

Recuento de pólenes

capítulo 23

F.J. Subiza Garrido-Lestache

INTRODUCCIÓN

Los pólenes fueron el primer agente descrito como capaz de inducir alergia en las vías respiratorias. Los trabajos vanguardistas de Charles Blackley en 1873 dieron a conocer al mundo que los pólenes de las gramíneas eran la causa de la fiebre del heno⁽¹⁾. Aunque posteriormente se ha podido comprobar que también otros pólenes pueden producir polinosis, en la actualidad siguen siendo las gramíneas las que, globalmente, originan más pacientes con fiebre del heno en casi todo el mundo, debido a su amplia distribución (20% de la superficie vegetal del planeta) y a la gran producción de pólenes aerovagantes y muy alergénicos que presentan no pocas de sus especies⁽²⁻⁵⁾.

En nuestro país, la escasa humedad media del aire que caracteriza a la España seca de clima continental (más de 2/3 de la península), condiciona una menor presencia de ácaros del polvo doméstico, siendo, por el contrario, la que presenta la mayor incidencia atmosférica de gramíneas⁽⁶⁻⁸⁾. Esto concuerda con la apreciación global de los alergólogos españoles, que consideran los pólenes, en esta extensa área de la España seca, como los alérgenos más importantes causantes de rinoconjuntivitis y asma bronquial^(9,10).

Por tanto, dada la gran relevancia clínica que presentan los pólenes, es importante para el alergólogo tener, al menos, conocimientos básicos sobre lo que es realmente un polen, de dónde procede y cómo se puede reconocer y contabilizar.

MORFOLOGÍA DE LA PLANTA

Entre los diferentes tipos de pólenes destacan los de las gramíneas como la principal causa de polinosis en España, es por ello que vamos a dedicar una líneas a la morfología de las plantas que la producen.

A la unidad floral de la gramínea se la denomina espiguilla. A las agrupaciones de espiguillas se las llama inflorescencias, las cuales pueden ser en forma de "panícula" (es decir, espiguillas acumuladas en el extremo distal de unas ramificaciones procedentes del eje de la inflorescencia o raquis (Figura 1), o bien las espiguillas pueden nacer directamente del raquis, denominándose entonces la inflorescencia "espiga" (Figura 2).

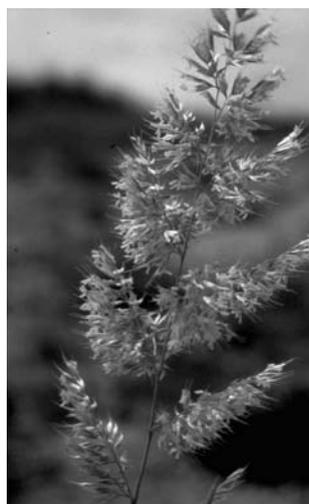


FIGURA 1. *Trisetum panicum*, panícula de 2-15 cm más o menos piramidal, amarillenta. Obsérvese la distribución de las anteras.



FIGURA 2. *Lolium perenne*, espiga recta de 4-20 cm. Espiguillas alternando a ambos lados del eje de la espiga. Cada espiguilla tiene 4-12 flores y una sola gluma. Obsérvese el detalle de las anteras.

Cada espiguilla tiene 1 ó 2 cubiertas (según la especie) llamadas glumas. Al abrirlas, vemos en el interior las flores, que varían de una (*Agrostis*) a más de media docena. Las flores nacen de un eje llamado raquilla (Figura 3).

Cada flor presenta dos cubiertas, una inferior (y exterior), llamada lema, y otra superior (e interna), llamada palea. Entre ambas se sitúan los órganos de reproducción, es decir, el pistilo y los estambres tratándose, por tanto, de flores bisexuales⁽¹¹⁾.

El pistilo o gineceo está formado por una protuberancia globosa, "el ovario", que presenta, en su parte superior, dos curiosos apéndices en forma de plumeros que corresponden a los estigmas. Cada estigma está unido al ovario mediante el estilo.

El androceo o aparato reproductor masculino está formado por los estambres, generalmente en número de tres, cada uno formado por un filamento que, en su extremo distal, presenta una antera, es decir, una especie de saquito con hendiduras lon-

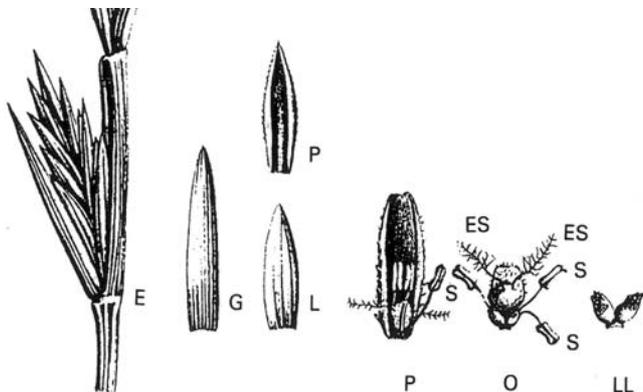


FIGURA 3. *Lolium perenne*; componentes de la espiguilla; E: Espiguilla; G: Gluma; L: Lema; P: Palea; ES: Estigma; O: Ovario; S: Estambre; LL: Lodículos. Por cortesía de González Bernáldez F. Gramíneas pratenses de Madrid. Madrid: Consejería de Agricultura y Ganadería; 1986.

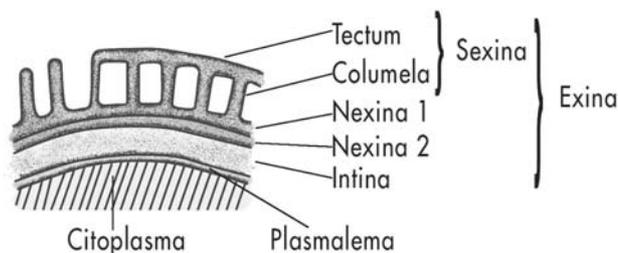
gitudinales y relleno de granos de polen. Los sacos de las anteras contienen un revestimiento secretor y un estrato de soporte o *tapetum*. El líquido tapetal, producido por este tejido, baña los granos de polen en desarrollo e intercambia sustancias metabólicas y antigénicas con ellos.

Los lodículos son unos globos situados en la base del ovario que, cuando se hinchan, entreabren la lema y la palea, permitiendo que las anteras salgan al exterior, quedando colgadas del filamento (Figura 3). A este momento se le denomina antesis (anteras colgando fuera de las flores) y constituye el periodo de floración de las gramíneas. A su vez, el aire seco y cálido (en general a primeras horas de la mañana) produce una rotura y retracción de esas hendiduras de las anteras, permitiendo que el viento disemine sus pólenes de forma aleatoria. La aerovagancia (flotabilidad en el aire) y la dispersión horizontal de los pólenes está condicionada por su densidad y tamaño. Por ej., el polen del *Zea mays*, con un diámetro de 122 μm , a pesar de ser producido en enormes cantidades (tan sólo una de sus anteras produce alrededor de 2.500 granos, una *espiguilla*, 15.000 granos y una *espiga*, de 2 a 5 millones), raramente puede encontrarse en concentraciones apreciables más allá de 0,5 km de su fuente de emisión⁽¹²⁾. Por el contrario, pólenes más pequeños (< 45 μm) como los géneros *Phleum*, *Lolium*, *Dactylis*, etc., pueden, parte de ellos, dispersarse con facilidad en varios kilómetros a la redonda.

MORFOLOGÍA DEL POLEN

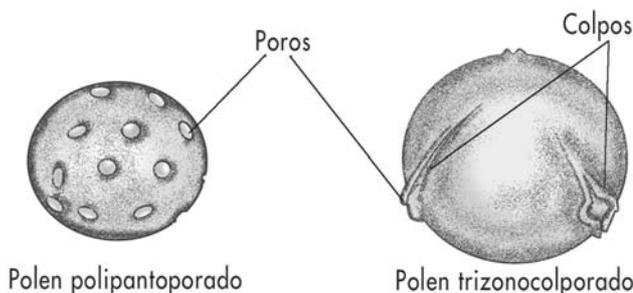
En el interior del grano, mediante el ME de transmisión, se distinguen dos células espermáticas y una célula vegetativa, cuya función es la de nutrir a las anteriores durante su estancia en el grano. Por tanto, el grano de polen resulta ser un receptáculo muy resistente, que asegura el transporte de esos gametofitos, desde las anteras de una flor hasta el estigma de otra, fenómeno al que se llama polinización.

Un grano de polen maduro está rodeado por una cubierta más o menos celulósica llamada **intina**, muy similar a la pared de una célula vegetal. Por fuera de esta se encuentra otra cubierta denominada **exina**, consistente en una sustancia lipóide llamada esporopolina. La **exina** se divide en una porción esculpida, llamada **sexina**, y una porción no esculpida, llamada **nexina**, la cual cubre la intina⁽¹³⁾.



Aperturas

La mayoría de los pólenes presentan aperturas ocasionadas por pequeñas pérdidas de continuidad de la exina. Hay dos principales tipos de aperturas: los poros y los colpos (hendiduras paralelas al eje polar). Los pólenes con un solo poro se denominan "porados" y, con un solo colpo, "colpados". Los que tienen a la vez un poro y un colpo en la misma apertura se denominan "colporados".



Los granos de polen se dividen en grupos según el número, posición y características de sus aperturas. El número de aperturas varía de 0 (inaperturado) a 70. En función de las aperturas, se denominan los pólenes mono- di- tri- tetra- penta- exa- o poli- (7 o más aperturas), seguidos de colpado, porado o colporado.

Si el poro y el colpo están presentes en el ecuador del grano reciben el prefijo "zono"; si, por el contrario, éstos están diseminados por toda la superficie, se aplica el prefijo "panto".

Forma y tamaño

Los pólenes generalmente son esféricos o elipsoides. Dentro de estos últimos, se denominan "prolados" cuando el diámetro polar es mayor que el ecuatorial (forma de melón) y "oblados" cuando el diámetro ecuatorial es mayor que el polar (forma de calabaza). (El diámetro polar va paralelo a los colpos.)

Según el diámetro del grano, se clasifican en: pólenes muy pequeños (< 10 μm), pequeños (10-24 μm), medianos (25-49

μm), grandes (50-99 μm), muy grandes (100-200 μm) y gigantes (> 200 μm).

Ornamentación

La sexina está formada por una capa externa (*tectum*) que se apoya en la capa interna (*nexina*) a través de unas columnas (báculos o columelas).

El polen puede presentar un *tectum* completo (grano tectado), parcialmente completo (grano semitectado) o completamente ausente (grano intectado).

SISTEMÁTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS GRANOS DE POLEN AL MICROSCOPIO ÓPTICO

Forma

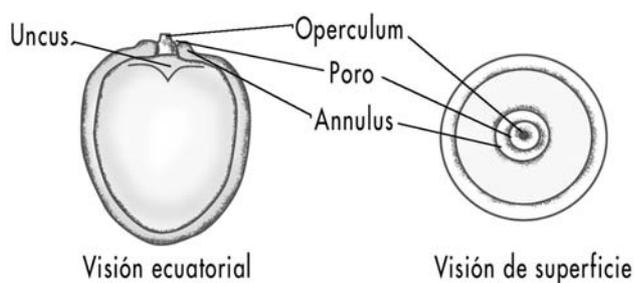
Esferooidal (*Olea*), prolado (*Castanea*), oblado (*Quercus*, *Platanus*, *Alnus*, *Corylus*).

Tamaño

La mayoría son medianos; es característico el pequeño tamaño del polen de *Castanea* y de las urticáceas.

Poros

Suelen estar cubiertos por una membrana. Por debajo del poro puede haber un vestíbulo formado por un repliegue de la intina, *uncus*, a veces muy convexo y profundo (*Corylus*). Por encima de la membrana se centra uno (gramíneas) o varios "opérculos" (*Chenopodium*). Los poros pueden presentar un engrosamiento en su borde *annulus* (gramíneas *Alnus*, *Betula* y *Corylus*). A veces el poro, con su membrana y su opérculo centrado, asemejan un ojo "ojo de delfín" (gramíneas) u "ojos del *Platanus*".



Colpos

Son las hendiduras que siguen al eje polar (parecido al espacio que dejamos al cortar una raja de melón). Su profundidad máxima se observa en "visión polar" (haz luminoso del microscopio, paralelo al eje polar) y enfocando el plano ecuatorial (sección óptica ecuatorial). Los colpos pueden ser:

Anchos (*Quercus*), estrechos (*Rumex*), triánguloaperturados (sobresalen hacia afuera [*Quercus pyrenaica*]), "trifosoaperturados" (quedan retraídos originando en visión polar una figura trilobulada [*Quercus ilex*]). Hay colpos anchos que tienen granulaciones en su interior (*Platanus*). Hay colpos estrechos y cor-

tos (*Fraxinus*) y estrechos y profundos (*Rumex*). El colpo puede terminar en una especie de pico (*Rumex*). Los colpos pueden destacar por tener un poro en el centro (*Castanea*, *Tilia*).

Exina

Se examina en visión de superficie.

La exina puede ser lisa "psilada" (gramíneas).

Con granulaciones: (Cupresáceas, *Quercus*).

Aspecto cerebroide (*Ulmus*) u ondulada (*Chenopodium*).

Forma de retículo "reticulada" (oleáceas). Las paredes del retículo se llaman *muri* y los espacios entre ellos, *lumina*. Pueden observarse las columelas en el corte sagital (sección óptica), que suele ser más evidente en la mitad de la intercolpia (superficie entre dos colpos) (*Artemisia*, oleáceas).

Claves para el reconocimiento de los pólenes alergénicos más importantes

Dentro de las cientos de familias de plantas existentes, sólo unas pocas engloban la mayoría de los pólenes alergénicos:

Betulaceae (*Betula*, *Alnus*, *Corylus*); Poaceae o Gramineae, Oleaceae (*Olea*, *Fraxinus*) Asteraceae o Compositae (*Artemisia*, *Ambrosia*), Urticaceae (*Parietaria*), Chenopo-Amaranthaceae (*Salsola*, *Chenopodium*, *Amaranthus*), Cupressaceae (*Cryptomeria japonica*, *Cupressus*, *Juniperus*, *Thuja*, *Taxus*), Platanaceae (*Platanus*), Plantaginaceae (*Plantago*), Polygonaceae (*Rumex*), Fagaceae (*Quercus*, *Castanea*) y Pinaceae (*Pinus*).

A continuación vamos a dar unas descripciones breves para el reconocimiento, no sólo de estos pólenes alergénicos al microscopio óptico, sino también de algunos más que presentan interés por su frecuencia en los recuentos⁽¹⁴⁻²²⁾.

Cupressaceae-Taxaceae

Forma: esferooidal.

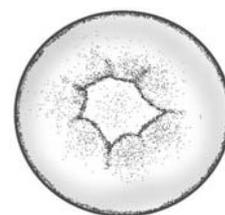
Tamaño: 19-38 μm (pequeño-mediano).

Aberturas: inaperturado o monoaperturado (el poro casi nunca se visualiza).

Exina: delgada, con gránulos finos y gruesos irregularmente esparcidos (**orbículos**) que pueden perderse con la madurez del grano.

Intina: muy gruesa, que puede llegar a 6 μm y que encierra un protoplasto con forma de **estrella**.

La exina puede romperse, saliendo el protoplasto envuelto en una intina que se hincha, haciéndose todavía más gruesa (asemejando un huevo frito).



Mercurialis

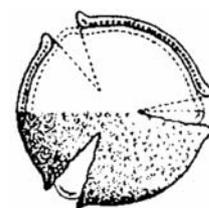
Forma: esferooidal.

Tamaño: 20-25 μm (pequeño).

Aberturas: trizonocolporado.

Exina: finamente reticulada. Suele engrosarse en los colpos.

Intina: fina, que se engruesa encima de los poros formando una membrana de 1,5 μm .



Corylus

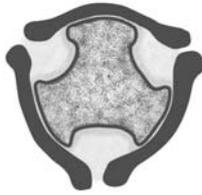
Forma: suboblado, triangular.

Tamaño: 20-26 μm (pequeño-mediano).

Aberturas: trizonoporado.

Exina: delgada, gránulos finos, **annulus poco marcados** (menos que los de la *Betula*).

Intina: delgada, **uncus muy marcados** (más que los de la *Betula*).

**Alnus**

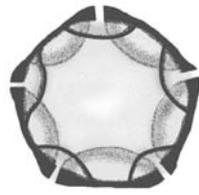
Forma: oblado.

Tamaño: 22-34 μm (pequeño-mediano).

Aberturas: pentazonoporado (aunque puede tener de 4 a 6).

Exina: fina con pequeñas granulaciones y **annulus gruesos**. La principal marca distintiva son los "arcs" (engrosamientos lineales de la superficie que van de poro a poro).

Intina: delgada, **uncus manifiestos**.

**Betula**

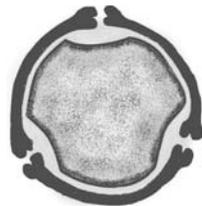
Forma: esferoidal.

Tamaño: 18-28 μm (pequeño-mediano).

Aberturas: trizonoporado (raramente 4).

Exina: delgada, con **annulus prominentes**, lisa o con pequeñas granulaciones.

Intina: delgada, **uncus menos profundos** que el *Corylus*.

**Acacia (mimosa)**

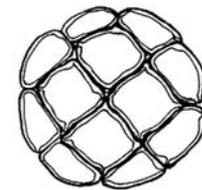
Forma: grano compuesto de 16 elementos (poliada), 8 de los cuales forman un cubo central rodeado de los 8 restantes. El grano tiene forma oblada o peroblada.

Tamaño: 25-52 μm (mediano grande).

Aberturas: inaperturado.

Exina: grosor medio, más en las angulaciones y pared externa.

Intina: delgada, más gruesa en las angulaciones.

**Ulmus**

Forma: esferoidal.

Tamaño: 26-30 μm (pequeño-mediano).

Aberturas: pentaporado (aunque puede tener de 4 a 7 poros).

Exina: grosor medio que aumenta en los poros. **Superficie cerebroide**.

Intina: gruesa de 2 μm que se hincha bajo los poros formando **uncus**.

Interior: se observan múltiples gránulos de almidón.

**Populus**

Forma: esferoidal.

Tamaño: 28-32 μm (mediano).

Aberturas: inaperturado.

Exina: finamente granulosa y fragmentada.

Intina: ancha, formando un espacio entre la exina y el citoplasma de 2 μm .

**Salix**

Forma: prolado o esferoidal.

Tamaño: 14-18 μm (pequeño).

Aberturas: tricollado.

Exina: reticulación grande que se incrementa en la intercolpia y se adelgaza según se aproxima a los colpos.

**Poaceae (gramíneas)**

Forma: esferoidal u ovoide.

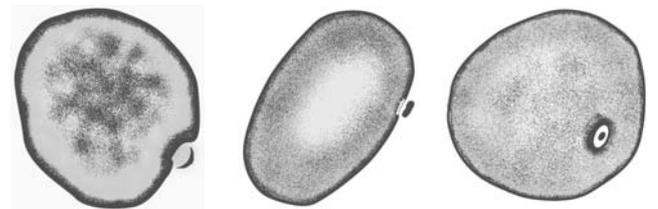
Tamaño: 22-80 μm (pequeño-grande).

Aberturas: monoporado con **opérculo grande** (ojo de delphin).

Exina: bastante fina, que se engruesa ligeramente en el poro (**annulus**). Superficie: lisa o con granulaciones finas.

Intina: (grosor variable, según especie).

Debe diferenciarse del Plantago (comprobar que sólo tiene un poro).

**Fraxinus**

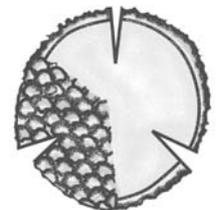
Forma: esferoidal.

Tamaño: 18-24 μm (pequeño).

Aberturas: tri-tetrazonocolpado, colpos estrechos.

Exina: **reticulada con báculos** y lumina (zona ecuatorial) algo más marcada en la intercolpia (heterobrochada).

Intina: fina con uncus.

**Olea**

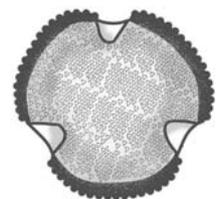
Forma: esferoidal.

Tamaño: 18-22 μm (pequeño).

Aberturas: trizonocolporado.

Exina: **reticulada** (más gruesa que el *Fraxinus*), **columelas muy visibles** y lumina del mismo tamaño (homobrochada).

Intina: fina con uncus.



Ligustrum

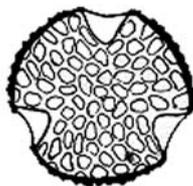
Forma: esferoidal.

Tamaño: 28-38 μm (mediano).

Aberturas: trizonocolporado.

Exina: gruesa, reticulada (más gruesa que la de la *Olea*), columelas muy visibles y lumina de diferentes tamaños (heterobrochada).

Intina: fina con uncus.

**Urticaceae (no es posible diferenciar la Parietaria de la Urtica)**

Forma: esferoidal.

Tamaño: 13-19 μm (pequeño).

Aberturas: trizonoporado (a veces 4).

Mínimo opérculo.

Exina: delgada y lisa, se tiñe poco.

Intina: delgada, uncus a veces poco visibles.

**Acer**

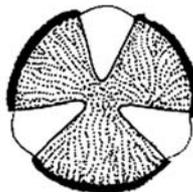
Forma: suboblado u oblado esferoidal, en visión polar subtriangular.

Tamaño: 28-32 μm (mediano).

Aberturas: trizonocolpado con colpos muy amplios con membrana lisa, dejando un campo polar muy pequeño.

Exina: gruesa con estrías finas.

Intina: fina.

**Platanus**

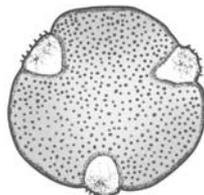
Forma: suboblado u oblado esferoidal.

Tamaño: 16-25 μm (pequeño).

Aberturas: trizonocolpado. Colpos cortos y muy amplios cubiertos de granulaciones.

Exina: fina con microrretículo difícil de ver al óptico.

Intina: grosor medio.

**Morus**

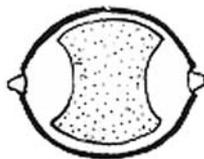
Forma: oblado.

Tamaño: 18-28 μm .

Aberturas: biporado, raramente triporado. Los poros alcanzan 4 μm de diámetro con opérculos de 2 μm .

Exina: fina, ligeramente granular.

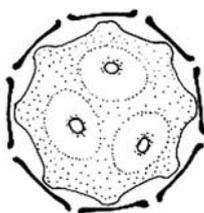
Intina: gruesa con uncus grandes.

**Juglans**

Forma: oblado esferoidal.

Tamaño: 35-39 μm (mediano).

Aberturas: 11-15 poros circulares o elípticos esparcidos mayoritariamente en uno de los hemisferios (distancia entre poros de 6-13 μm).



Exina: fina que se engruesa en los poros (Aspis).

Intina: fina con uncus grandes (9 x 2 μm).

Aesculus

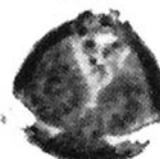
Forma: subprolado o prolado esferoidal.

Tamaño: 19-22 μm (pequeño).

Aberturas: trizonocolporado con colpos de 19 x 7 μm con membrana basal claveteada con 30-60 espinas de varios tamaños.

Exina: fina, ligeramente granular.

Intina: fina.

**Quercus**

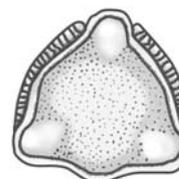
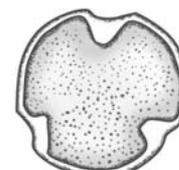
Forma: oblado.

Tamaño: 22-38 μm (pequeño-medio).

Aberturas: trizonocolpado, colpos muy anchos. A veces con protrusión, "trianguloaperturado" (*Quercus robur*, *Quercus pyrenaica*). Otras veces trizonocolporado, trifosoapertura (Quercus ilex).

Exina: gruesa con gránulos finos (encina) o gruesos (robles).

Intina: grosor medio.

**Phoenix**

Forma: prolado o esferoidal.

Tamaño: 16-20 μm (pequeño).

Aberturas: monocolpado.

Exina: lisa.

**Plantago**

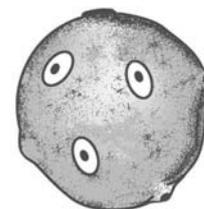
Forma: esferoidal.

Tamaño: 22-28 μm (pequeño-mediano).

Aberturas: poliporado (6 a 10 poros), repartidos asimétricamente por la superficie, opérculo grande.

Exina: delgada, verrugosa, *annulus* (similar al de las gramineas).

Intina: fina.

**Pinaceae**

Pinus:

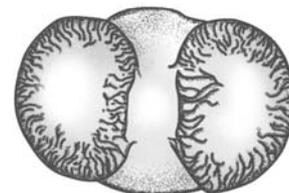
Forma: trilobulado debido a sus dos vesículas aéreas.

Tamaño: 60-80 μm (grande, aunque más pequeño que el abeto y el cedro).

Aberturas: monocolpado o inaperturado.

Exina: grosor medio con granulaciones medias.

Intina: grosor variable de 1,7-9,5 μm .



Rumex

Forma: esferoidal.

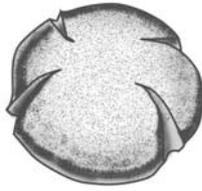
Tamaño: 20-24 μm (pequeño).

Aberturas: tri-tetrazonocolporado, colpos largos y muy estrechos (como cortes). Los poros son elongados y apenas se ven. Entre un colpo y otro la superficie es algo saliente dando la impresión de "colpos enterrados".

Exina: grosor medio, micro reticulada. Engrosamiento de la exina al final del colpo.

Intina: muy delgada.

Son muy características las formaciones granulosas esféricas y gruesas del protoplasto.



Exina: lisa, gruesa, que se engruesa más en las aberturas.

Intina: delgada, forma uncus convexos.

Tilia

Forma: suboblado trifosaperturado.

Tamaño: 30-32 μm (mediano).

Apertura: trizonocolporado, con colpos profundos y poros grandes de aspecto elíptico que pueden llegar hasta las 6 μm .

Exina: lisa, muy gruesa, que se engruesa más en las aberturas.

Intina: delgada con uncus.

**Ericaceae**

Tienen la característica de formar tétradas con diámetros variables según la especie *Calluna* (brezo común), *Erica terminalis* (brecina) *Arbutus* (madroño).

Calluna:

Forma: tetrada tetraédrica.

Tamaño: 34-40 μm (mediano).

Apertura: 3 colpos en el polo distal, cada uno con un poro en el centro.

Exina: media que se engruesa en los colpos.

Intina: delgada.

**Carex**

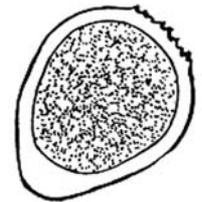
Forma: de pera.

Tamaño: medio, 27 x 37 ó 35 x 45 según la especie.

Apertura: inaperturado.

Exina: fina, que se engruesa en su circunferencia, formando intervalos que dan un aspecto poroide por donde habitualmente se rompe para emitir el tubo polínico. Uno en la base y 3 en los lados.

Intina: delgada que se engruesa en el ápex (zona más estrecha).

**Castanea**

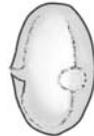
Forma: prolado (radio 2:1).

Tamaño: 10-13 μm , pequeño (todavía más pequeño que la *Urtica*).

Apertura: trizonocolporado.

Exina: delgada y lisa, por lo que se tiñe poco.

Intina: delgada.

**Chenopo-Amaranthaceae**

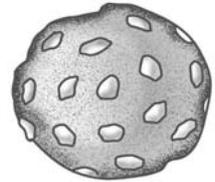
Forma: esferoidal.

Tamaño: 10-28 μm (pequeño-mediano).

Apertura: polipantoporado de 40-70 poros ("pelota de golf"), micro opérculo.

Exina: grosor medio, ondulada con granulaciones finas.

Intina: delgada.

**Typha**

Forma: tétradas cuadradas, a veces romboidal, lineal o en forma de T.

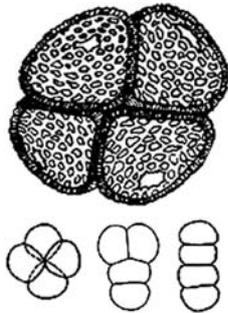
Grano esferoidal aunque a veces deformado por la contigüidad.

Tamaño: 17-25 μm (pequeño).

Apertura: monoporado, poro irregular situado en la cara externa.

Exina: delgada, reticulada, con annulus.

Intina: delgada con uncus.

**Artemisia**

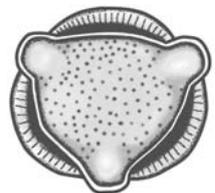
Forma: esferoidal u oblado esferoidal de aspecto triánguloaperturado.

Tamaño: 18-24 μm (pequeño).

Aberturas: trizonocolporado, colpos y poros grandes con protrusión de la intina.

Exina: exina gruesa de 3 μm (báculos largos en la intercolpia) que se adelgaza en los colpos, lo que le da su típico aspecto (en visión polar) de "tres medias lunas" formando un círculo. Superficie finamente granulada y microequinada.

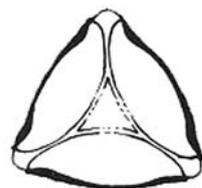
Intina: delgada.

**Eucalyptus**

Forma: suboblado triangular con lados cóncavos, ángulo aperturado.

Tamaño: 20-24 μm , pequeño.

Apertura: trizonocolporado (a veces 4) con colpos largos que pueden confluir entre ellos en el área polar determinando una característica zona clara (apocolpio triangular).

**Ambrosia**

Forma: esferoidal.

Tamaño: 22-24 μm (pequeño).

Aberturas: trizonocolporado.

Exina: grosor medio, superficie granulada y espinulada (espinas cortas de 1 a 3 μm).

Intina: fina.



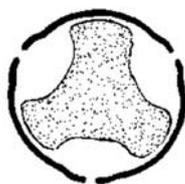
Casuarina

Forma: esferoidal.

Tamaño: 22-26 μm (pequeño).

Aberturas: trizonoporado con uncus muy marcados de 22-26 μm .

Exina: finamente verrugosa.

**COLECTORES DE PÓLENES****Método gravimétrico**

La captación de pólenes de la atmósfera se ha venido realizando desde 1946 con los métodos gravimétricos, sobre todo el preconizado por *Durham*, que fue aceptado en su día por la mayoría de los países.

Este método se basa en poner un porta horizontal con un medio de impactación donde, por deposición gravimétrica quedan atrapados los pólenes. No obstante, su eficiencia de captación sólo es buena para partículas $> 20 \mu\text{m}$, siendo mala para las esporas y pólenes pequeños, como los del castaño (*Castanea*) o las urticáceas (*Parietaria*, *Urtica*) que, por el contrario, suelen sobrevolar el porta en lugar de quedar impactados. La velocidad del viento también es un serio inconveniente ya que, al aumentar ésta, la deposición resulta empobrecida⁽²³⁾.

Método volumétrico

Para obviar estos inconvenientes, Hirst ideó el método volumétrico con sistema de aspiración⁽²⁴⁾. El aparato *Burkard seven day volumetric spore-trap*[®] se basa en estos principios y consta de una cámara de admisión de aire con un débito de 10 litros por minuto, a través de una hendidura que tiene 14 milímetros de largo por 2 mm de ancho y que está siempre frente a la dirección del viento gracias a que va montado sobre una veleta. La fuente de aire aspirada se enfrenta a una cinta transparente colocada en un tambor y que previamente se ha embadurnado con vaselina. La hendidura está muy próxima a la cinta (0,6 mm), quedando impactados sobre la capa de vaselina que recubre la mayoría de los corpúsculos atmosféricos $> 1 \mu\text{m}$. La cinta se desplaza en el sentido de la agujas del reloj a una velocidad de 2 mm/hora (48 mm/24 horas) y durante un máximo de 7 días seguidos.

Las ventajas sobre los aparatos gravimétricos (*Durham*) son:

- Se conoce exactamente el volumen de aire examinado.
- Tiene una mejor eficiencia para captar partículas pequeñas ($< 20 \mu\text{m}$).

Las ventajas sobre el *rotating-arm impactor Rotorod*[®] (un colector volumétrico muy utilizado en los EE.UU.) son:

- Tiene una mejor eficiencia para captar partículas pequeñas ($< 10 \mu\text{m}$).
- La eficiencia de captación no disminuye con el paso del tiempo de muestreo (en el Rotorod esta eficiencia va disminuyendo según se van almacenando las partículas en los brazos giratorios)⁽²⁵⁾.

RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA REALIZACIÓN DE LOS RECIENTOS

En Europa se han publicado unas recomendaciones para realizar los recuentos de pólenes atmosféricos con el objetivo de que los recuentos sean comparables de unas áreas a otras⁽²⁶⁾.

Colector

Volumétrico: Burkard[®] o Lanzoni[®].

Flujo a 10 L/min (comprobar calibración).

Altura de muestreo: 10-20 metros sobre el nivel del suelo.

Situación: lejos de edificios altos colindantes u otros obstáculos, así como de árboles muy próximos u otras fuentes de polen local.

En la metodología debe describirse brevemente el área donde se ha situado el colector (urbana, rural, así como la vegetación local y el clima).

Medio de impactación

No hay preferencias (glicerina o gelvatol).

Coloración

No hay preferencias (fuchina básica o safranina).

Microscopia

Magnificación 400x (objetivo 40x, ocular 10x).

La resolución del objetivo es directamente proporcional a su AN (apertura numérica).

Comprobar que en el objetivo 40x la AN $\geq 0,65$ (va grabada en el objetivo).

Examen de la preparación (porta)

Puede elegirse entre:

Al menos 3 barridos longitudinales.

Al menos 12 barridos transversales.

Al menos 50 campos elegidos al azar.

Los resultados deben ser dados en medias diarias de granos de polen por metro cúbico de aire.

Tiempo

En áreas mediterráneas: desde el 1 de enero al 31 de diciembre.

Resto de Europa: desde el 1 de enero al 30 de septiembre.

Transferencia de los recuentos: semanalmente.

Selección de los tipos polínicos

Requerimientos mínimos de selección:

Alnus, *Corylus*, *Cupressaceae/Taxaceae*, *Betula*, *Poaceae*, *Olea*, *Urticaceae*, *Artemisia*.

Selección incrementada (recomendado):

Fraxinus, *Platanus*, *Pinus*, *Quercus*, *Castanea*, *Rumex*, *Plantago*, *Chenopodiaceae/Amaranthaceae*.

No obstante, cualquier tipo polínico adicional siempre es apreciado.

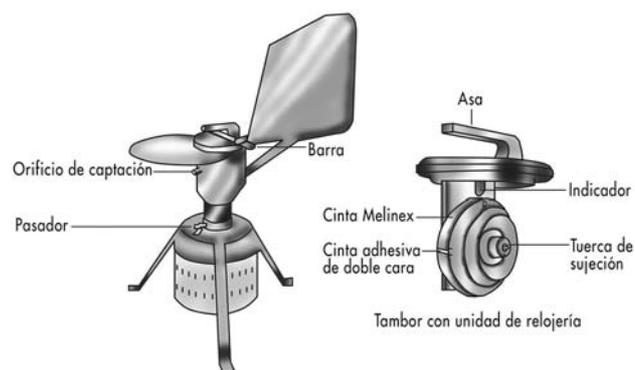
RECuentos de Pólenes usando el Burkard SEVEN-DAY RECORDING VOLUMETRIC SPORE TRAP®

A continuación se expone la técnica para la realización de los recuentos, utilizando el colector volumétrico de la casa Burkard, modelo *seven-day recording volumetric spore trap*®.

Extracción del tambor

1. Fijar el captador con el **pasador** para evitar que éste se mueva con el viento mientras extraemos el tambor.
2. Presionar la **barra** que se encuentra en la parte superior del captador y liberar la ranura, entonces puede girarse 180° en el sentido de las agujas del reloj.
3. Levantar el **asa negra**, extrayendo el tambor y la unidad de relojería del captador. El tambor debe cogerse por la pestaña dentada, para no manchar la superficie de captación.

La circunferencia del tambor es de 345 mm, dado que éste se desplaza a una velocidad de 2 mm cada hora (48 mm/día, 336 mm/semana), a los 7 días quedan sólo 9 mm (4,5 horas) antes de que comiencen a superponerse las capturas de pólenes.



Preparar la superficie de captación

1. Colocar el tambor en el soporte y ajustar la **tuerca de sujeción**.
2. Pegar transversalmente en el tambor en la posición **B** una **cinta adhesiva de doble cara**.
3. Colocar alrededor del tambor un trozo de **cinta Melinex** de 345 mm, pegando ambos extremos en la cinta adhesiva, sin que éstos se superpongan. Si la superficie de captación la queremos para sólo un día (48 mm), puede utilizarse un trozo menor por eje, de unos 90 mm, se adhiere bien al tambor y se pega el extremo inferior abajo (recordar que el tambor gira en sentido horario).
4. Extender la vaselina con un pincel plano de nailon o la punta del dedo sobre la cinta Melinex®. Es esencial que la capa sea fina, ya que una capa gruesa puede ensuciar la cara interna del orificio de captación.

Reposición del tambor

1. Dar cuerda al reloj.
2. Sujetando el tambor por la pestaña dentada, centrarlo sobre el eje del reloj y presionar para encajarlo en el mismo. Girar

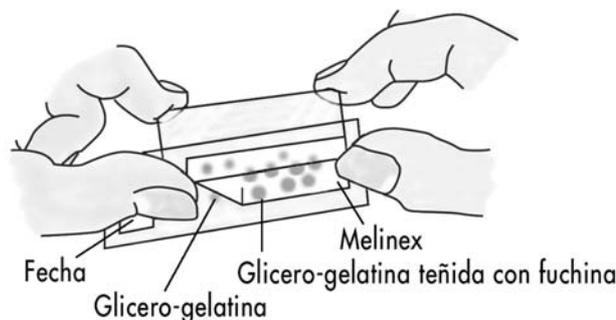
el tambor hasta que la marca roja (R) coincida con el **indicador** situado bajo la parte superior de la unidad. Apretar la **tuerca de fijación** en esta posición; la marca verde (G) "posición inicial" se situará en el centro del orificio de captación; si el reloj tiene toda su cuerda y está bien ajustado a los 7 días, será la marca negra (F), "posición final", la que estará situada en el centro del orificio de captación.

3. Introducir la **unidad (tambor-reloj)** en el captador. Poner la **barra** de fijación superior en su ranura y quitar el pasador de inmovilización.



Diseción y montaje de la cinta

1. Sustener el tambor en la mano izquierda por la pestaña dentada y utilizar una cuchilla para levantar la esquina de la cinta Melinex® y separar la cinta con cuidado de no mancharla ni tocarla y asegurándose de que la **posición inicial (G)** se coloca a la izquierda de la regla de metacrilato.



2. Cortar la cinta en trozos de 48 mm guiándose por las marcas presentes en la regla.
3. Poner unas gotas de glicerogelatina a 40 °C sobre el porta.
4. Colocar el trozo de cinta de 48 mm sobre el porta.
5. Poner unas gotas de glicerogelatina teñida con fuchina sobre la cinta Melinex®.
6. Poner el cubre y presionar *muy ligeramente* para extender las gotas y eliminar las burbujas de aire. Los granos de polen tardan en teñirse unos 30-60 minutos.
7. Los bordes de la preparación se sellan con pegamento Imedio®.
8. Poner una etiqueta en el porta con la fecha correspondiente a la exposición.

Glicerogelatina

- Gelatina 4 g
- H₂O 42 mL
(Poner al baño María a 80 °C hasta que se funda, luego añadir).
- Glicerina 50 mL

Solución de fuchina 0,5%

- Fuchina básica 1 g
- Etanol 96% 100 mL
- H₂O 100 mL

Glicerogelatina teñida con fuchina

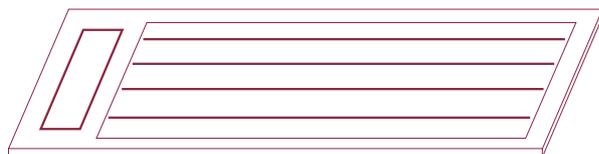
Poner 3-4 gotas de la solución de fuchina 0,5% en 10 mL de glicerina *jelly*.

Opcionalmente puede añadirse en la glicerina fenol al 1% como conservante.

Guardar la glicerogelatina con y sin fuchina repartida en varios goteros pequeños (como los de las pruebas cutáneas) para evitar excesivos recalentamientos. Si se va a almacenar durante largo tiempo es mejor guardarla en nevera.

Recuento

1. Colocar el porta en el microscopio.
2. Las lecturas se hacen usando el objetivo 40x.
3. Hacer 4 barridos longitudinales de 48 mm (lo que representa aproximadamente el 12% del área impactada). El número de pólenes contados en estos 4 barridos se multiplica por el factor de conversión 0,55 lo cual nos da el número medio de granos de polen por m³ de aire/24 horas.



4 barridos de 48 mm

4. Los granos de polen deben examinarse en visión de superficie y sección óptica.

¿Cómo se obtiene el factor de conversión?**1. Cálculo del área de cinta correspondiente a 1 m³ de aire**

Dado que conocemos el volumen de aspiración del colector y el desplazamiento de la cinta, es posible calcular el área que corresponde a un metro cúbico de aire.

Sabemos que el débito de aspiración es de 10 L/min (0,01 m³/min).

En 2 mm de cinta (60 min de aspiración), se impactarán 60 x 0,01 = 0,6 m³ de aire.

En 3,33 mm se impactarán 1 m³ de aire. Lo que corresponde a un área de 3,33 mm x 14 mm = 46,62 mm².

2. Obtención del diámetro de apertura de la lente 40x

El diámetro de apertura de nuestro objetivo es de 0,44 mm aunque este puede variar de una firma a otra y, aun dentro de las mismas, hay diferentes aberturas según el objetivo que se adquiera. Si el manual del microscopio no aporta el diámetro de apertura, éste puede calcularse con un portaobjetos con un retículo en micras, de los empleados en anatomía patológica.

3. Cálculo del área examinada de un día

Si el campo de apertura del objetivo (40x) es de 0,44 mm, el área de cinta correspondiente a un 1 barrido de un día será:

$$0,44 \text{ mm} \times 48 \text{ mm} = 21,12 \text{ mm}^2.$$

Como hacemos 4 barridos, será 0,44 mm x 48 mm x 4 = 84,48 mm².

4. Cálculo del factor de conversión

$$\frac{46,62 \text{ (área de impactación de 1 m}^3 \text{ de aire)}}{84,48 \text{ (área examinada de un día)}} = 0,55$$

El número de granos observados en los cuatro barridos x 0,55 nos da, por tanto, la concentración media en 24 horas del número de granos de pólenes/m³ de aire.

Material de laboratorio

- Portaobjetos 76 x 26 x 1 mm
 - Cubre-objetos 24 x 50 mm
 - Gelatina 1 litro
 - Fuchina básica Frasco 25 g
 - Glicerina 1 litro
 - Vaselina filante 250 g
 - Alcohol etílico 96° 1 litro
 - Caja portapreparaciones microscópicas Cajón para 365 portas 16 x 22 mm
 - Etiquetas pequeñas 16 x 22 mm
 - Baño termostático
 - Microscopio con una buena resolución, no inferior a 0,65 (objetivo 40x)
- (Utilizar productos de alta calidad, por ejemplo, de los laboratorios MERK® o PROBUS®.)

Material de la casa Burkard

- *Seven-Day Recording Volumetric Spore Trap.*
- *Melinex tape.*
- *Double sided tape.*

El material de la casa Burkard se puede solicitar a:

Burkard Manufacturing Co Ltd

Woodcock Hill Industrial Estate, Rickmansworth, Hertfordshire WD3 1PJ, England.

Tlfno: 07 44 1923 773134 - Fax: 07 44 1923 774790

http://www.burkard.co.uk/7dayst.htm

O bien a su distribuidor en España:

Anafil. Aldebarán 57, Madrid 28130

Tlfno: 916202571 - Fax: 916202642

PÓLENES EN INTERNET (ORIGEN DE WWW.POLENES.COM)

El PC propiamente dicho, es decir, el "ordenador personal" (*personal computer*) aparece en el mercado en 1981 y, apenas 2 años después, nace Internet (ARPANET se separa de la red militar que la originó). No obstante, tienen que pasar más de 14 años para que la RED llegue a España y es a partir de ese

momento cuando el Comité de Aerobiología de la SEAIC enseñada comprende el potencial de INTERNET para la difusión de los recuentos polínicos, creando su primera página WEB (www.polenes.com) en 1995⁽²⁷⁾.

Esta *web*, que se adelantó incluso en algunos años a la aparición de la propia *web* de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (www.seaic.com), Sociedad científica a la que pertenece el Comité de Aerobiología, resulta ser pionera en su diseño y contenido, presentando los recuentos de más de 20 colectores repartidos por toda España. El acceso a su base de datos es libre y gratuito y pueden obtenerse los recuentos, tanto en forma de gráficos, como en datos numéricos. Pueden observarse recuentos realizados desde el día anterior a históricos de más de 20 años así como datos comparativos de unas ciudades a otras⁽²⁸⁾. Otras redes importantes son www.rea.com (recuentos de España), www.polleninfo.org (recuentos de Europa) y www.aaaai.org/nab (recuentos de los EE.UU.).

BIBLIOGRAFÍA

- Blackley CH. Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay fever or asthma). London: Balliere, Tindall & Cox; 1873.
- Wodehouse RP. Hay fever plants. New York: Hafner Publishing Co.; 1971.
- Lewis WH, Vinay P, Zenger VE. Airborne and allergenic pollens of North America. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press; 1983. p. 105-27.
- Charpin J, Surinyach R. Atlas of European allergenic pollens. Paris: Sandoz; 1974.
- D'Amato, Spieksma FThM, Bonini S. (eds). Allergenic pollen and pollinosis in Europe. London: Blackwell Scientific Publications; 1991.
- Subiza E, Subiza J, Jerez M. Árboles, hierbas y plantas de interés alérgico en España. En: Tratado de Alergología e Inmunología Clínica. Vol IV. Madrid: Luzán; 1986. p. 257-366.
- Subiza E, Subiza J, Jerez M. Aerobiología de las gramíneas en los climas de España. Rev Esp Alergol Inmunol Clín 1989; 4: 45-50.
- Subiza J, Jerez M, Subiza E. Introducción a la aerobiología de las gramíneas. Rev Esp Alergol Inmunol Clín 1992; 7: 151-61.
- Libro blanco; las enfermedades alérgicas en España. Madrid: Bencard; 1983. p. 64-5.
- Sastre J et al, eds. Rinitis, conjuntivitis. Alergológica. Madrid: SEAIC-Lab. Alergia e Inmunología Abelló. 1994. p. 63-79.
- González Bernaldez F. Gramíneas pratenses de Madrid. Madrid: Consejería de Agricultura y Ganadería; 1986.
- Grasses and Grasslike plants. En: Airborne and allergenic pollens of North America, WH, Vinay P, Zenger VE (eds). Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press; 1983. p. 105-27.
- Accorsi CA, Bandini M, Romano B. Allergenic pollen: Morphology and Microscopic photographs. En: D'Amato G, Spieksma FThM, Bonini S, eds. Allergenic pollen and pollinosis in Europe. London: Blackwell Scientific Publications; 1991. p. 24-35.
- Hyde HA, Adams KF. An atlas of airborne pollen grains. London: MacMillan; 1958.
- Grant Smith Sampling and Identifying Allergenic Pollens and Molds: An Illustrated Identification Manual for Air Samplers. DHS 2000.
- Gregory PH. Microbiology of the Atmosphere, 2nd ed. Leonard Hill: Aylesbury; 1973.
- Odgen EC, Raynor GS, Hayes JV. Manual for sampling airborne pollen. New York: Hafner Press; 1974.
- Dalmau JM. Estudios palinológicos (tesis doctoral). Barcelona: Facultad de Farmacia; 1957.
- Subiza E, Subiza J, Jerez M. Árboles, hierbas y plantas de interés alérgico en España. En: Tratado de Alergología e I. C. Madrid: Luzán; 1986. p. 257-365.
- Basserr IJ, Crompron CW, Ph Melee JA. An atlas of airborne pollen grains and common fungus spores of Canada Hull, Quebec, Canada: Minister.
- Nilsson S, Praglowski J, eds. Erdtman's handbook of palynology. 2nd ed. Copenhagen, Denmark: Munksgaard; 1992.
- Kapp RO. How to know pollen and spores. Dubuque, IA: William C Brown Co Publishers, 1969 of Supply and Services Canada; 1978.
- Ranthio A. Sampling airborne pollen and pollen antigens. En: D'Amato G, Spieksma FthM and Bonini S, eds. Allergenic pollen and pollinosis in Europe. London: Blackwell Scientific Publications; 1991. p. 18-23.
- Hirst JM. An automatic volumetric spore trap. Ann Appl Biol 1952; 39: 257-65.
- Bush RK. Aerobiology of pollen and fungal allergen. J Allergy Clin Immunol 1989; 84: 1120-4.
- Jäger S. Recommendations for methodology for routinely performed monitoring of airborne pollen. En: Basomba A y Sastre J, eds. Postgraduate courses and practical workshops; Syllabus. Valencia: ECACI 95; 1995. p. 329-30.
- Martínez-Cóccera C, Villalón García AL. Pasado, presente y futuro de los recuentos de pólenes de la SEAIC. Rev Esp Alergol Inmunol Clín 2003; 18 (extraordinario nº 3): 1-4.
- Subiza J. Pólenes en Internet. Utilidad Clínica de www.polenes.com. En: Polinosis II. Valero AL y Cadaña, eds. Barcelona: MRA ediciones SL-Lab Menarini 2005. p. 197-205.