



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

ESTUDIO DE AEROALÉRGENOS: OLE e1 EN ELCHE.

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2015

Autor: Sara Martínez Pérez.

Modalidad: Experimental.

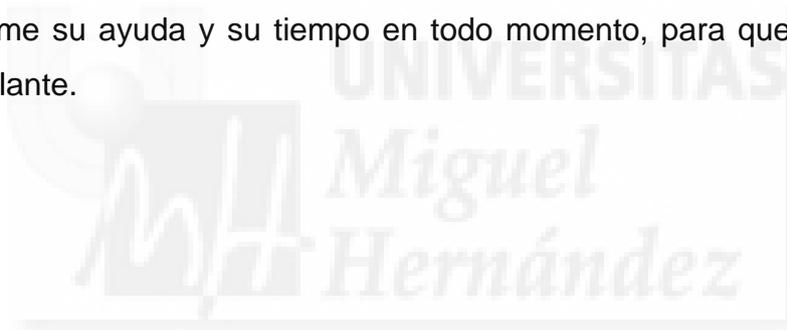
Tutor/es: Dña. Montserrat Varea Morcillo / D. Javier Crespo Mira.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría destacar el papel de D. Emilio Flores Pardo, de la Unidad de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de San Juan y profesor del departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández, en mi aprendizaje de la técnica ELISA, durante el cual compartió sus conocimientos con paciencia y amabilidad.

En segundo lugar, quiero agradecer a la Unidad de Alergia del Hospital Universitario de Elche y al Laboratorio de Contaminación Atmosférica de la Universidad Miguel Hernández, su colaboración, por haberme facilitado los datos y muestras para poder realizar este trabajo.

Finalmente, quiero mostrar mi inmensa gratitud a mis tutores, Montse y Javier, por prestarme su ayuda y su tiempo en todo momento, para que este trabajo saliese adelante.



RESUMEN

La polinosis es una patología que afecta a una gran parte de la población, causando una gran variedad de síntomas (asma, rinitis...) que disminuyen la calidad de vida de los afectados. Para la determinación de la concentración de polen en el ambiente, se realiza, de forma sistemática, un recuento de los granos de polen enteros. Sin embargo, el hecho de que en muchas ocasiones la clínica presentada por los afectados, no se corresponda con el recuento, ha propiciado que muchos estudios hayan centrado la atención en el alérgeno mayor del olivo, el Ole e1. Actualmente, relativa a la ciudad de Elche, solo existe información de los recuentos de polen, siendo este el primer trabajo en el que se va a realizar un análisis del Ole e1.

La distribución polínica del número de granos de polen, durante 2010 en Elche, indica que el *Oleaceae* es una de las especies más abundante en la zona, con un breve periodo de polinización y concentraciones elevadas que provoca una alta sintomatología sobre la población sensible a este polen. Por todo ello, se realiza 42 muestras diarias mediante análisis inmunológico para determinar la concentración del alérgeno mayor del olivo, Ole e1. Las muestras se tomaron en la ciudad ilicitana, durante el periodo de polinización del olivo, utilizando un captador gravimétrico de bajo volumen Derenda LVS3.1, sobre filtros de fibra de cuarzo y equipado con un cabezal de corte de PM₁₀. Estas muestras, tras su extracción con PBS-TW20-BSA, son analizadas por triplicado mediante ELISA directo utilizando anticuerpo de captura monoclonal, obteniéndose la concentración del Ole e1 en ng/m³, a partir de la absorbancia detectada por espectrofotometría y teniendo en cuenta el volumen de aire muestreado.

El estudio exhaustivo de los granos de polen del olivo y de los niveles de alérgeno Ole e1, pone de manifiesto que la presencia de lluvias de leve intensidad disminuye la presencia de polen en la aire, y por el contrario aumenta sustancialmente la concentración de alérgeno debido a la ruptura del polen por rehidratación. Por otro lado, las retrotrayectorias obtenidas utilizando el modelo atmosférico HYSPLIT, constatan la influencia de los aportes de masa de aire procedentes de otras regiones de España, ampliamente cultivadas de olivo, aumentando tanto el recuento de *Oleaceae* como de alérgeno Ole e1.

ÍNDICE

1.	Antecedentes.....	3
2.	Objetivos.....	10
3.	Material y métodos.....	11
4.	Resultados y discusión.....	17
	4.1 Distribución polínica en la ciudad de Elche	17
	4.2 Variación diaria de los granos de polen del olivo.....	21
	4.3 Cuantificación y estudio del alérgeno Ole e1.....	24
	4.4 Comparación de las concentraciones de Ole e1 respecto a las concentraciones de polen <i>Oleaceae</i>	28
5.	Conclusiones.....	11

1. ANTECEDENTES

En las últimas décadas, se ha observado un aumento de las personas que sufren alergia al polen (polinosis) en todo el mundo, pasando de ser una enfermedad muy rara que afectaba sólo a la clase aristocrática¹ a lo que sin duda es el trastorno inmunológico que con más frecuencia afecta en la actualidad al ser humano. Entre las enfermedades alérgicas se encuentran la conjuntivitis, la congestión nasal o rinitis, el picor de garganta y otras patologías respiratorias como el asma y la laringitis.

La rinitis alérgica ha sido considerada como un proceso patológico sin importancia, en el que los pacientes, en lugar de acudir al médico, se automedican.² Sin embargo, en los últimos años se ha observado, por un lado, que su prevalencia en los países desarrollados a ha aumentado hasta suponer el 10-25% de la población,^{3,4} y, por otro, que el impacto que esta enfermedad provoca en la calidad de vida de los afectados es considerablemente negativo. Es importante tener en cuenta los elevados costes económicos que genera la rinitis alérgica. El Libro Blanco de la Alergia en Europa,⁵ afirma que los costes producidos por ésta en Europa occidental en el año 1993, ascendieron a 3.000 millones de euros, habiendo aumentado con seguridad en estos últimos años.

Los granos de polen están formados por una gran variedad de moléculas (ceras, lípidos, moléculas aromáticas, proteínas y enzimas) que realizan diferentes funciones relacionadas con la reproducción. En el periodo de polinización, cuando el polen es liberado y alcanzan un estambre de otra flor o la mucosa de algún individuo, el grano sufre una repentina hidratación que provoca que parte de las proteínas y enzimas que lo forman sean liberadas al medio. Estas

¹Blackley CH. Experimental Researches on the Nature and Causes of Catarrhus Aestivus. London: Bailliere, Tindall & Cox; 1873.

²Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of Allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J.* 2004; 24: 758-64.

³Wuthrich B, Schindler C, Leuenberger P, Ackermann-Lieblich U. Prevalence of atopy and polinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). *Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults. Int Arch Allergy Immunol.* 1995; 106: 149-156.

⁴Nacleiro RM. Allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 1991; 325-860-869.

⁵Aas K, Aberg N, Bachert C, Bergmann K, Bergmann R, Bonini S, et al. Epidemiology: Prevalence of allergic diseases. *En: The UCB Institute of Allergy, eds. European Allergy White Paper. Bruxelles: AVISO sprl; 1997;17-154.*

sustancias, denominadas comúnmente como alérgenos, son las causantes, en gran medida, de la reacción alérgica que el polen produce en los individuos sensibilizados.⁶

A pesar de que el tamaño de los granos de polen es aparentemente muy grande como para poder alcanzar con facilidad las vías respiratorias bajas,⁷ hay una clara relación entre las concentraciones de polen y la presencia de asma en los pacientes sensibles.⁸ Esto es debido a que los alérgenos productores de la alergia, se encuentran dentro de los granos de polen y fuera de ellos (en distintas partes de la planta), en partículas inferiores a 10 micras, pudiendo estar libres en el ambiente. En el caso de los granos de polen, la liberación de los alérgenos se produce por la acción de la lluvia, por los choques que los granos sufren durante su transporte o por la simple secreción de éstos. El transporte de los alérgenos liberados lo realiza el aire, en el que generalmente, se encuentran adsorbidos a partículas derivadas de la contaminación.^{9,10}

La importancia de la polución reside en que las partículas contaminantes presentan una elevada facilidad para adsorber sustancias en su superficie, como los granos de polen, lo que provoca una potenciación de los efectos perjudiciales de ambos: la asociación propicia la fragmentación de los granos de polen y la liberación de alérgenos, lo cual se traduce en la sensibilización de un número mayor de pacientes y en la producción de reacciones alérgicas más severas.¹¹

⁶ Cabrera Sierra M. Cuantificación de los alérgenos de poaceae, oleaceae, platanaceae y cupressaceae en la atmósfera de Madrid y su correlación con los recuentos de pólenes y las variables meteorológicas y de contaminación (2009-2010) [tesis doctoral]. Madrid: Departamento de Inmunología, Universidad Complutense de Madrid; 2011.

⁷ Busse WW, Reed CE, Hoehne JH. Where is the allergic reaction in ragweed asthma? *J Allergy Clin Immunol.* 1972; 50: 289-293.

⁸ Dolovich J, Zimmerman B, Hargreave FE. Allergy in asthma. En: Clark TJH, Godfrey S eds. *Asthma*. London: Chapman & Hall; 1983. 132-157.

⁹ Nelson HS, Solomon WR. How ill the wind? Issues in aeroallergen sampling. *Allergy Clin Immunol.* 2003; 112: 3-8.

¹⁰ Cabrera M, Martínez-Cocera C, Fernández-Caldas E, Carnés Sánchez J, Boluda L, Tejeda J et al. *Trisetum paniceum* (wild oats) pollen counts and aeroallergens in the ambient air of Madrid, Spain. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 128: 123-129.

¹¹ D'Amato G. Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clin Exp Allergy.* 2000;30(5):628-36.

Esta es la razón por la cual generalmente los síntomas alérgicos están más exacerbados en zonas industrializadas que en ámbitos rurales.^{12,13}

Los pólenes varían según la vegetación y el clima. Además, la sintomatología experimentada por cada individuo depende de la concentración del polen en la atmósfera y de su exposición a estos niveles. La polinosis en España, está producida por unos determinados taxones, cuyo predominio varían en función del área geográfica en la que nos encontremos. Así, en el norte y centro de la península, la primera causa de polinosis se debe a las gramíneas, cuyo crecimiento se impulsa por el clima húmedo de estas zonas. En la costa sur mediterránea, sin embargo, las concentraciones de *Poaceae* son muy bajas, debido a que el clima seco junto con el efecto atemperado del mar, provoca que el periodo de floración de éstas, se alargue en el tiempo¹⁴.

En el sur de España, el taxón que produce de forma mayoritaria los casos de alergia, es el olivo, debido a que esta zona de la península, dedica una gran extensión de terreno al cultivo de *Oleaceae*. Por su parte, *Parietaria*, es la que predomina en la zona costera mediterránea. Concretamente en Elche, ciudad donde se enmarca nuestro estudio, la principal causa de polinosis es *Chenopodiaceae*, alcanzando en la Península Ibérica una prevalencia de sensibilizados de 30-40%¹⁵.

La población alérgica debe ser informada sobre el comienzo, duración y finalización de aquel o aquellos pólenes inductores de sus síntomas, para que, de esa manera puedan organizar su vida cotidiana (planificación de viajes, de actividades al aire libre...) y, además, para que los profesionales sanitarios puedan conocer el momento en el que es adecuado el inicio del tratamiento

¹² D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M. Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2000;10:33-9.

¹³ Gilmour MI, Jaakkola MS, London SJ, Nel AE, Rogers CA. How exposure to environmental tobacco smoke, outdoor air pollutants, and increased pollen burdens influences the incidence of asthma. *Environ Health Perspect*. 2006;114:627-33.

¹⁴ Comité de Aerobiología [sede Web]. Madrid:SEAIC [citado 1 abr de 2015]. Sociedad Española de alergología e inmunología clínica [aprox 2 pantallas]. Disponible en: www.polenes.com

¹⁵ Subiza Garrido-Lestache FJ, Pola Pola J, Feo Brito F, Moral de Gregorio AJ. Pólenes de interés en alergología en nuestro medio. En: Peláez Hernández A, Dávila Gnzález IJ, editores. *Tratado de alergología*, tomo I. Madrid: Ergon; 2007. p. 425-447.

farmacológico. El Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergia facilita a través los medios de comunicación y de internet (www.polenes.com) los recuentos diarios de pólenes de las diferentes especies vegetales presentes en la atmósfera y de más de 20 estaciones distribuidas por toda España.

El sistema más utilizado para la captación del polen, para su posterior recuento, es un equipo método volumétrico tipo Hirst,^{6,16,17,18} que consta de un cabezal o unidad de impacto formado por una ranura de captación de aire que va montado sobre una veleta que permite que siempre esté enfrentada a la dirección del viento. En el interior hay un tambor donde se coloca una cinta impregnada de vaselina en la cual se quedan retenidas secuencialmente las partículas, entre ellas los granos de polen, aspiradas con un caudal de 10 L/min (Fig. 1). Las muestras tomadas durante periodos de 7 días son observadas posteriormente al microscopio para identificar, a partir de su morfología, los granos de polen.

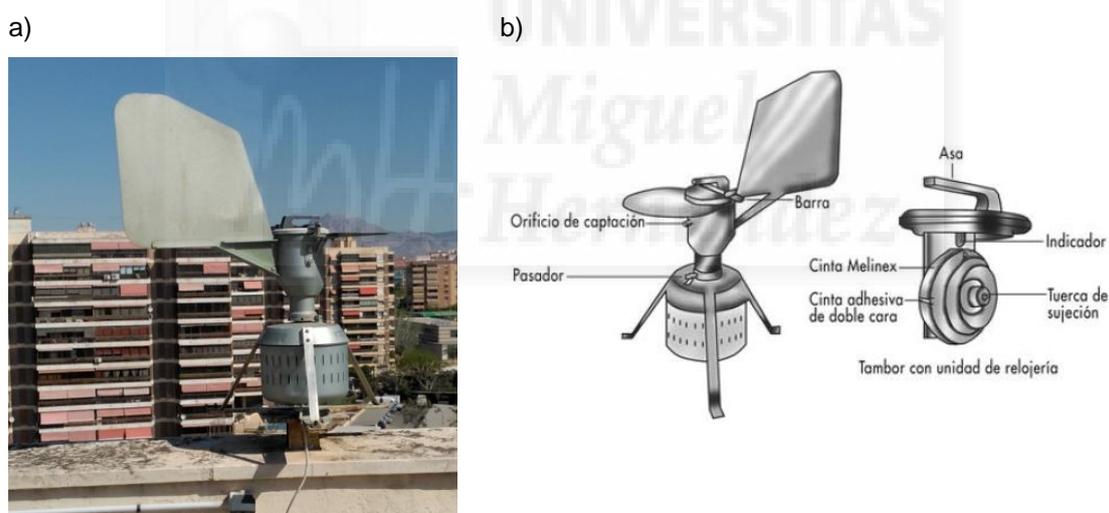


Figura 1. a) Captador volumétrico tipo Hirst; b) Esquema de las partes que componen el captador tipo Hirst.

¹⁶ Subiza J, Jerez M, Jiménez J, Narganes MJ, Cabrera M, Varela S, et al. Allergenic pollen and polinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;96(1):15-23

¹⁷ Díaz de la Guardia C, Alba F, Trigo M, Galán C, Ruiz L, Sabariego S. Aerobiological analysis of *Olea europea* L, pollen in different localities of southern Spain. *Taylor & Francis Group*. 2003;42:234-43.

¹⁸ Blanco Carmona JG, Bascones O, Carretero Añibarro P, Juste Picón S, Alloza Gómez P, Pérez Jiménez R, et al. Pólenes alérgicos y polinosis en la ciudad de Burgos. *Alergología e Inmunología Clínica*. 2005;20(3):90-4.

En los últimos años, se han realizado trabajos en los que se ha visto que la clínica que en muchas ocasiones presentan los individuos alérgicos, no se corresponde con los niveles de polen aportados por los recuentos,¹⁹ confiriendo a los alérgenos un papel más relevante.^{20,21} Lo que potencia que, en los últimos años, se haya dado especial relevancia al estudio sobre la concentración y el comportamiento de los alérgenos que conforman los diferentes taxones presentes en el aire. La no existencia de equipos técnicos expresamente diseñados para la captación de aeroalergenos, y su posible asociación con el material particulado en suspensión (PM) procedente de la contaminación atmosférica, propicia la utilización de equipos ampliamente usados en la vigilancia y control de la contaminación.²² Como por ejemplo, el captador en cascada Andersen, compuesto por un número variable de placas de aluminio (estadios de impactación) en los que hay orificios cuyo tamaño va decreciendo. Una bomba de vacío, succiona el aire a 28,3 L/min el cual forma unos chorros a presión que pasan a través de los orificios, quedando retenidas en cada una de las fracciones las partículas con un tamaño superior al del orificio y pasando al siguiente estadio aquellas que tiene un tamaño menor (Fig. 2).

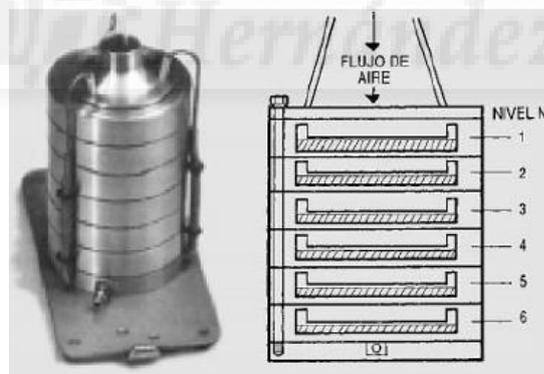


Figura 2. Impactador en cascada Andersen.

¹⁹Sánchez Mesa JA, Brandao R, Lopes L, Galan C. Correlation between pollen counts and symptoms in two different areas of the Iberian Peninsula: Cordoba (Spain) and Evora (Portugal). J Invest Allergol Clin Immunol. 2005;15(2):112-6.

²⁰ Moreno-Grau S, Elvira-Rendueles B, Moreno J, García-Sánchez A, Vergara N, Asturias JA, et al. Correlation between *Olea europea* and *Parietaria judaica* pollen counts and quantification of their major allergens Ole e1 and Par j1-Par j2. Ann Allergy Asthma Immunol. 2006;96:858-64.

²¹ Colás C, Monzón S, Venturini M, Lezaun A, Laclaustra M, Lara S, et al. Correlation between Chenopodiaceae/Amaranthaceae pollen counts and allergic symptoms in *Salsola kali* monosensitized patients. J Invest Allergol Clin Immunol. 2005;15(4):254-8.

²²Linares Fernández C. Análisis del polen alergógeno en la atmósfera de Granada: evolución de las concentraciones polínicas, actividad alérgica e incidencia en la población atópica [tesis doctoral]. Granada: Departamento de Botánica, Universidad de Granada; 2007

Este equipo, está diseñado para que las diferentes fracciones de tamaños que es capaz de captar simulen el proceso de penetración de partículas en el tracto respiratorio humano. Como es lógico, las partículas de menor tamaño tendrán menos dificultad para penetrar hasta los alvéolos y producir problemas respiratorios de mayor importancia, definiéndose como fracción torácica a todas aquellas partículas que poseen un diámetro aerodinámico inferior a $20\ \mu\text{m}$. Dentro de ésta, se diferencia la fracción respirable y la fracción respirable de alto riesgo con diámetros inferiores a 10 y $3\ \mu\text{m}$, respectivamente (Fig. 3).

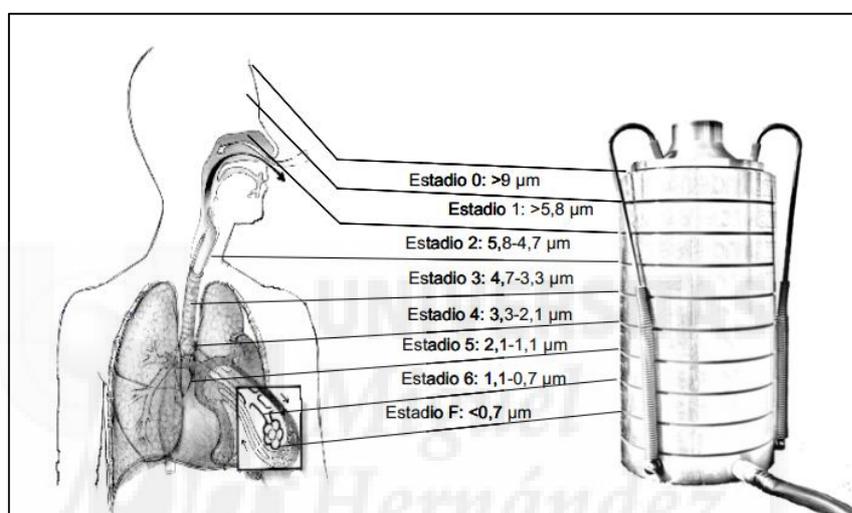


Figura 3. Captador Andersen y sus equivalencias con el aparato respiratorio humano.

Actualmente, existe en el mercado un captador ciclónico *Burkard*,^{6,23} similar al captador tipo Hirtz pero adaptado para la captar las partículas del aire, entre ellas el polen y los alérgenos, en un vial eppendorf (Fig. 4). Este equipo emplea un caudal de $16,5\ \text{L}/\text{min}$, y permite captar las partículas con un diámetro aerodinámico superior a 2 micras.

²³ Fernández-González D, Vega Maray A, González Parrado Z, Mandrioli P, Valencia Barrera RM. Relación entre las concentraciones atmosféricas del polen de *Fraxinus sp.* y el alérgeno Ole e1. *Polen*. 2012;22:55-9.



Figura 4. Captador ciclón Burkard.

En la provincia de Alicante, y concretamente en Elche, sólo existen datos de los niveles de polen en el aire que facilita la unidad de alergia de los principales hospitales. Debido a la amplia existencia de bibliografía que señala a los alérgenos como responsables más directos de la sintomatología registrada en la población sensible a la polinosis, en este trabajo se va a determinar la concentración de alérgeno Ole e1 presente en la atmósfera de Elche durante abril-junio de 2010. Para ello, se utilizarán las muestras tomadas por el Laboratorio de Contaminación Atmosférica, Grupo de Investigación del Área de Física de la Universidad Miguel Hernández de Elche las cuales fueron tomadas con el captador de material particulado de bajo volumen LVS3.1.

2. OBJETIVOS.

En la actualidad, las unidades de alergia utilizan de forma sistemática el recuento de granos de polen para obtener los niveles de polen en la atmósfera e informar a la población sensible para que sea tenido en cuenta a la hora de tomar precauciones. Sin embargo, hay evidencias de la existencia de sintomatología en los pacientes alérgicos que no se corresponde con la concentración de polen en el aire suficiente como para producirla.

El objetivo principal de este estudio es determinar la concentración de alérgeno Ole e 1 en la atmósfera de Elche en 2010 para poder analizar la existencia o no de una correlación entre el comportamiento de los granos de polen y del alérgeno.

Para poder alcanzar éste, se han marcado otros objetivos para este trabajo:

- Analizar la distribución polínica de los taxones más representativos de Elche.
- Examinar el comportamiento del polen del olivo a lo largo del periodo de estudio.
- Optimizar la técnica ELISA, analizar las muestras disponibles y cuantificar las concentraciones de Ole e, para así realizar, un estudio del comportamiento del alérgeno.
- Realizar una comparación del comportamiento del Ole e1 respecto al de los granos de polen.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se realiza en la ciudad de Elche, situada a 10 km de la costa mediterránea y a 86 m sobre el nivel del mar. Constituye el segundo núcleo de población más grande de la provincia de Alicante con más de 200.000 habitantes y presenta un clima mediterráneo seco con escasas precipitaciones.

Para poder evaluar los objetivos propuesto se analizan los datos de polen detectados en 2010, además, se cuantifican y evalúan los niveles diarios de alérgeno Ole e1, teniendo en cuenta los datos meteorológicos registrados y/o modelos atmosféricos.

- Recuento de pólenes.

La Unidad de Alergia del Hospital General Universitario de Elche, proporcionó los datos sobre las concentraciones diarias de polen registradas durante 2010. Estas concentraciones son obtenidas a partir de las muestras tomadas en la azotea del edificio del hospital, situada a 10 m del suelo y alejada de edificios colindantes altos y de árboles que puedan alterar la captación. Como metodología se utiliza un captador de método volumétrico tipo Hirts. Las muestras obtenidas a partir de éste son etiquetadas adecuadamente, teñidas con fucsina y congeladas para su posterior análisis con el microscopio óptico.

El recuento de pólenes, se realiza mediante la identificación de los granos de polen adheridos en la cinta a través de su morfología. Como por ejemplo, para la identificación del polen del olivo se tendría en cuenta que se trata de un grano de pequeño tamaño (18-22 μm), de forma esferoidal, trizonocolporado, en base a sus aberturas y con una exina reticulada con columelas muy visibles (Fig. 5).²⁴

²⁴ Subiza Garrido-Lestache FJ, Pola Pola J, Feo Brito F, Moral de Gregorio AJ. Pólenes de interés en alergología en nuestro medio. En: Peláez Hernández A, Dávila Gnzález IJ, editores. Tratado de alergología, tomo I. Madrid: Ergon; 2007. p. 425-447.

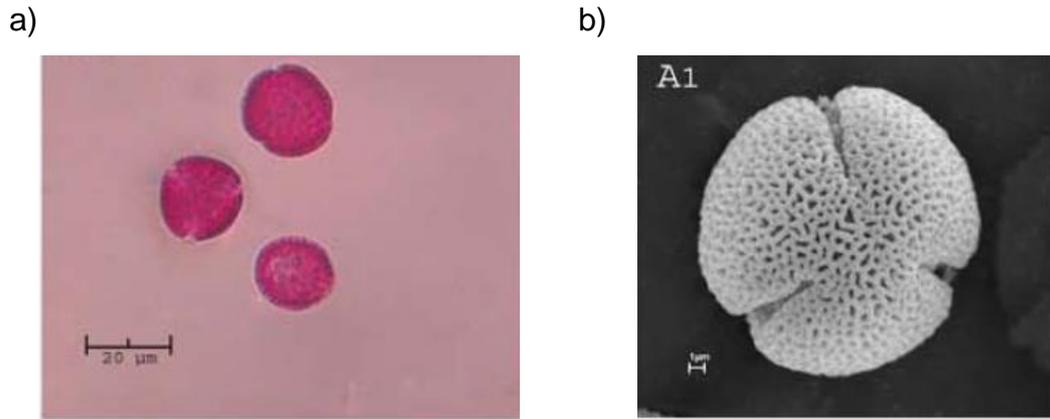


Figura 5. a) Polen del olivo teñido con fucsina; b) Polen del olivo visto a través del microscopio electrónico de barrido (MEB).

- Muestras para la cuantificación del alérgeno Ole e1.

El Laboratorio de Contaminación Atmosférica, Grupo de Investigación del Área de Física de la Universidad Miguel Hernández (LCA_UMH), proporcionó las muestras empleadas para la determinación del alérgeno Ole e1 mediante la técnica de ELISA directo. Estas muestras se capturaron, durante periodos de 24 horas, utilizando un captador de bajo volumen *Derenda LVS3.1* (Fig. 6) con filtros de fibra de cuarzo y cabezal de corte PM₁₀, capaz de seleccionar las partículas con tamaño aerodinámico inferior a 10 micras. Las muestras tras la captación son guardadas individualmente, en placas Petri convenientemente etiquetadas e identificadas, a -21°C hasta su análisis.

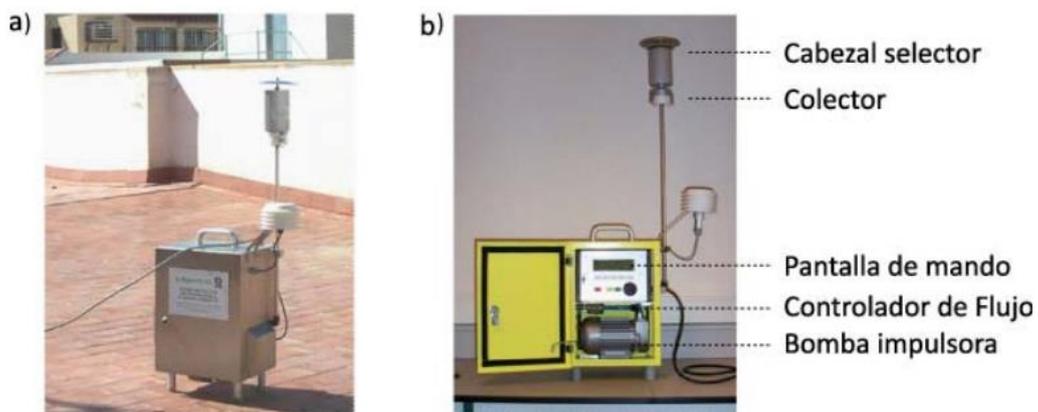


Figura 6. a) Captador LVS3.1; b) Partes del captador LVS3.1

El punto de muestreo se encuentra ubicado en la terraza de un edificio municipal, en la calle Fira nº 2, situado a 12 metros sobre el nivel del suelo. Corresponde al centro histórico de Elche donde hay calles peatonales y calles en las que la circulación está permitida de forma limitada.

- ELISA directo.

Se analizan 42 muestras, utilizando la técnica inmunológica *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) directo específica en captar antígenos solubles, como es el caso del alérgeno Ole e1 del olivo.

Previamente, a la realización del análisis es necesario realizar la extracción del Ole e1 de las muestras disponibles. Para ello, cada uno de los filtros es cortado con un troquel de sección circular de 19,6 cm² que representa el 1,485% del filtro total. En un vial Eppendorf, adecuadamente etiquetado e identificado, se introduce la porción/es de filtro a analizar, y se adiciona 420 µl de solución de PBS-TW20-BSA. Para preparar un litro de ésta, se necesitan 900 ml de agua destilada (Grifols), 100 ml de tampón fosfato salino (PBS, de Biowel), 10 g de albúmina de suero bovino (BSA, de Sigma-Aldrich) y 0,5 ml de Tween 20 (TW20, de Serva). Las muestras se dejan incubando toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente, se centrifuga cada una en un vórtex a 4000 rpm durante 10 minutos, hasta conseguir que el sobrenadante quede transparente. El sobrenadante de cada muestra se trasvasa a otro vial igualmente identificado y se guardan a temperatura de congelación para su correcta conservación.

Realizados los pasos previos, se inicia el análisis propiamente dicho de las muestras, mediante la técnica ELISA, esquema representado en la figura 7, y cuyos pasos se explican brevemente a continuación:

a) A cada pocillo se le adiciona 100 µl de la solución de anticuerpo de captura monoclonal específico para el alérgeno Ole e1 a una concentración de 2,5 µg/ml, diluido en PBS-TW20-BSA y se deja incubar en una cámara húmeda toda la

noche para facilitar la adhesión de los anticuerpos a la placa. Al día siguiente, se adiciona a cada pocillo 200 μ l de solución de PBS-TW20-BSA y se deja incubar en una estufa a 37°C durante 1 hora. El BSA de la solución es una molécula orgánica con una alta afinidad por los plásticos que bloquea las uniones inespecíficas de la placa.



Figura 7. Esquema del procedimiento del ELISA directo.

b) Transcurrido ese tiempo, a cada pocillo se adiciona 100 μ l de las muestras o de los estándares y se deja de nuevo incubar 1 hora en la estufa para propiciar la unión de los posibles alérgenos de Ole e1 en los anticuerpos de captura fijados en la placa. Cada muestra es analizada por triplicado, y como datos se emplea la media de éstas.

c) La placa se lava por triplicado con PBS-TW20. Para preparar un litro de ésta, es necesario 900 ml de agua destilada, 100ml de tampón fosfato salino (PBS) y 0,5ml de tween 20. Después, se adiciona 100 μ l de anticuerpo de revelado marcado con biotina a una concentración de 0,25 μ g/ml, diluido en PBS-TW20-BSA.

d) La placa se lava por triplicado y se adiciona 100 μ l de streptavidina peroxidasa diluida en PBS-TW20-BSA, a una concentración de 1 mg/ml. Esta enzima se une a la biotina del anticuerpo de revelado, produciendo una amplificación de la señal. Finalmente, tras una incubación de una hora y otro lavado por triplicado, se añade 200 μ l de orto-Fenilenediamina (OPD) enriquecido con urea- H_2O_2 a cada pocillo. Para prepararlo se disuelve en 20 ml de agua, el comprimido de OPD y el comprimido de urea- H_2O_2 (Sigma-Aldrich). La placa se incuba en oscuridad durante 30 minutos para que se dé la reacción colorimétrica (Fig. 8).

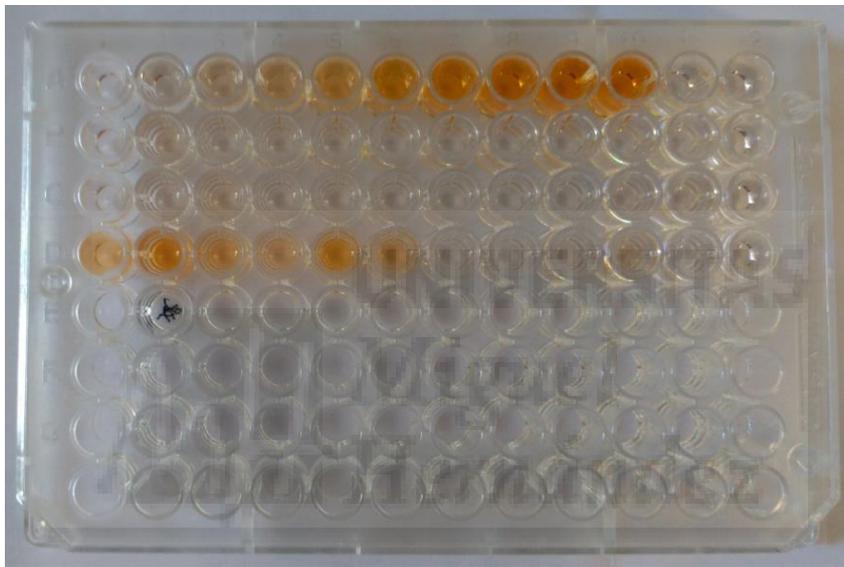


Figura 8. Placa en la que se ha realizado un ELISA directo de 49 muestras.

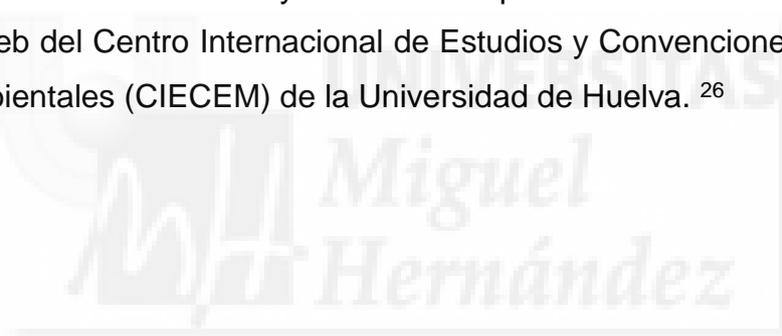
Finalmente, la reacción se para con 50 μ l de una disolución 3 M de H_2SO_4 y la absorbancia obtenida, se lee en un espectrofotómetro de microplacas Epoch2 de Biotek, a 492 nm. La absorbancia resultante se emplea para calcular la concentración de Ole e1 de cada muestra.

Bial Industrial Farmacéutica, S.A es el proveedor del alérgeno natural purificado Ole e 1, del anticuerpo monoclonal de captura de ratón y del anticuerpo policlonal biotinizado de conejo. Las placas que se utilizan para realizar los ELISAS constan de 96 pocillos y son enviados por Sigma-Aldrich.

- Otros datos.

Como se verá más adelante, para explicar las variaciones de los niveles de Ole e1 respecto a los niveles de granos, se van a emplear los datos de meteorología de la estación de Agroalimentari d'Elx, extraídos de la página web de la Red Valenciana de Vigilancia y Control de la Calidad del Aire (RVCCA)²⁵.

Además, con objeto de estudiar el movimiento de las masas de aire en la atmósfera, se empleará el modelo atmosférico HYSPLIT (Hybrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory) que permite visualizar la procedencia del aire en lugares concretos y durante un tiempo determinado. De esta manera se puede saber si las partículas detectadas en un sitio determinado, son originarias de dicho lugar o han sido transportadas por masas de aire provenientes de otras zonas. Para acceder al modelo y obtener las representaciones se ha accedido a la página web del Centro Internacional de Estudios y Convenciones Ecológicas y Medioambientales (CIECEM) de la Universidad de Huelva.²⁶



²⁵Generalitat Valenciana, Conselleria de Infraestructuras, territorio y medioambiente [sede Web]. Valencia: GVA [citado 15 abr de 2015]. Red Valenciana de Vigilancia y Control de la Contaminación Atmosférica [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.cma.gva.es/web/indice.aspx?nodo=27&idioma=C>

²⁶ Centro Internacional de estudios y convenciones ecológicas y medioambientales [sede Web]. Huelva: CIECEM [citado 8 abr de 2015]. Spain HYSPLIT [aprox 1 pantalla]. Disponible en: <http://www.ciecem.uhu.es/hysplit-bin/trajtype.pl?runtype=archive>

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente, se realiza un estudio de la distribución polínica durante el año 2010 en la ciudad de Elche, a partir del análisis de las concentraciones de polen facilitadas por la Unidad de Alergia del Hospital General, con el fin de determinar el Periodo Principal de Polinización (PPP) del olivo, observar su relevancia respecto al resto de pólenes y, además, estudiar su variación diaria a lo largo de dicho periodo. Determinado el PPP, se seleccionan las muestras facilitadas por el LCA_UMH, se optimiza la metodología a seguir, para su extracción y análisis por ELISA directo.

Finalmente, se determina la concentración diaria de Ole e1 a partir de la absorbancia obtenida por espectrofotometría, teniendo en cuenta el volumen de aire muestreado y la cantidad de muestra analizada por ELISA. y se observa la variación diaria de la concentración de Ole e1 durante el periodo indicado.

4.1 DISTRIBUCIÓN POLÍNICA EN LA CIUDAD DE ELCHE.

De los 47 taxones considerados por la Asociación Española de Alergia, sólo 26 tienen presencia significativa en la ciudad de Elche, durante 2010 (Tabla 1). Los taxones más abundantes, llegando a representar el 91% del total, son *Cupress*, *Chenopodiaceae*, *Olea*, *Palmaceae*, *Pinus*, *Poaceae* y *Urticaceae*. De entre los cuales, sólo tres de ellos representan más del 50%:

- a) El polen mayoritario, es el de *Palmaceae* que representa el 18,60% respecto al total anual, ya que como es sabido en Elche existen más de 200.000 ejemplares, lo que la ha llevado a ser considerada Patrimonio de la Humanidad por ser el conjunto de palmeras mayor de toda Europa y por constituir un espacio natural integrado en la ciudad. A pesar de ello, en estudios realizados se observa que no tiene mucha relevancia clínica pues

tan solo el 8,47% de los pacientes son sensibles a su polen, de los cuales solo el 9% es monosensible.²⁷

Tabla 1. Número de granos mensuales de polen de los taxones detectados en la ciudad de Elche en 2010

Taxón	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Total
Acer	0	0	0	3	44	25	0	0	0	0	0	0	72
Alnus	6	5	4	2	2	1	1	0	0	2	0	0	23
Artemisia	22	47	0	0	0	0	0	5	15	10	30	45	174
Betula	0	0	0	20	2	0	0	0	0	0	0	0	22
Carex	0	0	4	1	1	6	1	0	0	0	0	0	13
Castanea	0	0	0	0	0	0	69	13	2	4	0	0	88
Corylus	0	0	0	0	1	0	2	0	0	7	3	1	14
Cupress	19	347	771	112	102	82	11	2	12	195	137	85	1875
Chenopodiaceae	31	41	84	465	643	204	227	129	563	68	38	25	2518
Ericaceae	0	0	1	1	2	4	0	0	0	0	1	1	10
Eucalyptus	0	0	0	0	1	2	6	0	0	0	1	0	10
Fraxinus	2	18	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	28
Morus	1	0	10	4	3	0	0	0	0	0	0	0	18
Olea	0	9	34	76	1766	556	39	9	4	3	0	0	2496
Palmaceae	0	23	298	1101	1465	69	10	0	0	0	0	0	2966
Pinus	17	1	629	339	259	436	49	12	4	4	7	3	1760
Plantago	0	0	8	2	37	11	4	1	1	0	0	0	64
Platanus	0	0	30	36	2	0	0	0	0	0	0	0	68
Poaceae	32	0	32	218	730	383	106	38	40	87	41	16	1723
Populus	0	36	106	40	0	0	0	0	0	0	0	0	182
Quercus	2	0	0	23	355	151	2	1	4	1	0	0	539
Rosaceae	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	13
Rumex	0	0	0	5	41	18	1	0	0	0	0	0	65
Taraxacum	1	1	1	4	9	4	3	0	0	0	0	0	23
Ulmus	0	6	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
Urticaceae	34	101	219	198	223	142	111	29	37	46	42	24	1206
TOTALES													15944

- b) Con el 15,79% de presencia se encuentran las *Chenopodiaceae*, de las que se detectan a lo largo del año 2010, con un total de 2518 granos de polen. Este taxón tiene una considerable capacidad alergénica en la zona mediterránea, sin embargo su extenso periodo de polinización provoca la

²⁷ Fernández J. Polinosis por palmáceas. Rev Esp Alergol Inmunol Clín 2003; 18: 78-81

dilución de las concentraciones alcanzadas provocando síntomas más leves.²⁸

- c) El *Oleaceae*, con 2496 granos/año, se sitúa en el tercer puesto con una representación del 15,65%. Provocando, en la población sensible, una sintomatología muy acusada ya que en un breve periodo de tiempo se alcanzan elevadas concentraciones, siendo la principal causa de síntomas alérgicos, en la zona mediterránea.²⁹

Considerando el periodo de máxima producción de polen de cada especie, denominado Periodo de Polinización Principal (PPP), se puede observar de manera más sencilla su comportamiento. Para su cálculo, se tiene en cuenta desde el día en el cual la suma de concentraciones diarias de polen (porcentaje acumulado) alcanza el 2,5% de la suma total hasta cuando la suma alcanza 97,5%, es decir, el PPP corresponde al 95% de la cantidad total de polen observado.

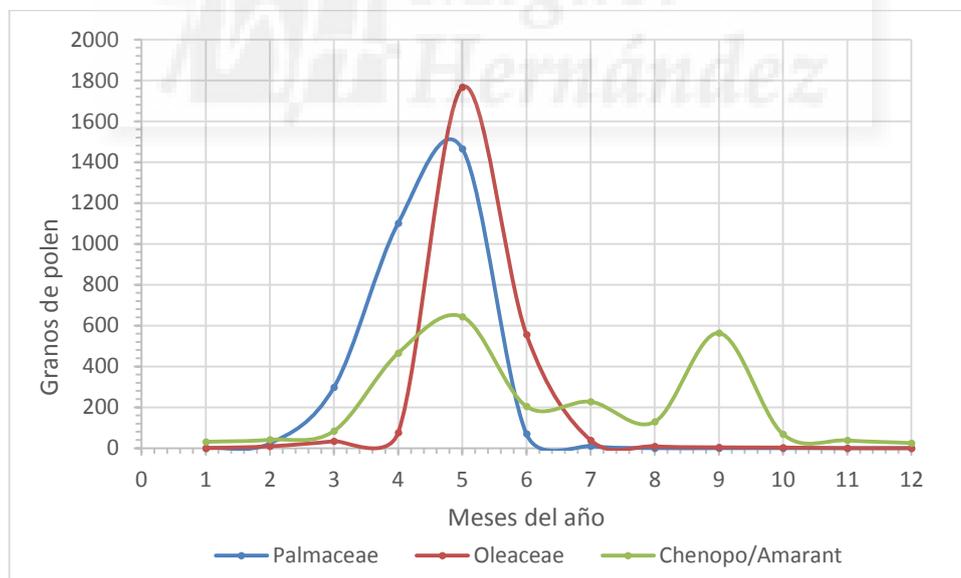


Figura 9. Representación del perfil asociado al recuento de los pólenes mayoritarios en Elche, durante su Periodo de Polinización Principal.

²⁸ Fernández J, García Mas F, Esteban A, Miralles A. Incidencia de granos de polen y polinosis en la ciudad de Elche, 1995. Rev Esp Alergol Inmunol Clin. 1998;13(2):88-91.

²⁹ Liccardi G, D'Amato M, D'Amato G. Oleaceae pollinosis. A review. Int Arch Allergy Immunol. 1996;111: 210-217.

En la figura 9, se observa que la mayor concentración de polen se alcanza de febrero a junio, alcanzándose máximos en mayo, y en el caso de las *Chenopodiaceae* que también presentan un periodo de máximos en septiembre. Este último, es el que presenta un PPP más largo con una duración de 250 días, cuyo pico se registra el día 9 de mayo con una concentración de 58 granos/m³. Por el contrario, *Oleaceae* y *Palmaceae* presentan un periodo mucho más corto, con duraciones de 77 y 78 días respectivamente. El PPP de la palmera abarca el periodo de primavera-verano con un pico máximo el 14 de mayo alcanzando 121 granos/m³. Por otro lado, el olivo, comienza su periodo principal de polinización el 12 de abril y finaliza el 27 de junio, alcanzando su pico máximo con 280 granos/m³ el 26 de mayo, niveles considerablemente superiores a los dos anteriores.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios anteriores en Elche, en los que se muestra, que los pólenes mayoritarios y representativos de la ciudad son *Palmaceae*, *Chenopodiaceae* y *Oleaceae*.³³ El hecho de que el PPP del olivo sea más breve muestra una floración muy explosiva³⁰, lo que explicaría el mayor número de pacientes sensibles a este tipo de polen.

4.2 VARIACIÓN DIARIA DE LOS GRANOS DE POLEN DEL OLIVO

Para realizar un estudio exhaustivo del comportamiento del polen del olivo, a lo largo del PPP comprendido entre 12 de abril y 27 de junio, se representa la concentración diaria en número los granos de *Oleaceae* por volumen de aire muestreado (m³).

En la figura 10, se observa un comportamiento heterogéneo durante todo el periodo. Destacando principalmente el pico máximo alcanzado el 26 de mayo (280 granos/m³) y picos concentrados durante la primera quincena de mayo, en

³⁰ Red Aerocam [Sede Web]. Toledo: Red de Aerobiología de Castilla-La Mancha [citado 17 abr 2006]. Aerobiología: seguimiento del olivo [aprox 2 pantallas]. Disponible en: http://aerocam.uclm.es/seguimiento_olivo

los cuales se alcanzan niveles de polen comprendidos entre 50 y 161 granos/m³. En el resto del periodo las concentraciones alcanzadas son inferiores a 50 granos/m³, con la excepción de picos puntuales que se explican más adelante junto con las concentraciones de aeroalergeno Ole e1.

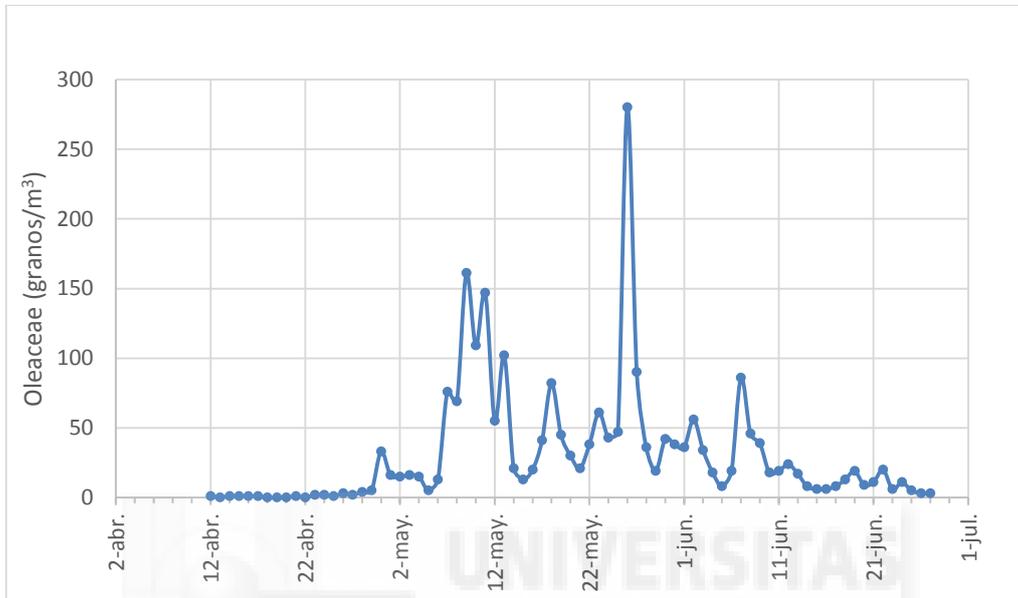


Figura 10. Representación de la concentración del polen de Olea durante el PPP en 2010.

Por otro lado, a partir de las retrotrayectorias utilizando el modelo atmosférico HYSPLIT se analiza la procedencia de las masas de aire que pueden contribuir a las concentraciones de polen alcanzadas diariamente. A modo de ejemplo, en la figura 11, se ha representado las retrotrayectorias de los días 11 y 26 de mayo. En ellas, se puede observar que las concentraciones diarias máximas detectadas dichos días están claramente influenciadas por las masas de aire procedentes de Sevilla, Ciudad Real e incluso Jaén, zonas con amplias extensiones cultivadas con olivo, al igual que ocurre con Castilla La Mancha principalmente Toledo.²⁹

Para cuantificar los aportes de polen procedentes de estas regiones de España, se observan los perfiles polínicos de *Oleaceae* en dichas ciudades (Fig. 12). En ciudades como Sevilla y Elche, con temperaturas más elevadas se observan perfiles similares pero desplazados en el tiempo. Alcanzándose, como era de

esperar, niveles mucho más elevados en Sevilla (1630 granos/m³). Sin embargo, en ciudades más frías, como son el caso de Ciudad Real y Toledo, el perfil polínico registrado es distinto, más corto y tardío. Aunque, al igual que en Sevilla, los niveles detectados en estas ciudades también son elevados (534 y 1568 granos/m³, respectivamente).

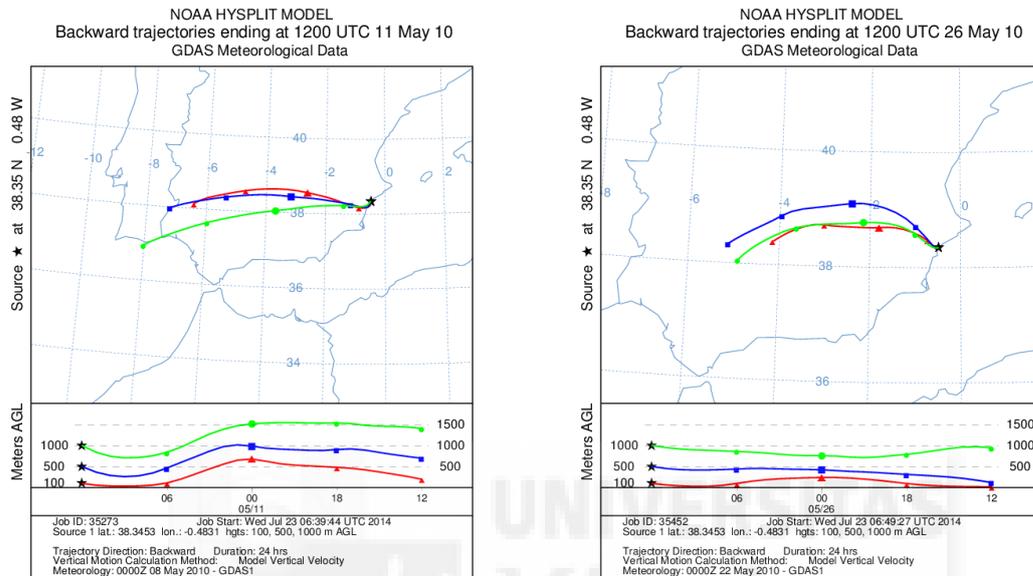


Figura 11. Retrotrayectorias correspondientes a los días 11 y 26 de mayo de 2010.

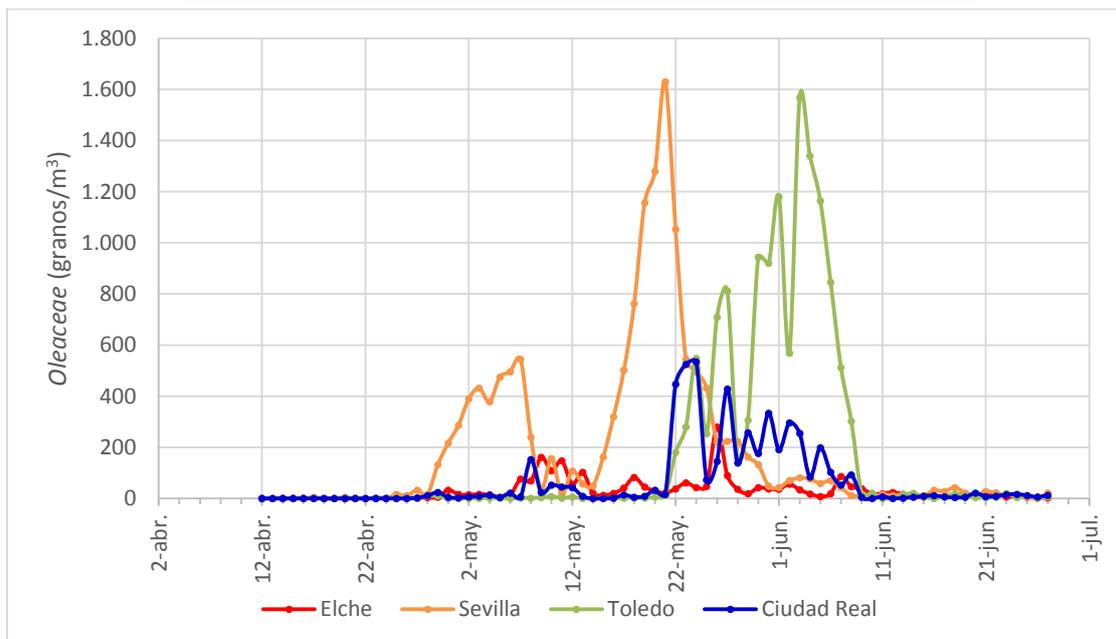


Figura 12. Representación de la concentración de polen de las principales ciudades de España dedicadas al cultivo de Oleaceae.

Además, se observa claramente que el pico máximo detectado en Elche, 26 de mayo, se detecta en días posteriores a los máximos registrados en Sevilla y Ciudad Real (21 y 24 de mayo, respectivamente). Mientras que las concentraciones registradas durante la primera quincena de mayo en Elche, aunque influenciadas por las masas de aire procedentes de Sevilla y Ciudad Real, no sean tan elevadas se debe a que los niveles alcanzados en ellas también son de menor importancia, ya que se alcanzaron niveles de 496 y 153 granos, respectivamente.

4.3 CUANTIFICACIÓN Y ESTUDIO DEL ALÉRGENO OLE e1.

En primer lugar, se va a explicar de forma detallada las mejoras que se llevan a cabo en el protocolo del ELISA respecto al explicado anteriormente, para conseguir una técnica más robusta y reproducible. Pasando a detallar el cálculo de las concentraciones de alérgenos de Ole e1 obtenidas en cada una de las muestras. Para concluir, se analizan los niveles de Ole e1 obtenidos para el periodo de estudio.

Previo al análisis de las muestras correspondientes al PPP del olivo, se optimiza la cantidad de muestra óptima para realizar el análisis inmunológico con resultados satisfactorios. Para ello, se extraen con 420 μ l distintas cantidades de filtro que van desde un 2,97 a un 11,90%, analizándose posteriormente sólo 100 μ l y por triplicado. Los resultados indican que con la extracción del 5,95% de muestra, el protocolo seguido era reproducible y la señal de absorbancias obtenida satisfactoria. Los extractos de sólo el 2,97% dieron como resultado concentraciones por debajo del límite de detección de la técnica, mientras que extractos del 11,90% del filtro dieron señales saturadas impidiendo conocer la concentración. Finalmente, se decide reducir el volumen de extracción a 320 μ l con el fin de obtener extractos más concentrados y, por tanto, absorbancias de mayor rango.

Del resto del protocolo descrito anteriormente para el análisis de los filtros no varía nada, excepto:

a) Las concentraciones de anticuerpo de captura y de anticuerpo de revelado se aumentan debido a que en las muestras que presentan una elevada cantidad de Ole e1, parte de éste no es captado por no haber suficiente anticuerpo de captura para fijarlo. En consecuencia, la concentración de anticuerpo de revelado se equipara a ésta pues la relación existente entre ambos es 1:1 se necesitan tantos anticuerpos de revelado como anticuerpos de captura hay en la placa fijados. De esta forma, la concentración final empleada en cada uno de ellos es de 5 µg/ml.

b) La placa soporte empleada, finalmente, para el análisis inmunológico son *High-binding*, que retienen el anticuerpo de captura con más afinidad evitando que al decantar, se pierda una cantidad importante de inmunoglobulina. De esta manera, la técnica se hace más estable, y sensible disminuyendo el límite de detección al 0,156 ng/ml.

Para la cuantificación del alérgeno Ole e1 en las muestras, se construye una recta patrón con 9 estándares con concentraciones comprendidas entre 0 y 20 ng/ml, preparadas siguiendo la técnica de las diluciones seriadas por tratarse de concentraciones muy pequeñas, utilizando alérgeno natural purificado Ole e1 del polen del árbol del olivo. A modo de ejemplo, en la figura 13 se representa una de las curvas patrón, representándose la absorbancia de cada estándar frente al logaritmo de la concentración y calculándose la regresión lineal correspondiente. Al emplear una representación semilogarítmica, se obtiene una recta lo cual hace que la técnica sea reproducible y que los rangos de concentración sean amplios.

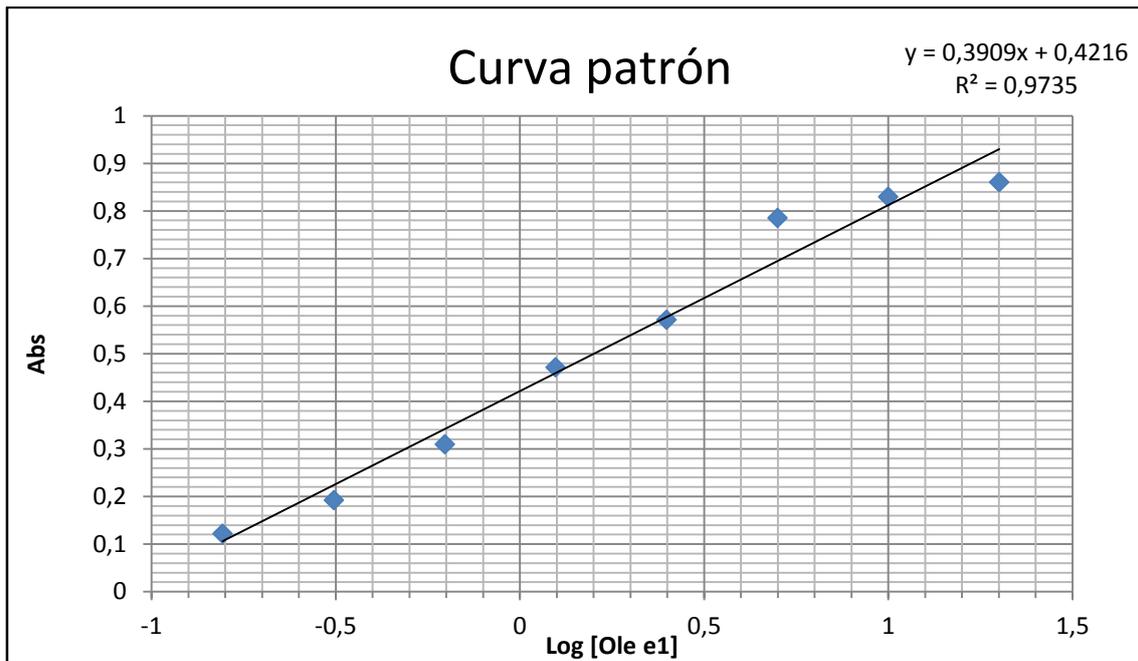


Figura 13. Curva patrón obtenida a partir de las absorbancias de los estándares de ELISA directo.

Para determinar la concentración de alérgeno en los 100 μ l de muestra dispensada en cada pocillo de la placa, se emplea la recta de regresión obtenida a partir de la curva de calibrado, en ella se sustituye la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro y se calcula el logaritmo de la concentración de cada muestra.

$$\log [\text{Ole e1}] = \frac{\text{Abs} - 0,421}{0,390}$$

Para obtener datos en concentración de alérgeno (ng/ml), se realiza la inversa del logaritmo de la concentración. Este dato representa la cantidad de alérgeno existente en 100 μ l del extracto procedente del extracto del 5,95% de la muestra. Además, se debe considerar el volumen de aire captado para cada muestra para calcular la concentración de Ole e1, en ng/m^3 , en el total de la muestra aplicando la siguiente ecuación:

$$[\text{Ole e1}]_{\text{muestra}} = \frac{x \cdot 10^{-3} \cdot 320}{0,0595 \cdot V}$$

Los resultados obtenidos, tras los cálculos, se representan en la figura 14, no pudiéndose observar completamente el perfil descrito por las concentraciones de alérgeno Ole e1, debido a que no se disponía del total de las muestras que comprenden el periodo de polinización principal del olivo de 2010.

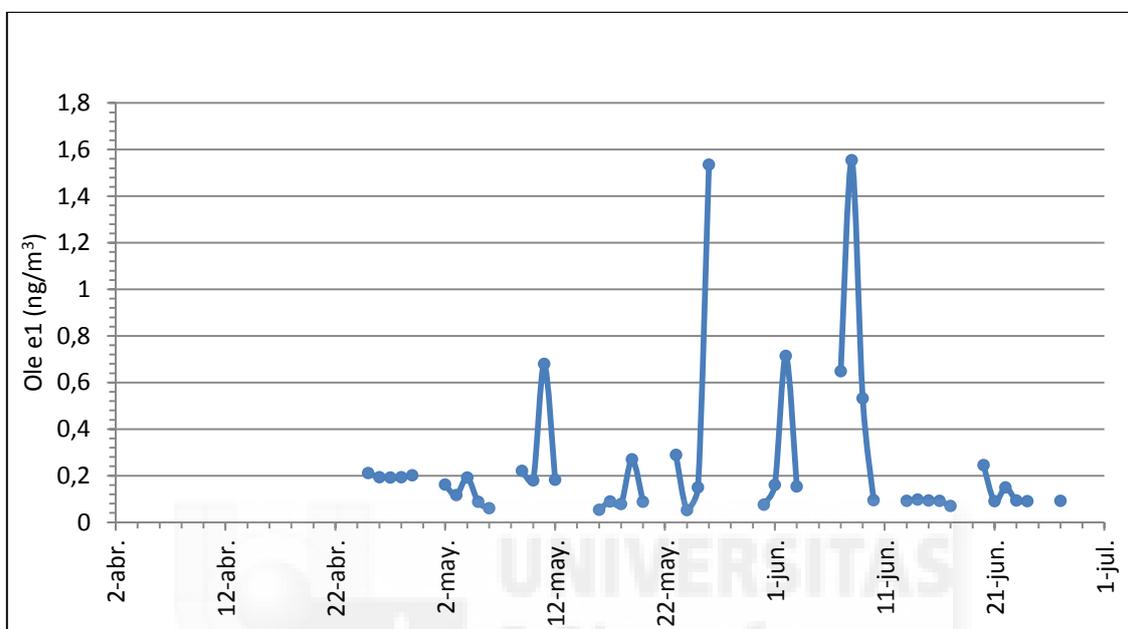


Figura 14. Representación de la concentración de Ole e1 durante el PPP del olivo en Elche.

El comportamiento que muestra el Ole e1 durante el PPP del olivo es heterogéneo y no sigue un patrón claro, detectándose la mayor presencia de alérgeno a partir de la segunda quincena de mayo. El pico mayor se da el 8 de junio con 1,55 ng/m³ de Ole e1, seguido de cerca por el pico detectado el 26 de mayo de concentración 1,54 ng/m³. Además, destacar los picos registrados el 11 de mayo y 3 de junio, que presentan concentraciones de alérgeno superiores a 0,65 ng/m³.

4.4 COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE OLE e1 RESPECTO A LAS CONCENTRACIONES DEL POLEN DE OLEACEAE.

Con objeto de profundizar más en el estudio del alérgeno Ole e1, se va a proceder a realizar una comparativa entre éste y el polen del olivo, para seguidamente, dar una explicación a las diferencias y similitudes encontradas en los comportamientos de ambos.

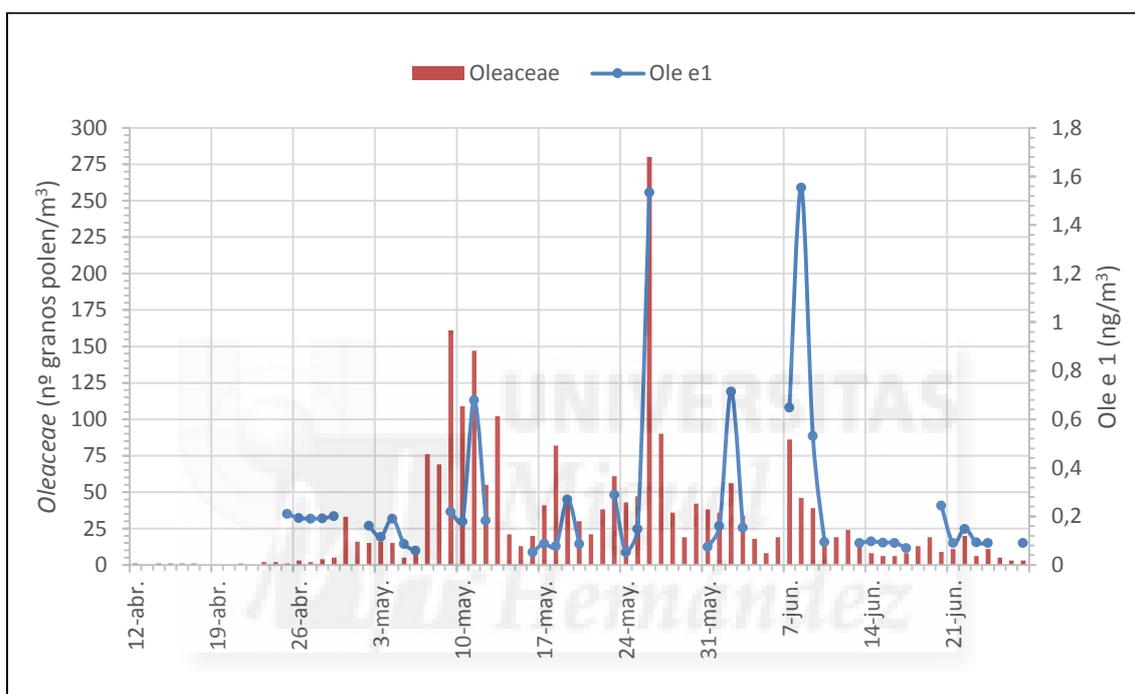


Figura 15. Representación de las concentraciones de Oleaceae y de Ole e1 durante el PPP en 2010.

Al inicio del periodo, se observa que el polen del *Oleaceae* y el alérgeno Ole e1, se comportan de forma paralela (Fig. 15). Destacan claramente los días 11 y 26 de mayo, en los que se registran máximos de polen (280 y 147 granos/m³, respectivamente) acompañados de máximos de Ole e1, que presentan un comportamiento muy similar. Ambos, son días característicos de máximos en los que ha habido aporte externo. En la figura 16a y 16b, las retrotrayectorias manifiestan claramente que las masas de aire que llegan a Elche, esos días, provienen del sur de España, caracterizado por su amplia dedicación al cultivo del olivo. El viento se encarga de transportar el polen a largas distancias, hecho que propicia que los granos se fragmenten al chocar con los distintos objetos

que se encuentra a su paso, dando lugar a la liberación de alérgenos, entre ellos el Ole e1.

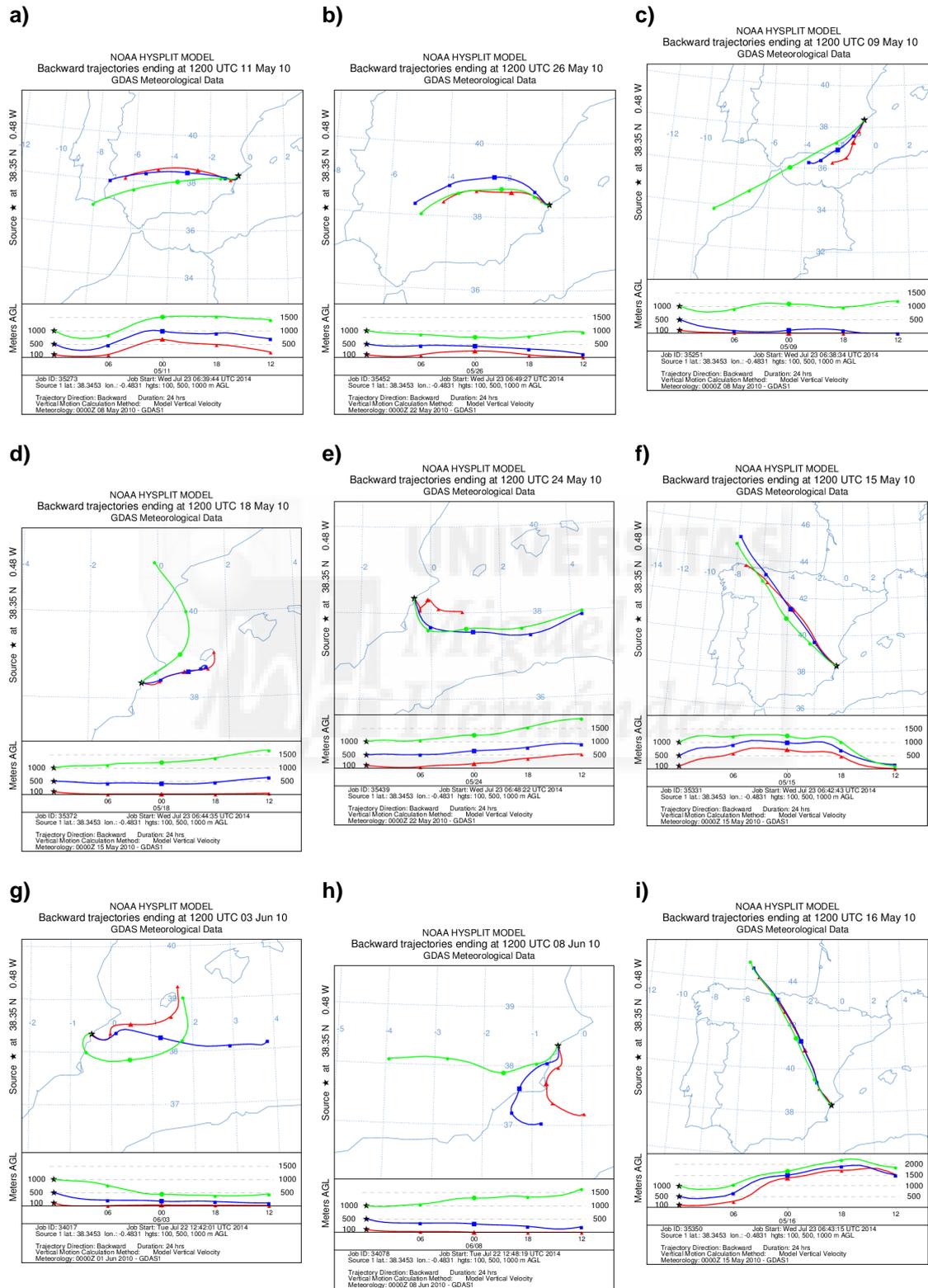


Figura 16. Retro trayectorias de diferentes días del PPP del olivo.

Por el contrario, los días 9, 18 y 24 de mayo se caracterizan por presentar picos de polen, que a diferencia de lo anteriormente descrito, se acompañan de mínimos de alérgeno Ole e1 registrándose 0,22 ng/m³, 0,08 ng/m³ y 0,05 ng/m³, respectivamente. Esto puede deberse a la no existencia, en estos días, de un aporte externo relevante respecto al olivo, ya que las retrotrayectorias indican que las masas de aire provienen del mar (Fig. 16c- e). Cabe destacar la disminución tanto de los niveles de alérgeno como de polen de *Oleaceae*, que se registran el 15 de mayo, ya que se corresponde con una masa de aire proveniente del norte de España. La gran distancia recorrida en tan corto espacio de tiempo se puede corroborar con la elevada velocidad media del viento registrada para ese día, de 2 m/s (Fig. 16f). El efecto que produce el fuerte viento es de lavado, arrastrando las partículas que se encuentran en la atmósfera, sin aportar nada externo, ya que tampoco cruza regiones de España con importante cultivo de olivo.

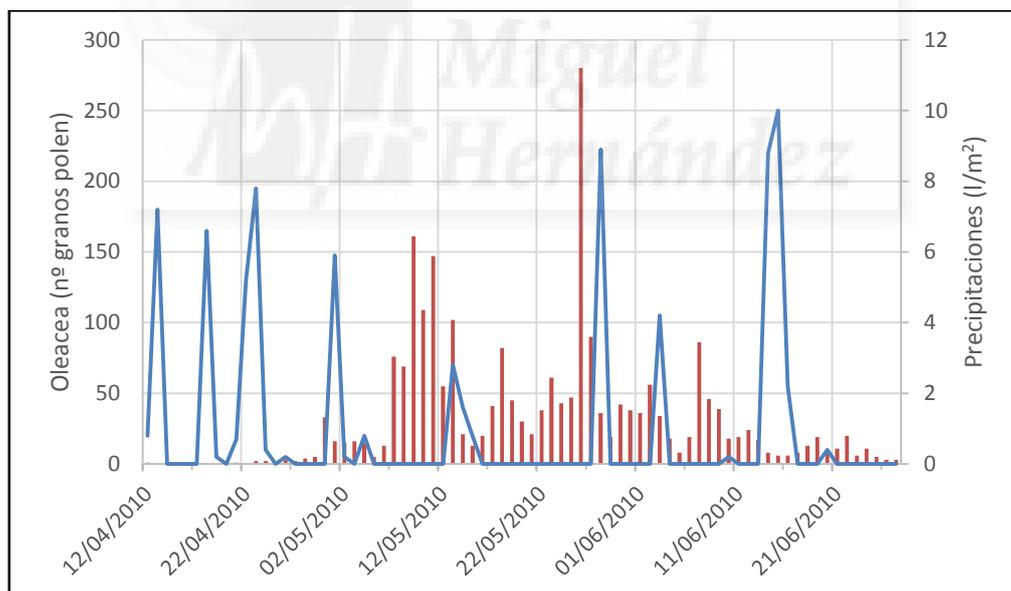


Figura 17. Efecto de las precipitaciones en los niveles de polen de *Oleaceae*.

En la segunda mitad del PPP del olivo, el comportamiento paralelo del Ole e 1 y de *Oleaceae* mostrado en el inicio, desaparece. Esto se evidencia, por ejemplo, en los días 3 y 8 de junio en el que las concentraciones de alérgeno, 0,714 y 1,554 ng/m³ respectivamente, no se corresponden con concentraciones de polen

del olivo que puedan explicarlo. La peculiaridad es que ambos días, están precedidos por periodos de lluvia, registrados el 28 de mayo y el 2 de junio con acumulaciones de 4,2 y 8,9 l/m², respectivamente. El efecto de las precipitaciones difiere en los granos y en el Ole e1 (Fig. 17).

En el caso del *Oleaceae*, la lluvia tiene efecto de lavado atmosférico en la fase de liberación de polen, ya que ejerce una acción mecánica sobre el grano, depositándolo en el suelo y disminuyendo su presencia en el ambiente. Además, los niveles tan elevados del 8 de junio se deben a que también se encuentra influenciado por el aporte externo procedente aparentemente de Jaén (Fig. 16 g y h). Sin embargo, para las concentraciones de alérgeno Ole e 1, se aprecia el aumento de sus niveles, provocado por la rehidratación de los granos de polen propiciando la salida de alérgenos al exterior y provocando así un aumento de éstos en la atmósfera.

Además, se registran otro periodos de lluvia posterior, comprendido entre el 14 y 16 de junio (10-2,2 l/m²) que preceden al pico de Ole e1 registrado el 20 de junio, repitiéndose el mismo comportamiento.

5. CONCLUSIONES

Del presente trabajo, se pueden extraer varias conclusiones:

- ✓ En la ciudad de Elche, a pesar de que el polen de *Oleaceae* ocupa el tercer puesto entre los mayoritarios, posee una considerable importancia ya que al presentar un PPP más corto, se obtienen concentraciones de polen más elevadas que se asocian con un interés clínico.
- ✓ El comportamiento diario del polen de *Oleaceae* en Elche, es similar al registrado en otras ciudades con características climatológicas parecidas, como Sevilla.
- ✓ El análisis de solo el 6% de las muestras, tras su extracción por ELISA directo, ha obtenido resultados satisfactorios lo que permite la posibilidad de realizar análisis posteriores de otros componentes biológicos o químicos para complementar y ampliar estudios en Elche.
- ✓ Al inicio del Periodo Principal de Polinización de olivo, el comportamiento descrito por el Ole e1 y los granos de polen es similar, patrón que no se sigue en el periodo tardío.
- ✓ El aporte externo conlleva un aumento de los niveles de polen, debido al transporte de éste desde otras ciudades; y un aumento de Ole e1 explicado por las fracturas que sufre el polen al ser transportado desde largas distancias.
- ✓ La presencia de lluvias provoca la precipitación de los granos de polen, disminuyendo la concentración registrada. Sin embargo, aumenta las concentraciones de Ole e1 debido a la rehidratación de los granos de polen que provoca la liberación de alérgenos.