

## El polen de *Fraxinus* como fuente de contaminación ambiental

### *Fraxinus* pollen as a source of environmental pollution

### O pólen *Fraxinus* como fonte de contaminação ambiental

**María Fernández-González\*, Estefania González, Alberto Vara, Alba Piña**

Universidad de Vigo. Campus "As Lagoas". 32004 Ourense.

**Cita:** Fernández-González M, González E, Vara A, Piña A. El polen de *Fraxinus* como fuente de contaminación ambiental. Rev. salud ambient. 2016; 16(1):52-61.

**Recibido:** 7 de abril de 2016. **Aceptado:** 18 de mayo de 2016. **Publicado:** 15 de junio de 2016.

**Autor para correspondencia:** María Fernández-González.

Correo e: [mfgonzalez@uvigo.es](mailto:mfgonzalez@uvigo.es)

Universidad de Vigo. Campus "As Lagoas". 32004 Ourense.

**Financiación:** Proyecto 10 PXIB 383 251 PR, subvencionado por la Xunta de Galicia.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y la preparación de este trabajo.

**Declaraciones de autoría:** Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

## Resumen

En el sur de Europa existen pocos estudios sobre la incidencia alérgica del polen de *Fraxinus* debido a su escasa representatividad. En Ourense este tipo polínico representa un 2 % del polen total registrado en la atmósfera. El objetivo del presente estudio es evaluar las concentraciones atmosféricas del polen de *Fraxinus* spp. y su alérgeno en la atmósfera de Ourense durante el año 2015, así como su relación con las principales variables meteorológicas. La finalidad es valorar si los recuentos polínicos representan las condiciones reales de exposición de los pacientes sensibles a los alérgenos. Para el muestreo del polen se ha utilizado un captador volumétrico Lanzoni VPPS-2000 y para la detección de los alérgenos un Burkard Cyclone sampler.

Durante el año de estudio la floración de *Fraxinus* tuvo una duración de 76 días entre la tercera semana de enero y la primera de abril, como consecuencia de la floración asincrónica de las diferentes especies del área de estudio. La presencia del alérgeno de *Fraxinus* spp. en la atmósfera puede ser detectada mediante el uso del alérgeno principal del olivo, Ole e 1. Nuestro estudio indica que la combinación de los recuentos de polen y la cuantificación de alérgenos debe ser evaluada para estimar de forma fiable la exposición real de las personas sensibles. En el caso del fresno estas pueden tener momentos de riesgo de alergias en los periodos previos y posteriores a la aparición de las concentraciones más elevadas de polen en la atmósfera, como consecuencia de condiciones atmosféricas especiales de lluvia y humedad durante la floración.

**Palabras clave:** *Fraxinus*; polen; Ole e 1; aerobiología; meteorología; reacciones cruzadas.

## Abstract

In Southern Europe there are but a few studies focused on the allergenic impact of ash (*Fraxinus*) pollen as a result of its scarce distribution. In the city of Ourense this type of pollen represents 2 % of the total atmospheric pollen recorded. The goal of this study is to determine the atmospheric concentrations of *Fraxinus* pollen and its allergen in Ourense's atmosphere in 2015, and to assess their relationship with the main meteorological variables. The aim is to assess whether the pollen counts match the actual exposure conditions for allergen-sensitive patients. A Lanzoni VPPS-2000 volumetric sampler was used for pollen sampling, whereas a Burkard Cyclone sampler was used for allergen detection.

The flowering period of *Fraxinus* was long, having a duration of 76 days between the third week of January and the first week of April as consequence of the asynchronous flowering of the different species growing in the study area. The presence of the ash allergen in the atmosphere can be detected using the main olive tree allergen, Ole e 1. Our study indicates that the combination of pollen counts and allergen quantification should be contemplated to estimate the real exposure of sensitive people. In the case

of *Fraxinus* pollen, there may be allergy risk periods before and after the occurrence of the highest pollen concentrations in the atmosphere as a result of special rain and humidity conditions during its flowering period.

**Keywords:** *Fraxinus*; pollen; Ole e 1; aerobiology; meteorology; cross reactions.

## Resumo

Existem poucos estudos no Sul da Europa sobre o impacto do pólen alergénico de *Fraxinus* pela sua escassa representatividade, em Ourense representa o 2 % do pólen total registrado. O objetivo deste estudo é avaliar as concentrações atmosféricas de pólen e alérgenos de *Fraxinus* na atmosfera de Ourense em 2015, e sua relação com as principais variáveis meteorológicas. A finalidade é avaliar se as contagens de pólen representam as condições reais de exposição dos pacientes sensíveis aos alérgenos. Para a amostragem de pólen foi usado um sensor volumétrico Lanzoni VPPS-2000 e para a deteção de alérgenos um Burkard Cyclone sampler.

Durante o ano em estudo o florescimento de *Fraxinus* teve uma duração de 76 dias, entre a terceira semana de janeiro e a primeira de abril, devido à floração simultânea de espécies diferentes na área de estudo. A presença do alérgeno de *Fraxinus* na atmosfera pode ser detectada usando o principal alérgeno de oliveira, Ole e 1. Este estudo indica que a combinação da contagem do pólen e a quantificação dos alérgenos devem ser avaliados para estimar com segurança a exposição real de doentes sensibilizados. No caso de *Fraxinus*, estes doentes podem ter momentos de risco de alergias respiratórias nos períodos antes e depois da ocorrência de maiores concentrações do pólen na atmosfera, como resultado de condições meteorológicas especiais de chuva e humidade durante a floração.

**Palavras-chave:** *Fraxinus*; pólen; Ole e 1; aerobiologia; meteorologia; reações cruzadas.

## INTRODUCCIÓN

El género *Fraxinus* pertenece a la familia Oleaceae y se encuentra ampliamente extendido en zonas templadas del norte y centro de Europa<sup>1</sup>. En cuanto a la distribución en la Península Ibérica de las diferentes especies de *Fraxinus* spp., *F. angustifolia* Vahl., localizada principalmente en la región biogeográfica mediterránea, *F. excelsior* L. se encuentra representada en la región eurosiberiana y finalmente *F. ornus* L. se localiza en pequeñas zonas en la cornisa norte y la comunidad Valenciana<sup>2</sup>. A pesar de que la ciudad de Ourense se encuentra situada en el noreste de España, en esta provincia se localiza la zona final de transición de la región biogeográfica mediterránea, por lo que la especie predominante en el zona de estudio es *F. angustifolia* Vahl. (localizada principalmente a lo largo del cauce del río Miño que atraviesa la ciudad). Como consecuencia del carácter limítrofe del área de estudio entre ambas regiones biogeográficas también se encuentran representadas, aunque en menor número, otras especies como *F. excelsior* L. y *F. pennsylvanica* Marsh.<sup>3</sup>, esta última formando parte de la flora ornamental de parques y jardines de la ciudad. A lo largo del año la primera de las especies en florecer es *F. angustifolia* Vahl. cuyo período de polinización se extiende desde finales de diciembre hasta el mes de febrero, mientras que la floración de *F. excelsior* L. y *F. pennsylvanica* Marsh. tiene lugar a continuación, desde finales de febrero hasta finales de

marzo<sup>3,4</sup>.

Diversos estudios realizados en el norte de Europa<sup>5,6</sup>, Suiza<sup>7</sup>, Francia y sur de Austria<sup>8,9</sup> identifican al polen de fresno como el causante de buena parte de las alergias en la población. En la actualidad existen pocos estudios sobre la incidencia alérgica que presenta el polen de *Fraxinus* en el sur de Europa debido a su escasa representatividad. En la ciudad de Ourense la concentración anual de polen de *Fraxinus* representa solamente un 2 % del polen total registrado en su atmósfera<sup>1</sup>. La presencia de procesos de reactividad cruzada entre las diferentes especies de la familia Oleaceae ha sido ampliamente demostrada<sup>10-12</sup> lo cual le confiere al polen de *Fraxinus* una elevada importancia como causa de alergias respiratorias en el sur de Europa<sup>1</sup>. El proceso de reactividad cruzada es consecuencia del alto grado de homología que su proteína alérgica principal posee con respecto a la del polen de olivo, la cual alcanza alrededor del 88 % de similitud en sus secuencias<sup>13</sup>. En este sentido, un estudio realizado en el País Vasco, en una zona donde los fresnos son comunes pero los olivos no están presentes, mostró que los pacientes alérgicos al polen de olivo desarrollaron sintomatología alérgica a principios de la primavera coincidiendo con la floración de los fresnos<sup>14</sup>. El polen de *Fraxinus* contiene 3 alérgenos principales: Fra e 1, Fra e 2 y Fra e 3<sup>15</sup>. Fra e 1 con un PM de 18-21 kDa es el alérgeno mayoritario en los pacientes sensibilizados al polen del fresno y pertenece a la familia

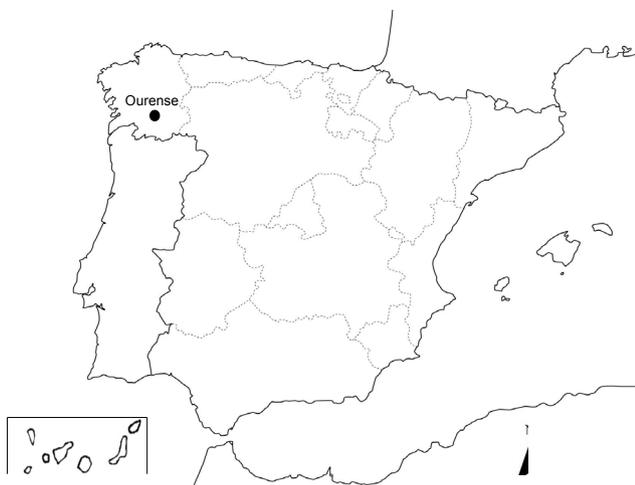
de las proteínas similares a Ole e 1, mostrando un alto grado de reactividad cruzada con otros miembros de la familia Oleaceae<sup>16</sup>. Aproximadamente en el 70-80 % de individuos sensibilizados al polen del fresno se detecta en sus sueros anticuerpos Fra e 1 e IgE específicos<sup>13</sup>.

El objetivo del presente estudio es evaluar las concentraciones atmosféricas del polen de *Fraxinus* y su alérgeno mayoritario en la atmósfera de Ourense durante el año 2015, así como su relación con las principales variables meteorológicas. La finalidad es valorar si los recuentos polínicos representan las condiciones reales de exposición de los pacientes sensibles a los alérgenos. Esta información nos puede ayudar a mejorar el conocimiento y prevención de los síntomas clínicos en pacientes sensibles.

## MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó durante el año 2015 en la ciudad de Ourense (42° 0' N 7° 5' W), que se encuentra situada en el noroeste de la Península Ibérica, incluida dentro de la región biogeográfica Mediterránea. Esta área cuenta con una temperatura media anual de 14 °C y 772 mm de precipitación total anual<sup>17</sup> (figura 1).

Figura 1. Localización de Ourense en el noroeste de la Península Ibérica



Para el muestreo del polen de *Fraxinus* en la atmósfera se ha utilizado un captador volumétrico tipo Hirst<sup>18</sup> modelo Lanzoni VPPS-2000 con un flujo de succión de 10 L/min y que está instalado en la azotea del edificio de la Facultad de Ciencias de Ourense a 15 m de altura. Los granos de polen y el resto de material particulado han sido capturados sobre una cinta Melinex impregnada con una solución de silicona. Para realizar la identificación y recuento de los granos de polen se ha utilizado un microscopio óptico a 40x

aumentos, siguiendo la metodología propuesta por la Red Española de Aerobiología<sup>19</sup>. Las concentraciones de polen de *Fraxinus* se han expresado como granos por metro cúbico de aire cuando se trata de concentraciones medias diarias y como polen cuando se trata del total anual.

Para la detección de los alérgenos hemos utilizado un captador Burkard Cyclone sampler (Burkard Manufacturing Co. Ltd.) con un flujo de succión de 16,5 L/min que genera una corriente ciclónica continua de aire en un tubo eppendorf de 1,5 mL donde quedan depositadas las partículas captadas. Estas muestras fueron recogidas diariamente y almacenadas a -20 °C para su posterior tratamiento siguiendo la metodología propuesta por Takahashi et ál.<sup>20</sup> con algunas modificaciones Moreno-Grau et ál.<sup>21</sup>. Para preparar la muestra centrifugamos los eppendorf a 13 400 rpm durante 3 min, añadimos el tampón de extracción 120 µL/eppendorf de tampón fosfato (50 mM/L pH 7,0) que contiene 150 mM/L de NaCl, 125 mM/L de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 3 mM/L de EDTA y 0,005 % de Tween 20. Se mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugan de nuevo a 4000 rpm durante 10 minutos, las muestras son almacenadas a -20 °C. Para el procesado de las muestras se ha seguido la metodología ELISA de doble sándwich. Debido al alto grado de homología entre las proteínas Ole e 1 y Fra e 1, hemos utilizado el anticuerpo Ole e 1 para detectar la presencia de los antígenos de *Fraxinus*. Las placas (Deltalab S.L., Barcelona, Spain) se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en un volumen final de 100 µL/pocillo con un anticuerpo monoclonal Ole e 1 específico (5A3 L-121 0,55 mg/mL) (Industria Farmacéutica Bial, España) mezclado con tampón fosfato (PBS). Al día siguiente los pocillos se bloquearon con 200 µL/pocillo de PBS-BSA-T (contiene PBS, seroalbúmina bovina al 1 % y 0,05 % de Tween 20) se incuban a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se incubaron durante 1 h a 37 °C con 100 µL/pocillo de un anticuerpo natural Ole e 1 y PBS-BSA-T, haciendo diluciones comenzando en 2,5 µg/mL desde 0,1 a 50 µg/mL (recta patrón). Al mismo tiempo se añadieron las muestras problema diluidas en tampón fosfato hasta alcanzar un volumen final de 100 µL/pocillo. A continuación se realizaron 3 lavados con 200 µL/pocillo de PBS-T y se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpo policlonal anti-Ole e 1 (L-091 0,72 µg/mL) (Industria Farmacéutica Bial, España), el cual se incubó durante 1 h a 37 °C. A continuación se realizan 3 lavados con 200 µL/pocillo con tampón de lavado (PBS-T). Se incuban durante 1 h a 37 °C con 100 µL/pocillo con streptavidina conjugada con peroxidasa (0,25 µg/mL) (Sigma S-5512) en PBS-BSA-T. Finalmente se realizaron 3 lavados con 200 µL/pocillo de PBS-T y se incuban las

placas con 200  $\mu\text{L}$ /pocillo de o-phenildiamina (Sigma-Fast TM o-phenildiamina Sigma p-9187) durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Esta reacción se para añadiendo 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3M) y se leen las placas en un espectrofotómetro a 492  $\text{nm}$ <sup>22</sup>. Los resultados de este análisis fueron expresados en  $\text{ng/mL}$  referidos al contenido de la proteína standard y posteriormente fueron transformados a  $\text{ng/m}^3$  de aire para poder compáralos con los datos de polen en aire.

Los datos meteorológicos han sido proporcionados por la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET). La estación está situada al lado de los captadores de polen y alérgenos, en la azotea de la Facultad de Ciencias. Las variables utilizadas fueron: temperaturas media, máxima y mínima ( $^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa (%), temperatura de rocío ( $^{\circ}\text{C}$ ), velocidad del viento ( $\text{km/h}$ ) y precipitación ( $\text{mm}$ ).

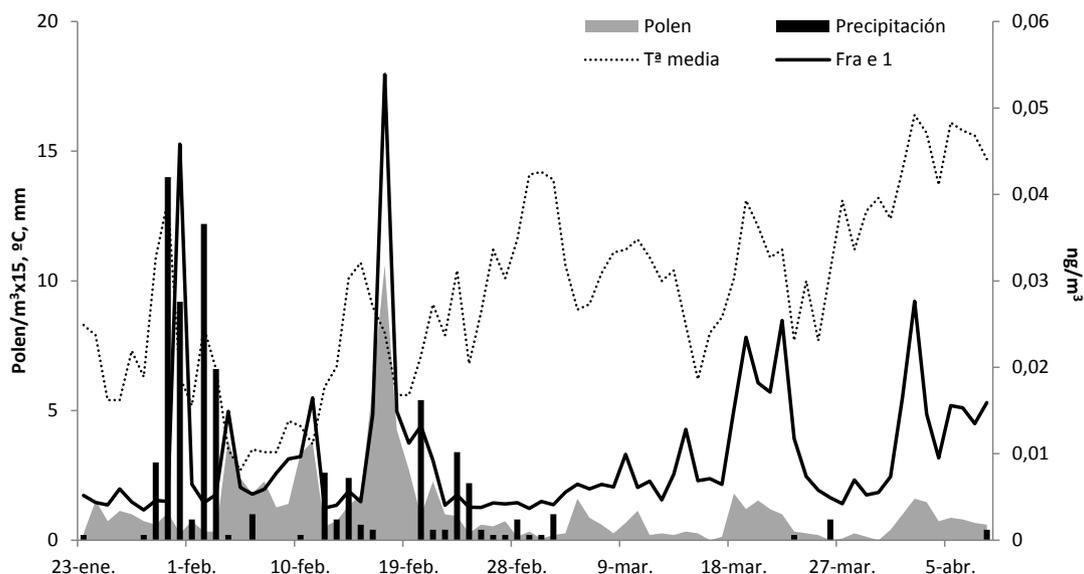
Entre las herramientas estadísticas utilizadas en el presente estudio, se ha aplicado un análisis de correlación de Spearman para analizar el grado de asociación entre los alérgenos, el polen y las principales variables meteorológicas. Además se ha realizado un Análisis Factorial de Componentes Principales (PCFA de aquí en adelante) con el fin de detectar una relación entre las diferentes variables, así como detectar la influencia de estas sobre la variación en las variables dependientes<sup>23</sup>. Una de las ventajas de realizar este tipo de análisis multidimensional es conseguir un modelo robusto cuando el número de variables es elevado

pero el número de observaciones es pequeño<sup>24</sup>. Con los datos obtenidos en el análisis de correlación y en el PCFA, se ha realizado un análisis de regresión lineal con el objetivo de desarrollar un modelo de predicción de la concentración de alérgeno de *Fraxinus* en la atmósfera de Ourense. Para ello se ha utilizado el programa STATISTICA 5.1.

## RESULTADOS

Durante el año 2015 la floración de *Fraxinus* se produjo desde la tercera semana de enero hasta la primera del mes de abril. El total de granos de polen registrados durante la estación ha sido de 1315. En cuanto a los valores máximos diarios, la concentración máxima de polen se ha registrado el día 17 de febrero con 159  $\text{granos/m}^3$ , aunque se observaron picos secundarios unos días antes, concretamente el 4 y 11 de febrero con 58 y 57  $\text{granos/m}^3$  respectivamente (figura 2). La cantidad total de alérgeno registrada durante el periodo de estudio ha sido de 0,737  $\text{ng}$ . El pico máximo de concentración de alérgeno coincidió con el de polen, el día 17 de febrero con 0,053  $\text{ng/m}^3$ . Previamente se registró un pico secundario el día 31 de enero con 0,046  $\text{ng/m}^3$ , mientras que al final del periodo de polinización se registraron otros periodos de concentraciones elevadas de alérgeno los días 19, 22 de marzo y 2 de abril con 0,023; 0,025 y 0,027  $\text{ng/m}^3$  respectivamente (figura 2).

Figura 2. Concentración de polen de *Fraxinus*, concentración de alérgeno, temperatura media y precipitación durante el año 2015



Con el fin de evaluar la influencia que de forma individual ejercen las variables meteorológicas y la concentración de polen sobre la concentración atmosférica de alérgeno, hemos realizado un análisis de correlación de Spearman. El análisis mostró una correlación con signo positivo y un intervalo de confianza del 99 % entre la concentración de alérgeno y la concentración de polen de *Fraxinus* del mismo día y la de 1 a 4 días anteriores, con la temperatura media de 1 y 2 días antes, con la temperatura máxima del mismo día y de 1, 2 y 7 días antes, y con la velocidad del viento del mismo día y del día anterior. Con el mismo nivel de significación pero signo negativo encontramos correlaciones con la humedad relativa del mismo día y de 1 a 3 días antes, con la temperatura de rocío del mismo día y con la precipitación del mismo día y de 1 a 3 días antes (tabla 1). Para comprender de forma conjunta la influencia que las variables meteorológicas ejercen sobre la concentración de polen y alérgeno, hemos realizado un PCFA. La finalidad de este análisis es obtener un pequeño número de combinaciones lineales con las 9 variables utilizadas en este estudio que representen la mayor parte de la variabilidad de los datos. En el presente estudio han sido extraídos 3 factores, con un autovalor mayor o igual a 1,0. Juntos representan el 78,2 % de la variabilidad de los datos reales (tabla 2). Esto nos indica que estas tres variables explican la mayor parte de la varianza, con una pérdida de información del 22 %. De forma general los tres componentes se correlacionaron de la siguiente forma: el componente 1 presenta la temperatura media, mínima y de rocío; el componente dos la temperatura máxima y la humedad relativa; el componente 3 la velocidad del viento (tabla 2). Los resultados de este análisis se representan en la figura 3, donde se observa que las variables que ejercen mayor influencia sobre la concentración de alérgeno han sido las temperaturas media, máxima y la velocidad del viento, mientras que las variables que ejercen un mayor efecto sobre la concentración de polen es la precipitación (figura 3).

Figura 3. Análisis Factorial de Componentes Principales (PCFA), representación gráfica del Factor 2 vs. Factor 3

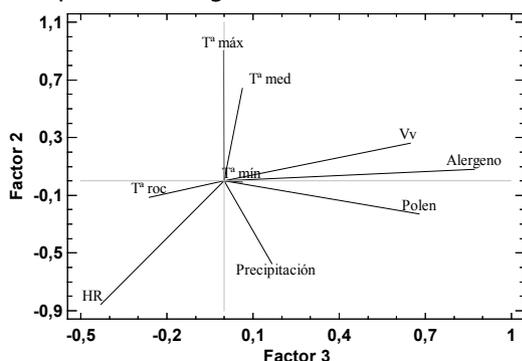


Tabla 1. Correlación de Spearman entre la concentración de alérgeno y el polen de *Fraxinus* o las principales variables meteorológicas durante el período de estudio (\*\*p < 0,01 y \*p ≥ 0,01 y < 0,05). Para hacer las correlaciones se han considerado los valores que estas variables alcanzaron durante los 7 días anteriores al muestreo

|             | R <sup>2</sup> |                  | R <sup>2</sup> |
|-------------|----------------|------------------|----------------|
| Polen       | 0,279**        | Humedad Relativa | -0,671**       |
| Polen-1     | 0,749**        | HR-1             | -0,568**       |
| Polen-2     | 0,792**        | HR-2             | -0,460**       |
| Polen-3     | 0,762**        | HR-3             | -0,374**       |
| Polen-4     | 0,778**        | HR-4             | -0,295*        |
| Polen-5     | -0,207         | HR-5             | -0,212         |
| Polen-6     | -0,368**       | HR-6             | -0,111         |
| Polen-7     | -0,448**       | HR-7             | -0,110         |
| Tª media    | 0,119          | Tª rocío         | -0,430**       |
| Tª media-1  | 0,246**        | Tª rocío-1       | -0,207         |
| Tª media-2  | 0,331**        | Tª rocío-2       | -0,041         |
| Tª media-3  | 0,219          | Tª rocío-3       | -0,093         |
| Tª media-4  | 0,214          | Tª rocío-4       | -0,028         |
| Tª media-5  | 0,229*         | Tª rocío-5       | 0,028          |
| Tª media-6  | 0,193          | Tª rocío-6       | 0,046          |
| Tª media-7  | 0,116          | Tª rocío-7       | 0,002          |
| Tª máxima   | 0,336**        | Velocidad viento | 0,382**        |
| Tª máxima-1 | 0,354**        | Vv-1             | 0,352**        |
| Tª máxima-2 | 0,397**        | Vv-2             | 0,248*         |
| Tª máxima-3 | 0,293*         | Vv-3             | 0,183          |
| Tª máxima-4 | 0,298*         | Vv-4             | 0,195          |
| Tª máxima-5 | 0,266*         | Vv-5             | 0,125          |
| Tª máxima-6 | 0,255*         | Vv-6             | 0,052          |
| Tª máxima-7 | 0,324**        | Vv-7             | -0,029         |
| Tª mínima   | -0,131         | Precipitación    | -0,420**       |
| Tª mínima-1 | 0,008          | Precipitación-1  | -0,356**       |
| Tª mínima-2 | 0,162          | Precipitación-2  | -0,317**       |
| Tª mínima-3 | 0,026          | Precipitación-3  | -0,320**       |
| Tª mínima-4 | 0,034          | Precipitación-4  | -0,267*        |
| Tª mínima-5 | 0,083          | Precipitación-5  | -0,172         |
| Tª mínima-6 | 0,026          | Precipitación-6  | -0,203         |
| Tª mínima-7 | -0,076         | Precipitación-7  | -0,198         |

Tabla 2. Análisis Factorial de Componentes Principales (PCFA) (en negrita  $p < 0,05$ )

| Componentes             | Factores     |               |               |
|-------------------------|--------------|---------------|---------------|
|                         | 1            | 2             | 3             |
| Autovalor               | 2,920        | 2,561         | 1,555         |
| Varianza (%)            | 32,449       | 28,464        | 17,284        |
| Porcentaje Acumulado    | 32,449       | 60,913        | <b>78,197</b> |
| Alérgeno                | -0,052       | 0,081         | <b>0,871</b>  |
| Polen                   | -0,344       | -0,229        | <b>0,677</b>  |
| Temp. Media (°C)        | <b>0,749</b> | 0,640         | 0,063         |
| Temp. Máxima (°C)       | 0,193        | <b>0,904</b>  | -0,003        |
| Temp. Mínima (°C)       | <b>0,945</b> | -0,009        | 0,063         |
| Humedad Relativa (%)    | 0,117        | <b>-0,854</b> | -0,431        |
| Temp. Rocío (°C)        | <b>0,913</b> | -0,113        | -0,261        |
| Velocidad viento (km/h) | 0,232        | 0,260         | <b>0,648</b>  |
| Precipitación (mm)      | 0,417        | -0,573        | 0,165         |

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos con el análisis de correlación, se ha realizado un análisis de regresión con el fin de predecir la concentración de alérgeno en la atmósfera. El modelo obtenido tiene como variable dependiente la concentración de alérgeno y como variables independientes la concentración de polen de *Fraxinus*, la humedad relativa y la precipitación. La recta de regresión explicaría el 50,3 % de la variabilidad de la predicción de la concentración del alérgeno (tabla 3). A partir de este modelo se ha realizado una estimación de la concentración de alérgeno durante el

periodo de estudio, con el fin de observar las diferencias entre la concentración real alérgeno en la atmósfera y la concentración estimada por el modelo propuesto. Como se observa en la figura 4 existe un gran ajuste entre los datos reales de alérgeno y los valores estimados por el modelo propuesto. La eficacia del modelo se ha comprobado estadísticamente mediante un t-Test para muestras dependientes, que nos indica la no existencia de diferencias significativas entre los datos reales y los estimados por el modelo (tabla 4).

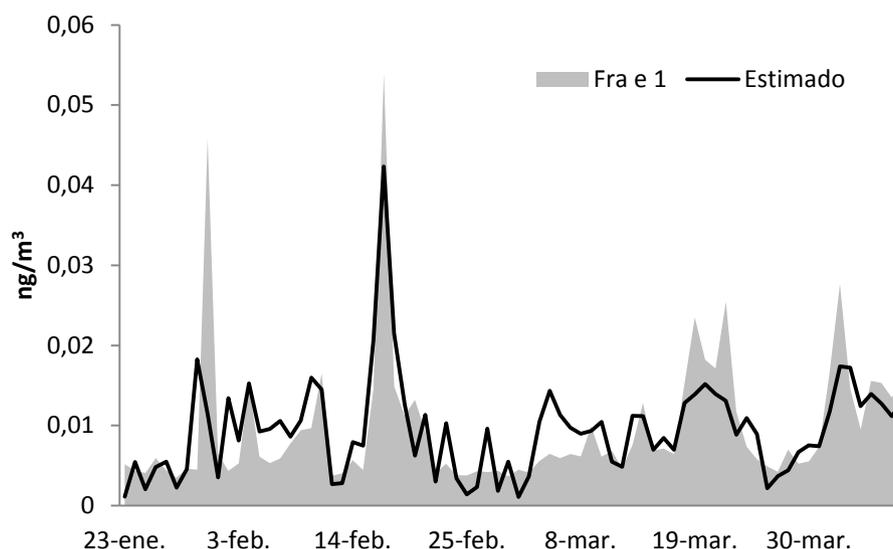
Tabla 3. Ecuación de predicción de la concentración de alérgeno ( $\text{ng}/\text{m}^3$ ). Beta es el coeficiente estandarizado de regresión. S.E. Beta es el error estándar. B es el coeficiente no estandarizado de regresión y S.E. B es el error estándar del mismo

|  | R      | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Ajustada | F      | D.F    | p       | S.E.  |
|--|--------|----------------|-------------------------|--------|--------|---------|-------|
|  | 0,724  | 0,523          | 0,503                   | 26,343 | 3,72   | < 0,000 | 0,006 |
| Alérgeno ( $\text{ng}/\text{m}^3$ ) = 0,031 + ( <i>Fraxinus</i> polen * 0,0002) - (Humedad Relativa * 0,0003) + (Precipitación * 0,0009) |        |                |                         |        |        |         |       |
|  | Beta   | S.E. Beta      | B                       | S.E. B | t(72)  | p       |       |
| Interceptado   |        |                | 0,031                   | 0,005  | 6,356  | 0,000   |       |
| Polen  | 0,575  | 0,082          | 0,0002                  | 0,000  | 7,027  | 0,000   |       |
| H. Relativa  | -0,462 | 0,087          | -0,0003                 | 0,000  | -5,302 | 0,000   |       |
| Precipitación  | 0,278  | 0,088          | 0,0009                  | 0,000  | 3,179  | 0,002   |       |

Tabla 4. Resultados del t-test. Diferencias significativas si  $p < 0,05$ 

|          | Media | Dv. Std. | N  | Dif.  | Dv. Std. Dif. | t     | df | p     |
|----------|-------|----------|----|-------|---------------|-------|----|-------|
| Alérgeno | 0,010 | 0,009    |    |       |               |       |    |       |
| Estimado | 0,009 | 0,006    | 76 | 0,000 | 0,006         | 0,301 | 75 | 0,765 |

Figura 4. Concentración de alérgeno frente a los valores de alérgeno estimados por el modelo propuesto



## DISCUSION

El fresno es un árbol que se encuentra ampliamente representado en las zonas del norte y centro de Europa. Aunque en el sur del continente no es tan abundante, el polen que este árbol libera a la atmósfera es un problema como causa de polinosis a tener en cuenta en el norte de España<sup>13</sup>. La producción de polen no es constante a lo largo del tiempo, sino que pueden producirse variaciones interanuales en las fechas en las que se registran los picos de polen para una misma región. La floración de *Fraxinus* durante el año 2015 en Ourense se ha extendido desde la tercera semana del mes de enero hasta la primera decena del mes de abril, con una duración total de 76 días. La estación polínica de *Fraxinus* es larga con respecto a otros años, ya que comienza a finales de diciembre y finaliza la tercera semana de marzo, debido a la floración asincrónica de las diferentes especies de fresnos presentes en el área de estudio, de *F. angustifolia* Vahl. que se inició a mediados de enero para posteriormente comenzar la floración de *F. excelsior* L. y *F. pennsylvanica* Marsh. durante el mes de marzo<sup>4</sup>. Estos datos son similares a los apuntados en estudios anteriores<sup>3</sup>, los cuales indican que la floración de *Fraxinus* comienza de forma general a finales de diciembre. En el año 2015, objeto de nuestro estudio,

la floración puede retrasarse hasta finales de enero si se registran temperaturas mínimas muy bajas en diciembre y/o comienzos de enero. Además de este patrón de temperaturas, diferentes autores apuntan que la precipitación puede influir sobre la temporalidad de la estación polínica de *Fraxinus*<sup>25,26</sup>.

La concentración total de granos de polen de *Fraxinus* registrada en Ourense durante el año de estudio ha sido de 1315 granos, lo cual indica que el polen de *Fraxinus* presenta importantes valores cuantitativos en la atmósfera en relación con las áreas del norte de Europa<sup>6,13,27</sup>. El día en el que se ha registrado la máxima cantidad de polen ha sido el 17 de febrero con 159 granos/m<sup>3</sup>. Estudios realizados sobre la distribución temporal y espacial del polen de *Fraxinus* en Galicia<sup>3</sup>, apuntan un retraso de más de un mes en las fechas en las que se registra el pico máximo de polen en esta comunidad frente al inicio de la floración. Este comportamiento también ha sido observado en el sur de España<sup>28</sup>, donde este retraso se atribuyó a la variación de la temperatura media en noviembre. Del mismo modo, estudios llevados a cabo en Méjico ponen de manifiesto que las concentraciones máximas de alérgeno aparecen en los meses de febrero y marzo<sup>29</sup>.

Estudios previos de carácter inmunológico y aerobiológico llevados a cabo por nuestro grupo de investigación<sup>1,30,31</sup> muestran que la presencia de proteínas similares a Ole e 1 (las cuales pueden estar directamente relacionadas con el alérgeno Fra e 1) pueden ser detectada con precisión mediante el uso del anticuerpo mayoritario del olivo Ole e 1 tanto en la atmósfera como en el grano de polen de *Fraxinus*. Este hecho reconoce al antígeno principal de polen de olivo (Ole e 1) como una causa principal de reactividad cruzada entre polen de la familia Oleaceae<sup>1,12,15,31,32</sup>. Nuestros resultados con los test ELISA también revelan la presencia de proteínas similares a Ole e 1 en la atmósfera durante la totalidad del período de polinización de *Fraxinus* en el año 2015. Trabajos realizados en la misma área de estudio en años anteriores, indican concentraciones de alérgeno muy similares a las citadas en el presente trabajo<sup>33</sup>.

En cuanto a las condiciones meteorológicas favorables para la presencia de los alérgenos en la atmósfera, diferentes autores apuntan que cuando se producen precipitaciones algunos materiales del contenido citoplasmático del grano de polen (principalmente gránulos de almidón y proteínas) se descargan bruscamente fuera del grano provocando así una rápida liberación de proteínas alergénicas, a la vez que estos mismos granos de polen son lavados de la atmósfera quedando esta libre de polen<sup>21,34,35,36</sup>. En nuestro estudio hemos detectado que si comparamos las curvas de polen y alérgeno con la precipitación y la temperatura media, podemos observar que cuando se producen las precipitaciones más importantes (a finales de enero y principios de febrero) se detecta una disminución de la concentración de polen y un aumento de la concentración del alérgeno. Otros estudios<sup>37</sup> apuntan que cuando las condiciones meteorológicas no son favorables para la dispersión del polen (por ejemplo la presencia de lluvia durante el periodo de floración), la concentración de este disminuye mientras que la de alérgeno puede ser potencialmente más elevada. Este fenómeno podría explicar la aparición en nuestro estudio de estos importantes picos de proteína al comienzo de la floración de *Fraxinus* en momentos previos a los de las máximas concentraciones. Por el contrario, los picos de alérgeno registrados al final del periodo de muestreo pueden ser debidos a que, en ausencia de precipitación, se produce la deposición mecánica de los granos de polen en diversas superficies, y si la humedad relativa es elevada (como es el caso del presente año de estudio) podría tener lugar la liberación de proteínas desde el polen seco que debido a su pequeño tamaño podrían volver a resuspenderse en la atmósfera<sup>21,38,39</sup>. En este sentido, el análisis de

correlación realizado entre los alérgenos frente al polen y las principales variables meteorológicas apunta que las variables que mayor influencia tienen sobre la concentración de alérgeno son la concentración de polen, la humedad relativa y la precipitación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de componentes principales (PCFA), los cuales indican que la concentración de alérgeno está fuertemente influenciada por la presencia de polen, precipitaciones y la velocidad del viento<sup>31</sup>. Estudios realizados en el sur de la Península Ibérica ponen de manifiesto el papel del viento en cuanto a la dispersión del polen en la atmósfera<sup>40</sup>.

Con el fin de poder predecir los períodos de riesgo de alergia al polen de fresno teniendo en cuenta la presencia de alérgenos en la atmósfera, hemos desarrollado una ecuación de regresión. Al realizar la comprobación tanto gráfica como estadística entre los datos reales y los predichos por el modelo propuesto observamos que existe un gran ajuste entre ambos, de todos modos la potencia de este modelo de predicción aumentaría con un mayor número de datos, ya que este estudio se centra en un año de muestreo tratándose así de resultados preliminares, por lo cual con el objeto de obtener un modelo más ajustado sería necesario ampliar el estudio a años sucesivos.

## CONCLUSIONES

La presencia de polen de *Fraxinus* en la atmósfera puede ser detectada mediante el uso del alérgeno principal del olivo: Ole e 1. Nuestro estudio indica que la combinación de los recuentos polínicos y la cuantificación de alérgenos debe ser evaluada para estimar de forma fiable la exposición real de las personas sensibles. Las personas sensibles al polen de *Fraxinus* pueden tener momentos de riesgo de alergias en los periodos previos y posteriores a la aparición de concentraciones más elevadas de polen en la atmósfera, como consecuencia de condiciones atmosféricas especiales de lluvia y humedad durante la floración. Además, consideramos que sería necesario incluir un extracto de polen de la familia Oleaceae en los prick-tests de rutina para el diagnóstico de pacientes con sensibilización a Oleaceae en zonas del norte de España donde limitan las dos Regiones Biogeográficas más importantes presentes en la Península Ibérica.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del Proyecto 10 PXIB 383 251 PR, subvencionado por la Xunta de Galicia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Vara A, Fernández-González M, Aira MJ, Rodríguez-Rajo FJ. *Fraxinus* pollen and allergen concentrations in Ourense (South-western Europe). *Environmental Research* 2016; 147:241-8.
2. FRAXIGEN. Ash species in Europe: biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. Capítulo 1-3: Native ash species of Europe. Introduction to the taxonomy, distribution and uses of ash species in Europe. Oxford: Oxford Forestry Institute, University of Oxford, UK. 2005. pp 8-12.
3. Jato V, Rodríguez-Rajo FJ, Dacosta N, Aira MJ. Heat and chill requirements of *Fraxinus* flowering in Galicia (NW Spain). *Grana* 2004; 43:217-23.
4. Guerra F, Galán C, Daza JC, et ál. Study of sensitivity to the pollen of *Fraxinus* spp. Oleaceae in Córdoba, Spain. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 1995; 5(3):166-70.
5. Heinzerling LM, Burbach GJ, Edenharter G, et ál. GA(2)LEN skin test study I: GA(2)LEN harmonization of skin pricktesting: novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe. *Allergy* 2009; 64(10):1498-06.
6. Smith M, Jäger S, Berger U, et ál. Geographic and temporal variations in pollen exposure across Europe. *Allergy* 2014; 69(7):913-23.
7. Schmid-Grendelmeier O, Peeters AG, Wahl R, Wüthrich B. Zur Bedeutung der Eschenpollenallergie. *Allergologie* 1994; 11:535-42.
8. Hemmer W, Focke M, Wantke F, et ál. ASH (*Fraxinus excelsior*)-pollen allergy in central Europe: specific role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1. *Allergy* 2000; 55(10):923-30.
9. Poncet P, Senechal H, Clement G, et ál. Evaluation of ash pollen sensitization pattern using proteomic approach with individual sera from allergic patients. *Allergy* 2010; 65:571-80.
10. Baldo BA, Panzani RC, Bass D, Zerboni R. Olive (*Olea europaea*) and privet (*Ligustrum vulgare*) pollen allergens. Identification and cross-reactivity with grass pollen proteins. *Mol. Immunol.* 1992; 29:1209-18.
11. Kerneman SM, McCullough J, Green J, Ownby DR. Evidence of cross-reactivity between olive, ash, privet, and Russian olive tree pollen allergens. *Ann. Allergy* 1992; 69:493-6.
12. Obispo TM, Melero JA, Carpizo JA et ál. The main allergen of *Olea europaea* (Ole e 1) is also present in other species of the Oleaceae family. *Clin. Exp. Allergy* 1993; 23:311-6.
13. Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, et ál. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115:351-7.
14. Gastaminza G, Bartolome B, Bernedo N, et ál. Oleaceae pollen allergy in a place where there's no olive trees. *Alergol. Inmunol. Clin.* 2005; 20(4):131-8.
15. Niederberger V, Purohit A, Oster JP, et ál. The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with allergens from various plant species. *Clin. Exp. Allergy* 2002; 32:933-41.
16. Barderas R, Purohit A, Rodriguez R, et ál. Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: comparison of the natural and recombinant forms. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2006; 96:557-63.
17. Martínez-Cortizas A, Pérez-Alberti A. Atlas Climático de Galicia. Santiago Compostela: Xunta de Galicia ed., 1999.
18. Hirst JM. An automatic volumetric spore trap. *Ann. Appl. Biol.* 1952; 39:257-65.
19. Galán C, Cariñanos P, Alcázar P, Domínguez E. Spanish Aerobiology Network: Management and Quality Manual. Córdoba: University of Córdoba, 2007.
20. Takahashi Y, Ohashi T, Nagoya T, et ál. Possibility of real-time measurement of an airborne *Cryptomeria japonica* pollen allergen based on the principle of surface plasmon resonance. *Aerobiologia* 2001; 17:313-8.
21. Moreno-Grau S, Elvira-Rendueles B, Moreno J, et ál. Correlation between *Olea europaea* and *Parietaria judaica* pollen counts and quantification of their major allergens Ole e 1 and Par j 1-Par j 2. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2006; 96: 858-64.
22. Arilla MC, Eraso E, Ibarrola I, et ál. Monoclonal antibody-based method for measuring olive pollen major allergen Ole e 1. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2002; 89:83-9.
23. Tipping M, Bishop C. Probabilistic principal component analysis. *J. R. Stat. Soc. Ser. B (Stat Methodol)* 1999; 61:611-22.
24. Sabatier R, Lebreton JD, Chessel D. Principal component analysis with instrumental variables as a tool for modelling composition data. In: Coppi, R., Bolasco, S. (Eds.), *Multiway Data Analysis*. North-Holland: Elsevier Science Publishers B.V. 1989. pp. 341-52.
25. Latorre F, Bianchi MM. Relación entre aeropolen y vegetación arbórea en Mar del Plata (Argentina). *Polen* 1997; 8:43-59.
26. Peeters AG. Frost periods and beginning of the ash (*Fraxinus excelsior* L.) pollen season in Basel (Switzerland). *Aerobiologia* 2000; 16:353-9.
27. Weryszko-Chmielewska E, Puc M, Piotrowska K. Effect of meteorological factors on *Betula*, *Fraxinus* and *Quercus* pollen concentrations in the atmosphere of Lublin and Szczecin. *Pol. Ann. Agr. Env. Med.* 2006; 13:243-9.
28. Candau P, González Minero F, Romero F. Aero-palynology of *Fraxinus* (ASH) in an urban area of southwestern Spain. *Aerobiologia* 1994; 10:47-51.
29. Robledo-Retana T, Zenteno E, Agundis-Mata MC, et ál. Detection of immunogens from *Fraxinus* spp. pollen grains. *Aerobiologia* 2015; 31:403-10.
30. Rodríguez-Rajo FJ, Vega-Maray A, Asturias JA, et ál. The relationship between tapetum cells and microspores based on

- protein localization in *Fraxinus angustifolia* (Oleaceae) pollen grains. *Int. J. Plant Sci.* 2010; 171:34–52.
31. Vara A, Fernández-González M, Aira MJ, Rodríguez-Rajo FJ. Oleaceae cross-reactions as potential pollinosis cause in urban areas. *Sci. Total Environ.* 2016; 542:435–40.
  32. Cariñanos P, Alcázar P, Galán C, Domínguez E. Privet pollen (*Ligustrum sp.*) as potential cause of pollinosis in the city of Cordoba, South-west Spain. *Allergy* 2002; 57:92–7.
  33. Vara A, Fernández-González M, Jato V, et ál. Aeroallergens cross reaction detection among the *Oleaceae* family. Póster. 2nd International APLE-APLF Congress, Madrid: APLE-APLF; 2013.
  34. Rantio-Lehtimäki A, Viander M, Koivikko A. Airborne birch pollen antigens in different particles sizes. *Clin. Exp. Allergy* 1994; 24:23–8.
  35. de Weerd N A, Bhalla PL, Singh MB. Aeroallergens and pollinosis: molecular and immunological characteristics of cloned pollen allergens. *Aerobiologia* 2002; 18(2): 87-106.
  36. Suárez-Cervera M, Asturias J A, Vega-Maray A, et ál. The role of allergenic proteins Pla a 1 and Pla a 2 in the germination of *Platanus acerifolia* pollen grains. *Sex. Plant Reprod.* 2005; 18:101-12.
  37. Buters JTM, Weichenmeier I, Ochs S, et ál. The allergen Bet v. 1 in fractions of ambient air deviates from birch pollen counts. *Allergy* 2010; 65 (7):850-8.
  38. Knox RB. Grass pollen, thunderstorms and asthma. *Rev. Clin. Exp. Allergy* 1993; 23(5):354–59.
  39. Solomon W, Burge H, Muilenberg M. Allergen carriage by atmospheric aerosol.1. Ragweed pollen determinants in smaller micronic fractions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1983; 72:443–7.
  40. Silva Palacios I, Tormo Molina R, Muñoz Rodríguez AF. Influence of wind direction on pollen concentration in the atmosphere. *Int. J. Biometeorol.* 2000; 44(3):128–33.