



# ¿Cómo Olemos?

José Bubis Reisch<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Profesor en escalafón a dedicación exclusiva, Categoría Titular  
jbubis@usb.ve

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina -  
Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia  
Biomédica Digital.

## RESUMEN

En esta revisión se describirán los avances obtenidos en la dilucidación de las principales funciones del sistema olfatorio, incluyendo la recepción y discriminación de los olores, así como los mecanismos que se encargan de transmitirlos

**PALABRAS CLAVE:** Olfato, olores, receptores, señalización

HOW DO WE SENSE SCENTS?

## SUMMARY

This review will highlight the recent advances that have emerged in the elucidation of the primary tasks of the olfactory system, which include odorant detection, discrimination, and signaling.

**KEY WORDS:** olfaction, odorants, receptors, signal transduction, pheromones

## INTRODUCCIÓN

El sistema olfatorio permite a los organismos detectar y segregar miríadas de compuestos químicos volátiles, principalmente orgánicos y de bajo peso molecular, que comúnmente llamamos olores. Grandes progresos han sido logrados en los últimos años en el entendimiento de cada paso de la ruta olfatoria, los cuales van desde el contacto de un olor con su receptor en el epitelio olfatorio, la codificación y el procesamiento de esta información en el sistema nervioso central y periférico, la manifestación de sensaciones, y el almacenamiento de memorias. Gracias al descubrimiento de diversas técnicas moleculares y fisiológicas avanzadas, así como a la publicación de varios genomas eucariotas, se ha logrado entender cómo este remarcable sistema quimiodetector consigue diferenciar todos los olores. La identificación en la nariz de una

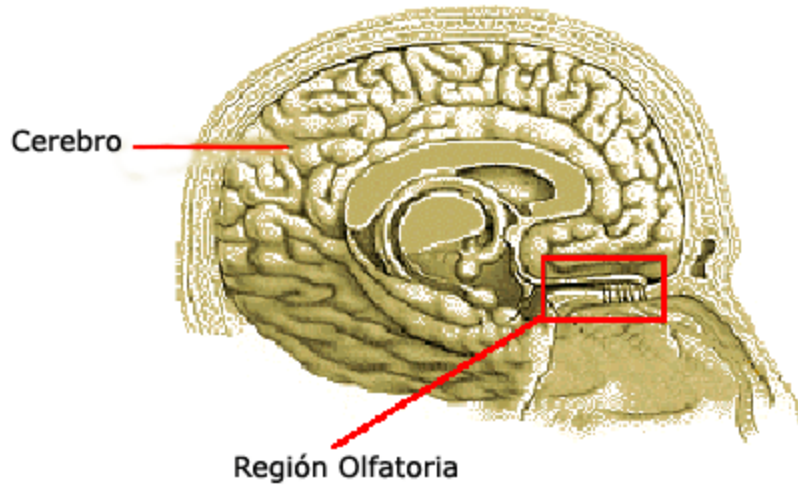
gran familia de receptores acoplados a proteínas enlazadoras de nucleótidos de guanina o proteínas G ha suministrado los fundamentos para el entendimiento del sentido del olfato, y es por ello que en estos momentos existe una descripción detallada del mecanismo de transducción responsable de generar la señal inducida por el estímulo en las neuronas sensoriales primarias, así como una fotografía explícita de la red neuronal que se encarga de transmitir la señal.

Dos sistemas olfatorios se han desarrollado en la mayoría de los animales.(19) El sistema olfatorio central o principal, que es el sensor del ambiente, utilizado por los animales para conseguir comida, detectar depredadores y presas, y marcar el territorio. Este sistema es notable por su amplitud y potencia discriminadora. Similar al sistema inmune, es un sistema abierto construido bajo la premisa de que es imposible predecir a priori con qué tipo de moléculas uno se va a topar. Para la tarea específica de encontrar una pareja receptiva se ha desarrollado un segundo sistema: el sistema olfatorio accesorio. Esta es una labor de tal complejidad que la evolución ha reconocido la necesidad de crear un sistema independiente y dedicado exclusivamente a esta actividad. Conocido como el sistema vomeronasal, se especializa en reconocer señales olfatorias específicas para cada especie, las cuales son producidas por uno de los sexos (macho o hembra) y percibidas por el otro, y que contienen información no sólo acerca de la localización del animal sino también de su estado reproductivo y disponibilidad. Adicionalmente, el sistema vomeronasal también cumple un papel importante en otros comportamientos sociales como son la territorialidad, la agresión y el proceso de amamantamiento.

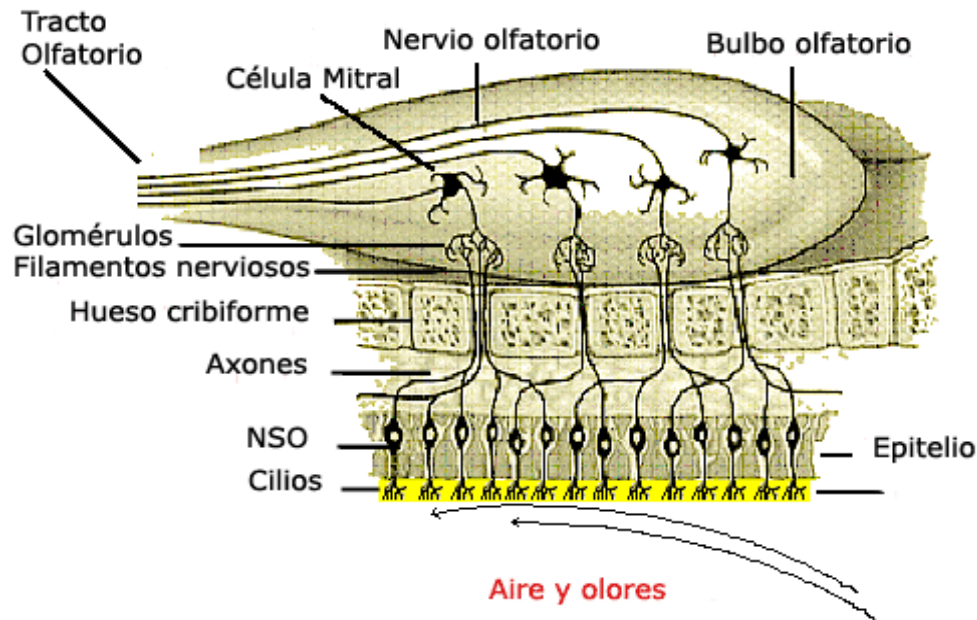
## ORGANIZACIÓN ANATÓMICA

El órgano sensor del olfato se ilustra esquemáticamente en la Fig.1. En el techo de cada una de las cavidades de la nariz existe una región denominada mucosa nasal donde se encuentran las células epiteliales pigmentadas o células de soporte, cuya coloración ha sido correlacionada con la sensibilidad olfatoria de las diferentes especies animales. Las glándulas de Bowman que residen en este tejido son las encargadas de producir el moco que cubre la superficie de todas las células presentes en él. Esparcidas entre las células de soporte de esta mucosa se encuentran las células receptoras o neuronas sensoriales olfatorias (NSOs), las cuales conforman el epitelio sensorial olfatorio. El neuroepitelio olfatorio típico posee alrededor de  $10^7$  NSOs en la parte superior de la cavidad nasal, las cuales son neuronas bipolares con una simple dendrita que alcanza la superficie del tejido y termina en una especie de botón del cual se proyectan unos 20-30 cilios muy finos. Estos cilios que yacen en la capa fina de moco que cubre este tejido constituyen el aparato de transducción sensorial. Un axón fino del polo proximal de cada neurona se proyecta directamente a las regiones más altas del cerebro. Por encima de la capa mucosa se encuentra el epitelio olfatorio basal, el cual consiste parcialmente de células precursoras basales capaces de dividirse mitóticamente para generar in situ las NSOs al madurar. Como en otros epitelios, la renovación celular persiste a través de la vida adulta para reemplazar las NSOs, cuyo período de vida es de semanas a meses.

## Anatomía del sistema olfatorio en humanos



**Figura 1.a**  
Localización de la región olfatoria

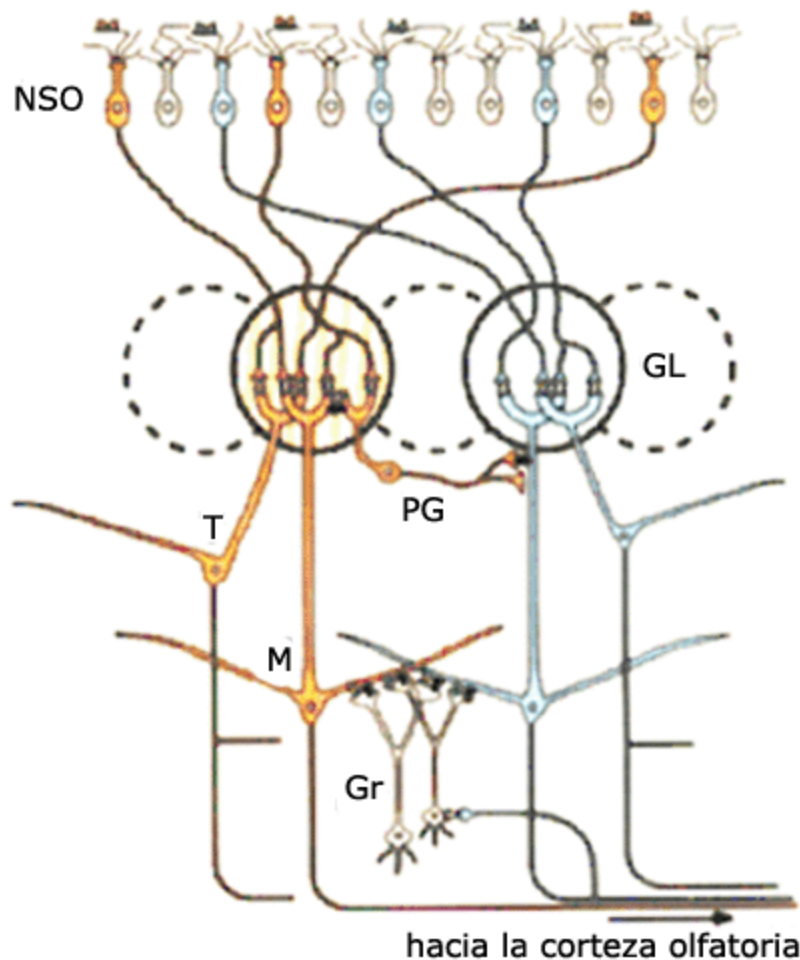


**Figura 1.b**  
Ampliación de la región olfatoria mostrando las proyecciones axonales desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo olfatorio principal.<sup>38</sup>

Las NSOs se extienden a través del epitelio olfatorio a fin de ponerse en contacto con los olores que se encuentran en el aire y envían sus axones hasta una región del cerebro conocida como el bulbo olfatorio. Para ello, sus axones se agrupan en el lado opuesto del mismo epitelio y penetran un hueso estrecho conocido como la placa cribiforme. Estos axones alcanzan el bulbo olfatorio del cerebro donde convergen para interactuar con células post-sinápticas y formar estructuras que se denominan glomérulos. Los glomérulos (GL) son conglomerados esféricos de neurovellosidades o neuropilos, de 50 -100  $\mu\text{m}$  de diámetro, formados por los axones de las NSOs y las dendritas de las principales células de proyección del bulbo que son las células mitrales (M) (Fig. 2). Las células con penachos (T) y las periglomerulares de axón corto (PG) también participan en la formación de los glomérulos (Fig. 2). En la siguiente capa, las dendritas de las

células mitrales y granulares (Gr) forman extensas sinapsis recíprocas (Fig. 2). Las células mitrales y las células con penachos son neuronas de salida, mientras que las células granulares y las periglomerulares corresponden a interneuronas locales. Al recibir información de las NSOs, los axones de las células mitrales y de las células con penachos, que pasan a través de las estrías olfatorias intermedia y lateral, la transmiten a la corteza olfatoria (Fig. 2), proyectándose hacia las regiones más elevadas del cerebro. En cada glomérulo, varios miles de axones de las NSOs hacen sinapsis con las dendritas de sólo 5-25 células mitrales, siendo así uno de los casos más extremos de convergencia del sistema nervioso (Fig. 2). Fisiológicamente, la convergencia que se produce en el ámbito de las células mitrales y de las células con penachos incrementa la sensibilidad de la señal olfatoria enviada al cerebro. El mensaje es entonces remitido directamente a través del tracto nervioso olfatorio a las estructuras más altas del sistema nervioso central que incluyen la corteza piriforme, el hipocampo y la amígdala, donde el proceso de señalización es decodificado y donde ocurre la interpretación y respuesta olfatorias.

### Diagrama resumiendo el cableado en el bulbo olfatorio principal



**Figura 2**

Cada neurona sensorial olfatoria (NSO) expresa sólo uno de los ~1000 genes que codifican para los ORs, y los axones de todas las células expresando ese OR particular convergen sobre uno o pocos glomérulos (GL) localizados en el bulbo olfatorio. Las NSOs y los glomérulos coloreados (de anaranjado o azul) representan organización sináptica básica causada por dos tipos diferentes de ORs. M, células mitrales; T, células con penachos; Gr, células granulares; PG, células periglomerulares. 53

## RECEPTORES DE OLORES

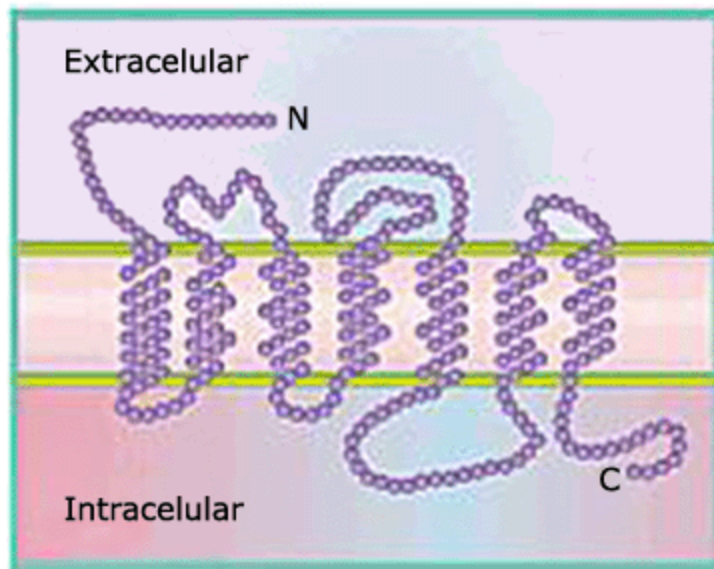
El descubrimiento de una familia de proteínas receptoras de olores en mamíferos (13) produjo por un lado un resultado previsto, pero produjo también un resultado muy sorprendente. Se esperaba que los receptores olfatorios (ORs) fueran receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) con características similares a aquellos que funcionan en la transmisión nerviosa, en la fotorrecepción y en muchos otros procesos celulares. Sin embargo, fue desconcertante conseguir que existían miles de genes codificando para los ORs en el genoma de los mamíferos, convirtiéndolos así en la mayor familia de GPCRs y probablemente en la familia génica más grande de todo el genoma. En los humanos existen alrededor de 350 genes y 560 pseudogenes que codifican para los ORs. (21) Este número de genes y pseudogenes específicos para el sistema olfatorio representa aproximadamente 2% del total de genes presentes en el genoma humano. Adicionalmente, los genes y pseudogenes que codifican para los ORs están presentes en prácticamente todos los cromosomas humanos, con excepción de los cromosomas 20 y Y, siendo el cromosoma 11 el más enriquecido en este tipo de genes. Zhang & Firestein (80) identificaron los genes que codifican para los ORs en el genoma de ratón. Ellos encontraron alrededor de 1300 genes para los ORs de ratón, los cuales incluyen un 20% de pseudogenes. Los peces y anfibios están peor dotados contando sólo con alrededor de 100 ORs.

¿Cómo se distribuyen los productos de los ~1000 genes que codifican para los ORs entre las millones de NSOs presentes en la nariz de los mamíferos?. Experimentos con células individuales, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, han indicado que solamente un OR es expresado en cada NSO. Por lo tanto, el epitelio olfatorio está representado por un mosaico complejo de poblaciones distintas de NSOs. Esta diseminación de NSOs con la misma sensibilidad hacia un olor particular, a través de una amplia área, posiblemente ayuda a incrementar la probabilidad de que los olores inhalados por el aire interactúen con sus receptores específicos durante su trayectoria turbulenta dentro de la cavidad nasal.

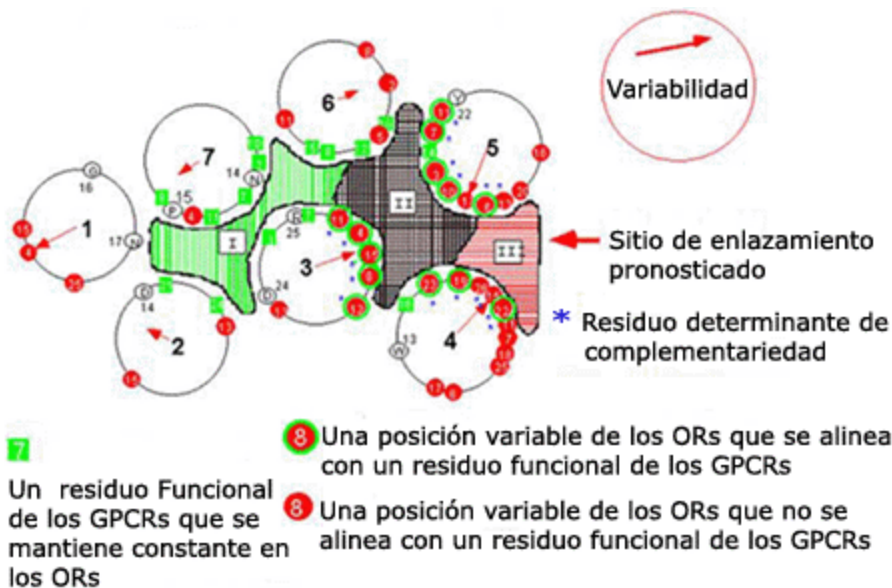
Los ORs comparten muchas particularidades con otros GPCRs, incluyendo una región codificadora que carece de intrones, una estructura que predice siete dominios  $\alpha$  helicoidales transmembranales conectados por lazos intracelulares y extracelulares de longitudes variables (Fig. 3A), y numerosas secuencias cortas conservadas. Sin embargo, existen muchas características específicas que sólo ocurren en los ORs, tales como un segundo lazo extracelular extremadamente largo, un par extra de cisteínas conservadas localizadas en ese mismo lazo, así como otras secuencias cortas. (48) Estudios comparativos de secuencias han reportado un rango de 40 a 90% de identidad dentro de la familia de los ORs. Quizás lo más interesante es la existencia de una región hipervariable, formada por una serie de 17 residuos localizados en los segmentos transmembranales 3, 4 y 5, cuyas secuencias muestran una divergencia particularmente fuerte (58) (Fig. 3B). Se ha postulado que esta zona corresponde a la región determinante de la complementariedad de los olores, por analogía con los sitios de enlazamiento de los antígenos en las inmunoglobulinas. Las hélices  $\alpha$  3, 4 y 5 parecen estar cara a cara y formar un bolsillo en el interior de la proteína receptora (Fig. 3B). En concordancia con otros GPCRs de este tipo (receptores  $\beta$ -adrenérgicos y rodopsina), este bolsillo parece ser el sitio probable de enlazamiento para los ligandos. La gran variabilidad en esta región provee la primera base molecular para entender el rango, la diversidad y el altísimo número de olores que pueden ser detectados y discriminados.



## Receptores de olores



**Figura 3.a**  
Estructura de un OR con los siete dominios helicoidales transmembranales. Los extremos N-terminal extracelular y C-terminal intracelular son relativamente cortos. 49



**Figura 3.b**  
Diagrama de la región hipervariable de los ORs, constituida por 17 aminoácidos localizados en los segmentos transmembranales 3, 4 y 5 que muestran una alta divergencia de secuencia. 58

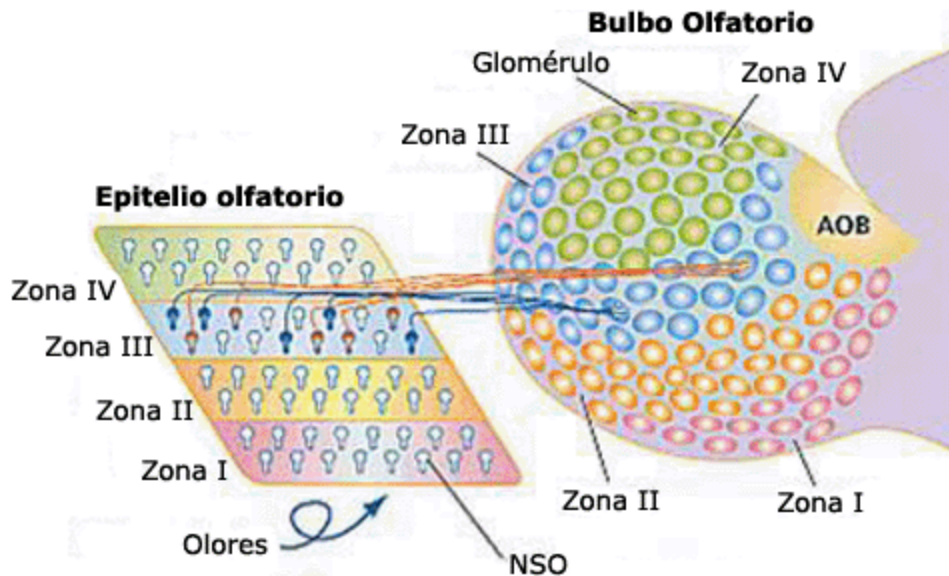
## CONEXIONES SINÁPTICAS ENTRE LA NARIZ Y EL BULBO OLFATORIO

¿Cómo se organiza funcionalmente el patrón de conectividad axonal entre el epitelio olfatorio y el bulbo olfatorio principal?. Estudios genético-moleculares recientes empleando ratones transgénicos han mostrado que todas las NSOs que expresan un OR particular,

independientemente de donde se encuentren sobre la capa epitelial, convergen hasta un simple blanco en el bulbo olfatorio que precisamente es su glomérulo específico.(48-49) Dos principios básicos han sido demostrados: la proyección zona-zona y la convergencia glomerular.(53)

El epitelio olfatorio del ratón está subdividido en cuatro zonas de expresión de los genes para los ORs. Cada una ocupa ~25% de la superficie del epitelio y comprende los cuerpos celulares de una vasta mayoría de las NSOs que están expresando un gen OR particular. Es por ello que los ORs se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo a su patrón de expresión en el epitelio olfatorio del ratón. Un tipo de OR determinado es expresado en una de las cuatro zonas circunscritas del epitelio olfatorio: zonas I, II, III y IV (Fig. 4), y dentro de cada zona, las neuronas que expresan los diferentes ORs se entremezclan mostrando una distribución esparcida y diseminada. Sin embargo, las comparaciones estructurales de varios ORs, en relación con sus zonas de expresión, han revelado que los ORs con secuencias de aminoácidos altamente homólogas tienden a estar localizados en la misma zona del epitelio olfatorio. Esta organización por zonas también es preservada en el bulbo olfatorio, como se ha demostrado mediante estudios inmunohistoquímicos(20) y de hibridización in situ.(73) Las zonas epiteliales se proyectan aproximadamente sobre cuatro zonas o dominios en el bulbo. Estas zonas pueden representar entonces una compartimentalización del sistema olfatorio en cuatro subdivisiones de ~250 tipos funcionales (formando un total de ~1000 poblaciones diferentes de NSOs), reduciéndose así la complejidad del problema de cableado. Consistente con esta hipótesis se ha reportado una expresión zona-específica de la molécula de adhesión celular olfatoria (OCAM), una homóloga de la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM), la cual es una molécula candidata a guiar el axón.(79) Por lo tanto, las informaciones de los olores recibidos por las NSOs localizadas en una zona determinada del epitelio olfatorio, son transmitidas a los glomérulos para luego ser transferidas a las células mitrales y a las células con penachos localizadas en la zona correspondiente del bulbo olfatorio.

## Patrones de conectividad axonal entre el epitelio olfatorio y el bulbo olfatorio principal



**Figura 4**

El Epitelio olfatorio de ratón puede ser subdividido en cuatro zonas con igual superficie de área (zonas I-IV), definidas por la expresión de los ORs. Un gen OR específico es expresado solamente en las NSOs cuyos cuerpos celulares están restringidos a una zona particular. Las NSOs localizadas en una zona determinada del epitelio se proyectan sobre los glomérulos situados en la zona correspondiente del bulbo olfatorio principal (zonas I-IV). Los axones de las NSOs expresando el mismo tipo de OR (rojo o azul oscuro) convergen sobre uno o pocos glomérulos definidos. NSO, neurona sensorial olfatoria; AOB, bulbo olfatorio accesorio. 49, 53

Lo interesante es que los axones olfatorios pueden encontrar sus glomérulos específicos en el bulbo olfatorio principal. Estudios recientes realizados en ratones han desenmarañado el patrón de convergencia glomerular altamente ordenado de la proyección axonal olfatoria: los axones de las NSOs que expresan un determinado OR convergen con extraordinaria precisión sobre algunos pocos glomérulos específicos entre los ~1800 glomérulos posibles (Fig. 4). Esta convergencia glomerular ha sido visualizada mediante experimentos de hibridación in situ (73) y por medio de la técnica de "knock in" en la cual se reemplaza un gen particular por otro.(48) Al recibir las señales axonales de entrada de las NSOs que expresan un gen OR particular, el glomérulo logra integrar la información e incrementar el cociente señal/ruido. Este concepto de convergencia glomerular es consistente con la visión ampliamente aceptada de la codificación olfatoria, en la cual la combinación particular de glomérulos activados le informa al cerebro lo que la nariz está oliendo.

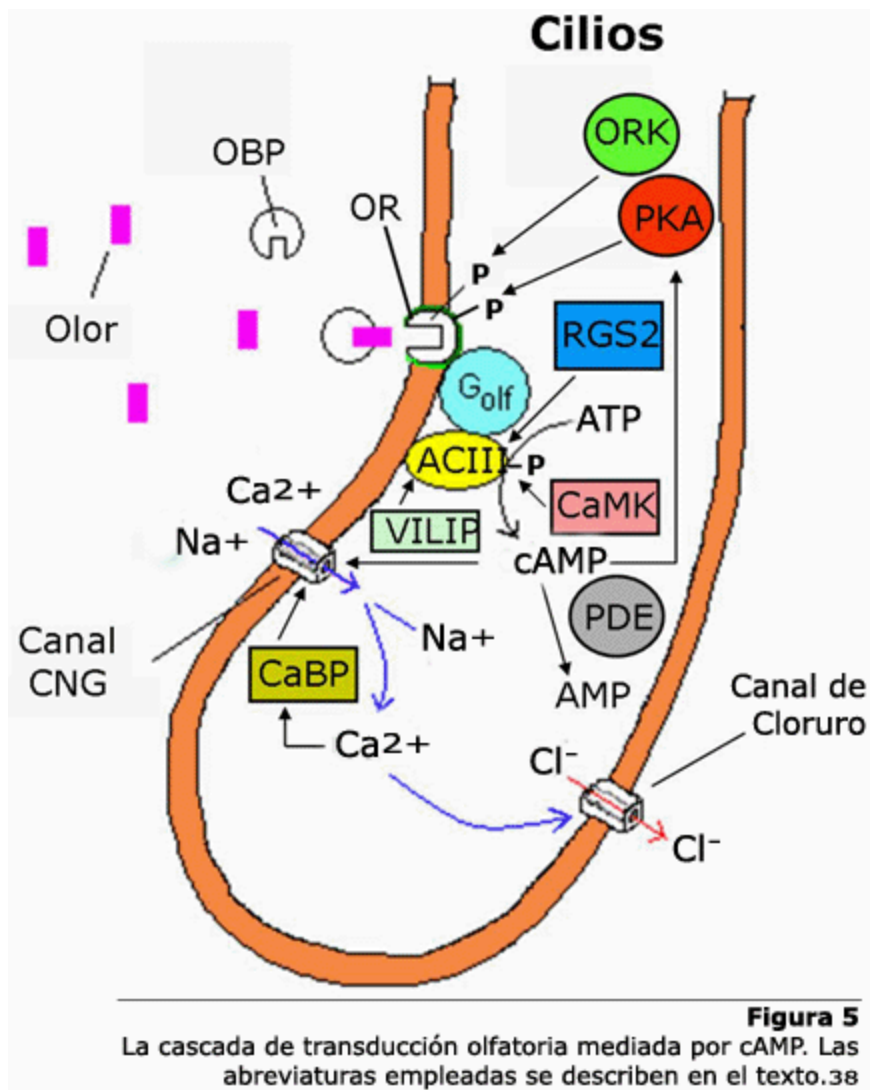
## TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL

Para que los olores, los cuales poseen pequeño tamaño y características hidrofóbicas, puedan interactuar con su receptor, ellos tienen que atravesar la barrera de moco que recubre el epitelio olfatorio. Se ha descubierto un número de proteínas en este epitelio que han sido denominadas proteínas enlazadoras de olores (OBPs), cuyo papel no ha sido totalmente clarificado. Las OBPs son miembros de la superfamilia de proteínas llamadas lipocalinas y se postula que son capaces



de enlazarse lipofílicamente a los olores en la interfase acuosa/lipídica del moco, incrementando así su concentración y facilitando su movilización desde las capas de moco hasta los ORs en las NSOs (56) (Fig. 5). También se ha sugerido que las OBPs actúan como una especie de filtro para prevenir que cantidades excesivas de olores alcancen al receptor y se produzca una sobresaturación. Adicionalmente, las OBPs podrían participar activamente en interacciones con la propia molécula de la proteína receptora. Esto ciertamente podría ser una posibilidad en el caso de la clase de receptores vomeronasales V2R (12), los cuales poseen un dominio N-terminal, extracelular, muy largo que podría interactuar con proteínas voluminosas enlazadoras de ligandos como las OBPs. Una vez que el receptor ha enlazado su molécula de olor, se inicia una cascada de eventos que transforman la energía química de enlazamiento en una señal neuronal, o sea, en un cambio en el potencial de membrana de la NSO.

El receptor enlazado a su ligando activa una proteína G de la clase de las proteínas G estimuladoras o Gs (un subtipo específico del olfato, Golf) (Fig. 5). Al igual que las otras proteínas G, Golf está constituida por tres subunidades, una subunidad  $\alpha$  que puede ser considerada la porción activa y las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  que la regulan. En su estado de descanso, la subunidad  $\alpha$  que posee GDP en su bolsillo de enlazamiento de nucleótidos, y junto a las otras dos subunidades forma el heterotrímero inactivo de Golf. Cuando un olor se enlaza a su OR, se producen cambios conformacionales en el receptor que ocasionan que se acople a Golf. Consecuentemente, el GDP en la subunidad  $\alpha$  es reemplazado por GTP, y la subunidad  $\alpha$  se disocia de las otras subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . Una subunidad unida a GTP es entonces capaz de estimular a la proteína efectora en este sistema, la adenilil ciclasa tipo III olfatoria (ACIII) (Fig.5). Esta enzima convierte el ATP, el cual se encuentra en abundantes cantidades en el interior celular, en AMP cíclico (cAMP), el mensajero secundario por excelencia que cumple numerosos papeles en diversos mecanismos de señalización intracelular. En el caso de las NSOs, el cAMP se enlaza a la cara intracelular de un canal iónico, un canal de compuerta que es abierto por nucleótidos cíclicos (canal CNG) y que está muy relacionado al encontrado en los fotorreceptores, permitiéndole conducir cationes tales como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 5). Las NSOs inactivas normalmente mantienen un voltaje de descanso a través de la membrana de alrededor de  $-65 \text{ mV}$  (adentro con respecto a afuera). Cuando los canales CNG se abren, el influjo de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  causa que el interior celular se vuelva menos negativo. Si suficientes canales se abren por el tiempo necesario, causando que el potencial de membrana se vuelva alrededor de  $20 \text{ mV}$  menos negativo, la célula consigue llegar a su potencial umbral y se genera un potencial de acción. Este potencial de acción es propagado a lo largo del axón, que cruza a través de la placa cribiforme, y llega al cerebro donde hace sinapsis con neuronas de segundo orden localizadas en el bulbo olfatorio.



## MENSAJEROS SECUNDARIOS

Ratones genéticamente alterados en los cuales varios componentes de esta cascada han sido delecionados (Golf, ACIII y el canal CNG) han comprobado que la vía del cAMP es la ruta más común para todas las NSOs. (11) Sin embargo, también se ha reportado que otros mensajeros secundarios están involucrados en la transmisión de la señal olfativa, así como en los procesos de adaptación.

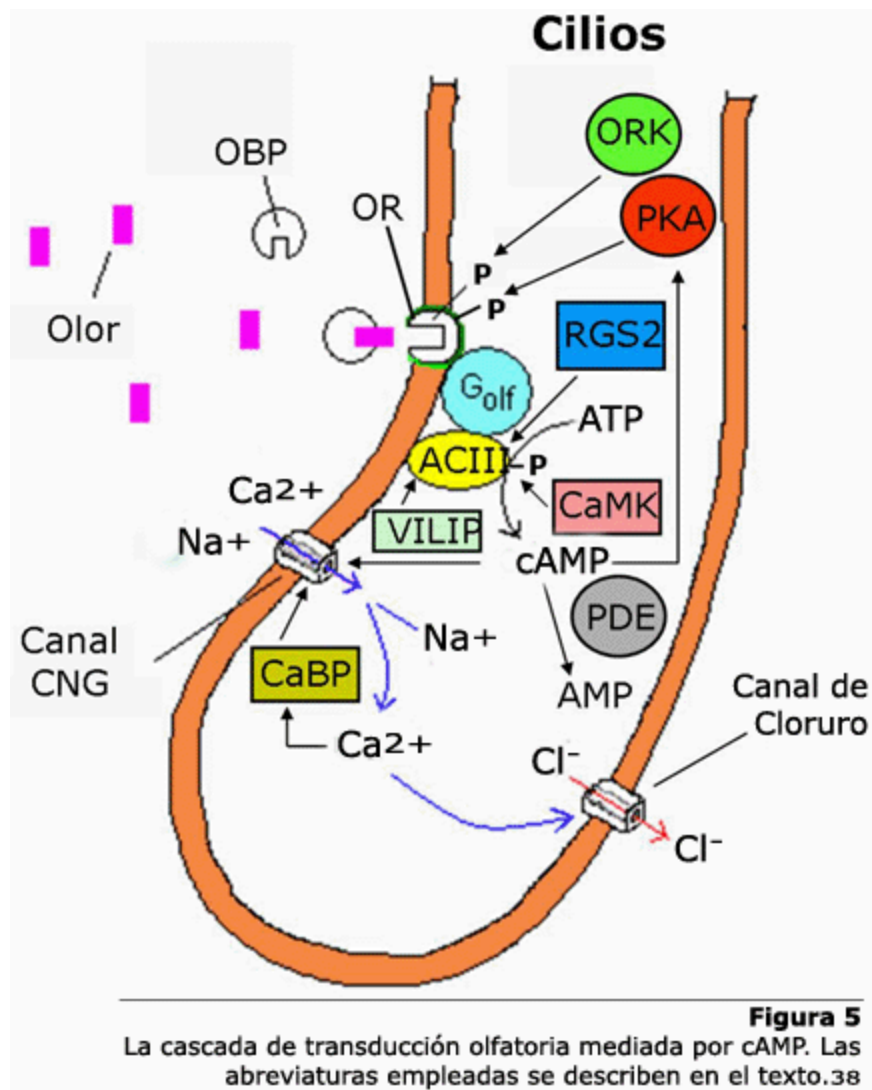
La cascada de mensajeros secundarios provee amplificación e integración de los eventos de enlazamiento del olor. Un receptor activado por un olor puede activar decenas de Golf, cada una de las cuales puede activar una molécula de ACIII capaz de producir cerca de miles de moléculas de cAMP por segundo. Los últimos cálculos estequiométricos sugieren que sólo se requieren 3 moléculas de cAMP para abrir un canal CNG, sin embargo, cientos de miles de iones pueden cruzar la membrana a través de un solo canal abierto. Por lo tanto una simple molécula de olor logra producir un evento eléctrico que puede ser medido en una NSO. Adicionalmente, números reducidos de canales abiertos al mismo tiempo son capaces de conducir suficiente corriente para inducir la generación de un potencial de acción.

Unido a esta ruta, existe un mecanismo de amplificación adicional y único en las NSOs. Los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que están entrando a través del canal CNG son capaces de activar otro canal iónico que es permeable a iones cloruro, los cuales están cargados negativamente (30) (Fig. 5). Los canales de  $\text{Cl}^-$  neuronales normalmente median respuestas inhibitorias, ya que los iones  $\text{Cl}^-$  tienden a estar distribuidos de tal manera que su concentración extracelular es mayor y por ello sólo tienen la posibilidad de entrar a la célula a través de un canal abierto. Pero este no es el caso en las NSOs las cuales mantienen una concentración intracelular inusualmente alta de  $\text{Cl}^-$ , presumiblemente por la acción de una bomba de membrana, y en consecuencia hay un eflujo de  $\text{Cl}^-$  cuando estos canales son activados. De esta manera se produce una carga positiva neta sobre la membrana que despolariza aún más a las células, aumentando así la magnitud de la respuesta excitatoria. Esta es una adaptación bien importante pues los cilios olfatorios residen en el moco donde las concentraciones de iones no están tan bien reguladas como en los compartimentos intersticiales normales.(41) Así que las NSOs mantienen su propia batería de  $\text{Cl}^-$ , en caso de que el gradiente de  $\text{Na}^+$  en el moco no sea suficiente para superar la corriente umbral, y esta batería almacenada de iones cloruro es usada para incrementar la respuesta.

Los iones de calcio que entran a través de los canales CNG también son importantes en la respuesta de adaptación del sistema, mediante una ruta de retroalimentación negativa que involucra al canal iónico.(35) A medida que el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular incrementa durante la respuesta olfatoria, el calcio acomplejado con calmodulina (14) u otra proteína enlazadora de calcio (CaBP) actúa sobre el canal, modulándolo y causando un decrecimiento en su sensibilidad al cAMP, requiriéndose así un estímulo de olor más fuerte para producir suficiente cAMP para abrir el canal (Fig. 5). Una variedad de proteínas enlazadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  que incluyen calmodulina, calretinina, calbindina-D28k, neurocalcina, recoverina, p26olf y la proteína parecida a visinina (VILIP) han sido identificadas en las NSOs.(2) Sin embargo, con excepción de calmodulina, aún no está claro si alguna de las otras moléculas interactúa con los canales CNG.

Este es solamente uno de los diversos mecanismos que las NSOs utilizan para ajustar su sensibilidad.(82) Otros mecanismos incluyen la proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMK), la cual fosforila y atenúa la actividad de la ACIII (75); una proteína reguladora de la señalización de la proteína G (RGS2), la cual aparentemente actúa sobre la ACIII inhibiendo su actividad (72); la proteína enlazadora de  $\text{Ca}^{2+}$  VILIP, la cual también modula negativamente a la ACIII (6); proteínas quinasas, como la proteína quinasa del receptor olfatorio (ORK) (15) y la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) (7), las cuales fosforilan a los receptores y los desensibilizan; y una fosfodiesterasa de cAMP (PDE) activada por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (9), la cual cataliza la hidrólisis del nucleótido cíclico a AMP, ayudando así a la terminación de la señal (Fig. 5). Además, se ha descrito la presencia de una fosfatasa 2A la cual también parece regular la respuesta de los cilios olfatorios.(32)

Mientras ciertos olores, como la citralva, promueven la producción de cAMP, otros olores, como la pirazina, inducen la elevación en la concentración de un mensajero secundario diferente, el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3). (8-62)



## SUBTIPOS PARTICULARES DE PROTEÍNAS G

Adicionalmente, Schandar et al. (66) identificaron subtipos particulares de proteínas G que fueron activados cuando cilios olfatorios aislados fueron estimulados por olores químicamente distintos. Estos resultados indicaron que diferentes olores disparan selectivamente cascadas de reacciones disímiles y proveen evidencias de la existencia de otras rutas de transducción en la señalización olfatoria que producen la formación de IP<sub>3</sub>. Aunque el proceso general es similar al descrito arriba para el cAMP, químicamente es muy diferente. Otra categoría de proteínas G (Gq, Gi/o) está involucrada en la activación de isoformas tipo β de la enzima fosfolipasa C (PLC) enlazada a la membrana, a través de sus subunidades α o complejos βγ. La PLC hidroliza al lípido fosfatidilinosito 1-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) en la membrana plasmática, produciendo IP<sub>3</sub> y diacilglicerol (DAG). Tanto IP<sub>3</sub> como DAG pueden actuar directa o indirectamente sobre los canales iónicos, generando en consecuencia un potencial de acción en la célula receptora. Adicionalmente, IP<sub>3</sub> y DAG pueden alterar los niveles intracelulares de calcio. Así parece que ambas rutas, la del cAMP y la del IP<sub>3</sub>/DAG pueden coexistir en la misma NSO y pueden ser activadas por diferentes olores operando como dos cascadas de señalización alternativas. Estos mensajeros secundarios hasta podrían tener efectos antagónicos, pues una elevación en los niveles de calcio podría activar los canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> presentes en las NSOs los cuales podrían hiperpolarizar la célula y hacer más lento o terminar el proceso de señalización. La

cascada del IP3 es regulada negativamente por la proteína quinasa C (PKC) (7), de la misma manera como la ruta de señalización vía cAMP es atenuada por fosforilación por la PKA.

Suplementariamente a la desensibilización de los ORs por fosforilación, la terminación de la señal olfativa parece estar relacionada a una serie de enzimas de biotransformación que procesan las moléculas olorosas. Los estudios extensivos de destoxificación realizados con muestras de hígado de vertebrados han provisto de un marco de referencia para el estudio de los mecanismos de destoxificación en otros sistemas. La destoxificación ocurre por lo general en dos fases denominadas I y II. En la fase I, el compuesto inicial es transformado en una especie más reactiva. Varias transformaciones químicas están involucradas en esta fase, las cuales incluyen reacciones de óxido-reducción catalizadas por enzimas de la superfamilia de los citocromos P450 (22) y miembros de la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR) (44). Las reacciones de la fase II consisten en la adición, ya sea a uno de los productos provenientes de una de las reacciones de la fase I o directamente a los reactivos tóxicos, de un grupo altamente polar como el UDP-glucuronosil (reacción catalizada por las UDP - glucuronosiltransferasas) (10) o glutatión (reacción catalizada por las glutatión S-transferasas) (71). Los productos resultantes de las reacciones de la fase II son hidrofílicos, por lo que ya no pueden atravesar las membranas y tienen que ser eliminados por secreción. En el epitelio olfatorio de los vertebrados se expresan varias enzimas biodegradativas en grandes cantidades, lo cual resulta lógico dado que dicho epitelio está constantemente expuesto a una variedad de compuestos xenobióticos como los olores y los compuestos tóxicos presentes en el aire. Entre las enzimas de biotransformación específicas del epitelio olfatorio se han identificado el citocromo P-450olf1, la UDP-glucuronosiltransferasa olfatoria [UGT(olf)] y la glutatión S-transferasa olfatoria (GST) (36-37;16;5). Dado que estas enzimas son capaces de actuar sobre pequeños compuestos hidrofóbicos, ellas posiblemente cumplen un papel importante en el metabolismo de los olores. Estas biotransformaciones producirían olores con propiedades más hidrofílicas, lo que facilitaría su eliminación mediante el flujo del moco o a través de la corriente sanguínea. Por ello, las enzimas de biodegradación mencionadas parecen jugar un rol primordial en el proceso del olfato, específicamente en la terminación rápida de la señal iniciada por los olores. Adicionalmente, tienen una función importante en la protección del neuroepitelio sensorial contra los compuestos tóxicos disueltos en el aire.

La cascada de transducción por cAMP en el sistema olfatorio parece estar modulada por otro nucleótido cíclico que también sirve de mensajero secundario en otros mecanismos de señalización, el GMP cíclico (cGMP). Los olores producen una elevación tardía y sostenida en la concentración de cGMP (32), la cual es causada, al menos parcialmente, por la activación de guanilil ciclasas localizadas en los cilios de las NSOs, como consecuencia de la acción de calcio y de una proteína activadora de la guanilil ciclasa (GCAP) (51). El cGMP así formado sirve para aumentar la señal del cAMP mediante la activación de la ACIII vía fosforilación por una proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG). Sin embargo, existe cierta controversia en este respecto, ya que hay reportes mostrando efectos inhibitorios del cGMP sobre la señal del cAMP, los cuales también parecen estar gobernados por la PKG (33). El cAMP a su vez regula negativamente a las guanilil ciclasas vía la PKA, limitando así la señal producida por el cGMP. Además, se conoce que los canales CNG olfatorios no sólo son abiertos por cAMP, sino que también pueden ser abiertos por cGMP, así que el incremento en la concentración de cGMP podría jugar un papel importante en la amplificación de la respuesta olfatoria.



## PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO Y MONÓXIDO DE CARBONO

El óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) también parecen jugar roles fundamentales en el sistema olfatorio. El NO ha sido implicado en la plasticidad sináptica en otras regiones del cerebro como resultado de su modulación de los niveles de cGMP. En ovejas, la enzima sintetasa del óxido nítrico se expresa tanto en las células mitrales como en las células granulares, mientras que la guanilil ciclasa, responsable de la formación de cGMP por estimulación de NO, se expresa solamente en las células mitrales. Por lo tanto, el NO parece actuar como un mensajero intracelular liberado de las células mitrales y granulares, para potenciar la liberación de glutamato de las células mitrales como consecuencia de su modulación de la concentración de cGMP. Kendrick et al. (28) han propuesto que los cambios que se producen en el circuito funcional del bulbo olfatorio motivan la formación de memorias olfatorias. Esto es consistente con el reporte de Okere et al. (54), quienes demostraron que la administración exógena de NO al bulbo olfatorio accesorio de ratones hembras, cuyas actividades sinápticas habían sido modificadas por feromonas luego de mantener relaciones sexuales, podían inducir una memoria olfatoria feromona-específica sin tener relaciones sexuales. Adicionalmente, otros datos sugieren una función prominente del NO en el establecimiento de conexiones dentro de las NSOs que se están regenerando y diferenciando.(63)

Igualmente, el CO puede servir como un mensajero neuronal gaseoso relacionado a la producción de cGMP, sugiriéndose su participación en el proceso de diferenciación de las NSOs. (26) También se ha encontrado que las señales de CO/cGMP endógenas contribuyen a la adaptación olfatoria y tienen que ver con el control entre ganancia y sensibilidad en el proceso de transducción olfatorio.(82) Estos resultados ofrecen un mecanismo por medio del cual un estímulo simple y corto producido por un olor puede traducirse en cambios intracelulares duraderos que podrían jugar un papel importante en la adaptación a la percepción de los olores.

## LA INTERPRETACIÓN DE LOS OLORES OCURRE POR UN PROCESO COMBINATORIO

¿Cómo puede la nariz interpretar la infinidad de diferentes olores?. Parece que el sentido del olfato en mamíferos está basado en una aproximación combinatoria para reconocer y procesar los olores. En vez de dedicar un OR específico a un olor específico, el sistema olfatorio utiliza un “alfabeto” de ORs para crear una respuesta de olor específica dentro de las neuronas del cerebro. El sistema olfatorio aparentemente utiliza combinaciones de ORs para así reducir considerablemente el número de tipos de ORs que se requieren para transmitir el amplio rango de olores existentes.

En un estudio reportado por Malnic et al. (42), NSOs individuales de ratón fueron expuestas a un rango de diferentes olores. Utilizando representaciones por imágenes de calcio, se pudieron detectar las células nerviosas que habían sido estimuladas por un olor particular. De esta manera se pudo demostrar que un OR individual puede reconocer múltiples olores, que un olor simple puede ser reconocido por múltiples ORs, y que diferentes olores son reconocidos por diferentes combinaciones de ORs. Estos resultados indican que el sistema olfatorio emplea un esquema de codificación combinatoria para codificar las identidades de los olores y explican cómo sólo alrededor de mil ORs pueden detectar y describir muchos miles de olores diferentes. Malnic et al.

(42) también demostraron que alteraciones muy sutiles en la estructura química de los olores, o un cambio en su concentración, pueden activar diferentes combinaciones de ORs. Por ejemplo, el octanol huele a naranjas, mientras que el ácido octanoico, que es un compuesto químicamente muy similar, huele a sudor. Similarmente, el indol en grandes cantidades huele a podrido, mientras que trazas del mismo reactivo huele a flores.

## FEROMONAS Y EL SISTEMA VOMERONASAL

En muchos mamíferos hay un sistema olfatorio accesorio localizado en un órgano con estructura tubular denominado el órgano vomeronasal o VNO, el cual se encuentra separado y es independiente del epitelio olfatorio principal (29; 46). EL VNO ha sido identificado mediante el estudio de la acción de las feromonas que son moléculas producidas y emitidas por otros miembros de la misma especie. Las feromonas han sido implicadas en fenómenos de apareamiento, amamantamiento, cortejo y otros comportamientos, y se cree que interactúan con el sistema endocrino a través del VNO.

Dos familias adicionales de GPCRs, no relacionadas a la familia de los ORs y conocidas como receptores vomeronasales (VR), han sido identificadas en el VNO. Llamativamente, ellas se expresan de forma diferencial en dos poblaciones separadas de neuronas sensoriales vomeronasales (NSVs) (18; 45; 64; 24). Además, las NSVs localizadas en la porción más apical del epitelio expresan proteínas G del tipo  $G_i$ , mientras que aquellas en la porción basal son positivas para  $G_o$  (27). Aunque no hay evidencias de que estas proteínas G están involucradas en la transducción de la señal, las dos familias de receptores están distribuidas en precisa coincidencia con ellas (31). Así, las neuronas positivas para  $G_i$  expresan receptores de la familia V1R, mientras que los receptores V2R son expresados en células positivas para  $G_o$ . El número de V1R es de aproximadamente 150 y pertenecen al mismo tipo de GPCRs que los ORs, o sea, tienen N-terminales extracelulares cortos. Los V2R son similares a los receptores metabotrópicos de glutamato en el sentido de que tienen N-terminales extracelulares largos los cuales se cree que están involucrados en el enlazamiento del ligando. Se ha estimado que también existen alrededor de 150 V2Rs en los ratones, los cuales están arreglados en varias subfamilias (17; 55). La organización del sistema vomeronasal es algo diferente que la del epitelio olfatorio principal puesto que al menos algunas NSVs pueden expresar más de un tipo de receptor (43). Las NSVs proyectan sus axones a una región caudal del bulbo olfatorio conocida como bulbo olfatorio accesorio, pero los axones de las NSVs no convergen en glomérulos simples como en el bulbo principal (60; 4). En el bulbo olfatorio accesorio, las neuronas sensoriales que expresan el mismo V1R convergen sobre el mismo glomérulo, pero hasta 10-30 glomérulos reciben la señal de entrada de un solo receptor (opuesto a 1-3 en el bulbo olfatorio principal).

Con la excepción de un pseudogen, ninguno de los VRs parece ser expresado diferencialmente en machos y hembras, indicando que las respuestas sexualmente divergentes a las feromonas son un resultado de funciones cerebrales a niveles más altos del cerebro, y que ambos sexos pueden detectar todas las feromonas. Lógicamente debe ser importante para una hembra saber que hay otra hembra en el área, aunque su respuesta hacia ella sea diferente de la que tendría hacia un macho.

El mecanismo de transducción de la señal en las NSVs aún no se conoce muy bien. Ciertas evidencias fisiológicas y bioquímicas han implicado a una actividad PLC y a la ruta de los fosfoinosítidos en dicho proceso de señalización (31; 25; 39). La mencionada ruta lipídica posiblemente incluye al IP3, el DAG, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , y quizás la apertura de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  parecido al receptor de potencial transiente (TRP) identificado en el proceso visual de *Drosophila* (23). La mayor dificultad para obtener evidencias concluyentes reside en la carencia de estímulos bien caracterizados, ya que las feromonas son componentes minoritarios presentes en los fluidos excretados, como la orina y el sudor, y por ello son difíciles de identificar, purificar y obtener en suficiente cantidad.

¿Son los humanos sensibles a las feromonas? En los humanos, se conoce que el VNO está presente en los fetos y que desaparece antes del nacimiento. Aunque la mayoría de los investigadores del área piensan que esto es improbable, existen algunos reportes aludiendo su existencia en adultos. Savic et al. (65) mostraron que el suministro a mujeres de olores químicamente similares a andrógenos produjo una activación a nivel del hipotálamo, con el centro de gravedad en los núcleos preópticos y ventromediales. En contraste, cuando se les proporcionaron olores parecidos a estrógenos a hombres, estos también activaron el hipotálamo pero con el centro de gravedad en los núcleos paraventriculares y dorsomediales. Esta activación hipotalámica dependiente del sexo sugiere un substrato fisiológico potencial para una respuesta de comportamiento sexual diferenciada en humanos. En el genoma humano todos los miembros de la familia de VR son pseudogenes, con una excepción. Rodríguez et al. (61) demostró que el genoma humano contiene un gen VIR intacto, que presenta una gran homología con una familia de receptores de feromonas de ratón. Aunque el gen VIR fue recuperado de 11 individuos con diversos orígenes étnicos, aún no se conoce cuál es el ligando para dicho receptor ni dónde es expresado.

## REFERENCIAS

1. Alenius, M. & Bohm, S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 26083-26086.
2. Bastianelli, E., Polans, A. S., Hidaka, H., & Pochet, R. (1995) *J. Comp. Neurol.* 354, 395-409.
3. Belluscio, L., Gold, G. H., Nemes, A., & Axel, R. (1998) *Neuron* 20, 69-81.
4. Belluscio, L., Koentges, G., Axel, R., & Dulac, C. A. (1999) *Cell* 97, 209-220.
5. Ben-Arie, N., Khen, M., & Lancet, D. (1993) *Biochem. J.* 292, 379-384.
6. Boekhoff, I., Braunewell, K.-H., Andreini, I., Breer, H., & Gundelfinger, E. (1997) *Eur. J. Cell. Biol.* 72, 151-158.
7. Boekhoff, I., & Breer, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 471-474.
8. Boekhoff, I., Tareilus, E., Strotmann, J., & Breer, H. (1990) *EMBO J.* 9, 2453-2458.
9. Borisy, F. F., Ronnett, G. V., Cunningham, A. M., Juilfs, D., Beavo, J., & Snyder, S. H. (1992) *J. Neurosci.* 12, 915-923.
10. Brierley, C. H., & Burchell, B. (1993) *Bioessays* 15, 749-754.
11. Brunet, L. J., Gold, G. H., & Ngai, J. (1996) *Neuron* 17, 681-693.
12. Buck, L. B. (2000) *Cell* 100, 611-618.
13. Buck, L. B., & Axel, R. (1991) *Cell* 65, 175-187.
14. Chen, T. Y., & Yau, K. W. (1994) *Nature* 368, 545-548.

15. Dawson, T. M., Arriza, J. L., Jaworsky, D. E., Borisy, F. F., Attramadal, H., Lefkowitz, R. J., & Ronnett, G. V. (1993) *Science* 259, 825-829.
16. Dear, T. N., Campbell, K., & Rabbitts, T. H. (1991) *Biochemistry* 30, 10376-10382.
17. Del Punta, K., Rothman, A., Rodriguez, I., & Mombaerts, P. (2000) *Genome Res.* 10, 1958-1967.
18. Dulac, C., & Axel, R. A. (1995) *Cell* 83, 195-206.
19. Firestein, S. (2001) *Nature* 413, 211-218.
20. Fujita, S. C., Mori, K., Inamura, K., & Obata, K. (1985) *Brain Res.* 326, 192-196.
21. Glasman, G., Yanai, I., Rubin, I., & Lancet, D. (2001) *Genome Res.* 11, 685-702.
22. Guengerich, F. P. (1993) *Sci. Am.* 81, 440-447.
23. Hardie, R. C., & Raghu, P. (2001) *Nature* 413, 186-193.
24. Herrada, G., & Dulac, C. (1997) *Cell* 90, 763-773.
25. Holy, T. E., Dulac, C., & Meister, M. (2000) *Science* 289, 1569-1572.
26. Ingi, T., & Ronnett, G. V. (1995) *J. Neurosci.* 15, 8214-8222.
27. Jia, C., & Halpern, M. (1996) *Brain Res.* 719, 117-128.
28. Kendrick, K. M., Guevara-Guzman, R., Zorrilla, J., Hinton, M. R., Broad, K. D., Mimmack, M., & Ohkura, S. (1997) *Nature* 388, 670-674.
29. Keverne, E. B. (1999) *Science* 286, 716-720.
30. Kleene, S. J., & Gesteland, R. C. (1991) *J. Neurosci.* 11, 3624-3629.
31. Krieger, J., Schmitt, A., Lobel, D., Gudermann, T., Schultz, G., Breer, H., & Boekhoff, I. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 4655-4662.
32. Kroner, C., Boekhoff, I., & Breer, H. (1996a) *Biochim. Biophys. Acta* 1312, 169-175.
33. Kroner, C., Boekhoff, I., Lohmann, S. M., Genieser, H. G., & Breer, H. (1996b) *Eur. J. Biochem.* 236, 632-637.
34. Kurahashi, T., & Yau, K. W. (1993) *Nature* 363, 71-74.
35. Kurahashi, T., & Menini, A. (1997) *Nature* 385, 725-729.
36. Lazard, D., Tal, N., Rubinstein, M., Khen, M., Lancet, D. & Zupko, K. (1990) *Biochemistry* 29, 7433-7440.
37. Lazard, D., Zupko, K., Poria, Y., Nef, P., Lazarovits, J., Horn, S., Khen, M., & Lancet, D. & (1991) *Nature* 349, 790-793.
38. Leffingwell, J. C. (2001) <http://www.leffingwell.com/olfaction.htm>
39. Leinders-Zufall, T., Lane, A. P., Puche, A. C., Ma, W., Novotny, M., Shipley, M. T., & Zufall, F. (2000) *Nature* 405, 792-796.
40. Liu, M., Chen, T. Y., Ahamed, B., Li, J., & Yau, K. W. (1994) *Science* 266, 1348-1354.
41. Lowe, G., & Gold, G. H. (1993) *Nature* 366, 283-286.
42. Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999) *Cell* 96, 713-723.
43. Martini, S., Silvotti, L., Shirazi, A., Ryba, N. J., & Tirindelli, R. (2001) *J. Neurosci.* 21, 843-848.
44. Maser, E., & Opperman, U. C. T. (1997) *Eur. J. Biochem.* 249, 365-369.
45. Matsunami, H., & Buck, L. B. (1997) *Cell* 90, 775-784.
46. Meredith, M. (2001) *Chem. Senses* 26, 433-445.
47. Miwa, N., Kobayashi, M., Takamatsu, K., & Kawamura, S. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 860-867.
48. Mombaerts, P. (1999) *Science* 286, 707-711.
49. Mombaerts, P. (2001) *Nat. Neurosci.* 4, 1192-1198.
50. Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., & Axel, R. (1996) *Cell* 87, 675-686.

51. Moon, C., Jaber, P., Otto-Bruc, A., Baehr, W., Palczewski, K., & Ronnett, G. V. (1998) *J. Neurosci.* 18, 3195-3205.
52. Mori, K., Fujita, S. C., Inamura, K., & Obata, K. (1985) *J. Comp. Neurol.* 242, 214-229.
53. Mori, K., Nagao, H., & Yoshihara, Y. (1999) *Science* 286, 711-715.
54. Okere, C. O., Kaba, H., & Higuchi, T. (1996) *Neuroscience* 71, 349-354.
55. Pantages, E., & Dulac, C. A. (2000) *Neuron* 28, 835-845.
56. Pelosi, P. (1996) *J. Neurobiol.* 30, 3-19.
57. Peppel, K., Boekhoff, I., McDonad, P., Breer, H., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 25425-25428.
58. Pilpel, Y., & Lancet, D. (1999) *Protein Sci.* 8, 969-977.
59. Ressler, K. J., Sullivan, S. L., & Buck, L. B. (1994) *Cell* 79, 1245-1255.
60. Rodriguez, I., Feinstein, P., & Mombaerts, P. (1999) *Cell* 97, 199-208.
61. Rodriguez, I., Greer, C. A., Mok, M. Y., & Mombaerts, P. (2000) *Nature Genet.* 26, 18-19.
62. Ronnett, G. V., Cho, H., Hester, L. D., Wood, S. F., & Snyder, S. H. (1993) *J. Neurosci.* 13, 1751-1758.
63. Roskams, A. J., Bredt, D. S., Dawson, T. M., & Ronnett, G. V. (1994) *Neuron* 13, 289-299.
64. Ryba, N. J., & Tirindelli, R. A. (1997) *Neuron* 19, 371-379.
65. Savic, I., Berglund, H., Gulyas, B., & Roland, P. (2001) *Neuron* 31, 661-668.
66. Schandar, M., Laugwitz, K.-L., Boekhoff, I., Kroner, C., Gudermann, T., Schultz, G., & Breer, H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 16669-16677.
67. Schleicher, S., Boekhoff, I., Arriza, J., Lefkowitz, R. J., & Breer, H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1420-1424.
68. Schwarting, G. A., & Crandall, J. E. (1991) *Brain Res.* 547, 239-248.
69. Schwob, J. E., & Gottlieb, D. I. (1986) *J. Neurosci.* 6, 3393-3404.
70. Schwob, J. E., & Gottlieb, D. I. (1988) *J. Neurosci.* 8, 3470-3480.
71. Shen, H., Kauvar, L., & Tew, K. D. (1997) *Oncol. Res.* 9, 295-302.
72. Sinnarajah, S., Dessauer, C. W., Srikumar, D., Chen, J., Yuen, J., Yilma, S., Dennis, J. C., Morrison, E. E., Vodyanoy, V., & Kehrl, J.H. (2001) *Nature* 409, 1051-1055.
73. Vassar, R., Chao, S., Sitcheran, R., Nunez, J., Vosshall, L., & Axel, R. (1994) *Cell* 79, 981-991.
74. Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., & Axel, R. (1998) *Cell* 93, 47-60.
75. Wei, J., Wayman, G. A., & Storm, D. R. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 24231-24235.
76. Wei, J., Zhao, A. Z., Chan, G. C. K., Baker, L. P., Impey, S., Beavo, J. A., & Storm, D. R. (1998) *Neuron* 21, 495-504.
77. Wong, S. T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G. C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G. H., & Storm, D. R. (2000) *Neuron* 27, 487-497.
78. Yan, C., Zhao, A. Z., Bentley, J. K., Lougheny, K., Ferguson, K., & Beavo, J. A. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9677-9681.
79. Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Fujita, H., Hayashi, H., Kagamiyami, H., & Mori, K. (1997) *J. Neurosci.* 17, 5830-5842.
80. Zhang, X., & Firestein, S. (2002) *Nat. Neurosci.* 5, 124-133.
81. Zufall, F., & Leinders-Zufall, T. (1997) *J. Neurosci.* 17, 2703-2712.
82. Zufall, F., & Leinders-Zufall, T. (2000) *Chem. Senses* 25, 473-481.