neurotóxica, provocando la activación de enzimas que degradan proteínas, membranas y ácidos nucleicos. El glutamato es liberado de los axones dañados y la glía bajo condiciones hipóxico-isquémicas y la excitotoxicidad mediada por receptores de glutamato ha sido descrita como un mecanismo predominante de lesión hipóxica en el desarrollo de la sustancia blanca cerebral (Swamy et al., 2010).

En el SNC, la conversión de glutamato en glutamina por medio de glutamina sintetasa que tiene lugar dentro de los astrocitos, representa un mecanismo clave en la regulación de la neurotransmisión excitatoria en condiciones normales, así como en la lesión cerebral. Así la glutamina sintetasa está implicada en la modulación de la renovación de glutamato a través del ciclo de glutamato-glutamina (Swamy et al., 2010). El aumento de los niveles de glutamato en el cerebro se han documentado en roedores expuestos a Mn (Gwiazda et al., 2007). Los estudios in vitro han implicado al Mn en la reducción de la expresión del transporte de glutamato (Erikson et al., 2002) y la captación astrocítica del mismo. Estas alteraciones podrían afectar negativamente en el metabolismo la distribución y la sinapsis del glutamato.

La evidencia disponible sugiere que los primates no humanos expuestos a Mn existe una mayor expresión de mRNA y disminución de los niveles de proteína de GLAST y GLT, los dos transportadores astrocíticos principales de glutamato y GS, la enzima que convierte el de glutamato en glutamina, en múltiples regiones del cerebro. La administración crónica de Mn a roedores produce un aumento en las concentraciones de GABA del cuerpo estriado y abolido el declive dependiente de la edad de ácido glutámico descarboxilasa, la enzima que convierte el glutamato a GABA. Estudios

adicionales en roedores apoyan una asociación entre la exposición al Mn y el aumento de las concentraciones de GABA en el cerebro. Sin embargo, otros estudios de roedores muestran que el Mn disminuyen los niveles de GABA en el estriado y la corteza frontal . (Erikson et al. 2007).

La neuropatología de manganismo se investigó mediante la evaluación regional neuronal y el metabolismo astrogial en ratones bajo la exposición crónica de Mn. Ratones machos fueron tratados con MnCl₂ (25 mg/kg, i.p.) por veintiún días. Posteriormente su metabolismo celular fue estudiado mediante la co-infusión de [U-¹³C₆]glucosa y [2-¹³C]acetato y monitorearon el etiquetado de Carbono (¹³C) para aminoácidos en tejido cerebral usando una espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear para Carbono (¹³C-[¹H]-NMR spectroscopy). Ellos encontraron una reducción en el etiquetado del ácido glutámico (Glu_{C4}), tanto para glucosa como para acetato, lo que sugiere una disminución en la oxidación de glucosa de neuronas glutamatérgicas y el ciclo de glutamato-glutamina en corteza, estriado, tálamo-hipotálamo y bulbo olfatorio como resultado de la exposición crónica al Mn. Además encuentran un decremento en la oxidación del acetato de la astrogia en las mismas regiones. Sin embargo, la función GABAérgica fue disminuida en los ganglios de la base. Los autores concluyen que la intoxicación crónica al Mn produce una pérdida en la función excitatoria (glutamatérgica) en casi todas las regiones cerebrales, mientras que solo existe una caída inhibitoria GABAérgica en los ganglios basales (Bagga et al. 2011)

2.2.5) Toxicidad en neuronas dopaminérgicas

Se ha descrito que los cambios en la percepción olfativa de las personas que han estado expuestas al manganeso se puedan dar porque el Mn produce una falla en la regulación dopaminérgica (Zoni et al. 2012).

El mecanismo bioquímico preciso por el cual el Mn conduce a la destrucción selectiva de las neuronas dopaminérgicas no se conoce, pero muchos investigadores creen que el Mn promueve la autooxidación de varias catecolaminas intracelulares, lo que conduce a una mayor producción de radicales libres, ERO, y otros metabolitos

citotóxicos, además de una disminución de los mecanismos celulares de defensa antioxidante (Burton y Guilarte, 2009).

Se sabe que *in Vitro* el Mn puede promover la autooxidación de la dopamina (DA), lo que conduce a la creación de dopamina quinonas reactivas. En los primates no humanos, altas exposiciones acumulativas a Mn > 300 mg / kg muestran una reducción de las concentraciones de DA estriatal. Otros estudios en primates no humanos sugieren que el Mn induce una disminución postsináptica de los niveles de receptores tipo 2 de DA (Eriksson et al. 1992).

2.3) *Procesamiento de olores*

Para entender como funciona la percepción de los olores, lo primero a tomar en cuenta es su entrada al organismo. Para esto Hornung (2006), explica que cuando el aire llega a la nariz durante la respiración o la inhalación, las moléculas odorantes pasan a través del área de la válvula nasal y llega por encima de los receptores olfativos recubiertos de mucosa. Una vez en el espacio aéreo encima de los receptores, moléculas odoríferas se unen a los receptores en los cilios que se encuentran en el extremo de las células receptoras olfativas. Cuando las moléculas odorantes se unen a los receptores de olor, la estructura de las proteínas unidas a la membrana cambia de una manera tal, que permite a los iones de calcio extracelular entrar en la célula. Esto produce un cambio en el potencial de membrana en la punta de la célula olfativa del receptor, que a su vez crea una señal eléctrica que fluye a lo largo de los axones de las neuronas olfativas al bulbo olfatorio (BO).

Los pasos iniciales del olfato se producen en las neuronas sensoriales primarias ubicadas en el epitelio olfativo de la cavidad nasal de los vertebrados. Estas neuronas son responsables de la detección de moléculas odoríferas presentes en el medio ambiente circundante y la generación de la señal neuronal que se transmite al cerebro (Hornung et al., 2006).

Las neuronas sensoriales primarias del epitelio olfativo, son neuronas bipolares con una sola dendrita que termina con un botón, de donde sobresalen varios cilios y es donde la transducción de la señal olfativa se lleva a cabo (Malnic et al., 2010).

La activación odorante de las neuronas sensoriales olfativas es mediada por una vía dependiente de la proteína G, lo que lleva a la activación de la adenilil ciclasa, y a su vez aumentos en las concentraciones intracelulares de adenosin- monofosfato cíclico (AMPC), la activación de canales activados por nucleótidos cíclicos (NCC) y la despolarización de la neurona (Malnic et al., 2010; Pifferi et al., 2010).

Los NCC situados en la membrana ciliar se activan directamente por el AMPC, provocando una despolarización y afluencia de iones Na^+ y Ca^{++} . Se ha demostrado que la corriente hacia el interior de transducción de olor inducida se compone no sólo de un flujo de cationes a través de canales de NCC, sino también de un flujo de salida a través de canales activados por Ca^{++} (Pifferi et al., 2010).

Posteriormente, el bulbo olfatorio (BO) es la primera estación de retransmisión del sistema olfativo central en el cerebro de los mamíferos y contiene unos pocos miles de glomérulos en su superficie. Debido a que los glomérulos individuales representan un solo receptor odorante, la capa glomerular del BO constituye mapas de receptores odoríferos. Los receptores odorantes individuales funcionan como unidades detectoras de características moleculares y se forman como glomérulos individuales en el bulbo. Los glomérulos individuales suelen responder a una serie de olores que comparten una determinada combinación de características moleculares, cada glomérulo parece ser único en su rango receptivo y glomérulos con rangos receptivos similares se reúnen en la proximidad y forman grupos especializados en detectar características moleculares similares (Mori et al., 2006).

Los grupos de características moleculares similares se encuentran en posiciones estereotipadas en el BO y podría ser parte de la representación neural de la calidad del olor básico. Estudios detallados sugieren que la capa glomerular representa las características moleculares característicos en forma sistemática, de forma gradual, y multidimensional (Mori et al., 2006).

A diferencia de las regiones sensoriales primarias de la neocorteza (somatosensorial, visual y auditiva), no existe una organización espacial aparente de proyecciones aferentes o la actividad evocada sensorial dentro de la corteza olfativa. En el bulbo olfatorio, las neuronas sensoriales olfativas que se expresan en el mismo receptor

olfativo distribuido a través del epitelio olfativo, convergen en un pequeño número de glomérulos individuales. Dado que los diferentes receptores imparten diferentes características de unión a ligando a las neuronas sensoriales, la convergencia homogénea neuronal sensorial a distintos glomérulos crea patrones espaciales de olores específicos de la actividad en el bulbo olfatorio. Las neuronas de segundo orden asociadas y las interneuronas locales parecen formar columnas alineadas con los glomérulos. Por lo tanto, diferentes patrones espaciales de glomérulos y sus células mitrales asociadas se activan en respuesta a diferentes sustancias odoríferas (Wilson y Rennaker, 2010).

2.3.1) Corteza olfativa

La corteza olfativa se define típicamente como aquellas áreas que reciben de entrada directa desde el bulbo olfatorio. Esto incluye amplias regiones del pedúnculo olfatorio del cerebro anterior y ventrolateral en roedores, y regiones más ventromediales en los seres humanos. Las estructuras diana específicas incluyen el núcleo anterior olfativo, el tubérculo olfatorio, el núcleo cortical de la amígdala, la corteza piriforme, e inclusive las regiones laterales de la corteza entorrinal, aunque la entrada directa a la corteza entorrinal desde el bulbo olfatorio es de menor importancia (Wilson y Rennaker, 2010).

Las funciones de la corteza piriforme tienen un contexto más amplio dentro de la actividad del cerebro anterior (Wilson y Sullivan, 2011). Más allá de estas regiones corticales olfativas primarias, existen áreas neocorticales con entrada olfativa sustancial (por ejemplo, a través de la corteza olfativa primaria), que incluyen la corteza entorrinal lateral y la corteza orbitofrontal (Wilson y Rennaker, 2010).

Además de la entrada del bulbo olfatorio, la corteza olfativa tiene relaciones fuertes, a menudo recíprocas con áreas límbicas, tales como la amígdala, el hipotálamo, y la corteza perirrinal. También hay gran inervación por entradas moduladores de la rama horizontal de la banda diagonal de Broca (acetilcolina), los núcleos del rafe (serotonina), y el locus coeruleus (norepinefrina) (Wilson y Rennaker, 2010).

Estas diversas conexiones agregan considerable riqueza a la información disponible de la corteza olfativa, en términos del contexto, la valencia hedónica, la recompensa, y la

expectativa. De hecho, unidades individuales de células en la corteza piriforme muestran cambios de actividad al realizar una tarea de discriminación de olores y estos cambios se dan en distintas fases desde el muestreo de olor, la aproximación al puerto de olor, hasta en la adquisición de la recompensa (Wilson y Sullivan, 2011).

La corteza piriforme funciona como un dispositivo de reconocimiento, capaz de contener memoria dirigible que permite el almacenamiento de patrones familiares de entrada de neuronas distribuidas a través de la plasticidad de las sinapsis de fibras de asociación intracortical uniendo así neuronas dispersas (Wilson y Sullivan, 2011).

2.3.2) La discriminación e identificación de olores como procesos sintéticos

La capacidad de discriminar, por ejemplo, entre el olor de las manzanas y las naranjas es una notable hazaña que se lleva a cabo fácilmente por la mayoría de los vertebrados e invertebrados. Para explicarlo, Wilson y Stevenson (2003) y Shepherd (2005) proponen que esta función se da por medio de un procesamiento sintético.

Por procesamiento sintético, nos referimos al hecho de que generalmente los mamíferos tienen una capacidad muy limitada para identificar los componentes en mezclas de olor (o características sub-moleculares de odorantes monomoleculares) y, más bien, tratan a las mezclas como un único conjunto perceptivo (Shepherd et al., 2005).

Los receptores olfativos responden diferencialmente y de una manera aparentemente sistemática a las características moleculares del mundo de los olores. Estas características son codificadas en patrones de actividad en la capa glomerular, que funciona como imágenes que representan el mundo de los olores. Las imágenes de olor se procesan sucesivamente por microcircuitos, para proporcionar la base para la detección y la discriminación de olores (Shepherd et al., 2005).

Los autores proponen que los circuitos del bulbo olfatorio crean patrones espacio-temporales de olores específicos que se sintetizan y se almacenan en la corteza piriforme a través de la plasticidad sináptica Hebbiana. Existe la base anatómica para dicha síntesis tanto en la proyección de las células mitrales de transporte de entrada de

receptores específicos que convergen en los parches terminales en la corteza piriforme anterior y, quizás que es más importante, a través del extenso sistema de asociación de fibras intracorticales (Wilson y Stevenson, 2003; Shepherd et al., 2005).

La experiencia con un olor (o mezcla de olor), en una variedad de condiciones permite crear un patrón de actividad olor-específica que se sintetiza como un único conjunto perceptivo a través de la plasticidad sináptica cortical y además, permite que el patrón para ser posteriormente comparado contra otros patrones de fondo de la actividad. Este último fenómeno podría, en algunos casos, resultar en la adquisición de propiedades perceptivas para los componentes de las mezclas. (Wilson y Stevenson, 2003; Shepherd et al., 2005).

La evidencia indica que la percepción olfativa es también dependiente en gran medida del aprendizaje y la memoria. En primer lugar, los participantes son inicialmente pobres en discriminar olores desconocidos de uno al otro, pero mejoran rápidamente con la exposición. En segundo lugar, las cualidades que se describen por los participantes al detectar un olor pueden ser adquiridas. En una serie de estudios se ha mostrado que al combinar olores no familiares con los sabores dulces, las personas creen oler dulce, y al combinar con sabores ácidos, creen oler ácido (Wilson y Stevenson, 2003; Shepherd et al., 2005).

El circuito básico de la corteza olfativa posee características esenciales de un circuito cortical canónico. Las propiedades del circuito básico olfativo le permiten funcionar como una memoria de contenido direccionable, que le facilita asociar nuevos estímulos de olor con huellas de la memoria de los estímulos anteriores para favorecer el reconocimiento de olores. La organización de microcircuitos contiene largas fibras de asociación similares a la zona cortical involucrada en el procesamiento de caras. Esta forma de patrones sintéticos de reconocimiento permite la transformación de objetos odorantes en características de olor complejas. La separación del patrón cortical que llega a dominar promueve la discriminación perceptiva (Wilson y Stevenson, 2003; Shepherd et al., 2005).

Las entradas moduladoras y los cambios dependientes del estado en la conectividad funcional permiten más ajustes en la codificación de olores, la asociación de la calidad del olor con el contexto y el hedonismo. Juntos, estos procesos colocan plasticidad

neural y la memoria en el centro de la percepción del olor, similar a la percepción de los objetos en otros sistemas sensoriales y la memoria espacial en el hipocampo (Wilson y Stevenson, 2003; Shepherd et al., 2005).

Como evidencia suplementaria a ésta teoría existen estudios de casos que sirven como apoyo, uno de ellos es el del paciente H. M., quien recibió resección bilateral de los lóbulos temporales mediales, incluyendo la corteza piriforme, como un tratamiento para la epilepsia intratable. H.M. es fácilmente capaz de distinguir el mismo olor presentado a diferentes concentraciones y dos cualitativamente diferentes olores presentados en diferentes concentraciones. Sin embargo, H.M. es totalmente incapaz de discriminar cualitativamente diferentes los olores cuando se eliminan las señales de intensidad. En otras palabras, para H. M., todos los olores huelen igual (Mair et al., 1980)

Hallazgos similares han surgido a partir del estudio de otras condiciones que se sabe que afectan la memoria, por ejemplo el síndrome de Korsakoff. En este síndrome, la discriminación de olores se puede observar independiente de cualquier cambio en la capacidad de los participantes para detectar la presencia y la intensidad de los odorantes. Tomados en conjunto, estos hallazgos apuntan a un sistema perceptual sintético basado principalmente en el aprendizaje y la memoria (Eichenbaum et al., 1983).

2.3.3) La capacidad olfativa disminuye con la edad

La capacidad de identificación de olores se midió en un total de 1955 personas de edades comprendidas entre 5-99 años. En promedio, las mujeres superaron a los hombres en todas las edades, y los no fumadores superaron a los fumadores. El máximo rendimiento se produjo en la tercera a quinta décadas y se redujo notablemente después de la séptima. Más de la mitad de los sujetos entre 65 y 80 años de edad mostraron un deterioro olfativo. Después de 80 años, más de tres cuartas partes evidenciaron mayores trastornos. De acuerdo a estos resultados, no es de extrañar que muchas personas mayores se quejan de que la comida le falta sabor y que la cuenta de ancianos tenga un número desproporcionado de casos de envenenamiento accidental de gas cada año (Doty et al., 1984).

También utilizando la prueba Sniffin' Sticks Hummel (2007) examinó a 3282 sujetos y encontró que haciendo caso omiso de las diferencias relacionadas con el sexo, la puntuación total o TDI fue de 24,9 en sujetos menores de 15 años, 30,3 para las edades de 16-35 años, el 27,3 para las edades de 36-55 años y el 19,6 para los sujetos mayores de 55 años

2.4) Riesgos del Mn como contaminante en el aire

Los estudios previos han indicado que los habitantes de ciudades contaminadas obtienen valores significativamente inferiores en su desempeño olfativo cuando son comparados con personas de lugares con condiciones geográficas y climáticas parecidas. Guarneros (2009), usó la batería de pruebas olfativas "Sniffin' Sticks" y una prueba establecida para la percepción del trigémino intranasal, para comparar las capacidades olfativas y la sensibilidad olfativa trigémino de los residentes de la Ciudad de México, una región con alto nivel de contaminación en el aire, con el rendimiento de una población de control del estado mexicano de Tlaxcala, una región geográficamente comparable pero menos contaminada. Se evaluó la capacidad de los 30 jóvenes de cada lugar de detectar un olor a rosa (2-feniletanol), a discriminar entre diferentes olores, y para identificar otras sustancias olorosas comunes. Los sujetos de control de Tlaxcala detectan 2-feniletanol en concentraciones significativamente más bajas que los sujetos Ciudad de México, ya que podían discriminar entre odorantes significativamente mejor, y ellos se desempeñaron significativamente mejor en la prueba de la sensibilidad del trigémino. Los autores llegaron a la conclusión de que la contaminación del aire en la Ciudad de México deteriora la función olfativa y la sensibilidad del trigémino intranasal, incluso en adultos jóvenes sanos.

Al igual que la investigación anterior, Hudson (2006), realizó un estudio comparativo entre el desempeño olfativo de los habitantes de la ciudad de México y de Tlaxcala, a los dos grupos se les mostraron fragancias de bebidas cotidianas en botellas de compresión. Al final encontró que alrededor del 10% de los sujetos de la Cd. de México en comparación con alrededor del 2% de los sujetos de Tlaxcala se consideró que tienen mal desempeño olfativo, todos eran de mayor edad (edad media: 48,6 años). Por

lo tanto, la contaminación del aire en la Ciudad de México parece tener un impacto sustancial en la función olfativa, incluso en los residentes jóvenes y de mediana edad. Un aspecto al cual recientemente se le ha dado particular relevancia es la concentración de manganeso en el ambiente de las grandes ciudades como resultado de la combustión de metilciclopentadienil tricarbonilo de manganeso (MMT, por sus siglas en inglés), un compuesto que forma parte de las gasolinas desde la década de 1970.

Con el objetivo de medir el impacto de las gasolinas en el nivel de Mn en el aire Boudia (1995), realizó mediciones del metal en tres distintas estaciones del subterráneo de Montreal, dos de ellas aledañas a vías con una alta densidad de automóviles y una de ellas en una zona de baja densidad, cabe señalar que el aire que entra a las estaciones no pasa por ningún filtro y llega directamente de la calle. Sus resultados arrojaron que las concentraciones de Mn en el aire de las dos estaciones cercanas al tráfico fueron más del doble que las mediciones de la tercera y también superaron el mínimo permitido por la EPA que es de $0.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ lo cual indica que las emisiones de los automóviles promueven niveles elevados de Mn en el ambiente.

Smargiassi (2002) llevo a cabo una investigación con el fin de demostrar que el MMT producido por los automóviles conlleva a una alza de niveles de Mn en el organismo. Examinó las concentraciones de tóxicos en el cordón umbilical de neonatos de dos diferentes ciudades, una de ellas París en la cual se continuaba usando plomo (Pb) como aditivo a la gasolina y otra Montreal en donde el MMT era el potenciador del octanaje en la gasolina. Al hacer la correlación encontró que los niveles de Mn en los cordones era significativamente mayor en los habitantes de Montreal y a su vez los niveles de Pb eran significativamente superiores en París. Sugiriendo que el MMT puede ser el principal responsable de los niveles superiores de Mn en los habitantes de Montreal.

2.5) Efectos del Mn en poblaciones expuestas.

La exposición al manganeso puede causar signos y síntomas neuroconductuales y neurológicos (Zoni et al., 2007).

Riojas-Rodríguez (2010), llevó a cabo una investigación con dos grupos de niños en edad escolar de 7 a 10 años, los participantes del primer grupo (n=79) habitan en el distrito de Molango en poblaciones que se encuentran expuestas al Mn debido a que en ese lugar se ubica el yacimiento más grande de Norteamérica y su principal actividad económica es la explotación de dicho metal, los sujetos del segundo grupo que son el utilizados como control (n=93) pertenecen a localidades que tienen un perfil sociodemográfico parecido, pero no tienen contacto con Mn. A los dos grupos se les aplicaron mediciones de concentración de Mn tanto en sangre (MnS), como en cabello (MnC), y éstos resultados fueron comparados con el desempeño que obtuvieron los niños en la escala de inteligencia Wisc adaptada a población mexicana. La presencia en sangre MnS de las personas expuestas fue de 9.5 $\mu\text{g/g}$ y en cabello MnC fue de 12.6 $\mu\text{g/g}$, mientras que para el grupo control fue significativamente menor con 8.0 $\mu\text{g/g}$ en sangre y 0.6 $\mu\text{g/g}$ en cabello. Al relacionar éstas mediciones con los resultados de la escala intelectual mostraron que el MnC se encuentra inversamente asociado con la capacidad intelectual, o sea, que entre exista más presencia de MnC, el desempeño intelectual es menor en los siguientes parámetros de la escala: Coeficiente intelectual verbal, Intervalo de Confianza, Desempeño y Escala total.

Al terminar, ellos concluyen que la exposición ambiental al Mn está inversamente asociada a la función intelectual en niños en edad escolar.

Rodríguez-Agudelo y cols. (2006), estudiaron el riesgo de alteraciones motoras en personas que habitan un distrito minero en México. Para saber lo anterior trabajaron con 288 participantes (168 mujeres y 120 hombres) de ocho comunidades. Midieron las concentraciones de MnS en la población y además obtuvieron las concentraciones en partículas aéreas, agua, suelo y cultivos. Al mismo tiempo aplicaron en los habitantes la batería neuropsicológica que evalúa funciones motoras llamada “Esquema de Diagnóstico Neuropsicológico” de Ardila y Ostrosky-Solis. Las concentraciones en el agua y el grano de maíz fueron inferiores a los límites de detección en la mayoría de los

sitios de muestreo, mientras que las concentraciones en sangre variaron de 5.0 $\mu\text{g/l}$ a 31.0 $\mu\text{g/l}$ y en aire entre 0.003 a 5.86 $\mu\text{g/m}^3$. Al obtener los datos, reportaron que no existía una correlación entre el MnS y las funciones motoras, sin embargo, al evaluar la asociación entre la concentración en el aire y el desempeño motor, describieron que el Mn en el aire es inversamente proporcional a las calificaciones de las pruebas motoras, es decir, a mayor concentración de Mn había un mayor déficit en funciones motoras, los test relacionados fueron los siguientes: Coordinación de dos movimientos, Cambios de posición en movimiento manual y Test que evalúa reacciones conflictivas (Regulación verbal del movimiento). Lo cual indica la inhalación de Mn provoca déficit motor.

Para efectuar una evaluación del riesgo de exposición al manganeso en un distrito minero, Santos-Burgoa (2001), realizó un estudio transversal se llevó a cabo con una muestra de residentes adultos de dos comunidades cercanas a una planta de refinación de Mn. Se recopilaron datos sobre las condiciones socioeconómicas de vida, las fuentes de emisión, las concentraciones de medios de comunicación del medio ambiente (aire, agua, suelo, polvo, alimentos), sintomatología respiratoria, y un examen neuropsicológico (Prueba de detección Mini-Mental, la prueba Organización Visual Hooper, el Esquema de Diagnóstico Neuropsicológico de Ardila y Ostrosky-Solis, y otros). Se examinaron 73 sujetos (52 mujeres), la mayoría de nivel socioeconómico bajo. Las concentraciones en el aire del medio ambiente fueron de 2 a 3 veces más altos que en otras concentraciones urbanas. Las concentraciones de MnS variaron desde 7,5 hasta 88 $\mu\text{g/l}$, con una concentración media de 15, la partida cuartil superior a 20 $\mu\text{g/l}$, el superior 10% estaba por encima de 25 $\mu\text{g/l}$. Se identificó que la concentración de MnS es directamente proporcional al aumento del riesgo de tener un desempeño cognitivo deficiente.

Menezes-Filho (2009), realizó un estudio en niños en donde correlacionó los niveles de MnC y los de plomo en sangre con indicadores de comportamiento (obtenidos mediante el "Check list del comportamiento de los niños") y los problemas de atención. Encontró que existe una asociación positiva entre la exposición elevada al Mn y problemas de conducta externa y la falta de atención, con las niñas presenta efectos más pronunciados que con los varones.

2.6) Los “Sniffin’ Sticks”, una prueba confiable para medir el desempeño del sistema olfativo.

“Sniffin’ Sticks” es una nueva prueba de rendimiento quimiosensorial nasal basado en dispositivos de dispensación de olor de tipo pluma. Es una prueba olfativa global creada por Hummel (1997), y se compone por tres tests de función olfativa: Umbral olfativo, Discriminación de olores e Identificación de olores.

Los “Sniffin’ Sticks” son plumones de aproximadamente 14 cm de largo y 1.3 cm de ancho, a los cuales en la goma (en vez de tinta) se les ha llenado con perfumes líquidos disueltos en glicol propileno a un total de 4 ml. Para presentar los olores, se remueve la tapa y se colocan por aproximadamente tres segundos, a aproximadamente dos cm de la nariz del examinado.

Esta prueba ha demostrado ser confiable tanto en test-retest de hasta cuatro repeticiones (Albrecht et. al., 2008), así como cuando ha sido comparada con otros test olfativos como el “Connecticut Chemosensory Clinical Research Center Test, CCCRC” (Hummel et al., 1997), el “University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT)” (Kobal et. al., 1996) y el “Indian Smell Identification test (INSIT)” (George et al. 2013). También ha mostrado ser confiable en estudios transculturales y ha sido adaptado para distintos países (Konstantinidis et. al., 2008; Orhan et. al., 2011; Neumann et al. 2012).

Los “Sniffin’ Sticks” han sido constantemente utilizados en el estudio del papel que desempeña el sentido del olfato en distintos padecimientos neurológicos como el Parkinson (George et al. 2013) y el Alzheimer (Förster et al., 2012; Seligman et al., 2013)

2.7) Estudios de medición del manganeso en cabello (MnC)

Eastmann (2013) describió que la ausencia de biomarcadores bien validados para el Mn eran un obstáculo para los estudios de toxicidad, por lo cual realizó un estudio en dos grupos de niños, los del primer grupo vivían cercanos a plantas de procesamiento de acero y los del segundo grupo no tenían acercamiento al contaminante. Al terminar sus resultados arrojaron que existían diferencias significativas en los dos grupos siendo

el grupo expuesto el que obtenía concentraciones más altas de Mn en el pelo. Por lo tanto concluye que el análisis de cabello es un buen biomarcador para mostrar la toxicidad del Mn en las personas.

Diversos estudios apoyan que la medición del MnC es un marcador que se encuentra asociado a los desórdenes cognitivos debidos a la intoxicación (Menezes et al., 2013; Riojas-Rodríguez et al., 2010). Un estudio con niños que viven cerca de una planta de procesamiento del acero en Brasil realizado por Menezes (2013) observó la correlación entre los déficits atencionales y los problemas de conducta la acumulación de MnC. En los niveles de MnC obtuvo una mediana para de 11.48 $\mu\text{g/g}$. Los análisis de correlación mostraron que varios índices de comportamiento y problemas atencionales se correlacionaron significativamente con los niveles de MnC en las niñas, pero no en los varones.

También, Riojas-Rodríguez (2010) observó que en sujetos de una población minera la presencia de manganeso en sangre (MnS) de las personas expuestas fue de 9.5 $\mu\text{g/g}$ y el MnC fue de 12.6 $\mu\text{g/g}$, mientras que para el grupo control fue significativamente menor con 8.0 $\mu\text{g/g}$ en sangre y 0.6 $\mu\text{g/g}$ en cabello. Al relacionar éstas mediciones con los resultados de la escala intelectual mostraron que el MnC se encuentra inversamente asociado con la capacidad intelectual, o sea, que entre exista más presencia de Mn en cabello, el desempeño intelectual es menor en los siguientes parámetros de la escala: Coeficiente intelectual verbal, Intervalo de Confianza, Desempeño y Escala total.

Aunque es reconocido que el examen de cabello es muy útil para identificar la exposición histórica a algunos contaminantes y puede tener un valor predictivo de las condiciones de salud, también existe gran incertidumbre respecto a los procedimientos de muestreo, la evaluación y el control de calidad y la falta de valores de referencia así como los resultados dosis-efecto. El color del pelo y uso de productos de tratamiento capilar pueden influir en los resultados (Smolders et al., 2009).

2.8) Investigaciones sobre el efecto del manganeso en el sentido del olfato

Bowler (2007), comparó los resultados obtenidos en la prueba UPSIT (Test de identificación olfativa de la Universidad de Pennsylvania) de una muestra de soldadores expuestos al manganeso, con un grupo control de sujetos pareados por edad, sexo, escolaridad y hábitos de tabaquismo obtenido de la base de datos del Centro del gusto y del olfato de la Universidad de Pennsylvania, sus resultados arrojaron que el 88% de los participantes del grupo expuesto mostró un desempeño significativamente menor que los del grupo control. Posteriormente en un estudio realizado en la región de Valcamonica Italia (Poblado que se encuentra bajo el impacto de emisiones de manganeso vertidas al ambiente por plantas de producción de acero), Lucchini 2012 utilizó el test de identificación de Sniffin' Sticks para evaluar el desempeño olfativo de alumnos de una escuela pública (n=154), los cuales fueron comparados con un grupo control de sujetos de una región no expuesta. Al terminar la investigación encontró que los resultados de los sujetos de la región de Valcamonica fueron significativamente inferiores a los resultados de los habitantes del poblado no expuesto

3) Justificación

Desde finales de los años setenta, con la finalidad de eliminar el uso del plomo de las gasolinas, les añadieron el compuesto de manganeso llamado MMT, que es un aditivo que provee mayor octanaje a los combustibles (Davis, 1998; Samargiassi et al., 2002). Sin embargo, existen varios estudios que indican que el manganeso al ser inhalado, resulta dañino para el organismo (Lucchini et al. 1995; Santos-Burgoa et al., 2001; Rodríguez-Agudelo et al., 2006; Bowler et al. 2007; Zoni et al., 2007; Riojas-Rodríguez et al., 2010) e inclusive puede llegar a tener consecuencias en zonas profundas del SNC (Sloot et. al. 1994; Roels et. al. 1996; Takeda et. al.1997; Leavens et al. 2007; Thompson et. al. 2011). También existe evidencia de que en algunas grandes ciudades, los habitantes expuestos a diversos contaminantes del aire, están obteniendo puntuaciones bajas en la medición de su desempeño olfativo (Guarneros et al., 2009;

Hudson et al., 2006). Por lo anterior, el presente estudio investigó si la exposición al Mn podría ser una causa de daño en el sentido del olfato. Adicionalmente, plantea añadir evidencias de que existe una relación entre la intoxicación crónica al Mn y el bajo desempeño olfativo. Para ello, se eligió medir el desempeño olfativo de dos poblaciones, una del distrito minero de Molango en el estado de Hidalgo (la cual se encuentra en contacto constante con el Mn, pero no así con otros contaminantes) y se le comparó con una segunda población del mismo distrito que se encuentra alejada 50 km de cualquier mina y también a tres horas de cualquier asentamiento urbano.

4) Objetivos

Objetivo general: Identificar si existe una relación entre la intoxicación al Mn y el bajo desempeño olfativo, mediante la aplicación de pruebas olfativas y medición de concentración de manganeso en el cabello de dos poblaciones una de las cuales se encuentra en constante exposición a una mina de Mn y la otra a más de 50 km de distancia.

Objetivos específicos:

- a) Establecer si existen diferencias en el desempeño olfativo entre la población expuesta y los sujetos control.
- b) Identificar las diferencias entre las concentraciones de Mn en el cabello de la población expuesta en comparación con la control.
- c) Analizar si las altas concentraciones de Mn en el cabello se correlacionan con el desempeño olfativo.

5) Hipótesis

- a) La exposición al Mn produce un daño significativo en la función olfativa.
- b) Las altas concentraciones de Mn en los tejidos se correlacionarán directamente con la disminución de la función olfativa.

6) Materiales y métodos

Sitio de estudio. El estudio fue conducido en el distrito de Molango en la Sierra del Estado de Hidalgo, en donde el Mn ha sido extensivamente extraído de las minas ahí presentes por los últimos 50 años (Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Solís-Vivanco et al. 2009; Catalán-Vázquez et al. 2012). Las minas y depósitos asociados de Mn ocupan el segundo lugar en dimensiones en Latinoamérica y el quinto en el mundo (Rodríguez-Agudelo et al. 2006; Catalán-Vázquez et al. 2012). Se seleccionó como sitio focal las comunidades vecinas de Tolago y Chiconcoac (T/C), que tienen una población de 1,269 personas (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México 2010), localizadas aproximadamente en las coordenadas 20°80' N, 98° 42' W; 1,900 msnm, y a <1 Km. de la planta de procesamiento de Mn. El sitio control fue el pueblo de Calnali, con una población de cerca de 15,000, localizado aproximadamente en las coordenadas 20°50' N, 98° 36' W; a 1,800 msnm, y a 50 Km. de T/C y de cualquier actividad minera o fuente de exposición. Los dos sitios tienen una temperatura similar, un clima húmedo de tierras altas, y las poblaciones tienen un nivel socio-económico y cultura similares. (INEGI, 2012)

Sujetos. Reclutamos 30 adultos de cada población con ayuda del personal de las clínicas de salud locales; 25 mujeres y 5 hombres pareados tanto como fue posible para edad y nivel educativo (Tabla 1). De acuerdo con los registros de las clínicas, todos estaban en buena salud general. Se reclutaron más mujeres que hombres debido a que la mayor parte de los hombres en la comunidad T/C eran trabajadores de la mina o habían migrado fuera del país en búsqueda de trabajo. Todos los sujetos fueron no fumadores, todos habían pasado toda su vida en su respectiva comunidad, y ninguno había sido empleado antes en actividades relacionadas con la mina (las ocupaciones se muestran en la Tabla 1).

Los procedimientos se apegaron a la declaración de Helsinki para investigación médica en humanos, y a los lineamientos para tratamiento de sujetos humanos en investigación del Instituto de Fisiología Celular y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM,

México. El estudio estuvo aprobado por el Subcomité del Campo de Conocimiento en Biología Experimental y Biomedicina, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, y también se obtuvo aprobación de las autoridades locales de salud (Desarrollo Integral de la Familia y Secretaría de Salud en Calnali; Clínica de Salud y Secretaría de Salud en Chiconcoac). Las pruebas fueron conducidas en presencia del personal clínico, y no involucraron intervenciones físicas invasivas ni consecuencias por tratamientos. Los sujetos fueron totalmente informados acerca del propósito y de los procedimientos del estudio, y se aseguró su anonimato. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado antes de ser evaluados.

Tabla 2. Características generales de la muestra.

Características	Manganeso	Control
Tamaño de muestra	30	30
Mujeres	25	25
Hombres	5	5
Edad, años (media, DS)	39.9 (15.8)	42 (12.6)
Escolaridad, Años (media, DS)	6.4 (4.36)	7.2 (4.63)
Ocupaciones		
Ama de casa	17 (mujeres)	22 (mujeres)
Enfermera	8 (mujeres)	1 (mujer)
Estudiante		1 (mujer)
Guardia	2 (hombres)	1 (mujer)
Agricultor de autoconsumo		5 (hombres)
Músico	2 (hombres)	
Conserje	1 (hombre)	

Procedimientos de las pruebas. Las pruebas fueron aplicadas en la clínica local de servicio de salud pública de cada comunidad por el mismo experimentador (NOR), quien estaba familiarizado con la cultura local y tenía una extensa experiencia con los métodos utilizados.

Después de obtener el consentimiento informado de los sujetos, se registró su edad, género, historia de hábitos tabáquicos, ambiente de trabajo, nivel escolar, e historia médica (Tabla 1). Posteriormente se evaluó el desempeño olfativo utilizando la prueba estandarizada de Sniffin' Sticks (ver abajo) la cual fue ligeramente modificada en ajuste a las condiciones locales. Tres odorantes (regaliz, manzana verde y aguarrás) fueron retirados de la prueba de identificación, dado que repetidamente se ha encontrado que estos estímulos no son familiares para los mexicanos, y por lo tanto son en general no identificables. Además, debido a 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 si así lo solicitaba el sujeto, con repeticiones. Cada sujeto fue evaluado en una sesión individual con duración máxima de 30 min. Las pruebas fueron conducidas en abril y mayo de 2011 para excluir posibles efectos estacionales entre las dos poblaciones. También, se obtuvieron pruebas de cabello de la mayoría de los sujetos para confirmar la mayor exposición a Mn en el grupo focal (ver abajo).

El procedimiento estándar de Sniffin' Sticks evalúa la habilidad que tienen los sujetos para detectar un olor (umbral), para distinguir entre odorantes (discriminación), y para nombrarlos correctamente usando una lista verbal de opciones (identificación). Una ventaja de combinar estas diferentes medidas de función olfativa es apuntar en dónde en la ruta quimiosensorial ocurre el daño sensorial (Hudson et al., 2006; Guarneros et al., 2009, 2011). Otro es que al usar más de una medida de función olfativa se incrementa la posibilidad de detectar la pérdida olfativa (Dalton et al., 2006; Lötsch et al., 2008).

Desempeño olfativo. Al igual que en un estudio previo de los efectos de la contaminación del aire de la Ciudad de México sobre la función olfativa (Guarneros et al. 2009), los odorantes se presentaron a los sujetos con los ojos vendados siguiendo un procedimiento establecido (Hummel et al. 1997; Kobal et al., 2000). Los odorantes presentados en contenedores similares a marcadores con punta de fieltro (Sniffin' Sticks) rellenos con 4 ml de odorante líquido o bien disuelto en propilenglicol. En el

momento de la prueba, la tapa era removida por el experimentador, quien sostenía la pluma de tal manera que la punta quedara aproximadamente a 2 cm en frente de las fosas nasales del sujeto por aproximadamente 2-3 s. Los sujetos fueron instruidos sobre cuándo olfatear y, excepto por la prueba de identificación, se les permitió oler cada estímulo una sola vez. (Figura 1)

Umbral. Se determinó la habilidad de los sujetos de detectar 2-fenil etanol (olor a rosas), mediante un procedimiento de selección forzada de una de tres alternativas. Todos los participantes realizaron la prueba con los ojos vendados para evitar la identificación visual de los plumones. Se prepararon dieciséis disoluciones en una serie geométrica comenzando con una disolución a una concentración de 4%, subsecuentemente diluida por un factor de 2:1 en propilenglicol. En cada ensayo se presentaron tres plumones separadamente de forma consecutiva; uno de los plumones contenía el estímulo en la concentración más baja de la serie de disoluciones, y los otros dos sólo contenían el solvente. El intervalo de la presentación de plumones dentro de un mismo triplete fue de aproximadamente 3 segundos, y entre tripletes fue de aproximadamente 15 segundos. Si los sujetos fallaban la tarea, se les presentaba otro triplete con el plumón objetivo que contenía la siguiente mayor concentración de la serie. La dirección del cambio de concentración presentada era revertida cuando el olor era identificado en dos intentos sucesivos; es decir que si acertaban dos veces sucesivas, entonces se les presentaba el plumón con la concentración anterior (menor), y nuevamente se revertía la dirección del cambio de concentración presentada cuando fallaban en la tarea. El umbral fue definido como la media de los últimos cuatro (de un total de siete) puntos de reversa. Los puntajes de los sujetos, por lo tanto, podían ir de 1 (mínima sensibilidad/anósmico para 2-fenil etanol) a 16 (máxima sensibilidad).



Figura 1. Para las pruebas olfativas, los plumones eran colocados aproximadamente a 2 cm de los orificios nasales para que el sujeto los olfateara.

Discriminación. Una vez más, usando un paradigma de selección forzada de tres alternativas, 16 tripletes de plumones contenían concentraciones de sustancias odorantes muy por encima del umbral para normósmicos, y los tripletes fueron presentados en orden un orden establecido. En cada triplete, dos de los plumones contenían un mismo olor, mientras que el tercero tenía uno diferente (Tabla 2). Los sujetos tenían que determinar cuál de los tres plumones era el que tenía el olor distinto. Como en la determinación del umbral, el intervalo entre presentaciones de los plumones de un triplete fue aproximadamente de 3 segundos, y entre tripletes de aproximadamente 20 segundos. Dado que se hizo la prueba con 16 tripletes, los puntajes de los sujetos podían ir de 0 a 16.

Tabla 3. Concentraciones de Mn en el cabello de los sujetos expuestos al Mn (N = 25) y en los sujetos control (N = 23).

	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

Identificación. Los sujetos fueron presentados con 13 odorantes comunes (ver *Procedimiento de las pruebas* arriba sobre la eliminación de 3 de los 16 odorantes originales), en el mismo orden para todos los sujetos, y se les pidió que escogieran el descriptor más apropiado de una lista de cuatro posibilidades (ejemplo: limón como objetivo contra manzana, durazno y toronja como distractores); (Tabla 3). Los odorantes estaban a concentraciones supraumbrales para normósmicos. El intervalo entre la presentación de un plumón y otro fue de aproximadamente 10 segundos y, una vez más, los puntajes de los sujetos iban de 0 a 16.

Desempeño general. Para cada sujeto, los resultados de las tres pruebas fueron sumados para dar un puntaje de desempeño general (máximo de $16 + 16 + 16 = 48$; (Wolfensberger et al., 2000; Hummel et al., 2007). Los puntajes iguales o mayores a 31 representan una habilidad olfatoria normal (normosmia), los puntajes entre 30.75 y 16 son indicativos de hiposmia, y los puntajes por debajo de 16 representan anosmia funcional (Kobal et al., 2000).

Tabla 4. Prueba de identificación. Para cada uno de los 16 intentos, el estímulo odorante objetivo está indicado en negritas para distinguirlo de los tres distractores.

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	Trementina
9	cebolla	Col	Ajo	Zanahoria
10	cigarro	Café	Vino	humo de vela
11	melón	Durazno	naranja	Manzana
12	clavo	Pimienta	canela	Mostaza
13	pera	Ciruela	durazno	Piña
14	manzanilla	Frambuesa	Rosa	Cereza
15	anís	Ron	Miel	Pino
16	pan	Pez	Queso	Jamón

Contenido de manganeso en el cabello. El Mn se acumula en el cabello, y se ha sugerido que la medición de las concentraciones proveen un buen marcador general de intoxicación por éste metal (Riojas-Rodríguez et al. 2010). Así que se tomaron 0.5 g de cabello de la región occipital de los sujetos, cerca del 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 libres de metales de 5-ml hasta su análisis. . Las muestras de ambos grupos fueron analizadas en la misma sesión por la Dra. Mireya Alcaraz Zubeldia en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Siguiendo un procedimiento previamente establecido (Riojas-Rodríguez et al. 2010), las muestras fueron lavadas tres veces por medio de agitación vigorosa en una solución detergente de Triton X-100 al 2%, y enjuagadas con agua desionizada. Posteriormente el cabello fue secado a 60 °C, cortado en pequeñas piezas para facilitar la digestión de ácido, y se colocaron 300 mg en los tubos de propileno con 250 microlitros de ácido nítrico concentrado (Suprapur; Merck, Naucalpan de Juárez, Estado de México) por 30 minutos a 60 °C. La solución resultante fue analizada usando 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 mediante un medio biológico de referencia (hígado bovino 1577b; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) analizado junto con las muestras.

Tratamiento y análisis de los datos. Debido a que los puntajes de desempeño olfativo no siempre estuvieron normalmente distribuidos (pruebas de Kolmogorov-Smirnov) y en su mayoría estuvieron basados en frecuencias, los datos para los 2 grupos fueron graficados como medianas y rangos intercuartiles, o como correlaciones de rango de Spearman, y fueron comparadas mediante pruebas no-paramétricas U de Mann-Whitney. Las pruebas de dos colas fueron llevadas a cabo mediante el programa estadístico SYSTAT 12, y tomando $P < 0.05$ como el nivel de significancia. Dado que los grupos fueron pareados por género, los puntajes de hombres y mujeres fueron combinados.

8) Resultados

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

Desempeño olfativo

Umbral. Los sujetos control detectaron el 2-fenil etanol en el paradigma de presentación de concentraciones ascendentes y selección forzada de una de tres alternativas a concentraciones significativamente más bajas (puntajes más altos) que los sujetos expuestos a Mn de T/C (Figura 2a; prueba U de Mann-Whitney: $U = 312.530,30$, $P = 0.042$). Basados en las medianas de los puntajes, esto representó una diferencia entre los grupos de 2 a 4 veces en la concentración requerida para detectar la presencia del estímulo.

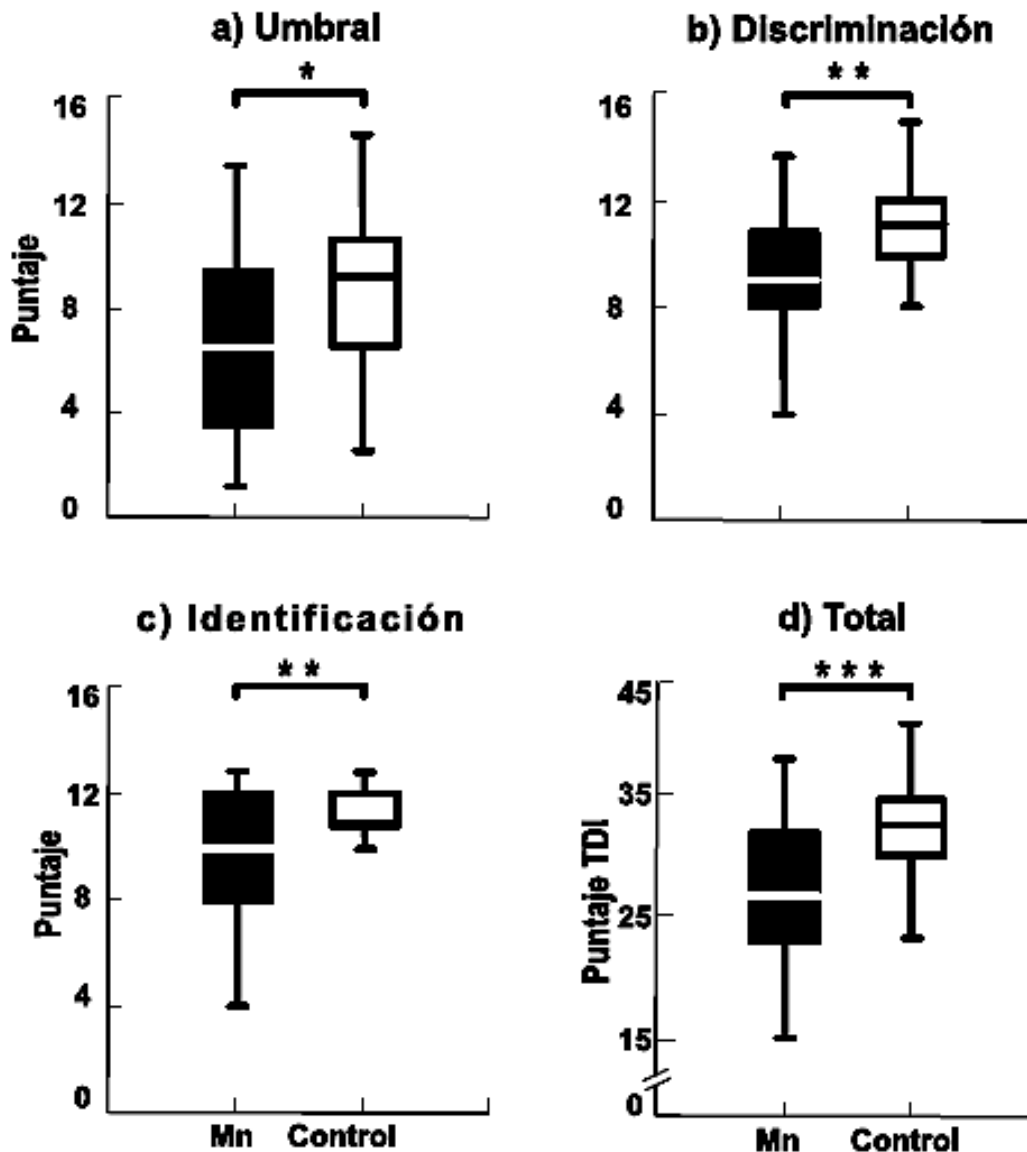


Figura 2. Desempeño del grupo expuesto a Mn y del control en las tres pruebas de desempeño olfativo (a-c), además de la puntuaciones totales (TDI). Para cada uno de los primeros test, (a y b) los sujetos podían obtener un puntaje máximo de 16 puntos y para la el test (c) un máximo de trece, por lo tanto la puntuación más alta de TDI puede alcanzar hasta 45. Gráficas de cajas: las líneas horizontales dentro de las cajas marcan las medianas, los límites horizontales dan los rangos intercuartiles y las barras verticales muestran los rangos absolutos: N = 30 por grupo; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 (Test U de Mann-Whitney)

Discriminación. Los sujetos control fueron más eficientes en distinguir los estímulos objetivo de los distractores en las pruebas de selección forzada de una de tres alternativas que los sujetos T/C (Figura 2b). Esta diferencia también fue significativa ($U = 27230,30$, $P = 0.008$).

Identificación. Aunque los odorantes en esta prueba fueron originalmente seleccionados por su familiaridad para los europeos, después de haber eliminado los estímulos no-familiares para mexicanos (manzana verde, regaliz y aguarrás, ver arriba), los sujetos control identificaron 8 de 13 estímulos correctamente en más de 90% de los ensayos, y 10 de 13 en más de 80% de los ensayos. En contraste, los sujetos T/C identificaron sólo 4 de 13 correctamente (café, ajo, plátano, pescado) en más de 90% de los ensayos, y 8 en menos de 70% de los ensayos. Nuevamente, la diferencia en desempeño entre los dos grupos fue significativa (Figura 2c; $U = 265.530,30$, $P = 0.005$).

Desempeño general. Como consecuencia de lo anterior, los sujetos controles tuvieron puntajes globales (TDI) significativamente más altos que los sujetos T/C, expresados como la suma de los puntajes obtenidos en las pruebas de umbral, discriminación e identificación (Figura 2d; $U = 213.030,30$, $P < 0.001$).

Mientras que 4 sujetos T/C (13%) tuvieron puntajes por debajo del sujeto control con menor puntaje, 3 sujetos control (10%) tuvieron puntajes por arriba del sujeto T/C con mayor puntaje.

Interacción con la edad. En todas las pruebas de habilidad olfativa, el puntaje declinó con la edad de los sujetos (Figura 3). Sin embargo, para el umbral, identificación, y desempeño general (Figura 3 a, c, d), el declive fue mayor para el grupo T/C que para el grupo control. La falta de una diferencia clara con la edad entre los dos grupos en la prueba de discriminación olfativa (Figura 3b), fue probablemente al menos en parte debido a que los sujetos más jóvenes expuestos a Mn presentaban ya puntajes tanto menores que sus coetáneos controles que los sujetos en este grupo no podían declinar mucho más para aproximarse al nivel de desempeño azaroso. Sin embargo, estos resultados en conjunto sugieren una interacción negativa entre la edad y la exposición a

Mn, que resultó en un decremento en el desempeño olfativo con la edad en el grupo T/C (Figura 3d).

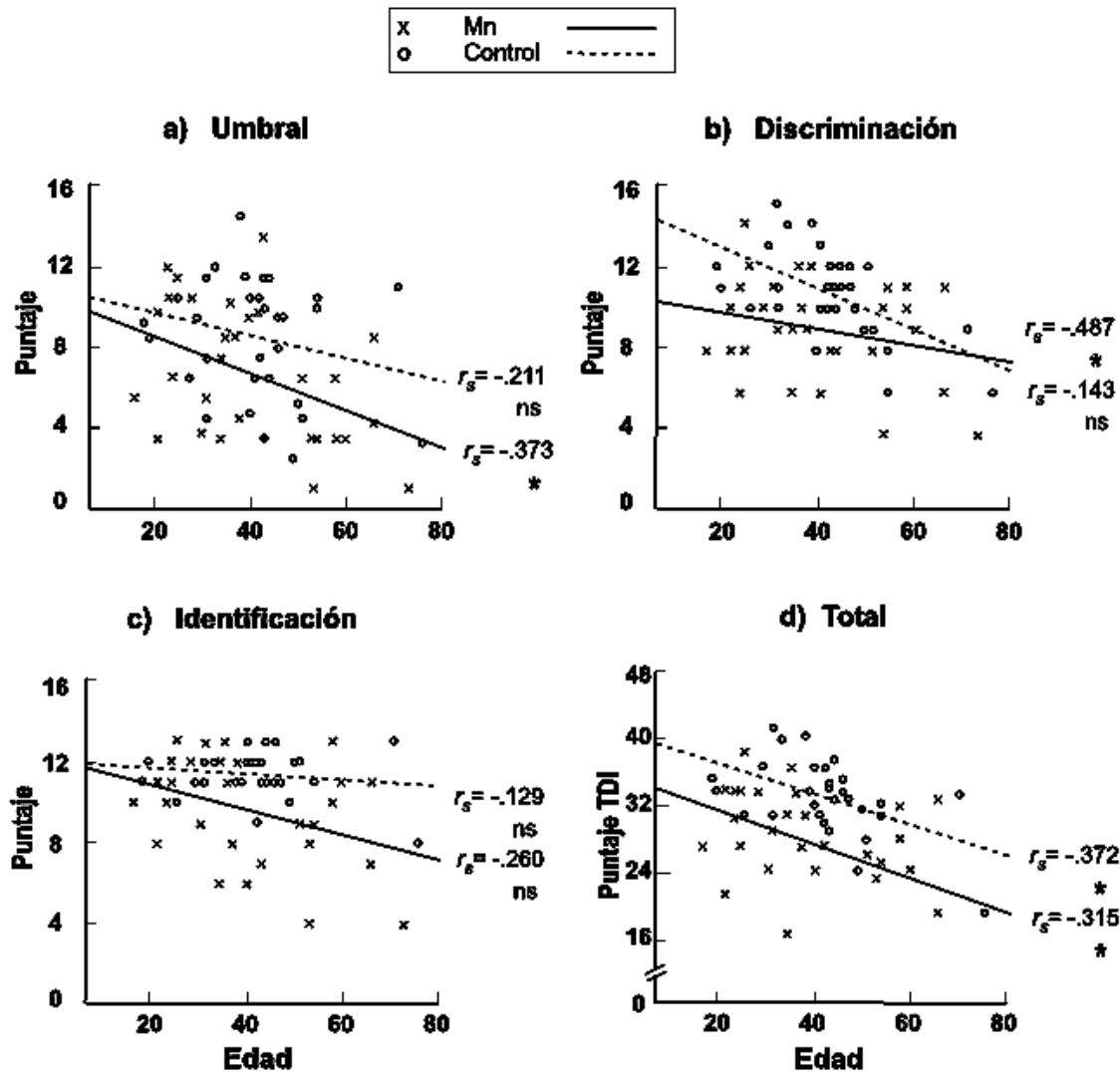
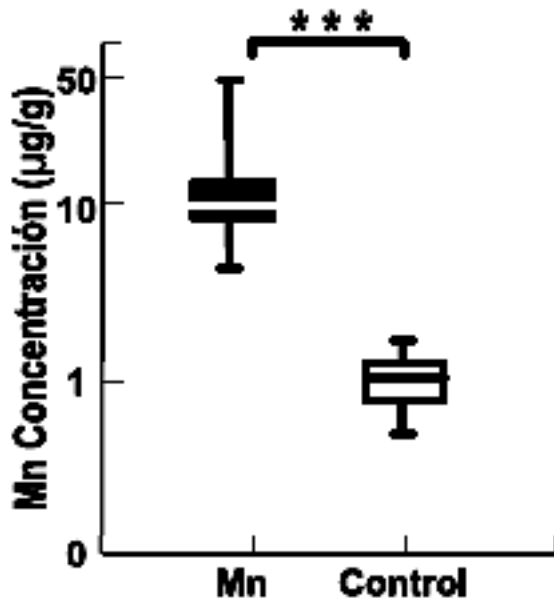


Figura 3. Correlación de Spearman entre sujetos, edad en años y el desempeño en tres test (a-c), además de la suma de los tres test o puntuación TDI (d). Las cruces y líneas sólidas muestran los valores del grupo expuesto Mn y los círculos y la línea punteada indican los valores del grupo control; N = 30 por grupo; coeficientes de correlación: *P < 0.05, ns = no significativa.

Contenido de manganeso en cabello (MnC). Los sujetos T/C tuvieron concentraciones significativamente más altas de Mn en cabello que los sujetos control (Figura 4; $U = 0.0025, 23, P < 0.001$). Basados en los puntajes de las medianas de $9.73 \mu\text{g/g}$ versus $1.01 \mu\text{g/g}$, esto representó una diferencia de cerca de 9 veces entre los dos grupos. También encontramos una correlación negativa tendencial entre las concentraciones de MnC y el desempeño de los sujetos dentro de cada grupo en cada una de las pruebas olfativas; umbral, discriminación, identificación y puntaje TDI. Aunque esto fue más claro para el grupo expuesto que para los sujetos control, ninguna de las correlaciones alcanzó la significancia para ningún grupo.



*Figura 4. Concentraciones de Mn en el cabello de los sujetos expuestos al Mn (N = 25) y en los sujetos control (N = 23). Gráficas de cajas: las líneas horizontales muestran las medianas, los límites horizontales de las cajas indican los rangos intercuartiles y las barras verticales dan los rangos absolutos: *** $P < 0.001$ (Test de U de Mann Whitney)*

9) Discusión

Los hallazgos del presente estudio proveen un claro apoyo a la predicción de que los sujetos de la comunidad minera de T/C, crónicamente expuesta a niveles elevados de Mn en el ambiente, mostrarían un daño notable en la función olfativa, y a pesar de nunca haber trabajado en actividades relacionadas con la minería. Así, en comparación con los sujetos controles del pueblo cercano de Calnali, una comunidad comparable pero sin actividad minera, los sujetos expuestos a Mn se desempeñaron significativamente peor en las tres pruebas de función olfativa; detección, discriminación, e identificación. Además, el declive normal de la función olfativa con la edad (Doty et al. 1984) fue mayor para el grupo expuesto que para el grupo control. Particularmente es notable el pobre desempeño del grupo expuesto en comparación con el control en la prueba de identificación de olores. La prueba Sniffin' Sticks permite evaluar la habilidad de los sujetos de reconocer y nombrar olores, y es por lo tanto dependiente de procesos cognitivos asociados con el aprendizaje, la memoria y el lenguaje, importantes para un amplio rango de funciones cognitivas a parte del reconocimiento de olores.

Es posible que el Mn atmosférico haya sido un contribuyente importante en los déficits olfativos de los sujetos T/C. La región T/C ha sido señalada por sus altos niveles de Mn atmosférico, los cuales están por arriba de los recomendados por la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos, que son de $0.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (US EPA 1997; Solís-Vivanco et al. 2009), y el aire ha sido reportado como la fuente más significativa de exposición a Mn en T/C (Santos-Burgoa et al. 2001, Rodríguez-Agudelo et al. 2006). Los altos niveles de Mn atmosférico en T/C también son consistentes con los niveles significativamente más altos de Mn en el cabello de los sujetos T/C comparados con el grupo control. El hallazgo de sólo una débil correlación entre MnC y desempeño olfativo quizás no sea sorprendente dada nuestro pequeño tamaño de muestra y la considerable varianza en los valores de MnC, particularmente entre los sujetos T/C expuestos a Mn (Figura 4). Factores tales como tipo de cabello, frecuencia de lavado y otras formas de cuidado capilar pueden afectar la acumulación de Mn

considerablemente y así contribuir a tal varianza (Smolders et al. 2009). Además, no es posible asegurar que el Mn haya sido único metal que contribuyó a los déficits olfativos reportados aquí. Sin embargo, un estudio que exploró la posible contaminación por plomo, reportó niveles de plomo en sangre en sujetos de la localidad T/C similares a los observados en otras comunidades rurales mexicanas (Santos-Burgoa et al. 2001).

También en apoyo al efecto de la exposición a Mn atmosférico, la inhalación ha sido reportada como una ruta más eficiente que la digestión para el ingreso de Mn en el cuerpo, y las concentraciones de Mn en cabello son un buen biomarcador de exposición crónica (Menezes et al., 2013 ; Riojas-Rodríguez et al. 2010). La pérdida de función olfativa, que particularmente involucra la participación de procesos cognitivos centrales, debido a Mn aéreo, también es consistente con estudios previamente reportados en la Introducción que demuestran el fluido transporte de Mn por vías olfativas: reclutamiento de Mn por las neuronas receptoras olfativas en la cavidad nasal y transporte trans-sináptico a regiones centrales del cerebro. (Sloot et. al. 1994; Roels et. al. 1996; Takeda et. al.1997; Thompson et. al. 2011).

Dado que ninguno de los sujetos había trabajado nunca en actividades relacionadas a la extracción o procesamiento de Mn, nuestros hallazgos sugieren que la exposición crónica incluso a niveles relativamente bajos de Mn puede afectar a la salud por inhalación, incluso en personas jóvenes y por demás saludables. Además, nuestros hallazgos podrían incluso ser conservativos dado que reclutamos sujetos de las clínicas de salud locales, y posiblemente eran más conscientes de su salud y con un mayor nivel educativo que otros miembros de la comunidad, como lo sugiere el hecho de que la mayoría tenían trabajos en interiores, y ocupaciones profesionales (Tabla 1). Los residentes más pobres de T/C quienes trabajan principalmente en exteriores (en el campo y en la mina), y posiblemente con una dieta más pobre y más baja calidad de vida, podrían ser incluso más vulnerables.

Nuestros hallazgos también demuestran la pertinencia de las pruebas olfativas para monitorear los efectos de la contaminación atmosférica en la salud. Las pruebas

olfativas tales como los Sniffin' Sticks son no-invasivas, rápida y fáciles de aplicar, y pueden aplicarse de manera adecuada independientemente del nivel de educación de los sujetos, como lo demuestra el buen desempeño de los sujetos expuestos en los odorantes “fáciles” mencionados anteriormente. Además, en nuestra experiencia, las pruebas olfativas tienen una buena recepción por parte de los sujetos. En el presente estudio, todos los sujetos aceptaron gustosamente participar e incluso se mostraron entusiastas de ser sujeto de estas pruebas de aspecto amigable. A pesar del hecho de que tuvimos que excluir 3 odorantes por ser no familiares para los mexicanos, los plumones frescos pueden ser rellenos con cualquier odorante (no tóxico, soluble y no perecedero) para seleccionar estímulos adecuados a cualquier población particular (e.g. Shu y Yuan 2008).

Particularmente notable es la habilidad de los Sniffin' Sticks para detectar y distinguir entre los déficits que ocurren a diferentes niveles en el sistema olfativo. Así, usando el mismo método en un previo estudio de función olfativa de los residentes de la Ciudad de México, se pudo demostrar que la contaminación de una gran ciudad tiene un efecto negativo en la detección de olores, menos en la discriminación, y –en contraste con el presente estudio- aparentemente no tiene efecto alguno en la identificación de olores (Guarneros et al. 2009, 2011), esto sugiere que el aire contaminado de la Ciudad de México, que contiene más bajos niveles de sustancias tóxicas capaces de alcanzar estructuras cerebrales centrales por medio del transporte trans-sináptico en comparación con los niveles atmosféricos de Mn en T/C, tiene un efecto negativo principalmente en la periferia del sistema olfativo (superficie receptora en la cavidad nasal).

10) Conclusión

Los resultados del presente estudio sugieren que la exposición crónica a Mn atmosférico, incluso fuera del lugar de trabajo, puede afectar la salud de las personas. Nuestros hallazgos también sugieren que las pruebas olfativas estandarizadas, no invasivas, económicas y de fácil administración proveen un medio eficiente de

monitorear los efectos en la salud general de la exposición a altos niveles atmosféricos de contaminantes potencialmente dañinos como el Mn. En el caso del Mn, esto es relevante no sólo para grupos ocupacionalmente expuestos, sino también en relación a cuestiones más generales como el uso de Mn en gasolinas o en pesticidas, y para el debate de posibles efectos de esto por causa de la contaminación atmosférica en la salud de las comunidades (Boudia et al. 2006; Smargiassi et al., 2002).

Tablas de ilustraciones

Tabla 1. Regiones en donde se acumula el Mn según los autores. _____	9
Tabla 2. Características generales de la muestra. _____	29
Tabla 3. Concentraciones de Mn en el cabello de los sujetos expuestos al Mn (N = 25) y en los sujetos control (N = 23). _____	33
Tabla 4. Prueba de identificación. Para cada uno de los 16 intentos, el estímulo odorante objetivo está indicado en negritas para distinguirlo de los tres distractores. _	34
Figura 1. Para las pruebas olfativas, los plumones eran colocados aproximadamente a 2 cm de los orificios nasales para que el sujeto los olfateara. _____	32
Figura 2. Desempeño del grupo expuesto a Mn y del control en las tres pruebas de desempeño olfativo (a-c), además de la puntuaciones totales (TDI). Para cada uno de los primeros test, (a y b) los sujetos podían obtener un puntaje máximo de 16 puntos y para la el test (c) un máximo de trece, por lo tanto la puntuación más alta de TDI puede alcanzar hasta 45. Gráficas de cajas: las líneas horizontales dentro de las cajas marcan las medianas, los límites horizontales dan los rangos intercuartiles y las barras verticales muestran los rangos absolutos: N = 30 por grupo; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 (Test U de Mann-Whitney) _____	36
Figura 3. Correlación de Spearman entre sujetos, edad en años y el desempeño en tres test (a-c), además de la suma de los tres test o puntuación TDI (d). Las cruces y líneas sólidas muestran los valores del grupo expuesto Mn y los círculos y la línea punteada indican los valores del grupo control; N = 30 por grupo; coeficientes de correlación: *P < 0.05, ns = no significativa. _____	38
Figura 4. Concentraciones de Mn en el cabello de los sujetos expuestos al Mn (N = 25) y en los sujetos control (N = 23). Gráficas de cajas: las líneas horizontales muestran las medianas, los límites horizontales de las cajas indican los rangos intercuartiles y las barras verticales dan los rangos absolutos: ***P < 0.001 (Test de U de Mann Whitney) _____	39

Referencias

- Albrecht J, Anzinger A, Kopietz R, Schöpf V, Kleemann AM, Pollatos O, Wiesmann M. (2008). *Test-retest reliability of the olfactory detection threshold test of the Sniffin' sticks*. Chem Senses. Jun;33(5):461-7.
- Antunes MB, Bowler R, Doty RL. (2007). *San Francisco/Oakland Bay bridge welder study*. Neurology 69:1278–1284.
- Aschner M. (2000). *Manganese: brain transport and emerging research needs*. Environ Health Perspect. 108:429–432.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological Profile for Manganese*. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service; (2008). (disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.html>)
- Aschner M, Guilarte T, Schneider J, Zheng W. (2007). *Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity*. Toxicol Appl Pharmacol. 221:131–147.
- Bagga P, Patel AB. (2012). *Regional cerebral metabolism in mouse under chronic manganese exposure: Implications for Manganism*. Centre for Cellular and Molecular Neurochemistry International 60 (2012) 177–185.
- 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. 366:143–147.
- 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. 64:167–177.
- 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 32:595–605.
- Burton NC, Guilarte TR. (2009). *Manganese Neurotoxicity: Lessons Learned from Longitudinal Studies in Nonhuman Primates*. Environmental Health Perspectives. 117;3
- 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.
- Chen B, Kan H. (2008). *Air pollution and population health: a global challenge*. Environ Health Prev Med. 13:94–101.

Chu NS, Huang C-C, Calne DB. (1996). *Sympathetic skin response and RR interval variation in manganism and comparison with Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord.*2:23–28. Crump KS, Rosseau P. 1999. *Results from eleven years of neurological health surveillance at a manganese oxide and salt producing plant. Neurotoxicol.* 20:273–286.

Cotzias GC, Horiuchi K, Fuenzalida S, Mena I. (1968). *Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. Neurology.* Apr;18(4):376-82.

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. BehavNeurosci.* 120:180–189.

Davis JM. (1998). *Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl: health risk uncertainties and research directions. Environ Health Perspect.* 106:191–201.

Desole MS, Miele M, Esposito G, Migheli R, Fresu L, De Natale G, Miele E. (1994). *Dopaminergic system activity and cellular defense mechanisms in the striatum and striatal synaptosomes of the rat subchronically exposed to manganese. Arch Toxicol.;* 68(9):566-70.

Dobson AW, Weber S, Dorman DC, Lash LK, Erikson KM, Aschner M. (2003). *Oxidative stress is induced in the rat brain following repeated inhalation exposure to manganese sulfate. Biol Trace Elem Res.* Summer;93(1-3):113-26.

Dorman DC, Struve MF, Clewell 3rd HJ, Andersen ME. (2006). *Application of pharmacokinetic data to the risk assessment of manganese in humans. Neurotoxicol.* 27:752–764.

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

Eastman RR, Jursa TP, Benedetti C, Lucchini RG, Smith DR. (2013). *Hair as a biomarker of environmental manganese exposure. Environ Sci Technol.* Feb 5;47(3):1629-37.

Eichenbaum H, Morton TH, Potter H, Corkin S. 1983. *Selective olfactory deficits in case H.M. Brain.;*106 (Pt 2):459-72.

Erikson KM, Shihabi ZK, Aschner JL, Aschner M. (2002). *Manganese accumulates in iron-deficient rat brain regions in a heterogeneous fashion and is associated with neurochemical alterations. Biol Trace Elem Res.;*87(1-3):143-56.

Erikson KM, Dorman DC, Lash LH, Aschner M. (2007). *Manganese Inhalation by Rhesus Monkeys is Associated with Brain Regional Changes in Biomarkers of Neurotoxicity. Toxicological Sciences* 97(2), 459–466.

Förster S, Vaitl A, Teipel SJ, Yakushev I, Mustafa M, la Fougère C, Rominger A, Cumming P, Bartenstein P, Hampel H, Hummel T, Buerger K, Hundt W, Steinbach S. (2010). *Functional representation of olfactory impairment in early Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis. ;22(2):581-91.

Golub MS, Hogrefe CE, Germann SL, Tran TT, Beard JL, Crinella FM, Lonnerdal B. (2005). *Neurobehavioral evaluation of rhesus monkey infants fed cow's milk formula, soy formula, or soy formula with added manganese*. Neurotoxicol Teratol.; 27(4):615-27.

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

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.

Gwiazda R, Lucchini R, Smith D.(2007). *Adequacy and consistency of animal studies to evaluate the neurotoxicity of chronic low-level manganese exposure in humans*. J Toxicol Environ Health A. 2007 Apr 1;70(7):594-605.

Herz R. (2009). *Basic processes in human olfactory cognition: current findings and future directions*. Ann NY Acad Sci. 1170:313–317.

Hornung DE. (2006). *Nasal Anatomy and the Sense of Smell* Hummel T, Welge-Lüssen A (eds): Taste and Smell. An Update. Adv Otorhinolaryngol. Basel, Karger, 2006, vol 63, pp 1–22

Hudnell H. (1999). *Effects from environmental Mn exposure: a review of the evidence from non-occupational exposure studies*. Neurotoxicol. 20:379–398.

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

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*. Chem Senses. 22:39–52.

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*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2007 Mar;264(3):237-43.

INEGI. *Catálogo de claves de entidades federativas, municipios y localidades*, Junio 2012.

Kobal G, Klimek L, Wolfensberger M, Gudziol H, Temmel A, Owen CM, Seeber H, Pauli E, Hummel T. (2000). *Multicenter investigation of 1,035 subjects using a standardized method for the assessment of olfactory function combining tests of odor identification,*

odor discrimination, and olfactory thresholds. Eur Arch Otorhinolaryngol. 257:205–211.

Konstantinidis I, Printza A, Genetzaki S, Mamali K, Kekes G, Constantinidis J. (2008). *Cultural adaptation of an olfactory identification test: the Greek version of Sniffin' Sticks.* Rhinology. Dec;46(4):292-6.

Leavens TL, Rao D, Andersen ME, Dorman DC. (2007). *Evaluating transport of manganese from olfactory mucosa to striatum by pharmacokinetic modeling.* Toxicol Sci. 97:265–278.

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

Lucchini RG, 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.* Scan J Work Environ Health. 21:143–149.

Lucchini RG, Guazzetti S, Zoni S, Donna F, Peter S, Zacco A, Salmistraro M, Bontempi E, Zimmerman NJ, Smith DR. (2012). *Tremor, olfactory and motor changes in Italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission.* Neurotoxicity and Neurodegeneration: Local Effect and Global Impact Volume 33, Issue 4, August 2012, Pages 687–696

Mair R. (1980) *Odor discrimination and memory in Korsakoff 's psychosis.* J. Exp. Psychol. Hum. Percept. Perform. 6, 433–458

Malnic B. (2010). *Odorant Receptors, Chapter 7.* The Neurobiology of Olfaction *Frontiers in Neuroscience* Edited by Anna Menini. Boca Raton (FL): CRC Press; 2010.

Martinez-Finley EJ, Gavin CE, Aschner M, Gunter TE. (2013). *Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species.* Free Radic.Biol. Med.

Menezes-Filho JA, Bouchard M, Sarcinelli Pde N, Moreira JC. (2009). *Manganese exposure and the neuropsychological effect on children and adolescents: a review.* Rev Panam Salud Publica. Dec;26(6):541-8.

Menezes-Filho JA, Paes CR, Pontes AM, Moreira JC, Sarcinelli PN, Mergler D. (2013). *High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant.* Neurotoxicol. 30:1207–1213.

Mergler D, Baldwin M, Bélanger S, Larribe F, Beuter AR, 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.* Neurotoxicol. 20:327–342.

Mori K, Takahashi YK, Igarashi KM, Yamaguchi. (2006). Maps of Odorant Molecular

Features in the Mammalian Olfactory Bulb. *Physiol Rev* 86: 409-433

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*. *Clin Otolaryngol*. Feb;37(1):23-7.

Orhan KS, Karabulut B, Keles N, Deger K. (2011). *Evaluation of Factors Concerning the Olfaction Using the Sniffin' Sticks*. *Test.Otolaryngol Head Neck Surg*. Oct 13

Pellizzari ED, Clayton CA, Rodes CE, Mason RE, Piper LL, Fort B, Pfeifer G, Lynam D. (2001). *Particulate matter and manganese exposure in Indianapolis, Indiana*. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 11:423–440.

Pifferi S, Menini A., Kurahashi T. (2010). *Olfactory Cilia, chapter 8*. *The Neurobiology of Olfaction Frontiers in Neuroscience* Edited by Anna Menini. Boca Raton (FL): CRC Press.

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*. 118:1465–1470.

Roels H, Meiers G, Delos M, Ortega I, Lauwerys R, Buchet JP, Lison D. (1997). *Influence of the route of administration and the chemical form (MnCl₂, MnO₂) on the absorption and cerebral distribution of manganese in rats*. *Arch Toxicol* 71: 223±230

Rodríguez-Agudelo Y, Riojas-Rodríguez H, Ríos C, Rosas I, Pedraza ES, Miranda J, Siebe C, Texcalac JL, Santos-Burgoa. (2006). *Motor alterations associated with exposure to manganese in the environment in Mexico*. *Sci Total Environ*. 368:542–556.

Roth J. (2006). *Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination*. *Biol Res* 39: 45-57.

Santos-Burgoa C, Rios 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, Section A* 85:90–104.

Schneider JS, Decamp E, Koser AJ, Fritz S, Gonczi H, Tore Syversen T, Guilarte TR. (2006). *Effects of Chronic Manganese Exposure on Cognitive and Motor Functioning in Non-Human Primates*. *Brain Res*.; 1118(1): 222–231.

Seligman SC, Kamath V, Giovannetti T, Arnold SE, Moberg PJ. *Olfaction and apathy in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy older adults*. *Aging Ment Health*. ;17(5):564-70.

Shepherd GM. (2005). *Outline of a Theory of Olfactory Processing and its Relevance to Humans*. *Chem. Senses* 30 (suppl 1): i3–i5

Shu CH, Yuan BC. (2008). *Assessment of odor identification function in Asia using a modified "Sniffin' Stick" odor identification test*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 265:787–790.

Sjögren B, Iregren A, Frech W, Hagman M, Johansson L, Tesarz M, Wennberg A. (1996). *Effects on the nervous system among welders exposed to aluminium and manganese*. Occupational and Environmental Medicine; 53:32-40

Slout WN, Gramsbergen JB. (1994). *Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia*. Brain Res.; 657(1-2):124-32.

Smargiassi A, Takser L, Masse A, Sergerie M, Mergler D, St-Amour G, Blot P, Hellier G, Huel G. (2002). *A comparative study of manganese and lead levels in human umbilical cords and maternal blood from two urban centers exposed to different gasoline additives*. Sci Total Environ.;290(1-3):157-64.

Smolders R, Schramm KW, Nickmilder M, Schoeters G. (2009). *Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring*. Environ Health. 8:1–10.

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. 28:172–178.

Swamy M, Mohd Jamsani Mat Salleh, Sirajudeen KNS, Wan Roslina Wan Yusof, Chandran G (2010). *Nitric oxide (NO), citrulline-NO cycle enzymes, glutamine synthetase and oxidative stress in anoxia (hypobaric hypoxia) and reperfusion in rat brain*. Int. J. Med. Sci., 7

Takeda A, Kodama Y, Ishiwatari S, Okada S. (1998). *Manganese transport in the neural circuit of rat CNS*. Brain Res Bull.; 45(2):149-52.

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. 120:163–172.

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

Vitarella D, Wong BA, Moss OR, Dorman DC. (2000). *Pharmacokinetics of Inhaled Manganese Phosphate in Male Sprague–Dawley Rats Following Subacute (14-Day) Exposure*. Toxicology and Applied Pharmacology 163, 279–285

Wilson DA, Sullivan Rm (2011). *Cortical Processing of Odor Objects*. DOI 10.1016/j.neuron.2011.10.027

Wilson DA, Stevenson RJ. (2003). *The fundamental role of memory in olfactory perception*. Trends Neurosci. 26:243–247.

Wilson D.A., Rennaker R. (2010). *Chapter 14, Cortical Activity Evoked by Odors*. The Neurobiology of Olfaction *Frontiers in Neuroscience* Edited by Anna Menini. Boca Raton (FL): CRC Press.

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

Zoni S, Albin E, Luccini R. (2007). *Neuropsychological testing for the assessment of manganese neurotoxicity*. Am J Ind Med. 50:812–830.

Zoni S, Bonetti G, Lucchini R. (2012). *Olfactory functions at the intersection between environmental exposure to manganese and parkinsonism*. Trace Elem Med Biol. 26(2-3): 179–182.