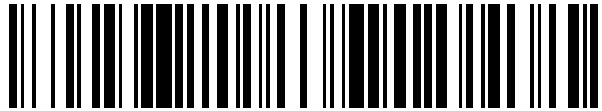


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 781**

51 Int. Cl.:

**G01R 33/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2011** **E 11305196 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015** **EP 2492705**

54 Título: **Método de IRMf para identificar estímulos olfativos del sistema de recompensa dopaminérgico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.03.2016**

73 Titular/es:

**TAKASAGO INTERNATIONAL CORPORATION  
(100.0%)  
37-1, Kamata 5-chome, Ohta-ku  
Tokyo 144-8721, JP**

72 Inventor/es:

**WARR, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 563 781 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de IRMf para identificar estímulos olfativos del sistema de recompensa dopaminérgico

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere al uso de IRM funcional (RMIf) cuantitativa, técnica de mapeo para distinguir respuestas humanas a estímulos olfativos en particular estímulos por ingredientes de fragancia, acuerdos o fragancias completamente formuladas que inducen un efecto de recompensa.

10

**Antecedentes de la invención**

Las técnicas de investigación de consumidores convencionales solo tienen éxito limitado en predecir si un producto será un éxito comercial o no. Es deseable tener una técnica de medir la respuesta del cerebro a estímulos sin el tiempo y la reflexión requeridos en formular y expresar ideas verbalmente, en respuesta a preguntas. Las técnicas de imagenología de resonancia magnética ofrecen una manera de investigar cómo responde un consumidor a un estímulo de una manera no verbal mientras el cerebro interpreta el estímulo; permite la visualización tanto de la respuesta primaria (por ejemplo, en la corteza piriforme, CP) como el procesamiento adicional de las señales sensoriales (por ejemplo, en la corteza orbitofrontal, COF). El consumidor tiene que usar, o experimentar el producto para reaccionar a él y en el contexto de medir respuesta cerebral por IRM esto puede ser difícil para muchos productos. Sin embargo, es posible introducir estímulos olfativos a sujetos de una manera exacta y precisa, al tiempo que se mide la respuesta cerebral, usando una forma específica de olfactómetro.

15

20

25

30

Un olfactómetro es un dispositivo diseñado para proporcionar un número de estímulos olfativos a sujetos de una manera controlada y reproducible. Los requisitos de la técnica de escáner de IRM impone restricciones en el diseño de olfactómetros adecuados para uso junto con escáneres de IRM. Una restricción principal es la eliminación de materiales magnéticos de la vecindad del escáner. Debido a la disponibilidad de olfactómetros que se pueden usar junto con escáneres de IRM el interés en medir la respuesta cerebral por IRM a estímulos olfativos ha aumentado significativamente en los últimos años. La mayor parte del interés en medidas de IRM con olfato se ha centrado en respuestas hedónicas a estímulos (véase, por ejemplo, Zatorre R.L. Jones-Gottman M, Rouby C, *Neural mechanisms involved in odor pleasantness and intensity judgements Neuroreport 11 2711-2716 (2000)* o Kobal G, Kettenmann B, *Int. J. Psychophysiology 36 (2)157-163 2000*).

35

Una visión ampliamente sostenida sobre la respuesta emocional es que tenemos 6 emociones básicas (*Ekman et al, J of Personality and Social Psychology 1987 v53, p712*):

- Ira
- Repulsión
- Miedo
- Felicidad
- Tristeza
- Sorpresa.

40

Estas emociones están relacionadas con recompensa, pero recompensa es un efecto de activar estas emociones; de hecho, un desenlace de la activación de todas estas emociones puede ser recompensa (si se supera el miedo entonces eres valiente y serás recompensado; la próxima vez se puede buscar miedo para experimentar esta recompensa, etc.).

45

La ruta dopaminérgica algunas veces se llama la ruta de la recompensa, y generalmente se asocia con funciones tales como:

50

- motivación y respuesta emocional
- recompensa y deseo
- placer, euforia,
- adicción, compulsión.

55

Las recompensas generalmente se experimentan como "hacer las cosas mejor" y por tanto gustan, se desean y persiguen. La recompensa se puede expresar usando palabras o expresiones que comunican un sentimiento intenso de bienestar.

60

Las áreas del cerebro implicadas en la ruta dopaminérgica se entienden bien, y se pueden encontrar descripciones generales en textos estándar tales como *The Brain Atlas, TA.Woolset et al (Wiley 2008, ISBN 978-0-470-08476-2)*, con detalles más específicos en artículos de revisión tal como "*Dopaminergic reward system: a short integrative review*" por O. Arrias-Carrion et al, *International Archives of Medicine 2010, 3:24*, y en *Everitt et al, Brain Res Brain Res Review 36, p129-138 (2001)*. La ruta implica el área tegmental ventral (localizada en el mesencéfalo dopaminérgico), núcleo accumbens, cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), amígdala, hipocampo y corteza prefrontal (giro frontal superior, medio, inferior) y giro cingulado anterior.

65

En una revisión de estudios de IRMf usando diversos estímulos *Sharpley y Bitsika (Behav Brain Res 13 Jul 2010)* advirtieron que el área tegmental ventral (VTA) se activaba tanto por amor materno como romántico, y comentaron que en casi todos los estudios de amor, humor y otras formas de placer, las áreas activadas también son las asociadas con procesos de recompensa. Sharpley y col. también advirtieron que la activación de VTA y el núcleo accumbens también estaba asociada con alegría/felicidad/risa, y esto se puede entender en el contexto de que con frecuencia son los desenlaces de recompensa de una experiencia emocional.

Normalmente, la estimulación de la ruta de la dopamina se logra por estímulos “fuertes”; fotografías de seres amados, recompensa monetaria, etc. No hay evidencia hasta la fecha de que un olor placentero pueda activar la ruta de la dopamina. Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que esta ruta se puede activar por el olor de una muestra de fragancia (como se define posteriormente). Incluso más sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que algunas, pero no todas las muestras de fragancia, provocan una recompensa a través de la ruta dopaminérgica, y han diseñado un método que usa imagenología IRMf para cribar materiales de interés. El mismo método se puede usar directamente para evaluar la capacidad de cualquier estímulo olfativo de estimular la ruta de recompensa.

Westermann et al. (J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2008, 79:19-24) es un estudio dirigido a determinar la imagenología funcional del sistema olfativo cerebral en pacientes con enfermedad de Parkinson. Smejkal et al. (Bratisl. Lek Listy 2003, 104(6): 184-188) es un estudio dirigido a localizar áreas cerebrales olfativas secundarias activadas por un estímulo agradable. Gottfried et al. (J. Neurosci., 15 diciembre, 2002, 22(24): 10829-10837) es un estudio que describe el uso de imagenología de resonancia magnética funcional relacionada con sucesos para delinear los sustratos neurales que subyacen el acondicionamiento olfativo humano.

### Compendio de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método según la reivindicación 1 de identificar una muestra de fragancia de interés para preparar un acuerdo o una fragancia completamente formulada, en donde el método comprende:

- a) someter un grupo de sujetos a una prueba de IRMf durante la cual cada sujeto huele un olor control y una muestra de fragancia de prueba;
- b) capturar escáneres cerebrales de IRMf de cada sujeto que huele el olor control y la muestra de fragancia de prueba de modo que se detecte la actividad cerebral de cada sujeto;
- c) promediar la actividad cerebral de todos los sujetos cuando huelen el olor control y la muestra de fragancia de prueba, respectivamente; y
- d) contrastar la actividad cerebral promediada de los sujetos cuando huelen la muestra de la fragancia de prueba con la actividad cerebral promediada de los sujetos cuando huelen el olor control.

En aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método según la reivindicación 6 de preparar un acuerdo o una fragancia completamente formulada, que comprende identificar una muestra de fragancia de interés por el método mencionado anteriormente y formular dicha muestra en una fragancia.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método según la reivindicación 8 de usar una muestra de fragancia identificada por el método mencionado anteriormente en un producto de consumo.

### Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término “actividad cerebral” significa actividad fisiológica y bioquímica en el cerebro humano, o una región del cerebro, asociada con actividad mental, incluyendo, pero no limitada a, aumentos en el flujo sanguíneo para activar regiones del cerebro, cambios en el nivel de oxígeno en la sangre, aumentos en la actividad metabólica (por ejemplo, consumo de glucosa), cambios en el potencial eléctrico de neuronas, y la liberación de neurotransmisores. La actividad cerebral se puede medir de forma no invasiva, por ejemplo, midiendo cambios en campos eléctricos, campos magnéticos que emanan del cráneo.

Como se usa en el presente documento, el término “área cerebral” se refiere a un volumen de tejido en el cerebro humano, que puede ser de cualquier forma y que se puede caracterizar anatómica o espacialmente.

Como se usa en el presente documento, los términos “frontal”, “anterior”, “posterior”, “superior” e “inferior” tienen sus significados acostumbrados en anatomía. Véase, por ejemplo, *Stedman’s Medical Dictionary*.

Las localizaciones específicas dentro del cerebro, o volúmenes en el cerebro, también se pueden describir mediante referencia a sistemas de coordenadas tridimensionales. Uno de tales sistemas es el descrito por *Talairach y Tournoux (Stereotaxic Coplanar Atlas of the Human Brain publicado por Thieme en 1988 ISBN 9783137117018)*, y se basa en único cerebro considerado típico por los autores. Las imágenes o mapas cerebrales de sujetos individuales se pueden comparar a tales cerebros plantilla por comparación visual, o se pueden usar programas de software

informático que mapean los cerebros individuales en un cerebro plantilla. Por ejemplo, el software Statistical Parametric Mapping (SPM), descrito posteriormente, realiza automáticamente un registro espacial y normalización de los cerebros individuales en la plantilla MNI. También está disponible software que determina la correspondencia entre coordenadas MNI y coordenadas de Talairach (por ejemplo, MRicro, disponible en [www.cla.sc.edu/psyc/faculty/rorden/micro.html](http://www.cla.sc.edu/psyc/faculty/rorden/micro.html); véase también Rorden y Brett (2000), *Behavioural Neurology*, 12:191-200).

Como se usa en el presente documento, el término “vóxel” se refiere a un punto de datos multidimensional correspondiente a un volumen específico en el espacio, y particularmente se refiere a tal punto de datos obtenido de un procedimiento de imagenología del cerebro y que corresponde a un volumen específico en el cerebro. El tamaño del vóxel depende del procedimiento y equipo experimental, notablemente la resolución del instrumento de IRMf. En esta solicitud se usó un instrumento de 1,5 Tesla, pero hoy están comercialmente disponibles instrumentos de hasta 7 tesla.

Como se usa en el presente documento, el término “mapa de activación cerebral” significa un conjunto o matriz de datos en las que cada punto de datos corresponde a un punto o volumen en un cerebro humano. Cada punto de datos puede consistir en un único dato asociado con una coordenada cerebral, o puede consistir en una matriz de datos multidimensionales asociados con una coordenada cerebral. El mapa de activación cerebral se puede mostrar como una representación bi o tridimensional, o se puede almacenar como un conjunto de datos que se muestran gráficamente.

Como se usa en el presente documento, el término “muestra de fragancia”, se supone que significa:

- cualquier material individual, por ejemplo, un “ingrediente de fragancia” (que es sinónimo con los términos “ingrediente de perfume” y “material de perfume”), que puede ser un ingrediente en un acuerdo o una fragancia completamente formulada;
- una mezcla de materiales individuales como se ha definido anteriormente, tal como por ejemplo un acuerdo o una fragancia completamente formulada. Las mezclas de materiales individuales pueden comprender hasta 40 ingredientes de fragancia, por ejemplo, al menos 10, preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 30 ingredientes de fragancia.

El experto en la materia apreciará que un ingrediente de fragancia puede él mismo comprender muchos compuestos químicos individuales y poseer un olor agradable. Esta distinción la entienden quienes son familiares con la técnica de la creación de fragancias. Un ingrediente de perfume o material de perfume puede ser cualquier aceite o extracto natural, o compuesto químico usado en una composición de fragancia. Los aceites y extractos naturales se describen en *The Essential Oils por E Guenther publicado por Van Nostrand* y puede incluir extractos y destilados de cualquier parte de plantas adecuadas: raíces, rizomas, bulbos, cormos, tallo, corteza, duramen, hojas, flores, semillas y fruto. Los ejemplos de tales extractos y destilados incluyen aceites de cítricos tal como aceite de naranja o limón, aceites de árboles tal como aceite de pino o cedro, aceites de hierbas tal como aceite de menta, aceite de tomillo, aceite de romero, aceite de clavo o extractos de flores tal como aceite de rosa, o aceite de geranio. También se conocen una amplia variedad de materiales odoríferos sintéticos para uso de perfumería, incluyendo materiales que poseen una variedad de grupos funcionales químicos, tal como acetales, alquenos, alcoholes, aldehídos, amidas, aminas, ésteres, éteres, iminas, nitrilos, cetales, cetonas, oximas, tioles, tiocetonas, etc. Sin querer estar limitado, en la mayoría de los casos, los ingredientes de perfume son compuestos odoríferos que tienen pesos moleculares entre 70 unidades de masa y 400 unidades de masa para asegurar la suficiente volatilidad. Los ingredientes de fragancia no contendrán grupos funcionales fuertemente ionizantes tal como sulfonatos, sulfatos o iones de amonio cuaternario. Los ingredientes de perfume se describen más completamente en S. Arctander, *Perfume flavors and Chemicals. Vols. I y II, Montclair, N.J., the Merck Index, 8ª Edición, Merck & Co., Inc. Rahway, N.J. y Allured's Flavor and Fragrance Materials 2008 publicado por Allured Publishing Corp ISBN 1-932633-42-1* todos los cuales se incorporan al presente documento mediante referencia.

### Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de identificar una muestra de fragancia de interés en donde el método comprende:

- a) someter a un grupo de sujetos a un primer protocolo que comprende:
  - hacer que cada sujeto de dicho grupo huela a un olor control,
  - capturar escáneres cerebrales de imagenología de resonancia magnética funcional (IRMf) de cada sujeto que huele el olor control de modo que se detecte la actividad la actividad cerebral de cada sujeto;
- b) someter al mismo grupo de sujetos a un segundo protocolo que comprende:
  - hacer que cada sujeto de dicho grupo huela una muestra de fragancia que se va a probar;
  - capturar escáneres cerebrales de IRMf de cada sujeto que huele la muestra de fragancia que se va a probar de modo que se detecte la actividad cerebral de cada sujeto,

- c) promediar la actividad cerebral de todos los sujetos obtenida en el primer protocolo y en el segundo protocolo; y
- d) contrastar la actividad cerebral promediada resultante obtenida en el segundo protocolo con la actividad cerebral promediada obtenida en el primer protocolo mediante lo cual se determina un número de vóxeles adyacentes activados;

en donde si un grupo de vóxeles adyacentes activados tiene un volumen igual a o mayor que un valor umbral, o si un grupo tiene un número de vóxeles activados adyacentes igual a o mayor que un valor umbral, en al menos tres áreas cerebrales seleccionadas de VTA, corteza prefrontal, cuerpo estriado y complejo amígdala-hipocampo, entonces la muestra de fragancia probada se considera que es de interés.

Inhalar cualquier olor provoca actividad cerebral debido al procesamiento del olor, que se detecta por IRMf como se detalla posteriormente. La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la activación simultánea de al menos tres de las siguientes áreas cerebrales específicas: el área tegmental ventral dopaminérgica, corteza prefrontal, cuerpo estriado y complejo amígdala-hipocampo en respuesta a oler una muestra de fragancia es evidencia de que la ruta dopaminérgica se ha activado.

El método de la invención comprende un primer paso donde sujetos en un grupo de sujetos huele cada uno un olor control y la actividad cerebral de cada sujeto se determina usando IRMf. El grupo de sujetos típicamente comprende al menos 5 sujetos, preferiblemente al menos 10 sujetos. El olor control es preferiblemente aire o un solvente diluido en aire. Cualquier solvente inodoro comúnmente usado en perfumería, por ejemplo, dipropilenglicol o citrato de trietilo, se puede usar en el método de la invención. En una forma de realización, el olor control también puede ser una muestra de fragancia como se ha definido anteriormente (por ejemplo, un material individual tal como, por ejemplo, rosa absoluto, o un acuerdo o una fragancia existente contra la que se prueba una nueva fragancia) que activa ninguna o solo una de las cuatro áreas cerebrales específicas mencionadas anteriormente (área tegmental ventral, corteza prefrontal, cuerpo estriado y complejo amígdala-hipocampo).

En un segundo paso, el mismo grupo de sujetos huele una fragancia de prueba y la actividad cerebral de cada sujeto se determina otra vez usando IRMf.

El olor control y la muestra de fragancia se administran a una de las narinas del sujeto a través de un olfactómetro. Para evitar que las vías nasales se sequen, el olor control y la muestra preferiblemente se humidifican antes de ser introducidas en la nariz.

En un tercer paso, la actividad cerebral de todos los sujetos que han olido el olor control se promedia, y la actividad cerebral de todos los sujetos que han olido la muestra de prueba también se promedia.

El siguiente paso comprende contrastar las actividades cerebrales promediadas resultantes. Esto se hace típicamente restando la actividad cerebral promediada del 'grupo control' de la actividad cerebral promediada del 'grupo de prueba'. Como resultado de la resta se determina el número de vóxeles activados adyacentes en el espacio tridimensional, es decir, los vóxeles adyacentes con flujo sanguíneo (o actividad) significativamente diferente, es decir, vóxeles que pasan la prueba de la t de Student ( $p < 0,005$ ) en cada área cerebral estudiada. La distribución de vóxeles se analiza y se identifican grupos de vóxeles activados. Tamaños de grupos significativos simultáneamente en al menos tres áreas cerebrales seleccionadas de área tegmental ventral, corteza prefrontal, cuerpo estriado y complejo amígdala-hipocampo indican que la ruta de la recompensa está activada. Este procedimiento se explica en más detalle posteriormente.

El resultado del paso de contrastar se compara a un valor umbral. El valor umbral preferiblemente se elige basado en una comparación del valor de un único vóxel respecto a todos los otros valores de todos los otros vóxeles en las áreas cerebrales estudiadas. El valor umbral se puede basar en el volumen de grupo o en el número de vóxeles activados adyacentes en un grupo. Los vóxeles son típicamente cubos, o cuboides, que miden, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 mm hasta aproximadamente 7 mm por lado. En una forma de realización ejemplar, se usa un vóxel de  $3,0 \times 3,0 \times 3,75 \text{ mm}^3$ ; en esta forma de realización el valor umbral se ha ajustado como que es de un mínimo de 9 vóxeles activados adyacentes en el espacio tridimensional, o un volumen de grupo (de vóxeles activados adyacentes) de al menos aproximadamente  $303 \text{ mm}^3$ .

Alternativamente, el paso de resta definido anteriormente se puede realizar contrastando, para cada sujeto, la actividad cerebral obtenida en el segundo protocolo con la actividad cerebral obtenida en el primer protocolo; y después promediando la actividad cerebral contrastada resultante de todos los sujetos.

La actividad cerebral se mide detectando señales cerebrales; restar señales 'control' de señales 'medidas' da señales que muestran estímulos de olor, que después se computan y transforman en un mapa tridimensional como se explica posteriormente. La actividad cerebral preferiblemente se mide usando el método dependiente de nivel de oxígeno en sangre (BOLD), que es una técnica reconocida para medir actividad cerebral que se correlaciona con el consumo aumentado de energía por el cerebro y el contraste entre oxihemoglobina y desoxihemoglobina.

#### Selección de sujetos

Se requiere que los sujetos puedan leer y escribir y tengan la capacidad de proporcionar consentimiento informado. Los sujetos potenciales se excluyen si tienen trastorno psiquiátrico presente o pasado diferente de simples fobias pero incluyendo toxicomanía/drogodependencia determinado por Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) (First et al., (1195); antecedentes de enfermedad neurológica; un estado médico actualmente inestable; han usado medicación psicotrópica en 5 semividas del tiempo de procedimiento; cualquier implante metálico o metralla que haría un procedimiento de IRM inseguro; dispositivos médicos no removibles tales como marcapasos o audífonos fijos; incapacidad previa para tolerar un procedimiento de IRM; o claustrofobia suficientemente grave para inducir ansiedad sustancial en espacios cerrados. Otros criterios de exclusión incluyen edad menor de 9 años, antecedentes de cualquier enfermedad que se sabe tiene un impacto en la función olfativa (por ejemplo, diabetes, enfermedad de Parkinson, insuficiencia renal, etc.). Un examen ENT (oído, nariz y garganta) completo excluyó patologías que podrían interferir con la capacidad olfativa: rinitis o sinusitis aguda o grave crónica, desviación del tabique grave, antecedentes de traumatismo, pólipos nasales, etc. Los sujetos también completaron un inventario de predominancia manual para la participación en el experimento. Se prefiere evitar variaciones debido al sexo o predominancia manual, de modo que los sujetos se seleccionan para comprender paneles o grupos de un solo sexo y que tienen la misma mano predominante.

Habiendo pasado los criterios de selección anteriores solo se seleccionaron sujetos normósmicos para la prueba. Varias pruebas están comercialmente disponibles para asegurar que los sujetos tienen un sentido del olor normal. Tales pruebas varían desde pruebas de identificación de olor a pruebas más sofisticadas de umbral y discriminación. Cualquier prueba adecuada debe estar validada y ser fiable. En el ejemplo dado a continuación se usó una prueba de "Sniffin' Sticks" para evaluar la función olfativa. Para información adicional sobre Sniffin Sticks véase *T Hummel, B Sekinger, SR Wolf, E Pauli, y G Kobal Sniffin Sticks: Olfactory Performance Assessed by the Combined Testing of Odor Identification, Odor Discrimination and Olfactory Threshold en Chem. Senses 1997 vol 22 pp39-52* o *T Hummel, K Rosenheim, C-G Konnerth y G Kobal Screening Olfactory Function with a Four Minute Odor Investigation Test Reliability Normative Data and Investigations in Patients with Olfactory Loss en Ann. Otol. Rhinol. and Laryngol 2001 vol 110 pp976-981*. Sniffin Sticks están disponibles de Burghardt GmbH Wedel Alemania. Para la presentación del olor el experimentador retira la tapa durante aproximadamente 3 s y la punta de la pluma se coloca aproximadamente a 2 cm delante de ambas narinas. La prueba de identificación de olor implica la evaluación de 12 olores comunes (canela, plátano, limón, regaliz, piña, café, clavo, rosa, cuero, pescado, naranja, menta). Usando una tarea de elección múltiple, la identificación de los odorantes individuales se realizó a partir de una lista de 4 descriptores por olor. El intervalo entre presentaciones de olor fue 20-30 s. Todas las medidas se realizaron en una habitación silenciosa con aire acondicionado. Se requerían 10 o más respuestas correctas para la participación en los experimentos posteriores.

#### Preparación de las muestras de prueba

Las muestras de prueba de los materiales de fragancia se prepararon para tener intensidad olfativa igual usando el método estático de ASTM E544 (1999) Standard Practice for Referencing the Intensity of Ambient Odours Procedure B Static Methods usando n-butanol como referencia.

#### Escáner de IRMf

Se puede usar cualquier dispositivo de IRM adecuado para lograr las imágenes de IRMf deseadas, que sea capaz de operar usando una secuencia imagenología de eco de espín, eco planar (SE-EPI). Este protocolo EPI se optimiza detectando cambios sutiles en los niveles de oxígeno en sangre en el cerebro a lo largo del tiempo. El escáner EPI es una manera eficaz de medir cambios en la señal dependiente del nivel de oxígeno en sangre (BOLD) que se ha mostrado que se correlaciona con precisión con cambios en la actividad neural. Se tomaron escáneres que cubrían el cerebro entero lo que permitir el seguimiento continuo del cerebro entero a lo largo de cada evaluación. Los escáneres de IRM adecuados están disponibles de Siemens AG, Phillips, GE Healthcare, Varian, Toshiba e Hitachi.

#### Olfactómetro

Se puede usar cualquier olfactómetro que sea adecuado para uso con un escáner de IRMf. Los diseños adecuados de olfactómetros han sido descritos por Kobal (*Electroencephalography and clinical neurophysiology 71, 241-250, 1988*) y Sobel (*J. Neuroscience methods 78, 115-123, 1997*) y olfactómetros comerciales adecuados están disponibles de Burghardt Medezintechnik GmbH de Wedel Alemania. Para minimizar el movimiento de cabeza los odorantes se aplican por vía intranasal por medio de una cánula con un diámetro interno de 2-3 mm. Esta cánula se inserta por ~1 cm en la narina de modo que su abertura está más allá de la válvula nasal. La presentación de los odorantes no activa simultáneamente mecano o termorreceptores en la mucosa nasal, ya que los pulsos de olor están embebidos en una corriente de aire (típicamente 6-8 l/min) que fluye constantemente termostatazada (36°C), humidificada (HR del 80%) que se vuelve rápidamente indetectable después de unos minutos. Por tanto, los sujetos no perciben ningún cambio cuando el olfactómetro cambia de un estado de no estímulo a un estímulo y viceversa, ni los sujetos experimentan ninguna interferencia de estimulación mecánica o térmica. Las velocidades del flujo de aire están determinadas por controladores de flujo de masa que, junto con válvulas de cambio, están controladas por ordenador. Por tanto, el equipo permite la configuración de secuencias de estímulos con diferente calidad,

intensidad, duración o intervalo interestímulo y múltiples repeticiones para alcanzar la máxima exactitud y precisión en la presentación de las muestras.

#### Análisis de los datos estadísticos

5 Los métodos para el análisis estadístico de los cambios en la actividad cerebral se conocen en la técnica y, para algunos dispositivos de medida de actividad cerebral, están comercialmente disponibles paquetes de software informático que están específicamente adaptados para analizar los datos. Por ejemplo, los datos de SPECT, TEP o IRM se pueden analizar usando los paquetes Dot o EMMA (Extensible MATLAB Medical image Analysis) que están  
10 ambos libremente disponibles del paquete de software MNI o SPM que está libremente disponible del Laboratorio de Imagenología funcional de Wellcome Department of Imaging Neuroscience en University College de Londres, UK ([www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/](http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/)). Los softwares EMMA y SPM se basan en el lenguaje de programación MATLAB® (MathWorks, Inc., Natick, Mass.), con rutinas adicionales en el lenguaje de programación C. Un módulo SPM se incorpora en el software comercialmente disponible MEDx (Medical Numerics, Inc., Sterling, Va.).

15 El software SPM usa un modelo estadístico paramétrico en cada vóxel, usando un modelo lineal general para describir la variabilidad de los datos en términos de efectos experimentales y de confusión, y variabilidad residual. Las hipótesis expresadas en términos de los parámetros del modelo se evalúan en cada vóxel con estadística univariable. La convolución temporal del modelo lineal general para IRMf permite la aplicación de resultados de  
20 regresión correlacionada en serie, lo que permite la construcción de imágenes estadísticas de la serie en tiempo de IRMf. El problema de comparaciones múltiples de evaluar simultáneamente toda la estadística de los vóxeles se aborda usando la teoría de campos aleatorios continuos, que asume que la imagen estadística en una buena representación en red de un campo aleatorio estacionario continuo subyacente. Los resultados para la característica de Euler producen valores p corregidos para cada hipótesis de vóxel. Además, la teoría permite la computación de  
25 valores p corregidos para grupos de vóxeles k que superan un umbral determinado, y para conjuntos enteros de grupos por encima del umbral, lo que produce pruebas estadísticas más poderosas a costa de algo de poder localizador (véase, *Friston et al., Magnetic Resonance in Medicine 35 346-355 1996* y referencias de la misma).

30 El enfoque estadístico usado para evaluar el conjunto general de datos de IRMf es una variante de serie de tiempo de la forma del análisis de varianza (ANOVA) de un modelo lineal general. El análisis estadístico prueba cada vóxel del cerebro, para cada sujeto, contra la hipótesis nula (que a lo largo de la duración de la prueba la subida y caída de la señal BOLD proveniente de ese vóxel no se correlaciona con los inicios y finales de los ciclos de presentación de los olores). Se crea un modelo ponderado que empieza con un simple modelo de tipo onda cuadrada de sucesos del momento encendido-apagado para una única variable de tarea de interés.

35 El modelo ANOVA permite usar regresores para variables molestas. En la presente invención, se usa la potencia de la señal global del cerebro entero como tal regresor. La potencia de la señal global del cerebro responderá de fluctuaciones en el cerebro causadas por ciclos respiratorios, ciclos de flujo cardiaco, parpadeo, etc. Estas variaciones de señales se producen a través de cerebro entero, y con frecuencia pueden ser de una magnitud mayor  
40 que los cambios localizados en la señal BOLD resultante de la señal olfativa. Estas variaciones de señal que se producen a través del cerebro se pueden restar de las señales de IRMf medidas para mostrar las señales resultantes de los estímulos de olor.

45 El producto resultante de la computación ANOVA en los datos de IRMf de una única persona es una matriz tridimensional de valores t que se pueden representar como un mapa tridimensional. Este mapa de valores t se puede convertir después en un mapa de probabilidad (un mapa de valores p correspondientes) y los resultados se pueden mostrar gráficamente a cualquier umbral que se desee (por ejemplo,  $p < 0,05$ ). Los resultados se pueden superponer sobre una imagen de IRM de mayor resolución, para facilitar la identificación de estructuras corticales de  
50 gránulos más finos.

55 Para combinar los datos de más de un sujeto, primero se normaliza el cerebro de cada sujeto en un espacio estereotáctico tridimensional común antes de computar el mapa t de cada individuo. A continuación, el valor de la suma de los pesos de contraste para cada vóxel de cada sujeto computado durante el ANOVA (básicamente, el numerador de la estadística t) se introduce como un único punto de datos en una nueva computación de estadística t de "segundo nivel". En esta computación de segundo nivel, después, el valor medio de cada vóxel a través de sujetos se modela como el término efecto y la varianza entre sujetos como el término error. Una consecuencia importante de este enfoque que hay que tener en cuenta es que es muy poco probable que un vóxel muestre  
60 activación significativa en el mapa de nivel de grupo, a menos que virtualmente todos los sujetos muestren activación en ese vóxel. También se considera solo que las áreas cerebrales se activan si un número de vóxeles adyacentes muestran una significación estadística por encima del estándar de probabilidad designado.

65 Para fines de análisis estadístico y exposición gráfica, los datos sin procesar sobre la actividad cerebral habitualmente se agrupan en vóxeles que corresponden a volúmenes fijados del cerebro del sujeto. El tamaño del vóxel puede variar dependiendo de la capacidad de resolución del dispositivo de medida de la actividad cerebral o el grado deseado de precisión en identificar regiones cerebrales. Se debe indicar, sin embargo, que vóxeles más pequeños tiene peores proporciones de señal respecto a ruido y mayores artefactos de susceptibilidad debido a

efectos de volúmenes parciales. Típicamente, los vóxeles son cubos, o cuboides que miden, por ejemplo, de 0,5 mm a 7 mm por lado (por ejemplo, 3,0x3,0x3,0 mm<sup>3</sup>). Los datos se pueden mostrar después gráficamente codificando por color los vóxeles según algún valor estadístico y mostrando las secciones transversales en las que los niveles de actividad o cambios en los niveles de actividad se mapean en dos dimensiones. Generando una serie de tales secciones transversales coplanares, se puede mapear el volumen cerebral entero.

Cuando se realizan análisis estadísticos en imágenes cerebrales, los investigadores pueden seleccionar un valor de probabilidad apropiado para evaluar la significación estadística. El valor particular elegido puede variar dependiendo del fin del análisis estadístico y el nivel de certeza requerido. En los estudios descritos en el ejemplo se eligió que el nivel para significación estadística fuera  $p < 0,005$ .

El método descrito anteriormente hace posible identificar muestras de fragancia que provocan una recompensa a través de la ruta dopaminérgica.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para preparar un acuerdo o una fragancia completamente formulada que comprende:

- a) identificar al menos una muestra de fragancia de interés por el método descrito anteriormente;
- b) formular dicha(s) muestra(s) de fragancia en un acuerdo o fragancia completamente formulada.

En una forma de realización, el acuerdo o la fragancia completamente formulada comprende vainillina.

Las muestras de fragancia así identificadas, que provocan una recompensa a través de la ruta dopaminérgica, también se pueden usar en productos de consumo tal como productos para el hogar, productos de lavandería, productos de cuidado personal y productos cosméticos (incluyendo fragancias alcohólicas y agua de colonia). Tales productos incluyen detergentes, por ejemplo, detergentes para lavadora, suavizantes y acondicionadores de ropa, champús, acondicionadores de cabello, lociones para la piel, aceites corporales, desodorantes, productos de protección solar.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1

Se seleccionaron 18 sujetos mujeres diestras para tomar parte en el experimento de IRMf. Se olieron los siguientes aromas agradables según el procedimiento detallado a continuación:

Vainillina, preparada por recristalización de una calidad comercial, se usó como solución al 15% en dipropilenglicol;

Thesaron® (el nombre comercial de trans-2,2,6-trimetilciclohexanocarboxilato de etilo) está disponible de Takasago, y se usó como una solución al 20% en dipropilenglicol;

Rosa absoluta de Marruecos (disponible de Biolandes, Francia) se usó como una solución al 0,5% en dipropilenglicol;

Acetato de isobornilo (IBA, disponible de Arco, Francia) se usó como una solución al 1% en dipropilenglicol.

Las muestras se prepararon para tener igual intensidad de olor. Los estímulos de olor se administraron a la nariz derecha de los sujetos en el escáner a través de un olfactómetro de dilución de aire controlado por ordenador (Burghart OM8b), que permitía la alternancia entre condiciones de estimulación olfativa (ON) y no olfativa (OFF) en un diseño de bloque de 20 s ON/20 s OFF. Los estímulos se administraron durante 1 s cada 2 s durante el periodo ON. Cada periodo ON iba seguido por un periodo OFF basal de 2 s concordante cuando se administró solo aire puro humidificado (como olor control). Cada uno de los estímulos se presentó en bloques alternantes en una carrera de barrido resultante de 240 s. Se construyeron cuatro protocolos con orden de bloques aleatorizado y se aplicaron en orden aleatorizado a través de los sujetos. Después de las carreras funcionales, se adquirieron escáneres anatómicos. Entre carreras se incluyeron descansos de 2 min. El tiempo de escaneo total fue aproximadamente 50 min. Al final de la sesión de escaneo, a los sujetos se les ofreció de nuevo los 4 estímulos en la misma organización en un orden aleatorizado y se les pidió valorarlos para intensidad, hedonismo y excitación.

Los datos se adquirieron usando un escáner de RM de 1,5 T (Sonata; Siemens, Erlangen, Alemania). Para las superposiciones anatómicas se adquirió un escáner axial ponderado en T1 (secuencia turboflash) con 224 secciones, tamaño de vóxel 1,6x1,1x1,5 mm<sup>3</sup>, un tiempo de repetición (TR) de 2130 ms, tiempo de eco (TE) de 3,93 ms, y dos medias (2130/3,93/2). Los estudios de IRMf se realizaron en el plano axial (orientado paralelo respecto al plano esfenoidal para minimizar artefactos de hueso) usando una secuencia multisección de imagenología eco de espín echo planar (SE-EPI). Los parámetros del escáner incluían una matriz de 64x64, tamaño de vóxel de 3x3x3,75 mm<sup>3</sup>, TR de 2500 ms, y un TE de 35 ms. Se adquirieron un total de 120 imágenes en cada una de las 24 localizaciones de sección por paradigma.



Los datos de neuroimagenología se pre- y posprocesaron usando SPM5 (Wellcome Department of Cognitive Neurology, Londres, UK implementado en Matlab R2007b; The MatWorks, Inc., Natick, MA, EE UU). Los datos funcionales se registraron, realinearon para corregir los problemas de movimiento y después se corregistraron a las imágenes estructurales correspondientes. Además, se analizaron las imágenes espacialmente normalizadas (estereotácticamente transformada en espacio MNI ICBM-152, plantilla MNI suministrada por SPM2) y alisadas (por medio de un filtro gaussiano FWHM de 7x7x7 mm<sup>3</sup>).

El análisis de los datos para las muestras se resume en la tabla 1. Se ajustó un grupo de un mínimo de 9 vóxeles activados adyacentes en el espacio 3D como el valor umbral ( $p < 0,005$ ), para el experimento basado en el análisis de SPM. "SI" significa que al menos 9 vóxeles adyacentes estaban activados. El contraste se realizó frente a sin olor (aire).

**Tabla 1**

	Vainillina	Thesaron	Rosa absoluto	IBA
Mesencéfalo (VTA)	SI	NO	NO	NO
Corteza prefrontal	SI	SI	SI	SI
Cuerpo estriado	SI	SI	NO	SI
Complejo amígdala-hipocampo	SI	NO	NO	NO

En conclusión, de los materiales probados, vainillina mostró activación en todas las áreas cerebrales que pertenecen a la ruta dopaminérgica. Los otros olores agradables no activaron la ruta dopaminérgica.

**Ejemplo 2**

Se repitió el procedimiento del ejemplo 1 contrastando vainillina con rosa absoluto como el olor control (ambos olores se prepararon como en el ejemplo 1). Se ajustó un grupo de un mínimo de 9 vóxeles activados adyacentes en el espacio 3D como el valor umbral ( $p < 0,005$ ), para el experimento basado en el análisis de SPM. "SI" significa que al menos 9 vóxeles adyacentes estaban activados. Los resultados se presentan en la tabla 2

**Tabla 2**

	Vainillina
Mesencéfalo (VTA)	SI
Corteza prefrontal	SI
Cuerpo estriado	NO
Complejo amígdala-hipocampo	SI

En este ejemplo, vainillina también mostró activación de la ruta dopaminérgica.

**Ejemplo 3**

Se realizó un experimento adicional usando un procedimiento experimental similar al ejemplo 1, siendo los cambios como sigue.

El olfactómetro usado se basaba en la guía de aire inodoro a través de recipientes de vidrio llenos con muestras de fragancia líquidas, de modo que aire saturado con olor en el espacio de cabeza del recipiente por encima de la muestra de fragancia líquida se arrastra hacia el sujeto. Los estímulos de olor humidificados bien se presentaron de una manera pulsátil a los sujetos o se consume en el medio ambiente. Durante los momentos cuando a los sujetos no se les presentan estímulos de olor, reciben aire humidificado, inodoro (como olor control). Típicamente, la duración del pulso fue 1 s, el intervalo fue 2 s. El flujo de aire típicamente usado fue 2 l/min; los olores (prueba y control) se presentaron a ambas narinas, de modo que se presentó 1 l/min a cada narina. Esta estimulación pulsátil con olor típicamente continuó durante 21 s (la denominada fase ON), después el sistema cambió a aire inodoro, que se presentó durante el siguiente periodo de 21 s (la denominada fase OFF). La duración del estímulo, intervalo interestímulo, duración de las fases ON y OFF se controlaron por ordenador, de modo que las secuencias siempre siguieron el curso que se había programada antes del inicio de la sesión. El procedimiento de escaneado fue como en el ejemplo 1.

En el protocolo anterior, 26 mujeres olieron vainillina (como una solución en dipropilenglicol – 3 g de vainillina en 10 g de solvente) y un acuerdo, designado con la referencia de Takasago DGFRUI067K, con un carácter de fruta roja que no contiene vainillina (dicho acuerdo se usó sin diluir). Como se ha descrito anteriormente, los olores se contrastaron frente al aire. Se ajustó un grupo de un mínimo de 9 vóxeles activados adyacentes en el espacio 3D

como el valor umbral ( $p < 0,005$ ), para el experimento basado en el análisis de SPM. "SI" significa que al menos 9 vóxeles adyacentes estaban activados. Los resultados se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3**

5

	Vainillina	DGFRUI067K
Mesencéfalo (VTA)	NO	NO
Corteza prefrontal	SI	SI
Cuerpo estriado	SI	SI
Complejo amígdala-hipocampo	SI	SI

En este ejemplo, vainillina mostró otra vez activación de la ruta dopaminérgica. El acuerdo probado que no contenía vainillina también mostró activación de la ruta dopaminérgica.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de identificar una muestra de fragancia de interés, para preparar un acuerdo o una fragancia completamente formulada, en donde el método comprende:
- 10 a) someter a un grupo de sujetos a un primer protocolo que comprende:  
 - hacer que cada sujeto de dicho grupo huele un olor control  
 - capturar escáneres cerebrales de imagenología de resonancia magnética funcional (IRMf) de cada sujeto que huele el olor control de modo que se detecte la actividad cerebral de cada sujeto;
- 15 b) someter al mismo grupo de sujetos a un segundo protocolo que comprende:  
 - hacer que cada sujeto de dicho grupo huele una muestra de fragancia que se va a probar;  
 - capturar escáneres cerebrales de IRMf de cada sujeto que huele la muestra de fragancia que se va a probar de modo que se detecte la actividad cerebral de cada sujeto;
- 20 c) promediar la actividad cerebral de todos los sujetos como se obtiene en el primer protocolo y en el segundo protocolo; y  
 d) contrastar la actividad cerebral media resultante obtenida en el segundo protocolo con la actividad cerebral media resultante obtenida en el primer protocolo mediante lo cual se determina un número de vóxeles activados adyacentes;
- 25 en donde si un grupo de vóxeles activados adyacentes tiene un volumen igual a o mayor que un valor umbral en al menos tres de las siguientes áreas cerebrales, o si un grupo tiene un número de vóxeles activados adyacentes igual a o mayor que un valor umbral en al menos tres de las siguientes áreas cerebrales: VTA, corteza prefrontal, cuerpo estriado y complejo amígdala-hipocampo, entonces la muestra de fragancia probada se considera que es de interés para preparar un acuerdo o una fragancia completamente formulada.
- 30 2. El método de la reivindicación 1, en donde el olor control es aire o un solvente de perfumería inodoro diluido en aire.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el grupo de sujetos comprende al menos 5, preferiblemente al menos 10 sujetos.
- 35 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el valor de volumen de grupo umbral es aproximadamente  $303 \text{ mm}^3$ .
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el número umbral de vóxeles activados adyacentes es nueve.
- 40 6. Un método de preparar un acuerdo o una fragancia completamente formulada que comprende:  
 a) identificar una muestra de fragancia de interés por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;  
 b) formular dicha(s) muestra(s) de fragancia en un acuerdo o una fragancia completamente formulada.
- 45 7. Un método según la reivindicación 6, en donde el acuerdo o la fragancia completamente formulada comprende vainillina.
- 50 8. Método de preparar un producto doméstico, un producto de lavandería, un producto de cuidado personal o un producto cosmético, en donde una muestra de fragancia identificada por el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 se usa en dicho producto doméstico, producto de lavandería, producto de cuidado personal o producto cosmético.