

Informe de resultados de la Adenda OTRI-UGR 5853a

# **ESTUDIO DE LA EFICACIA DE UN PURIFICADOR DE AIRE SOBRE LA CAPACIDAD ALERGÉNICA DE OLE E 1**

Empresa solicitante: Corporación Empresarial Altra S.L.

Calle Marie Curie nº 21 29590 Campanillas (Málaga)

Informe realizado por:

**Dra. Concepción De Linares Fernández**

Profesora Titular de Universidad

Universidad de Granada

Granada, 13 de diciembre de 2023

## I. INTRODUCCIÓN

En este informe se presentan los resultados obtenidos en los experimentos realizados de acuerdo a la memoria de la adenda relativa al contrato entre la empresa Corporación Empresarial Altra S.L. y la Universidad de Granada para la realización de un trabajo de carácter científico técnico.

## II. OBJETIVOS

El objetivo general del presente contrato es el de comprobar la eficacia higienizante de un aparato ionizador que posee la Corporación Empresarial Altra S.L. frente al alérgeno Ole e 1.

Para ello se plantea el siguiente objetivo específico:

- Estudiar la capacidad alergénica del alérgeno Ole e 1 después de tratarse con el ionizador a diferentes tiempos de exposición y a diferentes concentraciones de alérgeno (en concreto, a concentraciones de 200, 50 y 15ng/mL).

## III. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS Y LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Con los ensayos realizados se estudió la variación de la capacidad alergénica del alérgeno Ole e 1 a diferentes concentraciones (200 ng/mL, 50 ng/mL y 15 ng/mL) a dos tiempos de exposición: 1 hora y 24 horas ininterrumpidas. Para ello se utilizaron dos urnas de metacrilato (medidas interiores 50x60x15cm) herméticamente selladas, propiedad de la Corporación Empresarial Altra S.L., dentro de las cuales se colocaron dos dispositivos con ventilación mecánica con el fin de crear corrientes de aire durante el ensayo. Una de las cámaras actuó como cámara *Control* (solo hubo ventilación mecánica) y otra cámara como cámara *Ionizante* (en la cual, junto al ventilador, se encontraba funcionando el aparato de ionización). En ambas cámaras se realizaron idénticos experimentos con el fin de comparar la evolución del alérgeno en diferentes condiciones.

El alérgeno purificado Ole e 1 se adquirió en la empresa farmacéutica Roxall Group (Bilbao, España). Cada réplica de alérgeno se realizó depositando en un disco de 0.5cm de diámetro de filtro de fibra de vidrio, 20µL de solución alergénica (Ole e 1) a diferentes concentraciones (200, 50, 15 ng/mL). El análisis de alergenicidad de las muestras se realizó mediante un ensayo inmunológico tipo ELISA doble sándwich (Arilla et al. 2002). Para ello, posterior a la exposición y previo al análisis ELISA, los filtros fueron hidratados con PBS (phosphate buffered saline) durante seis horas para facilitar la liberación del alérgeno del filtro.

El número total de experimentos realizados en esta Adenda fueron tres: un experimento a 1 hora de exposición y dos experimentos a 24 horas de exposición. El número total de réplicas utilizadas para cada uno de estos tres experimentos fueron: 64 (32 para la cámara *Control* y 32 para la cámara *Ionizante*). Las réplicas a su vez se agruparon de dos en dos para ser colocadas en las cámaras de manera controlada e idéntica a la que se realizó con el contrato anterior OTRI-UGR 5853 (Figura 1 y 2).

			Ventilador / Ionizador		P13-14	O15-16	
						P15-16	
N1-2							
O1-2	N3-4						
P1-2	O3-4	N5-6					
	P3-4	O5-6	N7-8				
		P5-6	O7-8	N9-10			
			P7-8	O9-10	N11-12		
				P9-10	O11-12	N13-14	
					P11-12	O13-14	
						N15-16	

Identificación muestras	Tipo muestra
N1, ..., N16	Ole e 1_200 ng/mL
O1, ..., O16	Ole e 1_50 ng/mL
P1, ..., P16	Ole e 1_15 ng/mL

Figura 1: Códigos asignados a las muestras del experimento y diagrama de colocación de las réplicas en las cámaras Control e Ionizante.

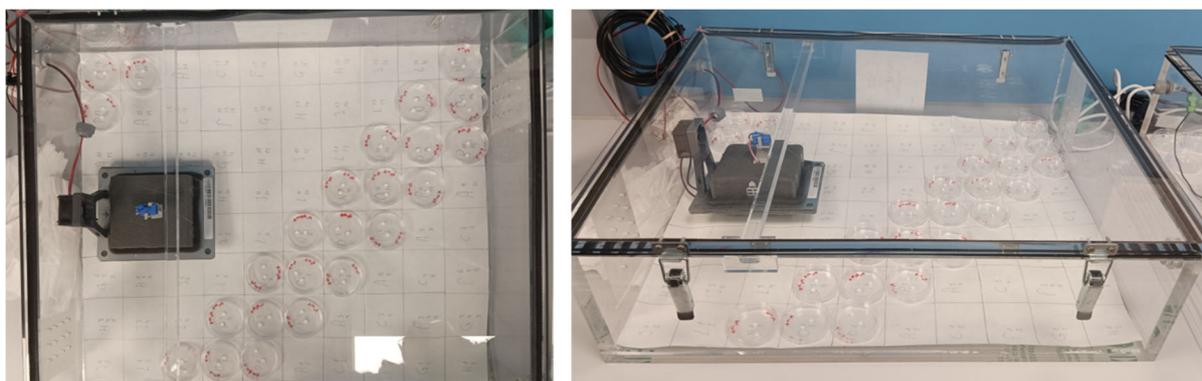


Figura 2: Colocación de las muestras en las cámaras.

Por otro lado, los resultados de los ensayos de esta adenda fueron analizados junto con los resultados de los ensayos realizados en el contrato OTRI-UGR 5853 para, de esta manera, lograr obtener un número de muestras robusto y obtener así un análisis estadístico más consistente. Su objetivo: conocer si el efecto ionizante sobre la alergenicidad de Ole e 1 mostraba diferencias significativas con respecto a las muestras control o no ionizadas. Para dicho análisis se ha seleccionado la prueba no paramétrica “Test de Mann-Whitney” que nos permite medir la varianza por rangos del conjunto de datos. Esta prueba compara los promedios o medianas de K muestras independientes y decide si éstas proceden de poblaciones idénticas con respecto a los promedios. Las hipótesis que se trata de contrastar son: H0= Las medianas de las poblaciones consideradas son iguales; H1= Al menos una de las poblaciones tiene mediana distinta a las otras. A la hora de interpretar los resultados, se debe tener en cuenta el valor de P o “p valor”, de tal forma que, si éste es menor de 0,05, se rechaza la hipótesis nula (H0) y se concluye que las muestras son diferentes, o al menos una de ellas tiene mediana distinta a las otras, por lo que existe un efecto ionizante sobre el alérgeno Ole e 1. Por el contrario, si “p valor” es mayor de 0,05 se acepta la hipótesis nula (H0), concluyéndose que las poblaciones consideradas son todas iguales y, por tanto, la ionización no ha provocado cambios en la capacidad alergénica de Ole e 1.

## IV. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### Determinación de la capacidad alergénica del alérgeno Ole e 1 en los experimentos realizados en la adenda

El Olivo (*Olea europaea*) es un árbol que puede alcanzar hasta 5 metros de altura, que presenta hojas opuestas y perennes, con envés blanquecino. Es abundante en entornos mediterráneos, donde se cultiva y se usa como ornamental. Sus flores, agrupadas en inflorescencias en racimos axilares, son hermafroditas, con 4 pétalos blanco-amarillentos y dos prominentes estambres. El tipo de polinización es principalmente anemófila (polen transportado por el viento) presentando su periodo de máxima dispersión en los meses de abril-junio (Díaz de la Guardia et al. 2003). Su fruto es una drupa conocida comúnmente como aceituna.

El polen de *O. europaea* es la principal causa de alergia en el área mediterránea (D'Amato et al. 2007), segunda en España tras el polen de Gramíneas (Ojeda et al., 2018) y primera causa en Andalucía (SEAIC, 2017). Se han identificado y caracterizado 13 alérgenos en el polen de *Olea*. El principal y más estudiado es Ole e 1, una proteína reconocida como alérgeno mayoritario, con un peso molecular de 20 kDa que representa el 20% del contenido proteico en el polen (Rodríguez et al., 2002). Ole e 1 es un alérgeno específico que se detecta solo en el tejido del polen y no en tejidos de hojas, frutos o tallos (Villalba et al., 1994). Los ensayos de inmunolocalización determinan que se almacena principalmente en el retículo endoplásmico (Alché et al., 1999), mientras que en las etapas maduras de los granos de polen esta proteína también se puede encontrar en la exina, donde podría participar en el reconocimiento entre el polen y el estigma o entre el tubo polínico y las células del estigma (Alché et al., 2004). Números estudios han determinado que la sintomatología alérgica a Ole e 1 no solo viene determinada por la presencia del grano de polen en el aire, sino que este alérgeno también está presente en la atmósfera de forma libre pudiendo generar sintomatologías más graves como el asma (De Linares et al, 2007; Plaza et al. 2016; García-Sánchez et al. 2019). Por ello, en el presente estudio del efecto higienizante de un ionizador, se realizó el estudio de la capacidad alergénica de estas proteínas de forma libre.

Los resultados obtenidos en el estudio de la capacidad alergénica del alérgeno Ole e 1 tras el efecto de la ionización a concentraciones conocidas (200, 50, 15 ng/mL) y tras la ionización durante 1 hora y 24 horas se muestra en la tabla 1. Ambos ensayos (1 hora y 24 horas) muestran una reducción de la capacidad alergénica en función de las concentraciones de alérgenos iniciales (más alérgeno-más reducción; menos alérgeno-menos reducción). En el ensayo de 1 hora, el análisis estadístico muestra que este hecho es lo suficientemente significativo como para establecer el patrón de reducción de la capacidad alergénica, confirmándose que, a mayor concentración de alérgeno, mayor es la capacidad de reducción de la alergenicidad. Sin embargo, los datos obtenidos a las 24 horas de ionización no arrojan las mismas conclusiones de forma tan categórica. Aunque parece existir un descenso de capacidad alergénica, el análisis Man-Whitney no muestra diferencias estadísticamente significativas.

Ole e 1

		Reducción alergenicidad	p valor Test Mann-Whitney
1h	200 ng/mL (n=64)	55,31%	<b>0,033*</b>
	50 ng/mL (n=64)	36,53%	<b>0,019*</b>
	15 ng/mL (n=64)	18,78%	0,183
24h	200 ng/mL (n=128)	49,14%	0,183
	50 ng/mL (n=128)	28,25%	0,304
	15 ng/mL (n=128)	25,25%	0,556

Tabla 1. Reducción de la alergenicidad del alérgeno Ole e 1 sometidos a ionización 1h y 24h.

\* existen diferencias estadísticamente significativas.

## Determinación de la capacidad alergénica del alérgeno Ole e 1 recopilando resultados con los experimentos realizados en el contrato OTRI-UGR 5853 y adenda

Con el fin de poder obtener resultados más robustos, en esta adenda se han utilizado de nuevo los resultados obtenidos en el contrato OTRI-UGR 5853 aumentando con ello, el número de réplicas utilizadas en el estudio. Así, para el ensayo a 1 hora se analizan un total de 128 réplicas (64 réplicas para 1 hora procedentes del contrato y 64 réplicas procedentes de la adenda); y para 24 horas, 160 réplicas (32 réplicas del contrato, más 128 réplicas de la adenda).

Los resultados de reducción de alergenicidad y Test Mann-Whitney se muestran en la tabla 2. La reducción de alergenicidad está íntimamente ligada a la concentración de alérgenos en la muestra. De esta forma, a altas concentraciones de alérgenos el efecto higienizante es mayor que a bajas concentraciones. En este sentido, con todos los datos agrupados se puede concluir que el efecto del ionizador es estadísticamente significativo a 1 hora de exposición a cualquier concentración de alérgeno, pero no así a 24 horas donde el Test Mann-Whitney indica que no existen diferencias significativas entre los resultados control y cámara.

Ole e 1

		Reducción alergenicidad	p valor Test Mann-Whitney
1h	200 ng/mL (n=128)	44,99%	<b>0,001*</b>
	50 ng/mL (n=128)	40,37%	<b>0,001*</b>
	15 ng/mL (n=128)	19,51%	<b>0,001*</b>
24h	200 ng/mL (n=160)	43,60%	0,081
	50 ng/mL (n=160)	25,36%	0,249
	15 ng/mL (n=160)	21,10%	0,766

Tabla 2. Reducción de la alergenicidad del alérgeno Ole e 1 sometidos a ionización 1h y 24h.

\* existen diferencias estadísticamente significativas.

## VI. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el estudio de la eficacia de un purificador de aire sobre la capacidad alergénica de Ole e 1 tras un proceso de ionización se puede concluir:

- El purificador de aire mediante proceso de ionización utilizado en este ensayo ha mostrado tener un efecto reductor de la capacidad alergénica del alérgeno Ole e 1.
- La ionización en presencia de una corriente de aire durante 1 hora ininterrumpida afecta significativamente la capacidad alergénica de Ole e 1 llegando a reducir dicha alergenicidad entre el 45 y 19%, dependiendo de su concentración inicial de alérgeno.
- La ionización en presencia de una corriente de aire durante 24 horas ininterrumpidas ha mostrado tener un efecto reductor sobre la capacidad alergénica de Ole e 1 a diferentes concentraciones. Sin embargo, el análisis estadístico no muestra significación por lo que se concluye que con tratamientos de 24 horas no existe reducción significativa de la capacidad alergénica de Ole e 1.

---

## BIBLIOGRAFIA

- Alché J.D., Castro A.J., Olmedilla A. et al. The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anter development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J Cell Sci* 1999; 112:2501–9.
- Alché J.D., Mrani-Alaoui M., Castro A.J., Rodríguez-García M.I. Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) Pollen, increases its expression and is released to the culture medium during in vitro germination. *Plant Cell Physiol* 2004; 45:1149–57.
- Arilla M.C., Eraso E., Ibarrola I., Algorta J., Martínez A., & Asturias, J. A. Monoclonal antibody-based method for measuring olive pollen major allergen Ole e 1. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2002, 89(1), 83-89.
- D'Amato G., Liccardi G., Frengueli G. Thunderstorm-asthma and pollen allergy. *Allergy* 2007, 62, 11–6. Doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01271.x
- De Linares C., Nieto-Lugilde D., Alba F., Díaz De La Guardia C., Galán C., Trigo M. M. Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to *Olea europaea* pollen in S Spain. *Clinical & Experimental Allergy* 2007, 37(1), 125-132.
- Díaz de la Guardia C., Alba F., Trigo, M.M., Galán C., Ruíz L., Sabariego S. Aerobiological analysis of *Olea europaea* L. pollen in different localities of southern Spain: Forecasting models. *Grana* 2003, 42(4), 234-243.
- García-Sánchez J., Trigo M.M., Recio M. Extraction and quantification of Ole e 1 from atmospheric air samples: An optimized protocol. *Chemosphere* 2019, 225, 490-496.
- InBio Biotechnologies. Available online: <https://inbio.com/elisa-kits/> (accessed on 18 July 2023).
- Maya-Manzano J. M., Oteros J., Rojo J., Traidl-Hoffmann C., Schmidt-Weber C., Buters J. Drivers of the release of the allergens Bet v 1 and Phl p 5 from birch and grass pollen. *Environmental Research* 2022, 214, 113987.
- Ojeda P., Sastre J., Olaguibel J.M., Chivato T. Alergológica 2015: A National Survey on Allergic Diseases in the Adult Spanish Population. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 2018, 28(3), 151-164.
- Plaza M.P., Alcázar P., Galán C. Correlation between airborne *Olea europaea* pollen concentrations and levels of the major allergen Ole e 1 in Córdoba, Spain, 2012–2014. *International Journal of Biometeorology* 2016, 60, 1841-1847.
- Rodríguez R., Villalba M., Batanero E. et al. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* 2002; 57:6–16.
- SEAIC (2017). Alergológica 2015. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Alergológica 2015. Madrid: Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Edit. Draft Grupo de Comunicación Healthcare. Madrid.
- Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, González de la Peña MA, Lahoz C, Rodríguez R. Cloning and expression of Ole e 1, the major allergen from olive tree pollen. *J Biol Chem* 1994; 269:15217–22.
-