

# Correlación entre los síntomas diarios de polinosis, recuentos de pólenes y recuentos de Phl p 1 y 5 en la atmósfera de Madrid

Martha Cabrera Sierra<sup>1,2</sup>, Javier Subiza<sup>1</sup>, José Ignacio Tudela<sup>3</sup>, Bárbara Cases<sup>3</sup>, Enrique Fernández-Caldas<sup>3</sup>, Stella Moreno-Grau<sup>4</sup>, María Suárez Cervera<sup>5</sup>, Eva Fernández<sup>3</sup>, María José Narganes<sup>1</sup>, José Luis Subiza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Clinica Subiza.* <sup>2</sup>*Hospital los Madroños, Brunete, Madrid.* <sup>3</sup>*Inmunotek SL, Madrid.* <sup>4</sup>*Departamento de Ingeniería Ambiental y Química. Universidad Politécnica de Cartagena.* <sup>5</sup>*Departamento de Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona*

## INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que los síntomas de los pacientes sensibilizados a pólenes se correlacionan con el respectivo recuento de granos. Sin embargo, diferentes estudios han confirmado la presencia de actividad alérgica aerovagante fuera del periodo de polinización.

Por ello, se ha sugerido que el recuento de pólenes no contempla el total de la exposición alérgica. Este hecho indica que existen otras fuentes de alérgenos además de los granos de polen, pudiendo constituir una carga alérgica relevante.

Los métodos inmunoquímicos para valorar la exposición alérgica tienen en cuenta la contribución de alérgenos con reactividad cruzada y otras fuentes de alérgenos en partículas micrónicas.

Las técnicas de muestreo cuantitativo de granos de polen nos han llevado a conocer mejor la distribución e importancia clínica de estos alérgenos naturales. En Madrid, atendiendo a los taxones de mayor relevancia clínica en esta área geográfica, para facilitar su comprensión se ha dividido el año en 4 periodos: noviembre-marzo, donde se detectan en la atmósfera fundamentalmente pólenes de la familia Cupressaceae; abril, prevalece el plátano de sombra, mayo y junio, fundamentalmente las familias Poaceae y Oleaceae y julio-octubre las Chenopodiáceas-Amarantáceas.

A pesar de que generalmente se relaciona el comienzo y la gravedad de las manifestaciones alérgicas respiratorias con la aparición y persistencia en el aire de los diferentes tipos de granos de polen o tipos polínicos, un parámetro mucho más relevante es conocer la cantidad real de alérgeno presente en la atmósfera en un momento determinado.

El significado clínico de pequeñas partículas portadoras de alérgenos de plantas ha generado un debate importante en los últimos años. La existencia de estas partículas alérgicas se ha demostrado para diversos grupos de plantas. Éstas pueden ser detectadas antes de la estación polínica y pueden persistir después de la polinización, contribuyendo a la carga total de alérgenos.

Estas partículas alergénicas se encuentran dentro de las dimensiones respirables, de tal manera que pueden penetrar profundamente en la vía aérea y provocar una crisis de asma. Sin embargo, poco se sabe sobre su prevalencia en la atmósfera, su variación geográfica y temporal y su composición química detallada.

De forma similar, el origen exacto de este aerosol atmosférico es desconocido pero se han propuesto varios mecanismos, interviniendo como variables la climatología, el hábitat y la contaminación:

- Reactividad cruzada entre pólenes relacionados o no taxonómicamente.
- Contribución de otras partes de la planta como hojas y tallos.
- Gránulos de almidón procedentes de granos de polen liberados en condiciones de humedad tras su ruptura.
- Orbículos procedentes del revestimiento de las anteras y del propio grano de polen.
- Alérgenos transportados en los mismos granos de polen.
- Alérgenos transportados por partículas formadas de forma natural en el ambiente (microgotas de agua).
- Alérgenos transportados por partículas de la contaminación.

Aunque el recuento de granos de polen es una herramienta de trabajo imprescindible para los alergólogos, ya que permite confirmar o identificar los tipos causantes de polinosis en cada una de las áreas geográficas, las evidencias señaladas llevaron, ya en el año 1994, a Rantio-Lehtimäki et al., a precisar que los hechos descritos anteriormente demandaban un esfuerzo a los aerobiólogos, encaminado al desarrollo de nuevos métodos para la cuantificación de los aeroalérgenos presentes en el aerosol atmosférico.

En los últimos años, uno de los campos más atractivos de investigación básica en alergología es el relacionado con la técnicas de muestreo y detección inmunoquímica de pequeñas partículas en la atmósfera para la cuantificación de su actividad alergénica, con el fin de conocer la carga total de alérgenos frente a la cual están expuestos los pacientes sensibilizados y para el desarrollo de un método rápido y asequible que pueda ser aplicado rutinariamente para complementar la información del recuento de polen. Esto es especialmente importante en los días húmedos cuando el recuento de polen no da una buena indicación del contenido alergénico del ambiente.

## OBJETIVO

Analizar la correlación entre los granos de polen de gramíneas y las concentraciones de Phl p 1 y p Phl p 5 en la atmósfera de Madrid, desde el 23/3/2009

hasta el 27/7/2010 y establecer su asociación con los síntomas de rinoconjuntivitis y/o asma en pacientes con sensibilización clínica a pólenes de gramíneas.

## MÉTODOS

Se utilizaron un Burkard 7 day spore trap y un Burkard Cyclone sampler para el recuento de pólenes y aeroalérgenos, respectivamente (Fig. 1). Las muestras de aerosol recogidas con el captador ciclónico en los tubos Eppendorf (Fig. 2) se sometieron a un proceso de extracción basado en el método propuesto por Takahashi et al. El extracto es separado por centrifugación.

La cuantificación de Phl p 1 y Phl p 5 se realizó mediante técnica ELISA doble fase. La población de estudio incluyó 181 pacientes con polinosis, cuyos síntomas y medicación se registraron diariamente durante todo este periodo con una cartilla electrónica (Alercon). Se consideró la influencia de las variables meteorológicas y de contaminación. Se utilizaron coeficientes de regresión lineal de Pearson, siendo significativo una  $p < 0,05$ .



Fig. 1. Captador de pólenes tipo Burkard a la derecha y captador de alérgenos Burkard ciclón a la izquierda.

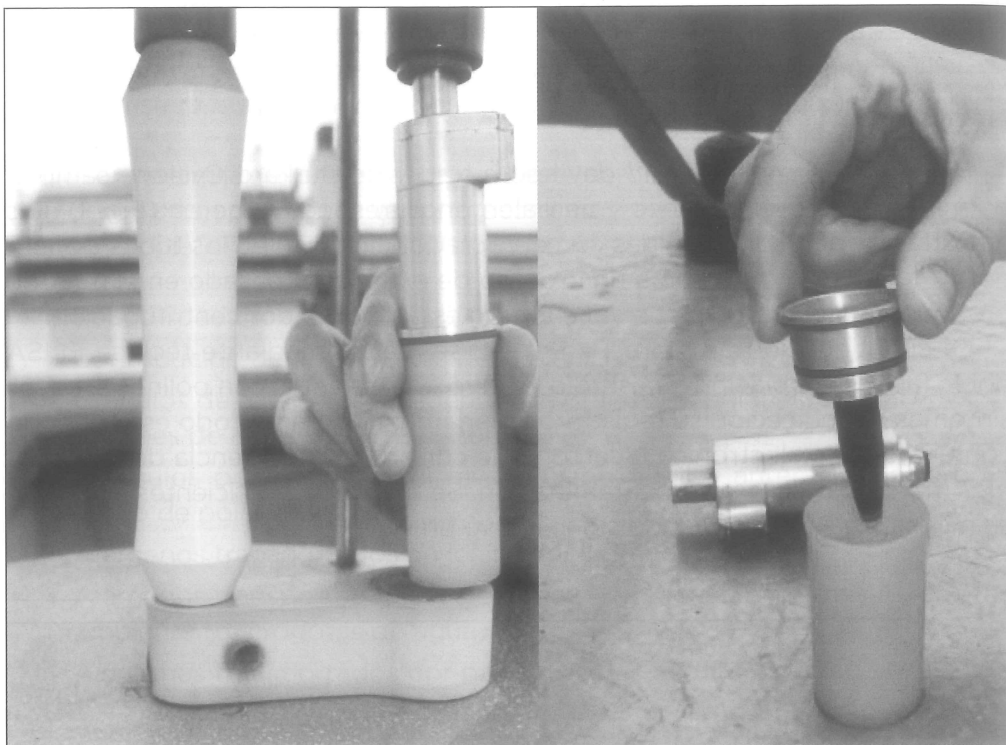


Fig. 2. Colocación de tubo de Eppendorf.

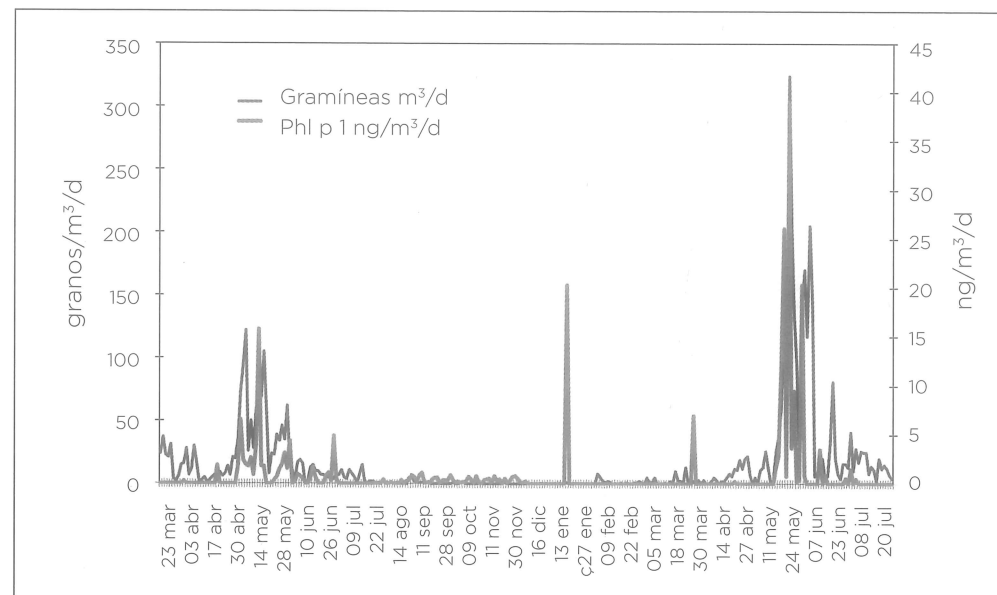
Las curvas de calibrado se realizaron utilizando como material de referencia Phl p 1 y Phl p 5, purificado a partir de extractos de polen respectivamente.

La obtención de los datos meteorológicos y de contaminación fue facilitada por el Instituto Nacional de Meteorología y la Secretaría de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid: lluvia, humedad relativa, velocidad del viento, dirección del viento, nivel de partículas, O<sub>3</sub>, O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CO y Benceno), correspondiente a los años 2009 y 2010 de las estaciones de Barajas y Escuelas Aguirre, respectivamente, las dos estaciones más cercanas a los colectores.

## RESULTADOS

En general, podemos afirmar que, en las muestras, cuando se produce un incremento en los recuentos de granos de *Poaceae*, se produce también un incremento en las concentraciones de los alérgenos. Así, para 2009 y 2010, se han encontrado buenos paralelismos entre el comportamiento de los recuentos de los granos de polen de gramíneas y los de Phl p 1 y Phl p 5 en las 284 muestras obtenidas, con un coeficiente de correlación significativo (Fig. 4).

### Gramíneas vs Phl p 1



### Gramíneas vs Phl p 5

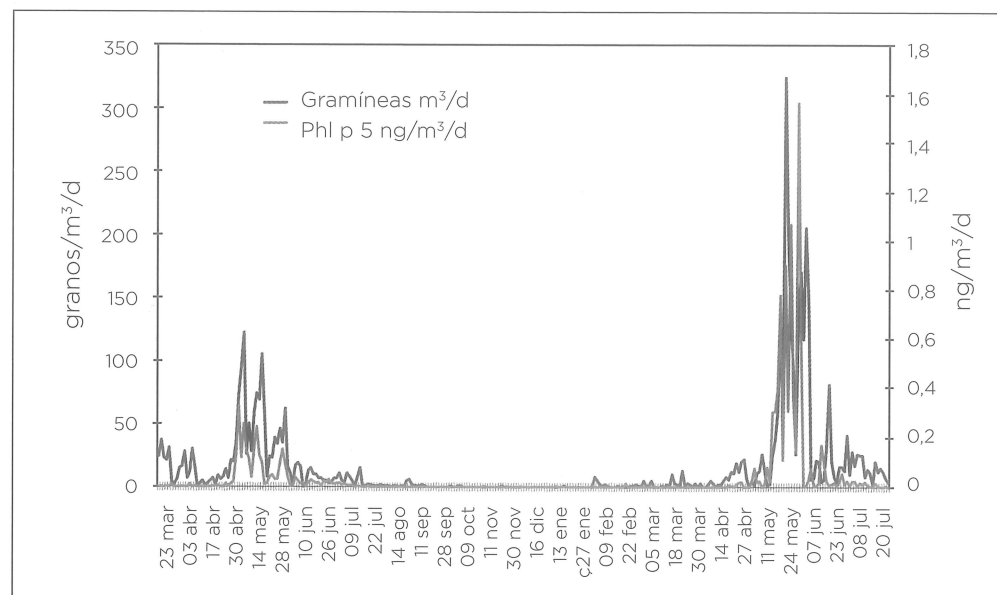


Fig. 3. Panel superior: Presencia del alérgeno Phl p 1 y pólenes de *Poaceae*.  $r: 0,630$ ,  $p=0,00001$ . Panel inferior: Presencia del alérgeno Phl p 5 y pólenes de *Poaceae*.  $r: 0,70$ ,  $p=0,00001$ .

Gramíneas vs Phl p 1

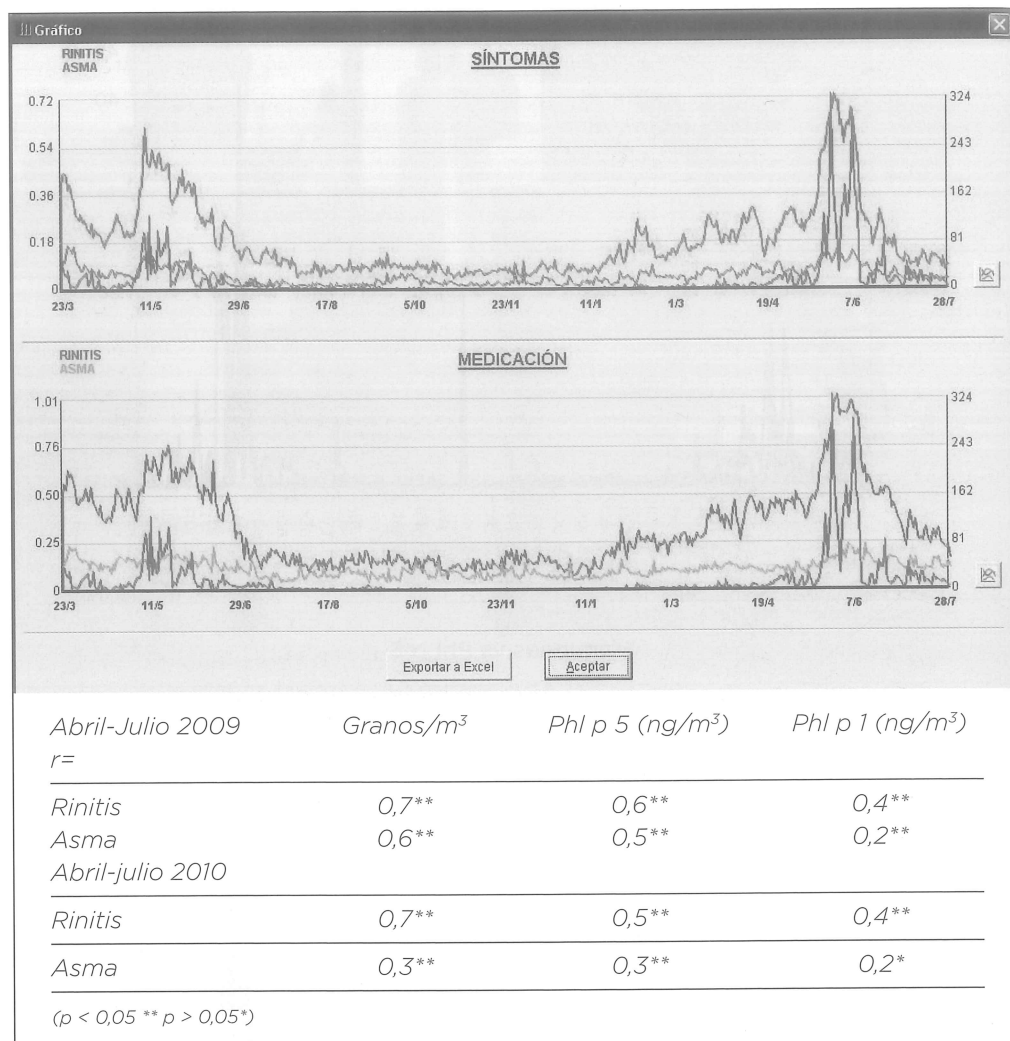


Fig. 4. Gráfico capturado del programa Alercon y tabla con los coeficientes de correlación entre intensidad de síntomas y recuentos de pólenes (en granos/m<sup>3</sup>) y concentración de alérgenos (en ng/m<sup>3</sup>).

Para los pólenes de Poaceae y la presencia de Phl p 1 y Phl p 5 durante el año 2009, el día pico de alérgenos se detectó el 19 de mayo (73 granos/m<sup>3</sup>/d Phl p 1 15,79 ng/m<sup>3</sup>, Phl p 5: 0,24 ng/m<sup>3</sup>) y durante el año 2010 el 24 de mayo (324 granos/m<sup>3</sup>/d y Phl p 1 38,9 ng/m<sup>3</sup>, Phl p 5: 1,56 ng/m<sup>3</sup>). Se detectaron mayores concentraciones de polen durante el año 2010, de forma significativa (del 19 de abril al 27 de julio: media de polen de 40 granos/m<sup>3</sup>/d) frente a 2009

(desde 23 de marzo al 17 de julio, con una media de polen de 19 granos/m<sup>3</sup>/d), r: 0,33, p < 0,001). Su correlación con los síntomas no fue mejor que con los recuentos de pólenes (Fig. 3).

Sólo la temperatura se correlacionó con los granos de polen de gramíneas y Phl p 5 (r = 0,2, p < 0,05 y r = 0,1, p = 0,05, respectivamente) y las PM10 con granos de polen de gramíneas (r = 0,1, p < 0,05).

CONCLUSIONES

La presencia atmosférica de Phl p 1 y p Phl 5 se limita principalmente al período de presencia de granos de polen de gramíneas, siendo relevante desde el punto de vista clínico pero sin ofrecer en nuestro estudio una información distinta a la que se obtiene con los granos de polen.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Fundación de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica y a Laboratorios Inmunotek por la financiación de este proyecto, así como a Clínica Subiza S.A. por el seguimiento clínico de los pacientes.

Este trabajo fue premiado como mejor comunicación oral en el Área de Aerobiología en el XXX Congreso de la Sociedad Europea de Alergia e Inmunología Clínica. Estambul, 10-15 de Junio de 2011.

DR. PEDRO OJEDA / CLÍNICA OJEDA: Muchas gracias Martha porque la verdad es que son datos interesantes. Y entonces yo lo que te quería preguntar, desde un punto de vista práctico, dado que salvo con el problema que tenéis con *Cupressus*, pero el resto de los pólenes parece que hay una correlación bastante buena entre el recuento de granos por metro cúbico de aire y el recuento de alérgeno mayoritario, ¿no?

DRA. MARTHA CABRERA / CLÍNICA SUBIZA: Sí.

DR. OJEDA: Entonces digamos ¿qué aportaría el hacer el recuento de alérgenos mayoritarios con respecto al método tradicional del recuento de granos? Porque me imagino que esto es bastante más laborioso y costo que lo otro, ¿no?

DRA. CABRERA: Claro, consume tiempo y efectivamente nosotros hemos observado, que esa presencia es prácticamente restringida al periodo álgido de polinización y lo que queríamos ver al tener un periodo de muestreo y de seguimiento de pacientes de un año y medio de

duración es si esa sintomatología fuera de la estación que los pacientes referían a lo mejor pudiese ser debida a la presencia de estas partículas. Pero como hemos visto, en el lapso interestacional pues prácticamente en lo que se refiere a los síntomas de rinitis no hemos visto ningún pico que se correspondiera con una actividad del grupo 5 en ese momento.

Nosotros seguimos pensando que el recuento de pólenes constituye una herramienta diagnóstica y de seguimiento clínico fundamental hoy en día para los alergólogos y posiblemente este tipo de estudios lo que nos enseña es que debemos continuar en seguir unificando las técnicas de muestreo, las técnicas de extracción y las técnicas de inmunodetección porque de momento no existe una metodología estándar para decir de forma fidedigna la cantidad de alérgeno 5. Por distintos métodos hemos observado que este método es el mejor y esto se ha reproducido en otros estudios. Pero hoy en día con esa veintena, treintena de estudios que hay todavía no se puede contestar.

Yo creo que en Madrid para nosotros ha sido esto muy interesante por la característica de nuestros pacientes, que son paciente polisensibilizados y el tema de la reactividad cruzada también está ahí y ha sido un poco como querer ir un poco más al fondo, al origen de todo esto.

DR. OJEDA: ¿Y pensáis que puedan existir otras partículas relevantes? Porque esto también iba un poco encaminado a ver si es que los pacientes que presentaban síntomas fuera de la época típica, a lo mejor era debido a partículas micrónicas.

DRA. CABRERA: Sí.

DR. OJEDA: Pero os habéis limitado a hacer dos alérgenos por ejemplo de gramíneas que era el Phl p 1 y el Phl p 5, ¿no?

DRA. CABRERA: Sí.

DR. OJEDA: ¿Pensáis que a lo mejor pueda ser otro alérgeno el responsable y que no lo hayáis medido y que a lo mejor esos pacientes estén más sensibilizados a ese otro alérgeno?

DRA. CABRERA: Pues a ver, nosotros lo hemos hecho con base a que la gramínea endémica en Madrid es el *Trisetum paniceum*, ¿no?, y el contenido de alérgenos son mayoritariamente del grupo 1 y del grupo 5, según el estudio de Montoro y Subiza en sus años. Pensamos que el *quid* de la cuestión en la reactiva-

ción de los pacientes está en estos dos alérgenos.

DR. JAVIER SUBIZA / CLÍNICA SUBIZA: Con relación a la pregunta de Pedro, ha puesto el dedo en la llaga en los dos momentos, o sea que es que realmente son cuestiones muy importantes. Cuando decidimos hacer este estudio, el segundo de los objetivos era precisamente lo que acabas de decir, o sea clínicamente, ¿qué pasa con esos pacientes que se reactivan antes de que aparezcan los recuentos de pólenes? ¿Va a ser más sensible esta técnica y lo va a poder detectar? La respuesta es, desde luego para nosotros, no porque, al contrario, incluso ha sido más sensible el recuento morfológico de pólenes que la determinación del grupo 1 y 5. Por tanto, no sabemos si es un problema de sensibilidad de la técnica o realmente es que esos síntomas que presentan los pacientes es porque o bien pueden ser por otros pólenes o a lo mejor podrían ser por gramíneas pero sencillamente son por gramíneas o alérgenos de gramíneas que se encuentran a nivel del suelo que nosotros no estamos recogiendo en la azotea, que no olvidemos que está a 22 metros de altura. Pero desde luego la determinación de alérgenos no ha demostrado ser más sensible que los recuentos morfológicos de pólenes para detectar este tipo de pacientes.

Y luego otro de los objetivos también que nos planteábamos es qué

pasa con los pacientes alérgicos a gramíneas que muchas veces y sobre la base de la experiencia clínica, uno tiene la idea de que en octubre se reactivan o que viene en septiembre, que están muy mal. Nosotros teníamos esa impresión, luego nos hemos llevado la sorpresa que nada de nada, o sea en el grupo de pacientes que hemos seguido durante estos casi dos años los síntomas aparecen de los pacientes clínicamente sensibilizados a gramíneas y en otros pólenes realmente la sintomatología solamente la hemos observado en el periodo de primavera, desde finales de abril, mayo, junio; pero no fuera de esa época. O sea que realmente al final; bueno, pues encontramos un estudio donde los síntomas aparecen solamente estacionalmente, los alérgenos aparecen solamente estacionalmente de acuerdo con los pólenes de gramíneas que aparecen solamente estacionalmente, en los pacientes clínicamente sensibilizados solamente a gramíneas. Y en los pacientes con síntomas fuera de la primavera, ¿cuál? Pues eso es lo que nosotros pensamos, que eran gramíneas. O sea, cuando hicimos este estudio teníamos la esperanza de decir, vamos a encontrar partículas de gramíneas y esto va a coincidir. Pues no.

DRA. LYDIA ZAPATERO / HOSPITAL MATERNO INFANTIL GREGORIO MARAÑÓN: LO que quiero que me aclaréis, que me parece importante, es que decís

que vuestros pacientes que llevan su cartilla de síntomas no se ha reactivado ningún en septiembre ni en enero-febrero si solo estaban sensibilizados a gramíneas.

DR. SUBIZA: Bueno, lo primero, para hacer este estudio aunque esté todo informatizado, con el Alercón que les incentiva para que cumplimenten la cartilla, pues al final como de 500 cartillas, 128 hicieron todo el periodo, y de esos 128, dejando polisensibilizados pero con una sensibilización solamente clínica a gramíneas y que hubiera hecho la cartilla durante todo el periodo se quedó solamente en 23. Entonces, bueno, es un triunfo el conseguir buena cumplimentación durante un periodo tan grande, pero ésa es la información que tenemos. De los polisensibilizados se eliminaron los que tenían una sensibilización clínica a Plátano y a *Cupressus*. Entonces, bueno, pues eso fue una sorpresa porque también pensábamos que los pacientes con gramíneas se reactivaban en los veranillos locos estos de marzo y abril; parece que eso tiene más que ver con pólenes de árboles que propiamente con gramíneas, eso es lo que estamos viendo ahora. Nos hemos encontrado unos resultados que nos han sorprendido también porque pensábamos que íbamos a encontrar partículas fuera de la estación y que eso podría explicar esas reactivaciones de los veranillos locos de marzo, de esas reactivaciones de septiembre, oc-

tubre, pero lo cierto es que luego ha quedado como una cosa muy, muy aséptica, ¿no? Pero bueno, eso es lo que hay y está bien saberlo, habrá que seguir investigando pero en relación a esta técnica pues vamos, yo creo que de momento lo único que ha servido es para despejar dudas pero yo creo que hoy por hoy no aporta más a los recuentos convencionales de gramíneas. Y siendo mucho más costoso y aparte que es una técnica que nunca se puede hacer al día, tiene que hacerse de forma retroactiva, o sea al final se cogen todos los tubos y es cuando se hace el

ensayo porque tiene que hacerse el ensayo simultáneamente. Entonces hoy por hoy yo creo que los recuentos de pólenes son insustituibles.

DR. OJEDA: Yo quería hacer un último comentario y decir que en medicina no solamente cuenta lo que te sale bien sino que también cuenta lo que te sale mal, entonces esa experiencia aunque no haya salido lo que se esperaba pero también es una buena experiencia, ¿no?

DRA. CABRERA: Bueno, pues muchas gracias.