

# METAANÁLISIS DEL SISTEMA OLFATORIO COMO DIAGNÓSTICO PRECOZ EN PARKINSON Y ALZHEIMER

De La Mata Pazos, M.

e- mail: manumata21@gmail.com

Trabajo Fin de Grado en Biología

Tutor:

- Manuel Ángel Pombal Diego

Departamento de Biología

Funcional y Ciencias de la Salud

Facultad de Biología

Universidad de Vigo.

## Resumen

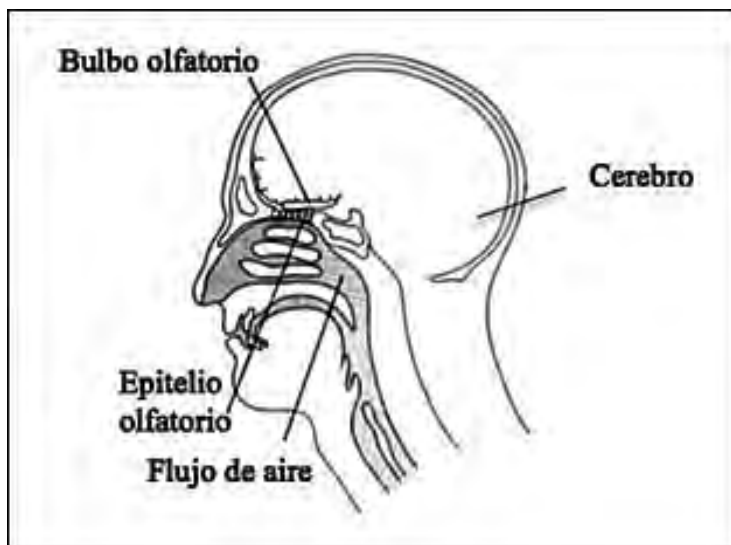
Revisión en la que además de esbozar y analizar parcialmente el funcionamiento del sistema olfatorio, se propone un metaanálisis con el que se pretende dar una nueva perspectiva en el diagnóstico precoz de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (EA) y el Parkinson (EP). Se enumeran una serie de pruebas a realizar, algunas no implantadas en el sistema sanitario nacional, y se detalla el método de trabajo para un total de 600 individuos a lo largo de una década.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los sentidos más peculiares y desarrollados del ser humano es el olfato. Con él, somos capaces de identificar y diferenciar alimentos, recordar, sentir e incluso reproducirnos a través de infinidad de olores (Leffingwell, 2002; Trotier, 2011; Brennan y Keverne, 2015). En la actualidad se sigue investigando en la actualidad es la influencia del olfato en la reproducción del ser humano, dado que el resto de primates no humanos y mamíferos lo siguen utilizando tanto para dicha función (feromonas) como para la detección de depredadores (Corona y Paredes, 2011; Trotier, 2011). Desde la prehistoria este sentido, como el resto, ha ido evolucionando. Los mecanismos de procesamiento de la gran mayoría de estímulos sensoriales que recibimos son, en gran medida, resultado de millones de años de evolución genética. Ya algunos estudios en biología comparativa (hombre-primate) han demostrado claras diferencias evolutivas en nuestros sentidos (Pierron *et al.*, 2013). Una de las más llamativas es cómo nuestro olfato ha ido perdiendo capacidad de discriminación a lo largo de la evolución. Algunas teorías indican que se debe a la pérdida de receptores olfatorios porque la postura erguida ha ido alejándose cada vez más del entorno. Otras lo achacan a la evolución de nuestro neocórtex donde los sistemas sensoriales primarios, encargados de la toma de decisiones, han sido acaparados por la vista y el oído. El neocórtex (isocórtex) posee un grosor de unos 2 cm e incluye las porciones derivadas del palio dorsal y constituye la mayor parte de la corteza cerebral humana.

## OBJETIVOS

Los motivos por los que se llevó a cabo este trabajo fueron, por una parte, la realización de un estudio en profundidad del sistema olfatorio (SO), de sus diferentes partes (Fig. 1) y del mecanismo de reconocimiento de moléculas olfatorias. Por otra parte, se pretende incluir un metaanálisis basado en distintas pruebas olfatorias que pudiese ser utilizado en la detección precoz de enfermedades neurodegenerativas como EA y EP.



**Figura 1:** Itinerario del flujo de aire en el paso por el epitelio olfatorio, donde se localizan las células sensoriales primarias. Éstas se proyectan hacia el bulbo olfatorio (BO), estructura cortical perteneciente al encéfalo (imagen tomada y modificada de Dewey, 2007)

### FUNCIONAMIENTO DEL SO

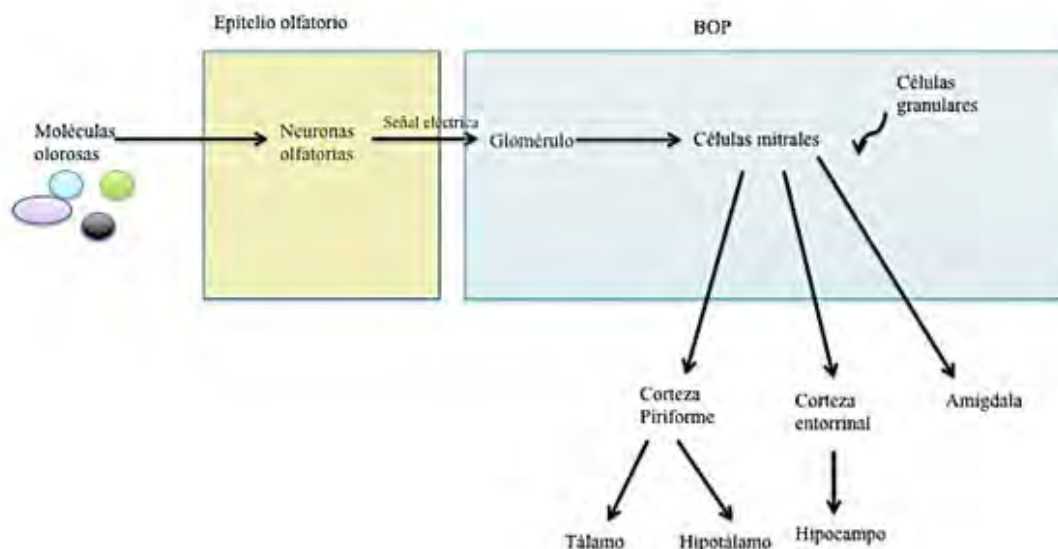
Para concretarlo de un modo sencillo pondremos el siguiente ejemplo: en un bosque se produce un incendio y una persona que se halla en las inmediaciones huele el humo. Observemos el proceso que experimenta dicha persona, desde que su olfato recibe las primeras moléculas de humo, hasta que se genera una sensación de estrés (miedo, angustia o ansiedad).

Las primeras moléculas de humo son recogidas en forma de estímulos olorosos a través de los cilios pertenecientes a las neuronas olfatorias. Estas neuronas transformarán el estímulo oloroso en señales eléctricas y químicas (Moody, 2014). Seguidamente la señal eléctrica alcanzará la capa glomerular (en el bulbo olfatorio principal, BOP).

Dentro del BOP, las células mitrales son las encargadas de comunicar el impulso procedente del glomérulo. A su vez, dicho impulso está regulado por las células granulares de tal manera que si el impulso eléctrico es suficientemente intenso, éstas permiten la amplificación de la señal eléctrica (Fig. 2). De lo contrario, las células granulares no permiten su continuación. Las señales que son amplificadas por las células mitrales se transmiten a tres destinos diferentes: corteza piriforme, corteza entorrinal y amígdala.

- **Corteza piriforme:** desde aquí el impulso nervioso pasa hacia dos destinos, el tálamo y el hipocampo.
  - o **Tálamo:** es el área en la que se inicia la vía tálamo-orbitofrontal cuyo fin es generar la percepción olorosa consciente a nivel cortical (córtex sensorial) (Wilson *et al.*, 2006).
  - o **Hipotálamo:** está encargado de funciones tan importantes como el mantenimiento de la temperatura corporal, la actitud agresiva o regular la secreción de hormonas en la hipófisis. Las hormonas hipofisarias pasarán al torrente sanguíneo para alcanzar la glándula suprarrenal y finalmente producir adrenalina y noradrenalina. Es ésta la razón por la que nuestro individuo comienza a sufrir sensación de estrés, miedo o pánico.
- **Corteza entorrinal:** es la corteza a través de la cual el impulso nervioso alcanza finalmente el hipocampo (forma parte del sistema límbico). Desarrolla funciones relacionadas con la memoria como la percepción espacial.
- **Amígdala:** también forma parte del sistema límbico y su función principal es el procesamiento y almacenamiento de reacciones emocionales.

De este modo es como se procesan los estímulos olorosos, desde el origen en el epitelio olfatorio hasta su posterior interpretación en los principales centros nerviosos de destino: tálamo, hipotálamo, hipocampo y amígdala.



**Figura 2:** Esquema del funcionamiento del SO desde la llegada de las moléculas olorosas al epitelio olfatorio y su percepción por las neuronas olfatorias primarias. Posteriormente el impulso llega al BOP y mediante sinapsis llega a las células mitrales (células de proyección reguladas por las células granulares). Finalmente, el impulso sensorial se divide llegando a los diferentes destinos: corteza piriforme, corteza entorrinal y amígdala.

## METAANÁLISIS DE PRUEBAS OLFATORIAS COMO DISEÑO EXPERIMENTAL EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LAS ENFERMEDADES DE ALZHEIMER (EA) Y PARKINSON (EP)

### Antecedentes

La medicina avanza cada vez más hacia la prevención por lo que es importante el desarrollo de metodologías de detección precoz de cualquier tipo de enfermedad. Los cambios en la capacidad olfatoria evolucionan paulatinamente y aun sin padecer ningún tipo enfermedad ya tiende a degenerar de manera natural. Además, en muchas de las enfermedades neurodegenerativas el desajuste olfatorio nos marca el síntoma y origen de la anormalidad cerebral. En la actualidad, existe una amplia variedad de pruebas para investigar la disfunción olfatoria y pretendemos usar algunas de ellas en nuestro metaanálisis.

### Objetivos

Después de establecer un grupo control y varios subgrupos para cada una de las enfermedades (EA y EP), distribuidos en clases de edad (ver tabla 1), en el presente metaanálisis se trata de aunar el historial clínico y familiar de cada uno de los individuos con una batería de pruebas olfatorias realizadas en las mismas condiciones a todos ellos. Es este diseño experimental se eligieron dos enfermedades neurodegenerativas (EA y EP) dado que uno de sus primeros síntomas confirmados es la pérdida de olfato. En la bibliografía consultada existen multitud de pruebas a realizar y, cuántas más sean abarcadas, mejores resultados se obtendrán. Por otra parte, es primordial elegir pruebas con las que se pueda confirmar el proceso de degeneración olfatoria, si la hubiere. Finalmente, los resultados recopilados se correlacionan para crear un perfil olfatorio de cada individuo.

El perfil olfatorio, además de recopilar los resultados obtenidos en las diferentes pruebas olfatorias, incluiría el patrón concreto (Fig. 3) de cada individuo. Los resultados que se obtengan persiguen cuatro objetivos principales:

- La creación de perfiles/patrones olfatorios del grupo control.
- La creación de perfiles/patrones olfatorios de los enfermos de EA y EP en cada uno de los estadios del estudio.

- La comparación y estudio de la evolución de patrones olfatorios en enfermos de EA y EP, y su posible patrón general de desarrollo.
- El diagnóstico precoz en individuos sanos a través de la correlación de sus resultados con los patrones de inicio de la disfunción olfatoria en enfermos de EA y EP.

Para llevar a cabo estos objetivos, se realizará un chequeo bianual (ya que el proceso de degeneración del olfato es paulatino y relativamente lento a lo largo de décadas) de cada uno de los individuos de todos los grupos para observar cómo evoluciona cada caso. Para que se pueda realizar este análisis global, el estudio deberá realizarse en el mayor número posible de individuos. Un mayor tamaño de muestra resultará en un menor error estadístico.

### Pruebas

Previamente a la aplicación del conjunto de técnicas, se realiza un chequeo médico general a cada uno de los individuos. De éste modo, cumplimos dos condiciones importantes. Por un lado, la obtención de datos precisos en cuanto al estado de salud psico-físico de cada sujeto. Como también, el conocimiento previo de salud de cada individuo como factor externo a las pruebas. El sumario de pruebas a las que se someterán los diferentes grupos de individuos son tres: técnicas electrofisiológicas (TER), de neuroimagen y de identificación.

- Técnicas electrofisiológicas (TER): determinación de potenciales relacionados con eventos olfatorios, olfatómetro y olfatograma. Ésta última sería la nueva herramienta a desarrollar, enmarcada dentro de las pruebas TER. Consiste en la implantación de microelectrodos en el epitelio olfatorio. Luego, se expone el sujeto a dos sustancias, tales como sulfuro de hidrógeno y fenil etil alcohol, en turnos diferentes.

La técnica mide las frecuencias que se obtienen de cada sujeto tras oler cada estimulante. Una vez que se realiza la batería de pruebas en el grupo control se calculan los valores medios estándar a los que se activan las neuronas olfatorias. Se trata de obtener tres parámetros diferentes:

- o Hallar los valores de las frecuencias de los dos grupos de enfermos y compararlos con el grupo control.
- o Realizar un estudio sobre las frecuencias olfatorias con resultados anormales en cada uno de los grupos de enfermos respecto al grupo control.

Posible aplicación clínica como método diferencial, para conocer si la patología que puede presentar un individuo es a nivel del epitelio olfatorio, o de niveles superiores del SO, como pueda ser el BOP. En cualquiera de los casos, esta prueba tendrá que ser desarrollada en paralelo a los avances en bioingeniería ya que a día de hoy, la prueba más cercana al olfatograma es el olfatómetro.

- Técnicas de neuroimagen: resonancia magnética funcional.

Se realiza mientras se pide a los sujetos que huelan diferentes sustancias. En diferentes estudios se ha observado que tanto la corteza piriforme como la amígdala se activaban mediante estímulos olorosos (Barresi *et al.*, 2012).

- Prueba de identificación: se realiza a través de patrones olfatorios.

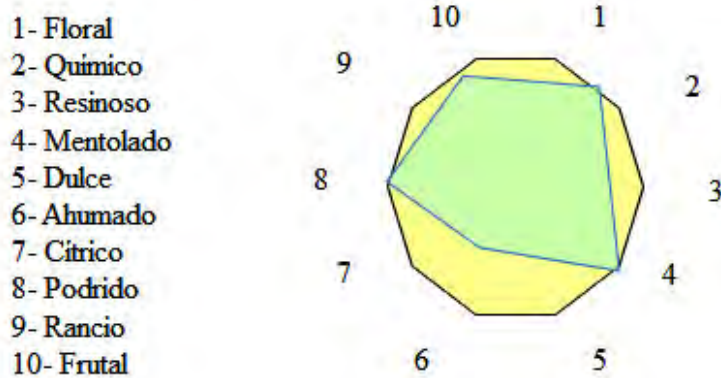
El diseño de esta prueba se inspiró en el modelo prismático que ya Heningn propuso en 1916 (ver Witting, 2001). Hoy, casi un siglo después, se propone una modificación del prisma de Heningn a un decágono compuesto por 10 olores diferentes: floral, químico, resinoso, mentolado, dulce, ahumado, cítrico, podrido, rancio, frutal (no cítrico). Se trata de abarcar una mayor variedad de olores.

Los sujetos deberán oler cada una de las 10 sustancias a través de un tubo de plástico. Se controlará el tiempo de exposición y la concentración de cada una de ellas. Según los resultados de cada uno de los

individuos se realizará un decágono en el que se representaría su perfil olfatorio particular. En la figura 3 se muestra un ejemplo.

Los estimulantes que se utilizarán en cada caso son (Schriever *et al.*, 2015):

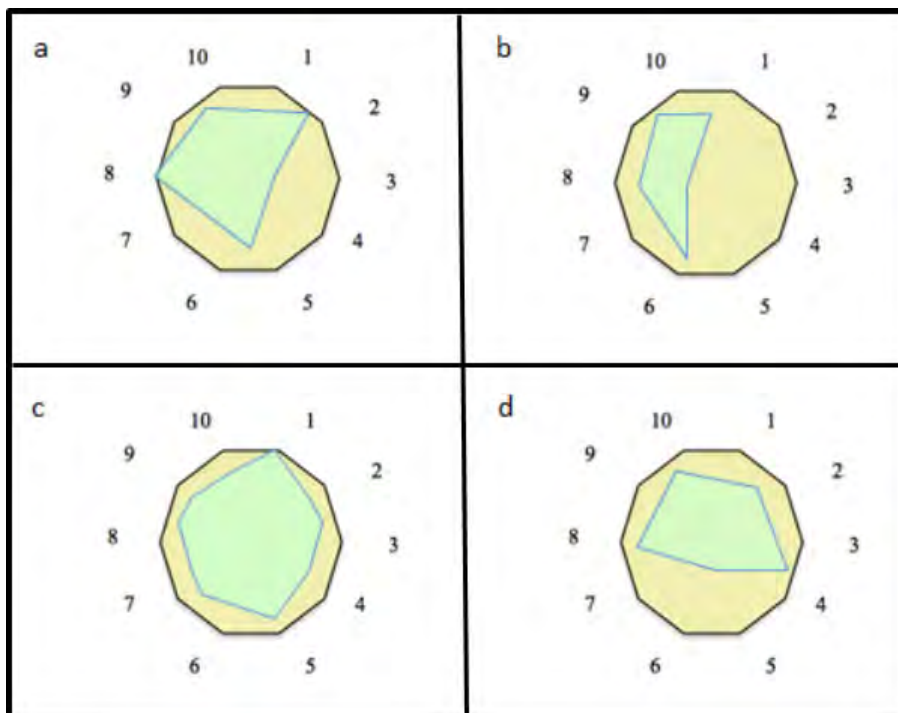
Olor - Sustancia estimulante



**Figura 3:** Resultado hipotético que se obtendría de un sujeto con predisposición para EP. En este caso se observa ya cierta disfunción olfatoria en las áreas correspondientes a los olores ahumado (6) y cítrico (7) sobre todo. Por otra parte, se mantiene con actividad normal el resto de áreas olorosas con una mayor sensibilidad hacia los olores tanto florales (1) como frutales (10).

1. Floral > Fenil etil alcohol (olor a rosas)
2. Químico > Hipoclorito sódico (lejía)
3. Resinoso > Resina de pino
4. Mentolado > Esencia de mentol
5. Dulce > Chocolate
6. Ahumado > Lignito
7. Cítrico > Fragancia de Limoneno
8. Podrido > Sulfuro de hidrógeno (huevo podrido)
9. Rancio > Amoníaco
10. Frutal (no cítrico) > Esencia de Plátano

El objetivo de esta técnica es elaborar perfiles únicos (decágonos) en individuos sanos y enfermos (Fig. 4). De este modo se podrían realizar diferentes correlaciones edad-género-patrón para intentar diagnosticar qué probabilidad tiene un individuo sano de padecer EA o EP en el futuro. Otros ejemplos de posibles resultados (los perfiles representados son hipotéticos) son los que se muestran en la figura 4.



**Figura 4:** A) Sujeto con predisposición genética para EA. Se observa ya cierta disfunción olfatoria en las áreas correspondientes a los olores resinoso (3) y mentolado (4), mientras que el resto de regiones sigue siendo funcional con quizás mayor sensibilidad hacia el olor podrido (8).  
 b) Sujeto en estado avanzado de EA. La disfunción olfatoria como podemos observar está agravada, careciendo de identificación olfatoria en los campos correspondientes a químico (2), resinoso (3), mentolado (4) y dulce (5). En lo que respecta al resto de áreas también se observa un cierto deterioro general.  
 c) Sujeto control, en el que se puede observar que su capacidad olfatoria no está mermada.  
 d) Sujeto en primeros estadios de EP. El sujeto tiene agravadas áreas como el dulce (5), ahumado (6) y cítrico (7).

Como se observa en la figura 4, el espectro de posibilidades puede ser muy amplio. Teniendo en cuenta que en términos metaanalíticos, cuanto mayor sea la diversidad de resultados, mayor fiabilidad obtendría el estudio.

## METODOLOGÍA

El tamaño de muestra para la realización del estudio se compone de 600 personas (ambos sexos): 300 del grupo control, 150 enfermos de EA y 150 de EP en diferentes fases de la enfermedad. Las edades entre las que se seleccionarán los individuos son entre 40 y 70 años, estableciéndose 3 clases de edad (40-50, 50-60 y 60-70). El rango muestral de 40-50 se considera edad precoz. Estos rangos se establecen con el fin de poder realizar el seguimiento clínico durante al menos una década. El estudio se organizaría en tres fases: grupo control, enfermos y doble ciego.

**Fase 1. Grupo Control:** Este grupo tiene un tamaño de muestra de 300 individuos, divididos equitativamente en las tres clases de edad: 40-50 (100), 50-60 (100) y 60-70 (100). Lo primero que habría que confirmar es que cada uno de los individuos seleccionados tenga un estado psicofísico saludable, sin ningún tipo de enfermedad, ni predisposición genética (o historial clínico) a ninguna de las dos enfermedades neurodegenerativas seleccionadas (EA y EP), ya que lo que queremos de esta primera fase es hallar los índices medios de los diferentes resultados. Posteriormente se realizaría la batería de pruebas a cada uno de los individuos.

**Fase 2. Enfermos:** Se les realizan las mismas pruebas olfatorias que al grupo control. Los individuos serán seleccionados según a) un historial clínico familiar con predisposición genética a padecer la enfermedad, b) enfermos en los primeros estadios de la enfermedad y c) enfermos en etapas avanzadas (tabla 1):

**Tabla1:** Número de individuos del grupo control y de pacientes agrupados según enfermedad y edad. Los sujetos se subclasifican en base a predisposición genética por historial familiar, primeras etapas de EA y EP, y enfermos en estados avanzados.

		EDAD (años)					
		40- 50		50-60		60-70	
		EA	EP	EA	EP	EA	EP
Número de sujetos (ambos sexos)	Grupo control	50	50	50	50	50	50
	Con predisposición genética	45	45	35	35	10	10
	Primeros estadios	5	5	10	10	30	30
	Estado avanzado	0	0	5	5	10	10
TOTAL (Individuos)		600					

**Fase 3. Doble Ciego:** Esta es, quizás, una de las fases más interesantes del estudio que se propone. Una vez calculados los valores medios de las diferentes pruebas olfatorias, se analizan dos grupos de sujetos cuyo historial clínico es desconocido (control y enfermos). A continuación se realiza la batería de pruebas a ambos grupos, y una vez obtenidos los resultados se realiza un patrón olfatorio exclusivo de cada individuo.

Por último, se calculan las probabilidades de desarrollo neurodegenerativo, comparando los resultados de todas las pruebas en todos los sujetos y elaborando sus perfiles olfatorios. Para culminar contrastando los perfiles olfatorios del grupo control y enfermos frente a los patrones obtenidos en esta fase. De éste modo se calculan los posibles errores y desviación típica que pueda poseer nuestro diagnóstico precoz.

### Seguimiento clínico

Una vez obtenidos los perfiles, se propone realizar un seguimiento de todos los grupos tanto control como enfermos. De éste modo se monitoriza tanto la evolución y resultados del grupo control, así como el deterioro olfatorio de los sujetos enfermos. Se llevará a cabo mediante chequeos bianuales a lo largo de una década para observar cómo evolucionan los patrones olfatorios con el tiempo. No obstante, se pueden producir algunas complicaciones y/o dificultades a la hora del desarrollo del metaanálisis derivadas de:

- **Falta de medios:** se necesita un amplio presupuesto para poder realizar la batería de pruebas a cada individuo dado el alto valor económico que tienen, en especial las TER.
- **Tamaño muestral:** la necesidad de encontrar un número suficiente de individuos para cada grupo. Aunque los números mostrados en la tabla 1 son hipotéticos, se prevé un escaso tamaño muestral en el rango de los 40-50 años. Por otra parte, el seguimiento clínico en el rango de 60-70 años puede verse alterado por la avanzada edad de los sujetos o incluso la defunción.

La finalidad del estudio, después del seguimiento de los sujetos durante una década es observar la evolución de los patrones olfatorios, los cuales han de ser comparados con los diferentes escenarios diagnosticados una década antes. El presente estudio se diseña para EA y EP como propuesta inicial, con la posibilidad de ampliarlo posteriormente a otras enfermedades neurodegenerativas como la Esquizofrenia. Los estudios que se pueden desarrollar son en la misma línea que el diseño metaanalítico elaborado en el que se comparase con grupos control como con sujetos de EP y/o EA. En último término, se buscaría su implantación como modelo de diagnóstico precoz en el sistema sanitario nacional.

## CONCLUSIÓN

Los estímulos olorosos recorren largas y complejas vías neuronales hasta llegar a destinos como el tálamo o el hipocampo. Es por ello, por lo que aún existe cierta incertidumbre en la comprensión total de los mecanismos de procesamiento de dichos estímulos. Y precisamente al tratarse de áreas encefálicas de difícil acceso in vivo, resulta especialmente interesante poder explorar nuevas vías de estudio no invasivas.

Por ello, en este trabajo se propone un metaanálisis basado en pruebas olfatorias, como el TER o la neuroimagen, como posible diagnóstico precoz de dos enfermedades (EA y EP), las cuales presentan como uno de sus primeros síntomas una disfunción olfatoria. Entre las técnicas a aplicar, se proponen como nuevas herramientas los patrones olfatorios y el olfatograma con el objeto de mejorar el diagnóstico temprano de la disfunción olfatoria originada en dichas enfermedades.

Las técnicas que se describen para aproximarnos a los engranajes del SO y su proceso degenerativo no están todas implantadas en el sistema sanitario actual. Por ello, seguramente en los próximos años la bioingeniería aportará la tecnología necesaria para su implantación y para nuevas técnicas de investigación no invasivas que faciliten un diagnóstico precoz de ciertas enfermedades neurodegenerativas basado en pruebas olfatorias y sea un proceso más eficiente, dinámico y rápido.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barresi, M., Ciurleo, R., Giacoppo, S., Foti, V., Celi, D., Bramanti, P., Marino, S. (2012). Evaluation of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. *J. Neurol. Sci.* 323: 16-24.
- Brennan, P., Keverne, E.B. (2015). Biological complexity and adaptability of simple mammalian olfactory memory systems. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 50: 29-40.
- Corona, R., Paredes, R.G. (2011). Nuevas neuronas para el olfato y la reproducción. *Rev. Dig. Univ. (Univ. Nac. México)*. Num. 3, 12: 1-10.
- Dewey, R.A. (2007). Senses and Perception. Olfaction. Recuperado el 24 de marzo de 2015 de [http://www.intropsych.com/ch04\\_senses/olfaction.html](http://www.intropsych.com/ch04_senses/olfaction.html).
- Leffingwell, J.C. (2002). Olfaction. *Leffingwell Reports.* 2: 1-34.
- Moody, S.A. (2014). Building the olfactory system. En: Moody, S.A. (Ed). *Principles of developmental genetics*. Londres, Reino Unido: Academic Press, pp. 357-371.
- Pierron, D., Gutiérrez, N., Letellier, T., Grossman, L.I. (2013). Current relaxation of selection on the human genome: tolerance of deleterious mutations on olfactory receptors. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66: 558-564.



- Schriever, V.A., Boerner, C., Mori, E., Smitka, M., Hummel, T. (2015). Changes of olfactory processing in childhood and adolescence. *Neuroscience*. 287: 15-22.
- Trotier, D. (2011). Vomeronasal organ and human pheromones. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* 128: 184-190.
- Wilson, D.A., Kadohisa, M., Fletcher, M.L. (2006). Cortical contributions to olfaction: plasticity and perception. *Sem. Cell Dev. Biol.* 17: 462-470.
- Witting, E. (2001). Evaluación sensorial. Una metodología actual para tecnología de los alimentos. Biblioteca digital de la Universidad de Chile. Recuperado el 24 de marzo de 2015 de [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/wittinge01/](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/wittinge01/)