



DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA, ECOLOGÍA Y FISIOLOGÍA VEGETAL
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

**Polen aerovagante y alérgenos mayoritarios de olivo y
gramíneas en la atmósfera de Córdoba**

Autora

María del Pilar Plaza García

Directoras

Carmen Galán Soldevilla - Purificación Alcázar Teno

Córdoba, Abril de 2017

TITULO: *Polen aerovagante y alérgenos mayoritarios de olivo y gramíneas en la atmósfera de Córdoba*

AUTOR: *María del Pilar Plaza García*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS

Polen aerovagante y alérgenos mayoritarios de olivo y gramíneas en la atmósfera de Córdoba.

DOCTORANDA:

María del Pilar Plaza García

INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS

El documento presentado por la doctoranda Dña. María del Pilar Plaza García, y que lleva por título "Polen aerovagante y alérgenos mayoritarios de olivo y gramíneas en la atmósfera de Córdoba" corresponde a su trabajo de tesis doctoral. Éste trabajo se ha enfocado en el estudio sobre el contenido polínico de la atmósfera de Córdoba, concretamente del polen de olivo y gramíneas, y en la concentración en el aire de sus alérgenos mayoritarios, con un mayor ratio de sensibilidad en la población.

Los principales eventos analizados fueron: el polen de Olivo y su alérgeno Ole e 1, cuyo estudio se presenta en el capítulo I "*Correlation between airborne Olea europaea pollen concentrations and levels of the major allergen Ole e 1 in Córdoba, Spain, 2012–2014*"; el estudio sobre el polen de gramíneas y su alérgeno mayoritario que se presenta en el capítulo II "*Mismatch in aeroallergens and airborne grass pollen concentrations*" y el estudio sobre dos captadores de alérgenos en el capítulo III "*Aeroallergens: a comparative study of two monitoring methods*".

El presente trabajo supone una aportación importante al campo de la Aerobiología, contribuyendo al conocimiento de dos especies con importante incidencia en la salud de la población del área mediterránea, así como un mayor conocimiento de la eficacia de dos captadores de alérgenos muy empleados por la comunidad científica. Esta tesis se presenta en formato de Tesis Internacional constituida por un conjunto de tres trabajos publicados por la doctoranda como primera autora en revistas incluidas en el primer y segundo cuartil según el Journal Citation Report (JCR). La doctoranda cumple con los requisitos académicos y científicos exigidos para la defensa de la tesis y para poder optar al grado de Doctor con Mención Internacional. Para ello la doctoranda ha realizado una estancia de investigación de tres meses de duración en la Universidad de Évora (Portugal). La citada Tesis Doctoral se ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la Universidad de Córdoba.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 7 de Abril de 2017

Firma de las directoras

Fdo.: Carmen Galán Soldevilla

Fdo.: Purificación Alcázar Teno

INFORME SOBRE APORTACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL Y FACTOR DE IMPACTO DE LAS REVISTAS CIENTÍFICAS (JOURNAL CITATION REPORTS)

Publicaciones en revistas científicas (Capítulos de la Tesis).

Plaza, M. P., Alcázar, P., & Galán, C. (2016). Correlation between airborne *Olea europaea* pollen concentrations and levels of the major allergen Ole e 1 in Córdoba, Spain, 2012–2014. *International Journal of Biometeorology*, 60(12): 1841-1847 (CAPÍTULO I DE LA TESIS).

Factor de Impacto: 2,309 Posición de la revista en relación a su categoría específica (*Environmental Sciences*): 83/225; segundo cuartil (Q2), primer tercil (T1).

Plaza, M. P., Alcázar, P., Hernández-Ceballos, M. A., & Galán, C. (2016). Mismatch in aeroallergens and airborne grass pollen concentrations. *Atmospheric Environment*, 144, 361-369 (CAPÍTULO II DE LA TESIS)

Factor de Impacto: 3,459 Posición de la revista en relación a su categoría específica (*Environmental Sciences*): 42/225; primer cuartil (Q1), primer tercil (T1).

Plaza, M. P., Alcázar, P., Velasco-Jiménez, M. J., & Galán, C. Aeroallergens: a comparative study of two monitoring methods. *Aerobiologia*, doi: 10.1007/s10453-017-9475-5 (CAPÍTULO III DE LA TESIS)

Factor de Impacto: 1,452 Posición de la revista en relación a su categoría específica (*Biology*): 41/86; segundo cuartil (Q2), primer tercil (T1).

Comunicaciones presentadas en congresos internacionales

Plaza, M. P., Alcázar, P., Galán, C. (2015). Relationship between atmospheric concentrations of *Olea europaea* L. pollen and aeroallergen Ole e 1. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Congress, 6 - 10 de Junio de 2015. Barcelona, España. Póster.

Plaza, M. P., Alcázar, P., Galán, C. (2015). Correlation between airborne Poaceae pollen concentrations and allergen Phl p 5 levels. 6th European Symposium of Aerobiology, 18 - 22 de Julio de 2016. Lyon (France). Comunicación oral.

Alcázar, P., **Plaza, M. P.**, Domínguez, E., Galán, C. (2014). Detection of airborne allergen (Pla 1) in relation to Platanus pollen in Córdoba, South Spain. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Congress, 7 - 11 de Junio de 2014. Copenhagen, Dinamarca. Póster.

Comunicaciones presentadas en congresos nacionales

Plaza, M. P., Alcázar, P., Galán, C. (2014). Metodología en la detección de aeroalérgenos en la ciudad de Córdoba. IV Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba. III Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación ceiA3. Póster.

Agradecimientos

Cuando he comenzado a redactar la dedicatoria de esta tesis, ha sido como visualizar una película en donde he visto cada instante de su realización, desde el principio al final y cada uno de los personajes que han participado en la trama, quienes significan mucho para mí y han sido pilares fundamentales.

No puedo dejar de acordarme de quien me animó a embarcarme en este proyecto, aun sin apenas tiempo ni financiación, sabiendo mejor que yo que supondría un esfuerzo, sí, pero aún más una increíble satisfacción y un estupendo proceso de aprendizaje. Gracias José Ramón Guzmán, por tu amistad, consejos y gran ejemplo como profesor y mejor persona.

Un lugar muy especial ocupan mis directoras de tesis: Carmen y Pura, que sin conocerme ni haberme dado clase, ha confiado en mí y me han apoyado y animado en este gran proyecto, aportándome su enorme experiencia y la pasión por la enseñanza y la investigación.

Gracias al equipo del laboratorio han sido más fáciles los momentos difíciles y aún mejores los momentos buenos. Aunque varios estéis ya por otros derroteros, no puedo dejar de agradeceros que hayáis compartido conmigo vuestras experiencias y entusiasmo a lo largo de estos años. Gracias Moisés, Álvaro, Jesús, Lola y especialmente a José Antonio y María José, que ya como doctores, han sido excelentes compañeros y me han ayudado y aconsejado siempre que lo he necesitado. Gracias a todos los miembros del Departamento, en especial, Herminia, Carmen, Gabriela, Rafaela, Paco, Antonio y Manolo, que hacen del laboratorio un auténtico hogar.

A Celia, Joana y Raquel del Departamento de Bioquímica en la Universidad de Évora en Portugal, que me acogieron durante mi estancia y junto con Alberto de la Universidad de Vigo y Juan Asturias y Mari Carmen de la Empresa Bial Farmacéutica en Bizcaia, tuvieron una labor fundamental en los primeros momentos, cuando estaba más perdida, y me guiaron en todos los aspectos metodológicos.

Ha sido un largo proceso y por ello, muchas de las personas que aunque no han estado a diario en el laboratorio y esto de los alérgenos se les escapa, son parte importante

de esta tesis. Se han preocupado porque siguiese adelante a pesar de todo y me han animado cuando las fuerzas flaqueaban. Gracias por los paseos a los que están cerca y por los mensajes desde California, desde Sevilla o Madrid. Gracias Isa, Belén, Sara, Mari, Roci, Miguel (tú eres el siguiente), Loida, Estefanía, Ivana, J.L. y Elisabet. Y como no a mis compañeras de fatigas, Montse y Beatriz y a nuestras conversaciones durante los entrenamientos.

Y aunque suene a tópico, nada habría sido posible sin el apoyo de mi familia, porque siempre han confiado en mí y en mis posibilidades, me han apoyado en cada una de las decisiones que he ido tomando desde que empecé a estudiar y se han alegrado con mis logros y me han sujetado en las caídas. Constantemente me han animado a estudiar, y ¡mirad, aún sigo! Se que estáis muy orgullosos de mí y yo aún más de teneros conmigo, porque sois el mejor ejemplo a seguir. Gracias papá, mamá, Silvia y Vicente. Esto es trabajo vuestro. Gracias a Rosa, Francis, Violeta, Javi, Inés y la demás familia, que han estado ahí desde el principio.

Y Alejandro, no me he olvidado de ti, es que he estado valorando colocarte como co-autor del proyecto. Gracias se queda corto para mostrarte todo el agradecimiento que te debo a lo largo de estos años, porque no solo me has apoyado y animado cada día, tanto cuando teníamos ilusión, como cuando costaba encontrarla. Me has acompañado en cada una de las aventuras que he emprendido aquí y allá, en mis viajes, en la toma de datos, en las fotografías, en los pósteres, por supuesto en la edición de la tesis, y seguro que me dejo cosas. . . Has creído en mi como nadie, aprendo de ti cada día y hemos aprendido juntos (con nuestra Leela) a ver que con poco se puede avanzar y que “cuando nada es seguro, todo es posible”. Te quiero.

Gracias a Dios por poneros en mi vida a todos y cada uno de vosotros, porque la tesis no es el documento final, en esta película lo realmente valioso ha sido el rodaje y cada una de vuestras aportaciones en él.

A todas aquellas mujeres que marcaron la historia de la ciencia desde la oscuridad y falta de reconocimiento, cambiando el panorama que hoy podemos ver en la investigación. Si ellas pudieron entonces, ¿qué no podremos hacer nosotras de aquí en adelante?

Índice



Índice

1. RESUMEN	3
1.1. ABSTRACT	7
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. Contexto de la tesis doctoral	11
2.2. Antecedentes	12
2.2.1. Aerobiología	12
2.2.2. Granos de polen	14
2.2.3. Alérgenos	15
2.2.4. El olivo	17
2.2.4.1. Alergia al polen de olivo.	19
2.2.5. Gramíneas	22
2.2.5.1. Alergia al polen de gramíneas.	23
2.2.6. Factores que influyen en la concentración polínica y de alérgenos en el aire.	25
2.2.6.1. La Meteorología y la situación geográfica.	25
2.2.6.2. La contaminación y el cambio climático.	28
2.3. Caracterización del área de estudio	31

2.3.1. Vegetación	32
2.3.2. Climatología	33
2.4. Métodos de muestreo: polen y alérgenos	35
2.4.1. Captador de polen utilizado en el estudio	40
2.4.2. Captadores de alérgenos utilizados en el estudio	40
2.5. Cuantificación inmunoquímica de alérgenos	41
3. OBJETIVOS	47
4. CAPÍTULO I:	
<i>Correlation between airborne Olea europaea pollen concentrations and levels of the major allergen Ole e 1 in Córdoba, Spain, 2012–2014</i>	49
5. CAPÍTULO II:	
<i>Mismatch in aeroallergens and airborne grass pollen concentrations</i>	59
6. CAPÍTULO III:	
<i>Aeroallergens: a comparative study of two monitoring methods</i>	71
7. DISCUSIÓN GENERAL	87
8. CONCLUSIONES	97
8.1. CONCLUSIONS	101
9. BIBLIOGRAFÍA	105

Resumen



1. RESUMEN

Los granos de polen de olivo y de gramíneas son una de las principales causas de alergia en la región mediterránea. Concretamente, el polen de gramíneas es la principal causa de polinosis en Europa y su alérgeno principal Phl p 5 tiene las tasas más altas de sensibilización (>50 %) en pacientes con alergia a este tipo polínico. Por otro lado, el polen de olivo es la segunda causa de polinosis en el sur de la Península Ibérica y de todos los alérgenos descritos en el olivo, Ole e 1 es el más frecuente como agente sensibilizante (> 75 %). Hasta la fecha, las redes de monitorizaje del polen en el aire han proporcionado información esencial sobre la dinámica del polen en un área determinada. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que los niveles de polen en el aire por sí solos pueden no proporcionar información suficiente sobre la exposición real a los aeroalérgenos. El objetivo principal de este estudio es evaluar las correlaciones entre las concentraciones en el aire de dos de los granos de polen más alergénicos, olivo y gramíneas, y los niveles de sus alérgenos mayoritarios Ole e 1 y Phl p 5, respectivamente, con el fin de determinar si las concentraciones de polen atmosférico son representativas a la hora de registrar los cambios en los síntomas de polinosis en la población. Por otro lado, se estudiaron los principales parámetros meteorológicos para conocer su influencia en el contenido de ambas partículas en el aire. Finalmente, se han comparado los datos obtenidos con dos captadores de alérgenos basados en distintos principios, realizando un estudio comparativo entre ellos y con el polen aerotransportado, con el fin de evaluar su eficiencia en la captación.

Los capítulos I y II se centraron en el estudio de la concentración de granos de polen de gramíneas y olivo y los alérgenos mayoritarios de estos granos de polen en el aire; el capítulo I se centró en el olivo y el capítulo II en las gramíneas. La toma de datos se llevó a cabo de 2012 a 2014. El muestreo de polen se realizó utilizando un captador volumétrico tipo Hirst y para la recolección de alérgenos se empleó un captador multi-vial Cyclone. Las partículas alergénicas

se cuantificaron mediante un test ELISA doble sandwich.

En el capítulo I, se encontraron correlaciones positivas significativas entre los niveles de Ole e 1 y las concentraciones de polen aerovagante de olivo. Sin embargo, hubo ciertos días, principalmente antes y después de la temporada de polen, en los que se detectaron ciertas concentraciones de alérgenos aun cuando no se detectaron granos de polen en la atmósfera. La distribución de ambas partículas biológicas en el aire fue irregular, y la cantidad de polen por alérgenos mostró variaciones interanuales, no coincidiendo necesariamente con la intensidad de la estación polínica.

En el capítulo II, se observó una correlación positiva significativa entre el polen de gramíneas y las concentraciones de Phl p 5 durante la estación polínica, aunque de forma esporádica se observaron días con ciertas discrepancias, tal y como ocurría en el caso anterior. El índice acumulativo anual de polen también varió considerablemente de un año a otro, lo más probable debido a la influencia de las variables meteorológicas. Sin embargo, no hubo una relación clara entre los alérgenos y las variables meteorológicas.

Por otra parte, en el capítulo III, dada la variedad de captadores y métodos desarrollados para conocer las concentraciones de alérgenos en el aire, se realizó una comparación detallada con dos de los más utilizados en Europa - Cyclone y ChemVol. Así mismo, se estudiaron los principales parámetros meteorológicos para determinar su posible influencia en la eficiencia de muestreo. Se analizaron las concentraciones en el aire de los alérgenos Ole e 1 y Phl p 5 obtenidas con ambos captadores durante dos años con una meteorología muy diferente, 2012 y 2014 y fueron cuantificadas con el test ELISA.

Los resultados se compararon con las concentraciones de polen durante los mismos periodos de estudio. Se observó una correlación positiva entre las concentraciones de alérgenos obtenidas con los dos captadores, así como con la concentración de polen durante la estación polínica. Sin embargo, las concentraciones

anuales acumuladas variaron considerablemente, siendo mayores las detectadas con el captador Cyclone, probablemente debido a las características técnicas y diferencias en el protocolo empleado con cada aparato. En resumen, a pesar de estas diferencias observadas, ambos captadores mostraron una distribución de aeroalérgenos similar y proporcionaron información adecuada para la detección de alérgenos. Los resultados de este estudio contribuyen a un mejor conocimiento del comportamiento atmosférico de los dos tipos de polen más alergénicos en el sur de España y dos de sus principales alérgenos, además de ampliar la información en cuestión de cómo se ven afectados los resultados obtenidos según el aparato y la metodología empleada en el estudio. Esta información puede ser de gran importancia en posteriores investigaciones.

1.1. ABSTRACT

Olive and grass-induced pollinosis is the most common pollen allergy in the Mediterranean region. Grass pollen is the main cause of pollinosis all over Europe and its major allergen Phl p 5 has the highest rates of sensitization (>50 %) in patients with grass pollen-induced allergy. Olive pollen is the second-largest cause of pollinosis in southern Iberian Peninsula and from all the allergens described in olive, Ole e 1 is the most frequent as sensitizing agent (> 75 %). Airborne pollen monitoring networks, thus far, have provided essential information on pollen dynamics over a given study area. Nevertheless, recent research has revealed that airborne pollen levels alone do not always provide a clear evidence of actual exposure to aeroallergens. The main objective of this study is to evaluate correlations between airborne concentrations of two of the most allergic pollen grains, olive and grass, and their major allergens levels, Ole e 1 and Phl p 5 respectively, in order to determine whether atmospheric pollen concentrations alone are sufficient to chart changes in allergenic symptoms. The meteorological parameters were also studied to find out their influence in these atmospheric records. Moreover, two allergens samplers have been compared each other and with airborne pollen monitored using a Hirst-type volumetric spore trap to examine their efficiency.

Chapter I and II focused on the study of both particles, pollen and allergens, chapter I about olive and chapter II about grass. Monitoring was carried out from 2012 to 2014. Pollen sampling was performed using a Hirst type sampler and a multi-vial cyclone sampler was used to collect aeroallergens. Allergenic particles were quantified by ELISA assay.

In chapter I, significant positive correlations were found between daily Ole e 1 allergen levels and airborne olive pollen concentrations. However, there were some events with allergen detection, before and after the pollen season, when no airborne pollen grains were observed. The correlation between the two biological

particles was irregular, and pollen potency showed year-on-year variations and did not necessarily match pollen-season intensity.

In chapter II a significant positive correlation was observed between grass pollen and Phl p 5 allergen concentrations during the pollen season, but also with some sporadic discrepancy episodes. The cumulative annual Pollen Index also varied considerably from year-to-year most likely related to a complex interplay of meteorological variables. Nevertheless, there was no clear relationship between allergens and weather variables.

Due to the great variety of samplers and methods developed to know airborne allergen concentrations, chapter III has been focused on a detailed comparison of two most used samplers, Cyclone and ChemVol. Moreover, the main meteorological parameters were studied to find out their influence on the sampler's efficiency. Ole e 1 and Phl p 5 were monitored over two years with different weather patterns, 2012 and 2014, and quantified by ELISA assay.

The results were compared with airborne pollen monitored using a Hirst-type volumetric spore trap during the same study periods. A positive correlation was detected in the aeroallergens concentrations obtained using the two samplers, as well as with the pollen concentration during the pollen season. However, cumulative annual Allergen Index varied considerably, higher values were obtained with Cyclone sampler, probably due to the technical characteristics and differences in the protocol of both samplers. In brief, despite these observed differences, both samplers showed similar distribution and provide suitable information for allergen detection. The findings showed in this study contribute to a better understanding of the atmospheric behavior of two major allergens related to airborne pollen in southern Spain. In addition, our research allows extending the information related to the influence of different samplers and methodology in the results. This information can be essential for further investigations.

Introducción



2. INTRODUCCIÓN

2.1. Contexto de la tesis doctoral

La presente tesis doctoral se centra en el estudio sobre el contenido polínico en la atmósfera de Córdoba, concretamente del polen de olivo y gramíneas, y la concentración en el aire de sus alérgenos mayoritarios, con un mayor ratio de sensibilidad en la población.

La polinosis, alergia causada por alérgenos aerovagantes del polen, es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en Europa y está en aumento en los últimos decenios (Bousquet *et al.*, 2007; D'Amato *et al.*, 2007; 2010). Un conocimiento sobre el contenido de polen en el aire es importante para los pacientes que sufren esta enfermedad. Por este motivo, tradicionalmente se han realizado recuentos de polen en el aire para estimar la exposición a los aeroalérgenos. Hoy en día se cuenta con diferentes redes de monitorizaje, tanto a nivel nacional como regional, integradas en la European Aeroallergen Network, EAN (<https://ean.polleninfo.eu/Ean/>). La Red Andaluza de Aerobiología, RAA (<http://www.uco.es/raa/>) y la Red Española de Aerobiología, REA (www.uco.es/rea) forman parte de la EAN y cuentan con bases de datos que se han venido tomando de forma ininterrumpida desde el año 1992.

Sin embargo, los niveles de polen pueden no llegar a representar siempre la exposición real al alérgeno, ya que, según estudios recientes, los niveles de máxima concentración polínica no siempre coinciden con los picos de aeroalérgenos (Fernández-González *et al.*, 2010, 2011; Rodríguez-Rajo *et al.*, 2011; Galán *et al.*, 2013) ni con los síntomas de pacientes que sufren alergia a un tipo polínico determinado.

Por este motivo, recientemente, además de realizar estudios sobre el contenido de polen en el aire, se están desarrollando nuevas técnicas para la detección de

alérgenos en el aire, así como pruebas inmunoquímicas y moleculares para su estudio.

2.2. Antecedentes

2.2.1. Aerobiología

La Aerobiología, término acuñado por Meier en los años 30, es una disciplina científica relativamente reciente que estudia la presencia en la atmósfera de microorganismos y material biológico de pequeñas dimensiones que se transportan de forma pasiva por el aire, así como su dispersión e impacto sobre el medio ambiente (Emberlin *et al.*, 1999). Por lo tanto, se ocupa de los granos de polen, virus, bacterias, y las esporas de hongos, levaduras, algas, briófitos y pteridofitos. Estas partículas, debido a su pequeño tamaño, pueden ser elevadas a largas alturas y desplazadas a grandes distancias, incluso intercontinentales.

La presencia en el aire de los diversos tipos de partículas biológicas suscita un gran interés a un número cada vez mayor de investigadores de instituciones universitarias y sanitarias, debido al incremento del porcentaje de la población que sufre problemas de salud en relación con estas partículas (alergias).

Son innumerables los trabajos que se han sucedido en lo referente a técnicas de análisis, sistematización de caracteres polínicos, creación de terminología propia y estudios morfológicos, siendo cada vez mayor el número de campos de la ciencia en los que se aplica la Aerobiología, tratándose de una ciencia convergente de muchas materias como: Botánica, Geología, Paleobotánica, Arqueología, Taxonomía, Agronomía, Apicultura, Farmacología y Alergología.

En el siglo XX se han realizado los progresos científicos más destacables que han permitido tener un amplio conocimiento sobre el comportamiento de los granos

de polen y las esporas de hongos en el medio ambiente y su repercusión en el ser humano.

En España fue en la década de los 80 cuando esta ciencia tuvo pleno desarrollo, con numerosos grupos de investigación que enfocaron sus estudios en la dinámica de las partículas aerovagantes (Ej. Domínguez-Vilches *et al.*, 1984; Belmonte, 1985; Galán, 1987; Subiza, 1987; Candau *et al.*, 1989). Habitualmente el monitorizaje de polen se realiza a través de redes de muestreo que abarcan distintas áreas de territorio, como son las redes nacionales o regionales, constituyendo un instrumento fundamental para conocer el contenido del polen atmosférico. EAN (European Aeroallergen Network) proporciona información sobre el contenido de polen en el aire de 32 países, con cerca de 400 estaciones de muestreo distribuidas por todo el territorio.



Figura 1. Inflorescencia del Olivo (A) y de las gramíneas (B).

Estas redes aerobiológicas, además de proporcionar valores diarios de concentraciones de polen, cuentan con bases de datos históricos que permiten calcular tendencias en la distribución del polen aerovagante y realizar previsiones semanales basadas en los conocimientos del momento, en archivos históricos y en las previsiones meteorológicas del área de muestreo. De esta forma, se ofrece una información eficaz a los pacientes y médicos para la prevención de las afecciones alérgicas y posibles cuidados clínicos necesarios.

En la presente tesis doctoral se han estudiado dos tipos polínicos, junto a dos de sus alérgenos mayoritarios: Ole e 1 del polen de olivo, de gran incidencia en la región mediterránea y algunas zonas de Norteamérica (D'Amato *et al.*, 2007); Phl p 5 del polen de la familia Poaceae, también de gran importancia, ya que muestra las tasas más altas de sensibilización (> 50 %) en pacientes con alergia a las gramíneas (Tripodi *et al.*, 2012).

2.2.2. Granos de polen

El conjunto de las características del grano de polen es constante para cada taxón al que representan. La diversidad que encontramos en cuanto a forma y estructura sugiere que los distintos tipos polínicos provienen de un extraordinario proceso de transformación y adaptación a diferentes factores, como son las interacciones polen-polen y polen-estigma, las condiciones atmosféricas y el medio de dispersión, ya sea por acción del viento, el agua o por la acción de animales.

Están rodeados por una pared, la esporodermis, cuya estructura es morfológica y estructuralmente muy compleja. Consta fundamentalmente de dos capas muy diferenciadas: la exina, cuyo componente químico fundamental es la esporopolenina; y la intina, cuyos componentes principales son celulosa, pectinas y glucoproteínas (Edlund *et al.*, 2004). Las características específicas de la pared de los granos de polen nos permite el reconocimiento del taxón que los origina; en ocasiones se puede diferenciar hasta nivel de especie, pero normalmente sólo nos aproxima a nivel de género o familia. Tiene además la función primordial de proteger el contenido celular en su viaje hacia el órgano femenino, ya que dicha pared es muy resistente a la pérdida de agua y a las distintas condiciones ambientales (Frenguelli, 2003): contiene carotenoides, que otorgan resistencia frente a las radiaciones solares (Pacini y Hesse, 2005) y reducen efectos negativos de los contaminantes atmosféricos (Castillo *et al.*, 2005); y flavonoides,

que parecen protegerlos frente a ataques de patógenos (Pacini y Hesse, 2005; Rezanejad, 2009).

El polen de algunas plantas polinizadas por el viento (anemófilas) es la principal causa de polinosis, ya que éstas liberan grandes cantidades de polen a la atmósfera. Generalmente es muy difícil evitar el contacto con el polen de estas plantas, debido a que en algunos casos pueden estar en el aire durante la mayor parte del año, y sus alérgenos pueden persistir durante meses (Taylor *et al.*, 2004). Sin embargo, en nuestro clima normalmente existe una marcada estacionalidad, aunque ésta varía según la zona geográfica (Martínez-Bracero *et al.*, 2015).

En cuanto al polen de especies herbáceas, el polen de gramíneas es uno de los más importantes desde el punto de vista cuantitativo en Europa y el de mayor incidencia en alergias (D'Amato *et al.*, 2007).

Respecto al polen de especies arbóreas, su incidencia en casos de alergia difiere en importancia según el territorio. Por ejemplo el abedul es el más importante en el centro y noroeste de Europa, mientras que el olivo y el ciprés son los más importantes en el mediterráneo (D'Amato *et al.*, 2007).

2.2.3. Alérgenos

La alergia al polen, o polinosis, fue descrita por primera vez en Inglaterra por John Bostock (1819), diferenciando la rinoconjuntivitis alérgica del catarro común por infección respiratoria y acuñando el nombre de “fiebre del heno”. Este término acabó siendo rechazando años después por él mismo. Posteriormente, Blackley (1873) describió los síntomas alérgicos, mediante pruebas cutáneas que se realizó a sí mismo y efectuó los primeros estudios aerobiológicos relacionando estos síntomas con el polen.

Un alérgeno es una sustancia antigénica ambiental que cuando entra en contacto con el sistema inmunitario de personas susceptibles, puede inducir una reacción de hipersensibilidad (alérgica) al generar unos anticuerpos especiales (IgE en el tipo I). Algunas de las proteínas que forman parte de los componentes estructurales de los granos de ciertos tipos polínicos, son susceptibles de ser alérgenos.

Muchas de estas proteínas alergénicas, glicoproteínas o lipoproteínas de bajo peso molecular (Guidós y Almeida, 2005), están implicadas en los procesos de hidratación que siguen a una respuesta de compatibilidad en el reconocimiento polen estigma (Edlund *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2004) durante la polinización.

Se trata, por tanto, de proteínas que se difunden fácilmente a través de la pared del grano de polen cuando entran en contacto con un medio acuoso, una superficie adecuada para la germinación (Knox, 1993; Casas *et al.*, 1996; Pacini y Hesse, 2005), y normalmente poseen gran estabilidad ambiental, lo que hace posible su acumulación en la atmósfera y la posible observación de niveles altos de exposición.

Es por ello que cuando estas proteínas, libres en la atmósfera y en ocasiones en gran número, se depositan en las mucosas conjuntival, nasal o bronquial de individuos susceptibles, causan la sintomatología de la rinoconjuntivitis y el asma (Moreno-Grau *et al.*, 2006). Sin embargo, no todos los granos de polen son alergénicos, de hecho, aún no se ha encontrado ninguna característica molecular común que especifique por qué una proteína se define como alérgeno (Aalberse, 2000). Un individuo alérgico presenta asimismo una predisposición genética a desarrollar respuestas de hipersensibilidad (García-Hernández, 2010).

Estas proteínas paucimicrónicas (inferior a $10\mu\text{m}$ de diámetro) o submicrónicas (inferior a $1\mu\text{m}$), además de encontrarse en los granos de polen, están presentes en el aire y pueden ser importantes en las enfermedades alérgicas (Pehkonen y Rantio-Lehtimäki, 1994; Spiexsma *et al.*, 1995; D'Amato *et al.*, 1998; De Linares *et al.*, 2007; Abou *et al.*, 2012). La naturaleza de estas partículas tiene un

origen variado: fragmentos producidos por la degradación física de las plantas, fragmentos de granos de polen, gránulos de almidón, aerosoles atmosféricos que contienen alérgenos fijados a partículas inorgánicas y granos de polen que se rompen por choque osmótico provocado por la lluvia y que liberan alérgenos al ambiente (Knox *et al.*, 1997). Al no poder identificarse estas partículas con los recuentos de polen, puede ocurrir que haya discordancia entre la cantidad de polen en el aire y la clínica. Al inicio y durante la polinización, puede suceder que haya días en que los pacientes sufran polinosis y el polen esté presente en el ambiente en bajas concentraciones (Galán *et al.*, 2013; Buters *et al.*, 2015; Moreno-Grau *et al.*, 2016).

En los granos de polen de diferentes familias se han logrado purificar numerosos alérgenos (Martínez *et al.*, 2002; Chapman, 2008; Postigo *et al.*, 2009).

2.2.4. El olivo

Olea europaea L. es una especie característica de la Región Mediterránea adaptada al clima de la zona. El acebuche (*Olea europaea* L. var. *sylvestris* Brot) es una especie presente en los paisajes de la Península Ibérica como un elemento más de los ecosistemas mediterráneos y de la cultura. El olivo (*Olea europaea* L. var. *europaea*) es un cultivo muy extendido, especialmente en Andalucía. Esta especie es sensible a las heladas, si bien puede soportar temperaturas de hasta -10 °C, aunque la resistencia al frío es una característica varietal (Aguilar *et al.*, 1995). Las altas temperaturas son perjudiciales, sobre todo, durante el periodo de floración. Aunque está bien demostrado que el olivo es una especie tolerante a la sequía, e incluso mejora el crecimiento vegetativo bajo estas condiciones, se ha introducido el riego en olivares modernos e intensivos (Barranco *et al.*, 2008; Lavee, 2011; Martinelli *et al.*, 2012).

El olivar en la Región Mediterránea se encuentra muy extendido debido principalmente a su alta rentabilidad para la obtención de aceite de oliva, teniendo un

amplio impacto económico y social (Aguilera *et al.*, 2015; Orlandi *et al.*, 2017), por sus conocidos efectos positivos en la salud (Omar, 2010; Salas-Salvado *et al.*, 2014; Buckland y González, 2015).

España es el país con más superficie dedicada a este cultivo, siendo Andalucía la comunidad que dispone del 60 % del total del cultivo español, concentrándose en gran parte en las provincias de Jaén y Córdoba (**Figura 2**).

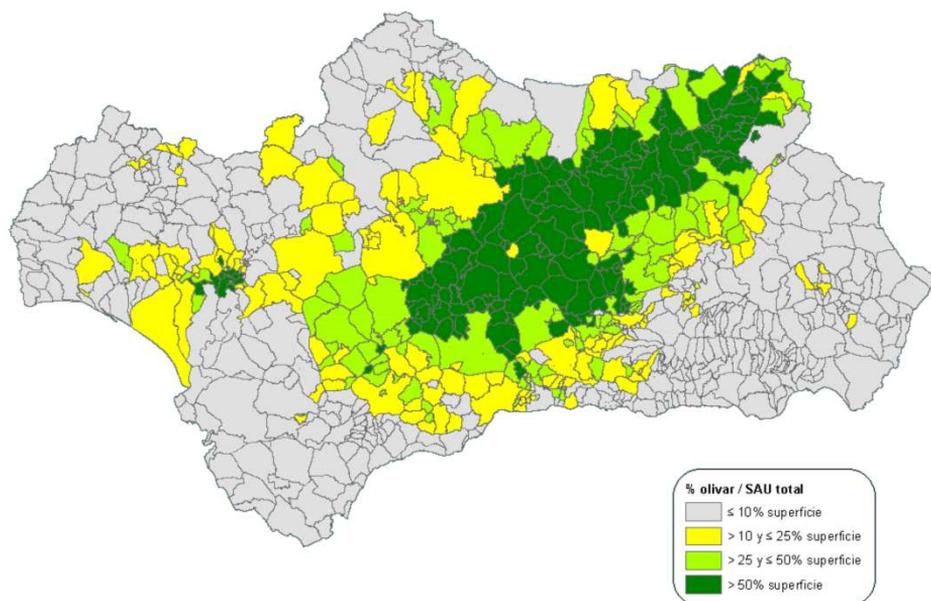


Figura 2. Distribución municipal de la superficie de olivar en Andalucía en función del porcentaje que representa respecto a la Superficie Agraria Útil (SAU). Junta de Andalucía. 2010.

El periodo de floración del olivo sucede entre abril y julio en el hemisferio norte,

desarrollando un importante número de inflorescencias, entre 10 y 35 flores cada una, que se suelen situar frecuentemente en la superficie de la copa, debido a que el olivo requiere una elevada intensidad de luz para el desarrollo de los brotes (Barranco *et al.*, 2008).

El proceso de polinización en el olivo se considera mixto, pasando de una polinización entomófila hacia la anemofilia a lo largo del tiempo, debido a la selección de variedades con alta producción de flores y al cultivo en masa (Barranco *et al.*, 1998; Rojo *et al.*, 2015). La floración del olivo se caracteriza por un breve periodo de polinización con concentraciones elevadas de polen aerovagante (Martínez-Bracero *et al.*, 2015; Galán *et al.*, 2016), pudiendo generar una alta sintomatología sobre la población sensible a este polen. Sin embargo, tratándose de un grano de polen aerodinámico, se pueden llegar a detectar granos de polen transportados desde larga distancia (Galán *et al.*, 2013).

2.2.4.1. Alergia al polen de olivo.

El polen de olivo (**Figura 3**) es actualmente una importante causa de alergia, y no sólo en la Cuenca del Mediterráneo (D'Amato *et al.*, 2007), ya que su sensibilización en la población está comprobada en diversas áreas biogeográficas donde se cultiva este árbol (Bousquet *et al.*, 2007). Este polen es considerado como uno de los más representados en el aire para toda la región mediterránea (Pérez-Badia *et al.*, 2010; Martínez-Bracero *et al.*, 2015; Rojo *et al.* 2016).

Recientemente se está observando un aumento en la frecuencia de polinosis dado el aumento en la superficie dedicada a esta especie (Hernández *et al.*, 2002) junto a cambios en las prácticas de cultivo, como el cultivo intensivo que debido al control de agua y uso de fertilización, puede provocar un aumento del número de flores por árbol (Fernández-Escobar *et al.*, 2008; Rapoport *et al.*, 2012), y por tanto, de la posible cantidad de polen en el aire.



Figura 3. Granos de polen de olivo

La prevalencia de las enfermedades alérgicas tipo I o inmediatas es superior al 25 % en los países industrializados (Smith *et al.*, 2014) y está creciendo en los últimos años (Hjern, 2012), con una tasa del 21 % en España respecto a la rinitis alérgica (Bauchau and Durham 2004). Concretamente en el sur de España, el polen de olivo es la principal causa de sensibilización alérgica (Barber *et al.*, 2008). En Córdoba, alrededor del 80 % de los pacientes son alérgicos a este tipo polínico (Sánchez-Mesa *et al.*, 2005b; Quiralte *et al.*, 2007; Cebrino *et al.*, 2017). Asimismo, el polen de olivo es el más abundante de la ciudad de Córdoba, representando casi un 40 % del total de la concentración polínica y llegándose a detectar, en ocasiones, valores de hasta 30.000 granos de polen al año, como ocurrió en 2009 (Velasco-Jiménez *et al.*, 2013), dando lugar a una importante intensidad polínica (**Figura 4**).

A día de hoy, se ha demostrado la presencia de, al menos, 20 proteínas con actividad alérgica en el polen de olivo, de las cuales 12 han sido caracterizadas (Ole e 1 - Ole e 12) según la nomenclatura de la IUIS (Internacional Union of Immunology Societies) (Rodríguez *et al.*, 2007; Villalba *et al.*, 2014). De todos los alérgenos descritos, Ole e 1 es el más frecuente como agente de sensibilización (alérgeno principal) (Wheeler *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 2002; Alché *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha comprobado que la relevancia de los alérgenos

depende de la concentración (Rodríguez *et al.*, 2002) y de los distintos tipos de alérgenos que encontramos en el aire y, por tanto, de la zona geográfica (Barber *et al.*, 2007). La frecuencia de los individuos alérgicos al polen de olivo, sensibilizados con el alérgeno principal Ole e 1 es muy alta (>75%) (Alché *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2007; Barber *et al.*, 2008) y constituye más del 10% del contenido total de proteínas del polen en las variedades de árboles de la familia Oleaceae (Cabrera, 2011). Ole e 1 juega, además, un papel importante en la hidratación del grano de polen, y por lo tanto se encuentra en altas concentraciones (Alché *et al.*, 1999).

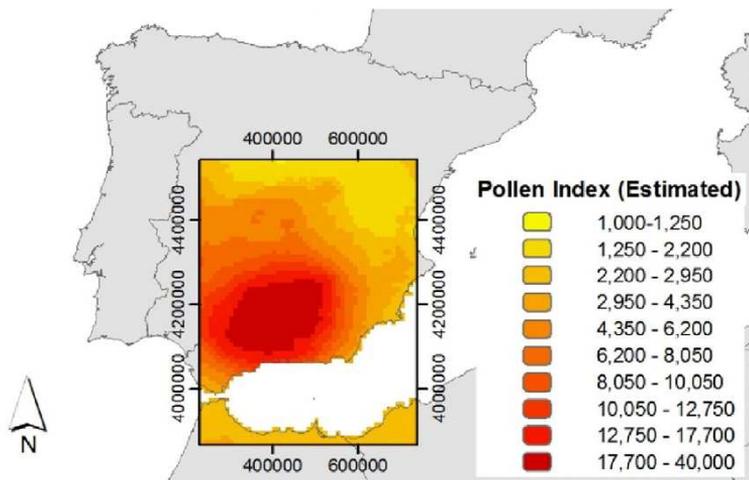


Figura 4. Mapa de intensidad polínica del olivo en Córdoba (Rojo *et al.* 2016)

Por otro lado, se conoce reactividad cruzada con polen de otras especies de la misma familia, y con otras familias botánicas, que puede llegar a intensificar los síntomas de alergia (Bousquet *et al.*, 1985; Cariñanos *et al.*, 2002; Lombardero *et al.*, 2002; Vara *et al.*, 2016). Ello es debido a la elevada similitud (mayor del 80%) que presenta con otros alérgenos de la familia de las oleáceas: Fra e 1 (*Fraxinus*), Lig v 1 (*Ligustrum*), Syr v 1 (*Syringa*) (Barderas *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007). Por lo tanto, los anticuerpos Ole e 1 han sido reconocidos

como un marcador de la sensibilización de esta familia botánica (Belver *et al.*, 2009 y Vara *et al.*, 2016).

Estudios previos han indicado que Ole e 1 es una proteína localizada únicamente en el grano de polen (Villalba *et al.*, 1994). Sin embargo, en trabajos más recientes se presenta la posibilidad de que se encuentre en otras partes de la planta (Jiang *et al.*, 2005; Bruex *et al.*, 2012), lo que podría explicar la discordancia, observada en ocasiones, entre concentraciones de polen de olivo y Ole e 1 en el aire (Galán *et al.*, 2013; Moreno-Grau *et al.*, 2016).

2.2.5. Gramíneas

Las gramíneas (Poaceae) constituyen una familia muy extensa de especies herbáceas anuales o perennes, que ha conquistado la mayoría de los nichos ecológicos del planeta, cubriendo casi el 25 % de la superficie terrestre (Dyer *et al.*, 1982). Es la cuarta familia con mayor riqueza de especies después de las compuestas, orquídeas y leguminosas (Heywood *et al.*, 1985), con un total de 700 géneros y cerca de 10.000 especies descritas (Watson y Dallwitz, 1992). Se trata de una de las familias más importantes, tanto por su interés agrícola como por ser un componente esencial de la flora de pastizales, considerada como la primera en importancia económica global.

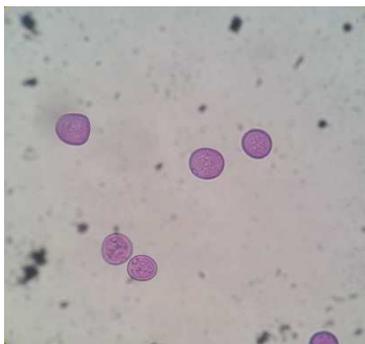


Figura 5. Granos de polen de gramíneas

La mayoría de las gramíneas son anemófilas y al tratarse de un grupo muy extenso, con diversas características fenológicas, se pueden encontrar especies en floración en las distintas estaciones del año (León-Ruíz *et al.*, 2011; Cebrino *et al.*, 2016). No obstante, la mayoría de las especies presentes en nuestra zona bioclimática florecen desde marzo hasta julio, alcanzando su máximo a finales de mayo (Velasco *et al.*, 2013). El tipo de inflorescencia particular de esta familia botánica, y la estructura de la flor, permiten la liberación de una gran cantidad de polen a la atmósfera. Los géneros más abundantes que causan polinosis en la Península Ibérica son: *Phleum* spp., *Dactylis* spp., *Lolium* spp., *Trisetum* spp., *Festuca* spp., *Poa* spp., *Cynodon* spp. y *Anthoxanthum* spp. (Subiza, 2003). Concretamente, las especies que más contribuyen al espectro polínico de la ciudad de Córdoba son: *Dactylis glomerata* L., *Lolium rigidum* Gaudin., *Trisetaria panicea* (Lam.) Paunero y *Vulpia geniculata* (L.) Link (León-Ruíz *et al.*, 2011; Cebrino *et al.*, 2016).

2.2.5.1. Alergia al polen de gramíneas.

El tipo polínico Poaceae (**Figura 5**) representa a toda la familia botánica y tiene un alto contenido de alérgenos, siendo la principal causa de polinosis en Europa (D'Amato *et al.*, 2007; Burbach *et al.*, 2009) con un 35 % de la población sensible (De Weger *et al.*, 2013). En España, el porcentaje medio de sensibilidad al polen de gramíneas varía según el área considerada. En el sur de España, supone casi un 60 % de la población con síntomas alérgicos (Pereira *et al.*, 2006), y en la ciudad de Córdoba más del 70 % de los pacientes alérgicos son sensibles a este tipo polínico (Sánchez-Mesa *et al.*, 2005b; Cebrino *et al.*, 2016).

Para producir síntomas no se precisan niveles atmosféricos muy elevados, de 30 a 50 granos de polen/m³ de aire, aunque concentraciones inferiores pueden ser suficientes para sujetos más sensibles (Subiza, 2001; Cirera *et al.*, 2011). Algunos años, se han llegado a detectar en Córdoba 800 granos de polen/m³ durante el pico de la estación polínica (Velasco-Jiménez *et al.*, 2013).

Aunque no es posible distinguir los granos de polen de gramíneas de diferentes especies a través de microscopía óptica, la identidad y concentración de los alérgenos en los granos de polen sí que varía entre especies (Gangl *et al.*, 2013) e incluso durante la vida útil del polen (Buters *et al.*, 2010).

Las proteínas alergénicas de las gramíneas, presentes en el grano de polen o en otras partes de la planta, se distribuyen en 14 grupos de alérgenos según las similitudes fisicoquímicas que presentan, independientemente de la especie de procedencia (Andersson y Lidholm, 2003; Weber, 2007), y en 10 grupos según su elevada reactividad cruzada (nombrados según la nomenclatura oficial IUIS). Los grupos 2, 3 y 5 sólo se encuentran en la subfamilia Poideae en regiones templadas. Los alérgenos del grupo 10 están presentes en sólo diez especies de gramíneas, y los del grupo 6 sólo se han descrito hasta ahora en *Poa pratensis*, *Anthoxanthum odoratum* y *Phleum pratense*. Los alérgenos del grupo 1 (presentes en todas las especies de la familia Poaceae) y grupo 5 suponen entre el 80 % y el 90 % de los pacientes alérgicos al polen de gramíneas, lo que los convierte en alérgenos mayoritarios (Weber, 2007). *Phleum pratense* es una fuente importante de alérgenos polínicos en las áreas templadas, y debido a que muestra una importante reactividad cruzada con otras especies de la misma familia (Aleksić *et al.* 2014), sus extractos y alérgenos son ampliamente utilizados para el diagnóstico de polinosis al polen de gramíneas. Concretamente, Phl p 1 y Phl p 5 son marcadores de sensibilización para este tipo polínico, al estar presentes exclusivamente en los granos de polen (Gangl *et al.*, 2013), pero no en los gránulos de almidón u otras partes de la planta (Behrendt *et al.*, 1999). Estos alérgenos muestran las tasas más altas de sensibilización (> 50 %) en pacientes con alergia inducida (Tripodi *et al.*, 2012), aunque la prevalencia de sensibilización a ambos alérgenos varía significativamente en distintas regiones de España (Barber *et al.*, 2008). Por otro lado, los mismos alérgenos incluidos en el grupo 5 están ausentes en las gramíneas subtropicales (Davies *et al.*, 2011).

Muchas gramíneas también muestran reactividad cruzada con alérgenos de polen de otras plantas (Asturias *et al.*, 2002; Weber, 2007) y como resultado,

diferentes concentraciones polínicas afectan la tasa de síntomas en pacientes sensibles (D'Amato *et al.*, 2007). Por estos motivos, la alergia debida al polen de gramíneas no puede ser igual en todas las áreas y por tanto el concepto de alérgeno principal no debe ser universal.

2.2.6. Factores que influyen en la concentración polínica y de alérgenos en el aire.

2.2.6.1. La Meteorología y la situación geográfica.

Durante los últimos años se han propuesto diversas causas para explicar el aumento de las concentraciones de polen en Europa para la mayoría de los tipos polínicos alérgicos (Ziello *et al.*, 2012), así como de pacientes sensibles a ellos (Beggs, 2004; D'Amato *et al.*, 2007; D'Amato y Cecchi, 2008). Por otro lado, como se ha indicado anteriormente, diversos estudios han observado variaciones en las concentraciones anuales de alérgenos y polen, encontrando altas concentraciones de polen aun cuando se recogen bajas concentraciones de alérgenos, y viceversa

Recientes artículos han demostrado que las características de la estación polínica y la abundancia de alérgenos en el aire se asocian con los diferentes factores ambientales (D'Amato *et al.*, 2007; Cecchi *et al.*, 2010; Fernández-González *et al.*, 2013; García-Mozo *et al.*, 2014; Rojo *et al.*, 2015). Por tanto, el contenido de polen en el aire puede variar cada año respecto a lo esperado (Frei y Gassner, 2008), según las condiciones atmosféricas de cada momento y lugar.

De esta forma, aunque la temporada de polen generalmente coincide con la floración, también depende de ciertos factores meteorológicos que pueden mantener el polen en el aire durante periodos más o menos largos. Factores que, en gran medida, determinan la dispersión, el transporte y la deposición de los granos de polen (Galán *et al.*, 1995; Jones y Harrison, 2004). Es importante

destacar que las plantas herbáceas, incluyendo las gramíneas, suelen manifestar una respuesta más inmediata a las condiciones meteorológicas que las especies leñosas (Alcázar *et al.*, 2009). La estación de polen, afectada por las lluvias de invierno y las temperaturas en primavera, comenzará cuando las condiciones sean en cada momento favorables para la liberación de los granos de polen. También se sabe que los patrones de floración diurna cambian de acuerdo con factores meteorológicos de una forma específica a cada especie (Subba-Reddi *et al.*, 1988).

La influencia de las distintas variables meteorológicas puede variar según nos encontremos antes o durante la estación polínica. Concretamente las precipitaciones que tienen lugar antes de la floración, al aumentar la disponibilidad de agua, pueden incrementar el número de flores y por tanto la cantidad de polen emitido a la atmósfera (Jato *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; McLauchlan *et al.*, 2011). En regiones donde la disponibilidad de agua es un factor limitante, como el Área Mediterránea, la sequía impide la germinación de muchas semillas, especialmente en gramíneas, reduciendo la intensidad de la floración y por tanto de la concentración polínica (Dahl *et al.*, 2013). En cambio, un periodo de lluvia ocurrido durante la estación polínica, produce un lavado de la atmósfera y una reducción del contenido de polen en el aire. Por tanto, la concentración ambiental de polen es muy variable y depende, en primer lugar, de la disponibilidad de agua (especialmente en las gramíneas) (Clary *et al.*, 2004) y en segundo lugar de la temperatura (Sánchez-Mesa *et al.*, 2003), aunque esta última está más relacionada con el inicio de la estación polínica (Galán *et al.*, 2001; Smith y Emberlin 2006; Rosenzweig *et al.*, 2007). La temperatura es un factor que influye en la apertura de las anteras y en la dispersión del polen atmosférico en las regiones templadas (García-Mozo *et al.* 2009; Jato *et al.*, 2009). Las condiciones extremas de la ciudad de Córdoba, pueden implicar variaciones año a año y dentro de la misma estación (Sánchez-Mesa *et al.*, 2003).

De forma general podemos decir que bajo condiciones meteorológicas normales durante la estación polínica, a mayor temperatura y menor humedad, se alcan-

zarán las mayores concentraciones polínicas (Wan *et al.*, 2002). El ritmo estacional del fotoperiodo también influye en el desarrollo de las gramíneas (Laaidi, 2011). Los resultados de García-Mozo *et al.* (2009) mostraron que la variación entre diferentes áreas de estudio podía atribuirse a la latitud, las precipitaciones acumuladas y la temperatura.

Por otro lado, la temperatura mínima (Smith *et al.*, 2009) y las condiciones meteorológicas del año anterior a la floración parecen influir especialmente a las especies leñosas. Concretamente el olivo es altamente dependiente de la temperatura durante los meses que preceden al inicio de la floración (Galán *et al.*, 2005; Rojo y Pérez-Badía, 2015) y precisa unos umbrales óptimos de temperatura para florecer, con un rango de 5 - 12,5 °C en Andalucía, según la zona bioclimática donde se encuentre (Galán *et al.*, 2001; 2005).

Varios estudios han observado, además, que aunque las principales fuentes de emisión de polen proceden de áreas locales cercanas (Oteros *et al.* 2015a), se pueden detectar concentraciones de polen dispersadas a largas distancias (Hernández-Ceballos *et al.*, 2011a; 2011b; Sikoparija *et al.*, 2013; Rojo y Pérez-Badía, 2015), sobre todo en aquellos casos en los que el tamaño de polen es especialmente pequeño, como es el caso del olivo (Silva Palacios *et al.*, 2000; Galán *et al.*, 2013; Moreno-Grau *et al.*, 2016).

En el caso de los alérgenos, su concentración en el aire depende de las condiciones meteo-climáticas locales y la flora específica (Barber *et al.*, 2007). Concretamente, su liberación es un proceso dependiente de temperatura y pH, con valores máximos a 37 °C y pH 7,4 por ejemplo, en el caso de Phl p 5 (Behrendt *et al.*, 1999), además de otros factores ambientales, como la humedad, las tormentas y la polución (Bartra *et al.*, 2007).

De hecho, se ha observado que la misma cantidad de polen puede liberar cantidades variables de alérgenos (Buters *et al.*, 2015). Una mayor humedad parece aumentar la concentración de alérgenos (Fernández-González *et al.*, 2011; Buters

et al., 2015) y por tanto los casos de polinosis (D'Amato *et al.*, 2007), siendo las concentraciones variables en distintas zonas geográficas y a lo largo de la temporada de polen (Jochner *et al.*, 2015). Por ejemplo, Fernández-Caldas *et al.* (2007) señaló que existe una oscilación anual tanto en la potencia alergénica como en las concentraciones de Ole e 1, que se atribuyen a aspectos ambientales como temperaturas y precipitaciones. Las distintas especies parecen tener una menor concentración de alérgenos en los años con mayor producción de polen, y durante años con menor producción de polen, la planta aumenta su expresión, con el fin de garantizar la eficacia del proceso de fecundación, tal y como se ha observado en el olivo (Moreno-Grau *et al.*, 2016).

2.2.6.2. La contaminación y el cambio climático.

Las plantas están continuamente expuestas a estrés ambiental, tanto abiótico como biótico, y pueden responder ante estas condiciones de diferentes formas.

Los contaminantes se encuentran entre los principales factores externos a los que se enfrentan, especialmente en las zonas urbanas, y pueden influir en el porcentaje de emisión de alérgenos y por tanto, en la sensibilidad de los sujetos alérgicos (Suárez-Cervera *et al.*, 2008) o aumentando la reacción inmune de los individuos (Bartra *et al.*, 2007; Annesi-Maesano *et al.*, 2012). Además, las partículas contaminantes del aire pueden actuar como portadores de alérgenos, ayudando a su dispersión y acceso a las vías respiratorias (D'Amato, 2000; D'Amato *et al.* 2007; 2010).

Algunos estudios indican que la contaminación del aire, igualmente, puede provocar estrés a las plantas y reducir la intensidad de la floración (Guedes *et al.*, 2009), de manera que producen menos granos de polen menos y más pequeños. Otros estudios, sin embargo, indican que en estos casos los granos de polen aumentan el contenido y liberación de alérgenos por peso (Moreno-Grau *et al.*, 2016).

Los principales contaminantes atmosféricos que afectan a las plantas, especialmente después de una exposición a largo plazo, son el ozono, el dióxido de azufre y el dióxido de nitrógeno (D'Amato *et al.*, 2010). Distintos estudios se han enfocado en el papel que juegan las partículas diesel (DEP) y sus componentes, en el aumento de la sensibilización a los alérgenos aerotransportados (Riedl y Diaz-Sanchez, 2005).

Los entornos urbanos se caracterizan, no sólo por el efecto "isla de calor", sino también por los altos niveles de contaminantes (NO, CO₂, partículas...). Concretamente las altas concentraciones atmosféricas de CO₂ pueden causar un aumento general de la biomasa de la vegetación (Jablonski *et al.*, 2002), un aumento de la floración y por tanto, de la producción de polen (Rogers *et al.*, 2006; Ziska *et al.*, 2009; Albertine *et al.*, 2014), y probablemente un aumento en la alergenicidad del mismo (Singer *et al.*, 2005). Se ha observado, por ejemplo, que el polen de *Phleum pratense* libera más concentración de alérgenos por polen cuando se expone a concentraciones elevadas de NO₂, O₃ y CO₂ (Motta *et al.*, 2006, Albertine *et al.*, 2014). Los resultados de Ziska (2003) muestran una serie de efectos indirectos potenciales sobre determinadas plantas expuestas a un aumento en la concentración de CO₂, como cambios en el contenido nutricional de los alimentos o un aumento del uso de herbicidas, así como posibles efectos directos, como el aumento del polen de ambrosía. Sin embargo, se han observado determinadas discrepancias en la relación de los contaminantes sobre los síntomas de pacientes alérgicos en determinados tipos polínicos (Cirera *et al.*, 2011).

La abundancia de alérgenos y ciertos contaminantes en el aire pueden estar influenciados por los mismos factores, tales como la temperatura y la precipitación, por lo que sus concentraciones máximas pueden coincidir a menudo (Cecchi *et al.*, 2010; D'Amato *et al.*, 2010; Cecchi, 2013).

Dependiendo del tipo polínico, las concentraciones de polen pueden ser más bajas en las ciudades que en las zonas rurales circundantes, aunque un estudio

a escala continental revela una tendencia creciente en la concentración anual de polen en el aire para muchos taxones en Europa, que es más pronunciada en zonas urbanas que en zonas semi-rurales o rurales (Ziello *et al.*, 2012). Sin embargo, las tasas de prevalencia a la polinosis y el asma relacionada con el polen son, con frecuencia, tanto o más altas en las ciudades incluso con concentraciones polínicas menores (D'Amato, 2002; D'Amato *et al.*, 2010). En el caso de las gramíneas, se ha observado una disminución anual de la cantidad total de polen en Europa (Emberlin *et al.*, 1999; Ridolo *et al.*, 2006; Jato *et al.*, 2009), probablemente debido a los cambios en el uso del suelo que han llevado a una reducción en los pastizales. En cambio, la frecuencia de la sensibilización alérgica de gramíneas no disminuye, probablemente por la influencia de la contaminación (Cecchi *et al.*, 2010; D'Amato *et al.*, 2010) ya que el aumento antropogénico de los niveles atmosféricos de CO₂ parece ser influyente (Ziello *et al.*, 2012).

Por otro lado, el cambio climático parece afectar especialmente al área mediterránea (Fernández-González *et al.*, 2005; Parry *et al.*, 2007; Hillel y Rosenzweig, 2013), donde las temperaturas están aumentando, la precipitación disminuyendo y los fenómenos pluviales extremos son cada vez más frecuentes, con periodos de sequía más largos (IPCC, 2014). Es probable que las funciones biológicas de las plantas que responden tanto a las condiciones de calor y frío, se estén viendo modificadas por este aumento de temperatura y por la escasez de agua. Hay evidencias de que el cambio climático actual está afectando a los diferentes procesos aerobiológicos de aeroalérgenos y a los contaminantes (Cecchi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Se espera que afecte al inicio, la duración y la intensidad de la estación polínica (D'Amato y Cecchi, 2008; Ayres *et al.*, 2009; Galán *et al.*, 2016). Concretamente se ha observado un adelanto en el periodo de floración de forma general (Galán *et al.*, 2005; Beaubien y Hamann, 2011), lo que podría provocar una temprana liberación de polen, tal y como se ha observado en el olivo (García-Mozo *et al.*, 2015) y por tanto, una aparición temprana de síntomas de enfermedades alérgicas (Cecchi *et al.*, 2010). Hay estudios, en

cambio, que muestran una tendencia hacia un inicio tardío en la estación polínica y una duración más corta de la misma (Jato *et al.*, 2009), pero se trata de una zona meteo-climática diferente al área mediterránea y con un número bajo de años de estudio, que no permite producir resultados concluyentes.

2.3. Caracterización del área de estudio

El estudio se ha llevado a cabo en la ciudad de Córdoba (**Figura 6**), situada al sur de la Península Ibérica. Se localiza a 37 °C 53' N y 4° 45' W y a una altitud de 123 metros.

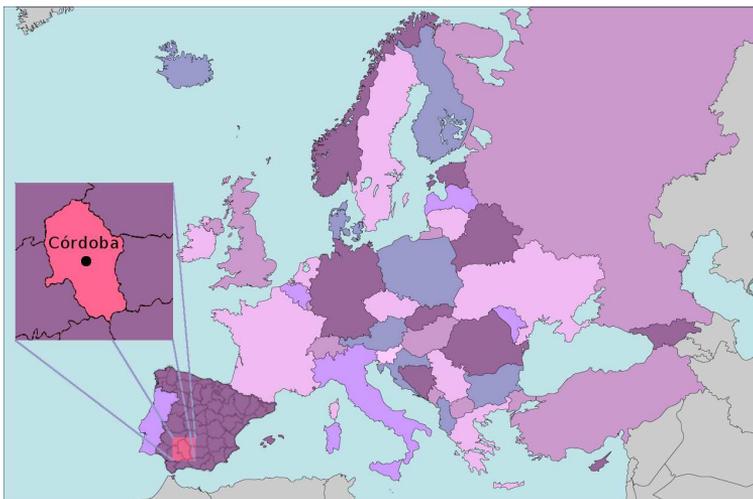


Figura 6. Situación de Córdoba

Su término municipal, de 1245 Km², se halla dentro del Valle del Guadalquivir, río que lo atraviesa completamente. La orografía se delimita en dos zonas, Sierra Morena al norte y la Campiña al sur, seguida de la Sierra Subbética. Sierra Morena tiene una altitud media de 400 metros donde afloran rocas de gran complejidad, calizas, esquistos y conglomerados, y destacan especialmente las rocas

metamórficas, principalmente anfibolitas. En la campiña encontramos terrenos bajos con leves ondulaciones del terreno que forman la denominada genéricamente campiña, con materiales sedimentarios de origen marino depositados en los primeros momentos de la orogenia alpina (Valle, 2016).

2.3.1. Vegetación

Respecto a la vegetación, Sierra Morena se corresponde con la serie mesomediterránea luso-extremadurensis seco-subhúmeda y silicícola de la encina (*Quercus rotundifolia* Lam.) y sus bosques típicos serían los encinares y alcornoques, con coscojales, madroñales, jarales, etc., y a menudo con cultivos de pinos. Sin embargo no son abundantes los encinares bien conservados, siendo explotados tradicionalmente en forma adehesada para un aprovechamiento ganadero y cinegético. En las zonas más meridionales de Sierra Morena han sido reemplazadas por olivares, generalmente de carácter marginal.

La vega y campiña de Córdoba pertenece a la serie climatofila del piso mesomediterráneo (termofila bética con lentisco) y sólo el sector occidental se corresponde con el piso termomediterráneo (bético-algarbiense seco-subhúmedo-húmeda basofila de la encina) (Costa-Pérez y Valle-Tendero, 2004). No obstante, dada la intensa roturación a la que ha llevado la temprana antropización del sector, debido al potencial agronómico del suelo, la vegetación natural es sólo marginal (acebuches, encinas y alcornocal con acebuche). Los cultivos tradicionales son sobre todo cereales (especialmente trigo y cebada), aunque a medida que se ha ido introduciendo el regadío en muchas zonas, se ha incrementado la producción de algodón, girasol y plantas forrajeras. El olivo está muy presente en esta zona y ha crecido en extensión de forma notable durante los últimos quince años.

Actualmente, Córdoba junto con Jaén, Granada y Sevilla, forman la zona más extensa del mundo dedicada a las plantaciones de olivo (1.549.967 ha), con una producción anual de oliva superior a 5.000.000 de toneladas. Dentro de esta

región, la provincia de Córdoba es la segunda zona oleícola con 347.107 ha, con un promedio de 1.000.000 de olivos (Anuario Estadístico de Andalucía 2015).

La vegetación que se encuentra dentro de las ciudades puede tener una importante influencia en la concentración polínica del aire (Cariñanos *et al.*, 2002; Gonzalo-Garijo *et al.*, 2006). En los jardines de la ciudad de Córdoba encontramos gran variedad de especies ornamentales que ocasionan problemas de salud a la población por su carácter alergógeno: *Platanus x hispanica* Mill. ex Muenchh, *Olea europaea* L., *Cupressus sempervirens* L., *Cupressus macrocarpa* Hartw., *Populus alba* L., *Betula pendula* y *Phoenix* spp. son algunos de los más utilizados. Las familias más representadas en los jardines y calles son: Arecaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Fabaceae, Liliaceae, Moraceae, Myrtaceae, Oleaceae, Pinaceae, Rosaceae y Salicaceae (Velasco *et al.*, 2013), siendo los tipos polínicos más abundantes: Cupressaceae, *Quercus*, Poaceae y *Platanus* (Martínez-Bracero *et al.*, 2015). También encontramos especies poco alergénicas como *Celtis australis* L., *Schinus molle* L. y *Cercis siliquastrum* L.

Concretamente los captadores se encuentran en el Campus de Rabanales de la Universidad de Córdoba al este de la ciudad, a 22 metros de altura sobre el nivel del suelo. Se trata de una zona próxima a la sierra de Córdoba y rodeada de pequeñas zonas de cultivo, así como de herbáceas surgidas de forma espontánea y especies típicas de áreas ajardinadas.

2.3.2. Climatología

Córdoba posee un clima mediterráneo con cierta continentalidad y con influencia atlántica. Los inviernos son suaves, aunque con algunas heladas que en ocasiones han llegado a ser fuertes. Los veranos son muy calurosos, con importantes oscilaciones térmicas diarias y temperaturas máximas que, en promedio, son las más altas de Europa, sobrepasándose todos los años los 40 °C, llegando a superar en diversas ocasiones los 45 °C. Aunque las mínimas son más frescas, la

temperatura media alcanza los 28 °C en julio y agosto. La temperatura media anual es de 18,1 °C y la precipitación media anual es de 591 mm según datos de AEMET durante 30 años (1982-2011) (**Figura 7**).

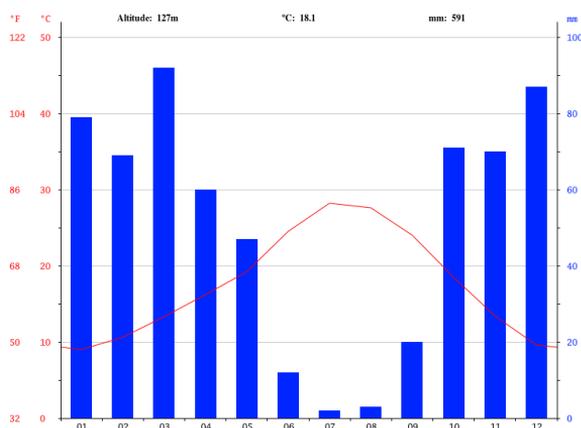


Figura 7. Climograma de la ciudad de Córdoba. AEMET media de 30 años (1982-2011).

Las precipitaciones se concentran en los meses más fríos, debido a la citada influencia atlántica, ya que se producen por la entrada de borrascas desde el oeste, situación que se da más en el periodo de diciembre a febrero. Presenta una fuerte sequía estival, típica de los climas mediterráneos. Las lluvias anuales alcanzan los 600 mm, aunque hay una importante irregularidad interanual.

La temperatura máxima registrada en el Observatorio del Aeropuerto de Córdoba (situado a 6 km de la ciudad) son los 46,6 °C del 23 de julio de 1995 y los 46,2 °C del 1 de agosto de 2003. La mínima más baja corresponde a los -8,2 °C del 28 de enero de 2005. 2015 fue un año especialmente caluroso con la temperatura media de las máximas más alta (40.3 °C)(**Tabla 1**).

<i>Máx. nº de días de lluvia/mes</i>	24 (dic 1996)
<i>Máx. nº de días de nieve/mes</i>	2 (ene 2006)
<i>Máx. nº de días de tormenta/mes</i>	9 (may 1998)
<i>Prec. máx. en un día (l/m²)</i>	154.3 (02 nov 1997)
<i>Prec. mensual más alta (l/m²)</i>	355.0 (dic 1996)
<i>Racha máx. viento: velocidad y dirección (Km/h)</i>	Vel 126, Dir 210 (18 dic 1989 14:10)
<i>Tem. máx. absoluta (°C)</i>	46.6 (23 jul 1995)
<i>Tem. media mensual de las máx. más alta (°C)</i>	40.3 (jul 2015)
<i>Tem. media mensual de las mín. más baja (°C)</i>	-0.9 (feb 2012)
<i>Tem. media mensual más alta (°C)</i>	30.5 (jul 2015)
<i>Tem. media mensual más baja (°C)</i>	7.2 (dic 1967)
<i>Tem. mín. absoluta (°C)</i>	-8.2 (28 ene 2005)

Tabla 1. Datos meteorológicos de la ciudad de Córdoba. Fuente: AEMET (1959-oct 2016)

2.4. Métodos de muestreo: polen y alérgenos

A lo largo del siglo XX los métodos de muestreo comenzaron a desarrollarse y mejorarse, con el fin de tener un buen conocimiento de las partículas presentes en el aire que ocasionaban alergias.

Aunque Wolf *et al.* (1959) presentó en su día una crítica indicando que el número de métodos disponibles para el muestreo de partículas en el aire era aproximadamente igual al número de investigadores, en realidad hay un número limitado de enfoques o principios físicos para la recogida de polen o esporas. Los principales son: deposición gravitacional (Durham, 1946; Tauber, 1967), filtración (Cour, 1974), impacto (Perkins, 1957), succión-impacto (Hirst, 1952) e impacto en cascada (May, 1945; Andersen, 1958). Se ha demostrado la importancia de la instalación de los captadores a una altura elevada cuando se busca estu-

diar dinámicas polínicas, ya que está menos dominada por efectos localizados o contaminación del aire (Alcázar *et al.*, 1999; Khattab y Levetin, 2008).

Los primeros muestreadores se basaron en la sedimentación por gravedad. Un método simple y poco costoso, pero poseen la desventaja de que sólo se cuantifican datos en términos de superficie (cm^2) y no ofrecen una estimación de la concentración de partículas en volumen de aire. Con estas muestras de polen la captura está, además, sesgada a partículas más grandes. Sin embargo, hoy en día, ha demostrado ser un método eficaz y es particularmente útil en lugares remotos donde el suministro de energía podría plantear un problema (West y Kimber, 2015).

Otros captadores se basan en el método de impacto, referidos a superficies sólidas, tales como agar en una placa Petri (muestreador Andersen, SKC Biostage y muchos otros), en el caso de esporas de hongos que pueden germinar, o cinta adhesiva, diapositivas o varillas (Hirst, Air-O-Cell, Rotorod), o sobre un líquido (Coriolis, CIP 10-M). La elección del muestreador dependerá generalmente de la disponibilidad de energía (red o batería y/o panel solar), el formato más adecuado para el análisis, el volumen de aire muestreado por minuto y la duración del muestreo (West y Kimber, 2015).



Figura 8. Captador Volumétrico tipo Hirst en el Campus Universitario de Rabanales (Córdoba).

En el caso de estudios continuos sobre el contenido de polen o esporas en el aire, recientemente, los muestreadores utilizados se basan en análisis volumétricos por succión, donde las partículas son atraídas hacia los captadores a través de bombas, ventiladores o aspiradores. El captador más utilizado de este tipo es el Hirst (1952) (**Figura 8**), con una sencilla estructura formada básicamente por tres unidades: unidad de impacto, veleta y bomba de vacío. Esta estructura básica ha podido mejorarse en modelos posteriores. En los captadores de las casas comerciales Burkard y Lanzoni se emplea como superficie de impacto una cinta adhesiva adherida a un tambor circular que gira durante un período de siete días, de esta forma, se puede realizar el muestreo continuo de la atmósfera durante una semana completa, y obtener a partir de él datos diarios y horarios. Existen otros modelos basados en el mismo diseño, como el captador Kramer-Collins (G R Electric, Manhattan, KS). Ocasionalmente, se publican informes aerobiológicos que utilizan otros métodos de muestreo (Piotrowska y Weryszko-Chmielewska, 2003). Dado que en los captadores volumétricos se conoce el volumen exacto de aire muestreado, tras ser identificados los granos de polen y/o esporas y contabilizados por microscopía óptica, los recuentos de polen se expresan como la media diaria de granos de polen por metro cúbico de aire.

Un dispositivo similar, ampliamente utilizado hasta hace poco en los EE.UU., es el Rotorod (Gregory, 1973; Allen, 1981), un muestreador de impacto giratorio, relativamente barato y simple de operar, que proporciona información sobre concentraciones promedio durante la duración del tiempo de muestreo. Consiste en una varilla de latón en sección cuadrada en forma de U. Los dos brazos verticales giran a través de 120 litros de aire por minuto y las partículas se recogen por impactación. Los brazos se retiran después del muestreo y se observan directamente bajo el microscopio.

Los captadores en cascada presentan la particularidad de separar las partículas por tamaño durante el muestreo. El muestreador Andersen (Andersen, 1958) aspira a una velocidad de 28,3 L/min., a través de una serie de placas circulares

de tamaño idéntico, perforadas cada una con 400 orificios, progresivamente de más grandes a más pequeños, a través de los cuales se depositan partículas sobre un medio estéril en placas de Petri.

Cada captador tiene diferentes ventajas e inconvenientes en aspectos relacionados con la eficiencia en la recolección (que varía generalmente con el tamaño de partícula), el consumo de energía, la longitud del período de la muestra, tiempo que se puede dejar desatendido y la facilidad en la toma y procesamiento de las muestras.

Respecto al muestreo de alérgenos, se han utilizado distintos muestreadores de bajo y alto volumen, además de pruebas inmunoquímicas y moleculares. Concretamente se han desarrollado sistemas que ya se utilizaban en el muestreo polínico con el fin de obtener muestras destinadas a la aplicación directa de métodos de diagnóstico inmunológico, particularmente ELISA (West y Kimber, 2015).

El primer captador que comenzó a emplearse en la detección de alérgenos fue un tipo Accu-Vol (CAV, captadores de alto volumen), el cual tomaba grandes cantidades de aire y las partículas impactaban en un filtro (Johnsen *et al.*, 1992). Numerosos investigadores en este campo usan este tipo de muestreadores, principalmente debido a la necesidad de recolectar suficiente alérgeno para la cuantificación. Estos se suelen combinar con captadores en cascada con el fin de fraccionar las partículas que se recogen en los filtros por distinto tamaño. Un sistema desarrollado para el muestreo durante largos períodos a un alto volumen de aspiración (800 L/min) es el captador por impacto en cascada ChemVol (Butters *et al.*, 2012) que posee cuatro posibles etapas de captura progresivamente más finas. El sustrato de impacto es una espuma de poliuretano que permite reducir el rebote de partículas y facilita el muestreo durante períodos prolongados (West y Kimber, 2015).

Igualmente se han empleado captadores de bajo volumen (CBV). Se desarrolló un muestreador de ciclones direccionales, que aspira a un volumen de 16 L/min,

y recoge las partículas directamente en tubos Eppendorf secos para un posterior análisis inmunológico o para el recuento de partículas (Emberlin, 1995; Pashley *et al.*, 2012). Es un método rápido y relativamente barato para el muestreo del contenido de aeroalérgenos en la atmósfera. Este nivel de automatización y facilidad de procesamiento se ve atenuado por la eficiencia de recogida variable, ya que según West y Kimber (2015) se pueden acumular partículas por encima del tubo de recogida y los tubos tienden a llenarse de agua en días lluviosos. Se ha desarrollado otro sistema basado en ciclones que tiene un mayor volumen de flujo (200 L/min) y las muestras se recogen directamente en líquido, pero no es direccional (Thibaudon y Lachasse, 2006).

Por último, es importante destacar el gran número de innovaciones que se están llevando a cabo en el desarrollo y uso de dispositivos de muestreo atmosférico, combinando la ciencia de la microbiología con los avances en ingeniería y tecnología. Estos incluyen mejoras en la eficiencia de captura, diagnóstico e informes inalámbricos de los resultados o incluso montaje de captadores en plataformas móviles tales como UAVs (vehículos móviles autónomos) (González *et al.*, 2011) y vehículos terrestres para permitir el muestreo en diferentes altitudes y ubicaciones en un corto espacio de tiempo. Los sistemas de información geográfica y la aplicación a una red de captadores pueden permitir una mayor predicción de la dinámica de dispersión (Noh *et al.*, 2013).

Igualmente, el análisis de alto rendimiento mediante microscopía para recuento e identificación de los distintos tipos polínicos ha sido asistido por el uso de técnicas automatizadas de reconocimiento de imágenes (p. ej. www.aeromedi.org) con el fin de reducir la carga de trabajo y obtener un rápido informe de las concentraciones de polen. Oteros *et al.* (2015b) obtuvo buenos resultados con un sistema de monitoreo de polen basado en reconocimiento de imágenes, totalmente automatizado, BAA500, un impactador virtual de 3 etapas a 60 m³/h. Cerca del 95 % del polen identificado fue reconocido correctamente. Sin embargo, aún se precisan mejoras; en comparación con la identificación manual por microscopía óptica, el 27 % del total del polen capturado no fue recogido en el

informe automático.

Estudios recientes se han centrado más en la mejora de técnicas post-muestreo aplicadas para aumentar precisión en la identificación de partículas mediante el uso de técnicas tales como: métodos inmunológicos (por ejemplo, ELISA, dispositivos de flujo lateral), diagnósticos basados en el ADN (por ejemplo, PCR, TwistDX y LAMP), y biosensores (por ejemplo, el muestreador automático SYield, que transmite los resultados sin necesidad de llevar la muestra a un laboratorio (Heard y West, 2014).

2.4.1. Captador de polen utilizado en el estudio

El captador volumétrico tipo Hirst (Hirst, 1952), es el método propuesto por la European Aeroallergen Network (EAN) y la Red Española de Aerobiología (REA). Este captador succiona 10 L/min de aire de forma continua, permitiendo conocer el volumen de aire muestreado y la concentración diaria y horaria de granos de polen en el aire, presentando estos resultados como número de granos de polen/m³ de aire. Por este motivo, este ha sido el captador empleado para nuestro estudio (**Figura 8**). Para la obtención de los datos polínicos se han seguido las recomendaciones que se detallan en el Manual de Calidad y Gestión de la REA (Galán *et al.* 2007) y los mínimos requerimientos de la European Aerobiology Society (EAS, 2011; Galán *et al.*, 2014).

2.4.2. Captadores de alérgenos utilizados en el estudio

Los captadores de alérgenos empleados en este estudio se basan en un sistema de captación basado en las fuerzas centrífugas de origen ciclónico (Cyclone) y un captador en cascada de alto volumen (ChemVol). En ambos casos se pueden realizar cuantificaciones de alérgenos mediante técnicas moleculares y enzimáticas, como ELISA.

- Muestreador Burkard multi-vial Cyclone (**Figura 9**) (Williams *et al.*, 2001), de bajo volumen. Las partículas se recogieron en un vial Eppendorf seco de 1,5 ml durante 24 horas con un flujo de aire de 16,5 l/min. Ocho viales se disponen en una ruleta automática que permite el cambio de los Eppendorf cada 24 horas y permite una autonomía de una semana. Posteriormente las muestras son almacenadas a -40 °C hasta la extracción de los aeroalérgenos (Fernández- González *et al.* 2010; Rodríguez-Rajo *et al.* 2011).
- Captador de alto volumen ChemVol (Albany, NY, EE.UU.) (**Figura 9**) con un caudal de 800 L/min. Las partículas se recogieron en filtros de poliuretano a diferentes niveles, que deben ser renovados tras 24 horas y almacenados a -80 °C hasta la extracción de las proteínas alergénicas (Buters *et al.* 2010).



Figura 9. Captador Cyclone (izquierda) y Captador ChemVol (derecha) el Campus Universitario de Rabanales (Córdoba).

2.5. Cuantificación inmunoquímica de alérgenos

La técnica ELISA (Enzyme Linked Immuno Absorbent Assay: “ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas”) es una técnica muy común que consiste en detectar el antígeno o anticuerpo (nuestra proteína alergénica) a través de dos

componentes acoplados: un anticuerpo (que se une al antígeno de forma específica) y una enzima (que se activa y señala la unión al antígeno). La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría (**Figura 10**) el antígeno en la muestra.

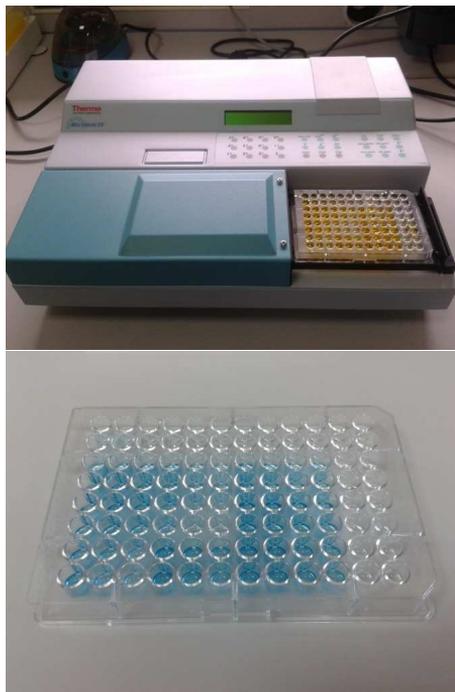


Figura 10. Espectrofotómetro y placa utilizada en el análisis de cuantificación alérgica.

Aunque existen diferentes técnicas para conocer la concentración de anticuerpos o antígenos, cuando el objeto de los ensayos es estudiar concentraciones de alérgenos en muestras o extractos, el ELISA sándwich (**Figura 11**) es la mejor alternativa y la más recomendable al ser la técnica que proporciona mayor sensibilidad y especificidad. Por otro lado, es menos comprometida para el medio ambiente. Schäppi *et al.* (1996) presentó los primeros resultados con un test ELISA doble sándwich para determinar alérgenos de Betula (Bet v 1) y

gramíneas (Phl p 5).

En nuestro estudio, la extracción de alérgenos del captador Cyclone se realizó siguiendo el método recomendado por Takahashi *et al.* (2001), y modificada por Moreno-Grau *et al.* (2006), cuyo tampón de extracción emplea bicarbonato amónico (NH_4HCO_3). La extracción de las muestras del captador Chemvol se realizó siguiendo la metodología de Buters *et al.* (2010), que emplea solución salina con fosfato (PBS) como tampón de extracción.

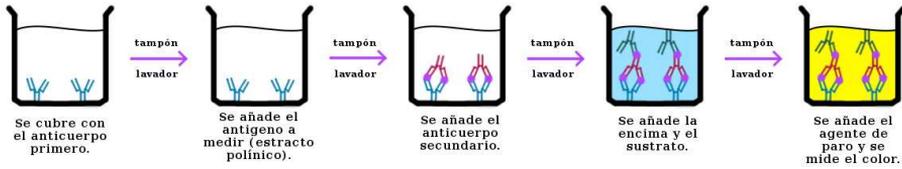


Figura 11. Diagrama del test Elisa doble sándwich

Objetivos



3. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido realizar un estudio sobre el comportamiento de dos de los alérgenos mayoritarios y de importante ratio de sensibilidad en la población, así como compararlos con la concentración de polen en el aire y estudiar la relación existente entre ellos y las variables meteorológicas de la atmósfera de Córdoba. Se han utilizado varios captadores con el fin de determinar el método de captura más eficiente. Para ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos en cada uno de los diferentes capítulos.

Capítulo I

1. Cuantificar el contenido del alérgeno mayoritario Ole e 1 y del polen de olivo en la atmósfera de Córdoba.
2. Realizar un estudio comparativo entre Ole e 1 y los granos de polen de olivo en el aire, y determinar la producción potencial de aeroalérgenos por polen.
3. Estudiar la relación existente entre las concentraciones polínicas y de alérgenos en la atmósfera con los principales parámetros meteorológicos.

Capítulo II

1. Cuantificar el contenido del alérgeno Phl p 5 y del polen de gramíneas en la atmósfera de Córdoba.
2. Realizar un estudio comparativo entre el contenido de Phl p 5 y los granos de polen de gramíneas en el aire, y determinar la producción potencial de aeroalérgenos por polen.
3. Estudiar la relación existente entre las concentraciones polínicas y de alérgenos en la atmósfera con los principales parámetros meteorológicos.

Capítulo III

1. Realizar un estudio comparativo sobre el comportamiento de distintos aeroalérgenos utilizando muestreadores de alto y bajo volumen para determinar el método de captura más eficiente.
2. Estudiar la relación de alérgenos detectados por cada uno de los captadores con el contenido de polen en el aire.
3. Estudiar la influencia de los parámetros meteorológicos en los distintos métodos de muestreo empleados.

Capítulo I



Correlation between airborne *Olea europaea* pollen concentrations and levels of the major allergen Ole e 1 in Córdoba, Spain, 2012–2014

M. P. Plaza¹ · P. Alcázar¹ · C. Galán¹

Received: 18 August 2015 / Revised: 6 April 2016 / Accepted: 9 April 2016 / Published online: 19 April 2016
© ISB 2016

Abstract *Olea europaea* L. pollen is the second-largest cause of pollinosis in the southern Iberian Peninsula. Airborne-pollen monitoring networks provide essential data on pollen dynamics over a given study area. Recent research, however, has shown that airborne pollen levels alone do not always provide a clear indicator of actual exposure to aeroallergens. This study sought to evaluate correlations between airborne concentrations of olive pollen and Ole e 1 allergen levels in Córdoba (southern Spain), in order to determine whether atmospheric pollen concentrations alone are sufficient to chart changes in hay fever symptoms. The influence of major weather-related variables on local airborne pollen and allergen levels was also examined. Monitoring was carried out from 2012 to 2014. Pollen sampling was performed using a Hirst-type sampler, following the protocol recommended by the Spanish Aerobiology Network. A multi-vial cyclone sampler was used to collect aeroallergens, and allergenic particles were quantified by ELISA assay. Significant positive correlations were found between daily airborne allergen levels and atmospheric pollen concentrations, although there were occasions when allergen was detected before and after the pollen season and in the absence of airborne pollen. The correlation between the two was irregular, and pollen potency displayed year-on-year variations and did not necessarily match pollen-season-intensity.

Keywords Olive · Aeroallergens · ELISA · Airborne pollen · Ole e 1 · Pollinosis · Aerobiology · Pollen · Pollen index · Meteorological parameters

Introduction

Hay fever caused by pollen allergens is among the most common chronic diseases in Europe, and its incidence has risen over recent decades (Bousquet et al. 2007; Cecchi et al. 2010). Airborne pollen concentrations have traditionally been used as a means of estimating exposure to aeroallergens and as the basis for information provided to local allergy-sufferers. Today, national and regional monitoring networks provide essential data on the spatial and temporal distribution of airborne pollen.

However, recent research has shown that airborne pollen concentrations alone do not always provide a clear indication of actual allergen exposure; nor do they always coincide with symptom intensity in patients sensitive to a given pollen type (D'Amato et al. 2007; Brito et al. 2011). Variations in aeroallergen concentrations have been observed under certain environmental conditions (De Linares et al. 2007; Fernández-González et al. 2010; Buters et al. 2012). Differences in pollen potency reported for different sites in Europe may well be attributable to specific local conditions, including long-range transport and other factors (Buters et al. 2012; Galán et al. 2013).

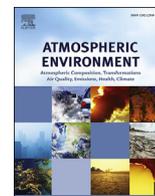
Olive pollen (*Olea europaea* L.) is the second largest cause of pollinosis in the southern Iberian Peninsula (Sánchez-Mesa et al. 2005), and it is the leading cause of hay fever in some areas of Andalusia, where up to 80 % of patients suffering from allergy are sensitized to this pollen type (Sánchez-Mesa et al. 2005; Barber et al. 2008). Ole e 1 is the most representative allergen, accounting for over 10 % of the total

✉ M. P. Plaza
m02piplm@uco.es

¹ Department of Botany, Ecology, and Plant Physiology, University of Córdoba, Edificio C-4, Celestino Mutis, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

Capítulo II





Mismatch in aeroallergens and airborne grass pollen concentrations



M.P. Plaza ^{a,*}, P. Alcázar ^a, M.A. Hernández-Ceballos ^b, C. Galán ^a

^a Department of Botany, Ecology and Plant Physiology, University of Córdoba, Carretera Nacional IV Km. 396, Edificio C-4, Celestino Mutis 3^a Planta, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, Spain

^b European Commission, Joint Research Centre (JRC), Institute for Transuranium Elements (ITU), Via Enrico Fermi 2749, 21027, Ispra, VA, Italy

HIGHLIGHTS

- High pollen concentrations do not always imply high aeroallergen levels.
- Pollen concentrations are better correlated with weather factors than allergen.
- Light winds prompt the accumulation of grass pollen near the surface.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2016

Received in revised form

1 September 2016

Accepted 5 September 2016

Available online 7 September 2016

Keywords:

Poaceae

Aeroallergens

Airborne pollen

Córdoba

South Spain

Meteorological parameters

ABSTRACT

An accurate estimation of the allergen concentration in the atmosphere is essential for allergy sufferers. The major cause of pollinosis all over Europe is due to grass pollen and Phl p 5 has the highest rates of sensitization (>50%) in patients with grass pollen-induced allergy. However, recent research has shown that airborne pollen does not always offer a clear indicator of exposure to aeroallergens. This study aims to evaluate relations between airborne grass pollen and Phl p 5 concentrations in Córdoba (southern Spain) and to study how meteorological parameters influence these atmospheric records. Monitoring was carried out from 2012 to 2014. Hirst-type volumetric spore trap was used for pollen collection, following the protocol recommended by the Spanish Aerobiology Network (REA). Aeroallergen sampling was performed using a low-volume cyclone sampler, and allergenic particles were quantified by ELISA assay. Besides, the influence of main meteorological factors on local airborne pollen and allergen concentrations was surveyed. A significant correlation was observed between grass pollen and Phl p 5 allergen concentrations during the pollen season, but with some sporadic discrepancy episodes. The cumulative annual Pollen Index also varied considerably. A significant correlation has been obtained between airborne pollen and minimum temperature, relative humidity and precipitation, during the three studied years. However, there is no clear relationship between allergens and weather variables. Our findings suggest that the correlation between grass pollen and aeroallergen Phl p 5 concentrations varies from year-to-year probably related to a complex interplay of meteorological variables.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Grass pollen is the major cause of pollinosis in Europe (Burbach et al., 2009) and one of the most important airborne allergen sources worldwide. It contains various allergens, the major group 5 allergen (<http://www.allergome.org/>) has been considered on this study a major source of grass pollen in temperate areas, Phl p 5 is associated with the highest rates of sensitization (>50%) in patients with grass pollen-induced allergy (Tripodi et al., 2012). The

prevalence of this allergen is also an optimal marker for grass pollen concentrations, since it occurs solely in Poaceae pollen grains (Andersson and Lidholm, 2003).

The Poaceae family comprises ca. 10,000 species (Watson and Dallwitz, 1992) flowering mostly during spring, from April to June in the Mediterranean area of Europe, although the pollen season of grass can last until September in northern, central and eastern Europe (D'Amato et al., 2007; Puc, 2011). A total of 420 species grow in Andalusia (García Rollán, 1985). In the Andalusian city of Córdoba, the grass pollen curve is mainly associated with only some species, including *Arrhenatherum album*, *Dactylis glomerata*, *Lolium rigidum*, *Trisetaria panicea* and *Vulpia geniculata* (León-Ruiz et al., 2011; Cebrino et al., 2016). Although pollen release in other

* Corresponding author.

E-mail address: o02piplm@uco.es (M.P. Plaza).

Capítulo III



Aeroallergens: a comparative study of two monitoring methods

M. P. Plaza · P. Alcázar · M. J. Velasco-Jiménez · C. Galán

Received: 13 December 2016 / Accepted: 9 February 2017
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2017

Abstract Olive and grass pollen grains are the major causes of hay fever in the Mediterranean region. A number of samplers and methods have been developed in recent years in order to obtain reliable data regarding airborne allergen concentrations. This paper reports on a detailed comparison of two samplers—Cyclone and ChemVol—and on the parameters that could influence their efficiency. Airborne concentrations of two key olive and grass allergens, Ole e 1 and Phl p 5, respectively, were monitored over two years with different weather patterns, 2012 and 2014. Allergenic particles were quantified by ELISA assay, and results were compared with pollen concentrations monitored using a Hirst-type volumetric spore trap over the same study periods. The influence of weather-related parameters on local airborne pollen and allergen concentrations was also analysed. Although

a positive correlation was detected between results obtained using the two samplers during the pollen season, results for the cumulative annual Allergen Index varied considerably. The two samplers revealed a positive correlation between pollen concentrations and both minimum temperature during the warmer year (2012) and maximum temperature during the cooler year (2014); a negative significant correlation was observed in both cases with rainfall and relative humidity. In summary, although some differences were observed between the two samplers studied, both may be regarded as suitable for allergen detection.

Keywords Olive · Grass · Aeroallergens · Cyclone sampler · ChemVol sampler · Airborne pollen

M. P. Plaza (✉) · P. Alcázar · M. J. Velasco-Jiménez · C. Galán

Department of Botany, Ecology and Plant Physiology,
University of Córdoba, Carretera Nacional IV Km. 396,
Edificio C-4, Celestino Mutis 3^a Planta, Campus de
Rabanales, 14014 Córdoba, Spain
e-mail: o02piplm@uco.es

P. Alcázar
e-mail: bv2altep@uco.es

M. J. Velasco-Jiménez
e-mail: bv2vejim@uco.es

C. Galán
e-mail: bv1gasoc@uco.es

1 Introduction

Pollen allergy is among the most prevalent causes of seasonal respiratory disease in Europe. Exposure to allergens derived from pollen grains, microsome particles or other parts of the plant, is an important risk factor for the development of allergic symptoms such as rhinitis and conjunctivitis (Fernández-Caldas et al. 1992; D'Amato et al. 1991) and of asthma (Eder et al. 2006; Cecchi et al. 2010); it is also associated with allergen sensitization (De Weed et al. 2002; Brito et al. 2011). Air sampling has traditionally been used to analyse atmospheric bioaerosol composition

Discusión



7. DISCUSIÓN GENERAL

Este estudio se ha centrado en la relación entre las concentraciones de polen y de los aeroalérgenos en la atmósfera de Córdoba, así como en la influencia de los parámetros meteorológicos. Se han estudiado los tipos polínicos *Olea europaea* L., y Poaceae, con sus alérgenos mayoritarios Ole e 1 y Phl p 5, de gran incidencia en el área mediterránea. Concretamente en Córdoba, las concentraciones polínicas del olivo son muy elevadas durante la estación polínica, con una media diaria entre 50 y 4000 granos de polen/m³ (Velasco *et al.*, 2013). Debido a la gran extensión de este árbol en nuestra región, se trata del tipo polínico más abundante de la ciudad de Córdoba, representando casi un 40 % del total de la concentración polínica de la atmósfera (Velasco *et al.*, 2013; Martínez-Bracero *et al.*, 2015).

Por otro lado, las gramíneas, representan aproximadamente el 10 % del total del polen registrado en la ciudad de Córdoba, con una media diaria desde 25 a 900 granos de polen/m³ durante la estación polínica (Velasco *et al.*, 2013). Este tipo polínico supone la segunda causa de alergias en la ciudad (Sánchez-Mesa *et al.*, 2005b; Cebrino *et al.*, 2016) y en toda Europa se llegan a registrar pacientes con síntomas alérgicos aun cuando las concentraciones de polen de gramíneas son bajas (D'Amato *et al.*, 2007; 2010).

En los últimos años se han realizado estudios similares comparando la concentración de polen y alérgenos en el aire, por ejemplo, en el caso de las gramíneas (Fernández-González *et al.*, 2010; 2011), abedul (Buters *et al.*, 2012), olivo (Galán *et al.*, 2013), abedul y gramíneas (Jochner *et al.*, 2015), y plátano de sombra (Alcázar *et al.*, 2015). En estos estudios se ha intentado establecer, además, una relación entre estas partículas biológicas en el aire y las condiciones meteorológicas, señalando la importancia de la humedad atmosférica en los procesos de emisión de polen y aeroalérgenos en el aire. En el caso del polen, un descenso en la humedad ambiental permite la liberación de polen a la atmósfera

una vez la antera ha madurado, por el contrario, la lluvia provoca una disminución del contenido de polen en el aire debido al lavado de la atmósfera. En cambio, distintos estudios han puesto de manifiesto el papel de la humedad en la emisión de alérgenos desde el polen (Brito *et al.*, 2011; Fernández-González *et al.*, 2011; Buters *et al.*, 2015). La hipótesis que se plantea es la posibilidad de que los granos de polen u otras partículas vegetales expuestos a una determinada humedad y a ciertos contaminantes atmosféricos, pueden llegar a romperse, o simplemente liberar partículas más pequeñas que pueden entrar por las vías respiratorias y provocar síntomas cuando los granos de polen están ausentes (Fernández-González *et al.*, 2010; 2011; Brito *et al.*, 2011; Buters *et al.*, 2012, 2015). Otros estudios indican que la ruptura del polen puede ocurrir directamente en las anteras como fuente de alérgenos (Taylor *et al.*, 2002). Por otro lado, varios estudios han destacado el posible papel del cambio climático en la emisión de un polen con mayor contenido de alérgenos (D'Amato *et al.*, 2007; 2015).

Sin embargo, nuestros resultados (capítulos I y II) no han puesto de manifiesto este papel de la humedad durante la estación polínica, probablemente debido a las características específicas de la zona de estudio, con un clima muy seco y cálido la mayor parte del año. En cambio, durante el año más lluvioso (2012), la cantidad de aeroalérgenos por polen fue mayor que durante los otros 2 años. Esto indica que los aumentos puntuales de humedad registrados durante los episodios tormentosos, generalmente durante la primavera en Córdoba, pueden causar una liberación creciente de alérgenos, con la posibilidad de permanecer en el aire el resto de la temporada (Fernández-González *et al.*, 2011).

Los resultados de nuestro estudio ponen de manifiesto una correlación significativa entre la concentración de aeroalérgenos y el polen en el caso de los dos tipos polínicos estudiados, con coeficientes de determinación (R^2) bastante elevados (capítulos I y II). Sin embargo, hay determinados días, tanto fuera de la estación polínica como durante la misma, donde el nivel de aeroalérgenos no se explica por la concentración de polen. Estos mismos resultados fueron obtenidos

por Fernández-Caldas *et al.* (1992), Rantio-Lehtimäki *et al.* (1994), Cabrera *et al.* (2002), Brito *et al.* (2011) y González-Parrado *et al.* (2014). Por otra parte, según D'Amato *et al.* (1994) los síntomas de los pacientes están más relacionados con los niveles de alérgenos que con las concentraciones polínicas.

Aunque generalmente las mayores concentraciones de alérgenos coinciden con las altas concentraciones de polen durante la estación polínica, se ha registrado cierta concentración de alérgenos en el aire cuando las concentraciones de polen son muy bajas, incluso fuera de la estación polínica. Esta circunstancia posiblemente sea debida a su transporte a larga distancia, algo puesto de manifiesto por diferentes autores que han detectado aeroalérgenos antes y después de estación polínica (Galán *et al.*, 2013; Rojo y Pérez-Badia, 2015; Moreno-Grau *et al.*, 2016). Los aeroalérgenos se transportan adheridos a partículas más pequeñas que los granos de polen, y por lo tanto pueden transportarse con mayor facilidad desde áreas más distantes que los granos de polen y permanecer en la atmósfera durante cierto tiempo fuera de la estación polínica. En el caso de las gramíneas, este comportamiento se puede explicar, además, por las diferentes especies de la familia Poaceae que florecen en distintas estaciones, contando con algunas especies con floración invernal y otoñal, y a que diferentes especies pueden presentar diferentes alérgenos (Andersson y Lidholm, 2003; Ferreira *et al.*, 2004).

Por otro lado, muchos autores coinciden en que las condiciones meteorológicas que se registran durante la estación polínica poseen un considerable efecto sobre la cantidad de polen en el aire (Fornaciari *et al.*, 1997; Huynen *et al.*, 2003; Fernández González *et al.*, 2013). La temperatura desempeña un papel clave en el inicio de la estación polínica (Aguilera *et al.*, 2014). En el capítulo I observamos como el clima cálido en 2014 probablemente causó una floración temprana de los olivos, y por lo tanto un comienzo temprano de la estación de polen. Por el contrario, el invierno más seco y frío de 2012 dio lugar a un retraso en el inicio de la estación polínica. Se observó, además, una correlación significativa entre la temperatura y las concentraciones de alérgenos, pudiendo

ser éstos más sensibles que los granos de polen a la temperatura (Brito *et al.*, 2011; Galán *et al.*, 2013). En el capítulo II se presenta una clara variación en la temporada de floración de las gramíneas de un año a otro, dependiendo de las condiciones climáticas locales (Branzi y Zanotti, 1992; Emberlin *et al.*, 1999; Estrella *et al.* 2006). Concretamente la latitud y otros factores ambientales, como la disponibilidad de agua y la temperatura, son los responsables de las principales variaciones interanuales de las concentraciones de polen en el aire y de la longitud de la estación (Sánchez-Mesa *et al.*, 2005a; Cenci y Ceschia, 2000; García-Mozo *et al.*, 2009; Puc, 2011), afectando especialmente a las herbáceas, y fundamentalmente durante el período pre-pico de la estación polínica (Sánchez-Mesa *et al.*, 2003). Nuestros resultados muestran una correlación significativa negativa entre las concentraciones de polen y la humedad relativa o la precipitación en las gramíneas. Sin embargo, no se observaron correlaciones claras de estos factores meteorológicos con las concentraciones de alérgenos. Córdoba posee unas condiciones climáticas con escasez de humedad durante la primavera, y por ello, el efecto de la humedad no se ha visto claramente reflejado.

El análisis de la correlación entre la dirección del viento y las concentraciones de polen de gramíneas llevadas a cabo en el capítulo II refleja la mayor frecuencia de vientos procedentes del oeste durante la emisión del polen, lo que conlleva a una mayor influencia de las fuentes de polen ubicadas al oeste de la ciudad. Es importante señalar que la eficiencia en el muestreo de polen depende también de la velocidad del viento, siendo menor a velocidades de viento moderadas y mayor a velocidades de viento altas y bajas (Frenz, 2000). En nuestro estudio, las concentraciones de polen y la velocidad del viento muestran una correlación negativa significativa, indicando la capacidad dispersiva del viento a altas velocidades y parece reafirmar que los vientos ligeros provocan una acumulación de granos de polen cerca de la superficie.

En este punto, es importante señalar que los granos de polen y los alérgenos tienen un origen distinto de emisión, así como tamaños diferentes, y por tanto, un comportamiento diferente en cuanto al proceso de transporte y/o dispersión.

El contenido de polen en el aire es consecuencia de la emisión polínica durante el estado fenológico de la floración en plantas anemófilas, mientras que la liberación de aeroalérgenos del polen está también ligada a la exposición del polen a contaminantes, o a una alta humedad ambiental antes de episodios tormentosos. Por otra parte, las plantas, bajo procesos de estrés o situaciones extremas, pueden reducir la intensidad de la floración y, por lo tanto, generar una menor concentración de polen (Guedes *et al.*, 2009), pero los granos de polen pueden llegar a producir más alérgenos como estrategia para asegurar la polinización (Moreno-Grau *et al.*, 2016).

En nuestra investigación, se ha observado una clara correlación significativa positiva entre las concentraciones de polen de ambos taxones (olivo y gramíneas) en el aire y los niveles de sus principales alérgenos Ole e 1 y Phl p 5 ($p < 0,01$) durante todos los años de estudio, lo que indica que los granos de polen han sido la fuente principal de aeroalérgenos en el aire. Por este motivo, podríamos pensar en la posibilidad de que los granos de polen sean un buen indicador de la cantidad de alérgenos en el aire y un dato importante para la prevención de alergias. Sin embargo, como muestran estudios recientes (Jato *et al.*, 2010; Fernández-González *et al.*, 2011; Buters *et al.*, 2015; Jochner *et al.*, 2015), la relación entre las dos variables no suele ser constante durante el período de estudio, ya que se obtiene diferente relación polen/alérgenos (*Allergy potency*) en los distintos años de estudio. Por ello, se considera fundamental que se establezcan las concentraciones de aeroalérgenos como referencia para el seguimiento de los pacientes, especialmente en el caso de alergias a las gramíneas (Brito *et al.*, 2010).

El interés del polen como portador de alérgenos ha llevado al desarrollo de redes de monitoreo en EE.UU. (Ziska *et al.*, 2011), Europa (www.ean.polleninfo.eu) y en otras partes del mundo. Desde comienzos del siglo veinte, se ha utilizado una amplia variedad de métodos de muestreo y análisis del contenido de polen atmosférico, y a día de hoy se siguen desarrollando nuevos métodos. Sin embargo, aún quedan varios problemas por resolver. Por ejemplo, de momento no se ha

definido ningún método de muestreo único para la detección y análisis de todos los tipos de bioaerosoles, y actualmente no hay protocolos estandarizados para la mayoría de ellos. Solo en el caso de la detección de polen y esporas se cuenta con un método estandarizado en Europa, que posee el método volumétrico tipo Hirst (Hirst 1952) como requisito básico y donde todos los miembros que participan siguen unos requisitos mínimos (Galán *et al.* 2014) propuestos por European Aerobiology Society (EAS). Sin embargo, en el caso de los aeroalérgenos, no se cuenta con un método estándar y existe una amplia variedad para su estudio. Estos captadores abarcan desde dispositivos de impacto, algunos con posibilidad de separar tamaños distintos de partículas, hasta ciclones o dispositivos de sedimentación (Raulf *et al.*, 2014).

Por lo tanto, los resultados de diferentes estudios son a menudo difíciles de comparar debido a las diferencias en el diseño del captador, el tiempo de recolección, el flujo de aire y el método de análisis (Grinshpun *et al.*, 2016).

Esto complica el uso de los resultados del muestreo para su evaluación. De hecho, en distintas ocasiones se ha puesto de manifiesto que el uso de diferentes captadores de alérgenos no permite hacer comparaciones fiables (Levetin, 2004; Raulf *et al.*, 2014), por ello en el capítulo III se ha realizado una comparación entre dos de los captadores de alérgenos más empleados en los últimos años en Europa: Cyclone (Rodríguez-Rajo *et al.*, 2011; Alcázar *et al.*, 2015) y ChemVol (Buters *et al.*, 2012, 2015; Jochner *et al.*, 2015). A pesar de las claras diferencias metodológicas en la toma de muestras, las concentraciones diarias de aeroalérgenos registradas por los dos captadores siguieron una distribución diaria similar durante la temporada de polen, aunque se detectaron diferencias en cuanto a las concentraciones de alérgenos, siendo éstas más altas cuando se obtienen con Cyclone. Estas diferencias tienen sentido ya que ambos captadores se basan en principios diferentes, contando además, con un protocolo distinto de extracción de alérgenos (Cyclone utiliza PBS y ChemVol NH_4HCO_3). Por otro lado, Cyclone posee una veleta que orienta el orificio de captación de partículas en la dirección del viento, lo que puede justificar la mayor concentración

de alérgenos observada con este método. Sin embargo, las concentraciones de alérgenos detectadas por ambos captadores están correlacionadas significativamente (99 %, $p < 0,01$), además de estar correlacionadas con las concentraciones de polen (99 %, $p < 0,01$), por lo que ambos captadores muestran eficacia en el muestreo de alérgenos.

Por otra parte, tal y como muestran otros estudios (Buters *et al.* 2015; Jochner *et al.* 2015), se observó una importante diferencia en el número de alérgenos por grano de polen (pg/pollen - AP) durante los dos años de estudio y, en nuestro caso además, según el captador utilizado, obteniendo valores más elevados con el Cyclone. Sin embargo, estas diferencias en AP son mucho menos marcadas en 2014, un año más húmedo y frío que 2012.

Por este motivo, se ha estudiado, además, la relación entre la concentración de granos de polen y de alérgenos detectados con ambos captadores y las distintas variables meteorológicas, tratando de identificar qué parámetros pueden influir en la eficacia de las dos metodologías. Se observó una correlación negativa significativa entre las concentraciones de polen y de alérgenos con las precipitaciones y la humedad relativa en ambos años y con ambos captadores, excepto con Cyclone en 2012 para ambos tipos polínicos.

Tanto en el caso del polen como de los alérgenos se observaron correlaciones positivas significativas en ambos captadores, con la temperatura mínima durante el año más cálido y más seco (2012) y con la temperatura máxima durante el año más frío (2014). Ciertos estudios indican que la temperatura tiene una correlación más alta con las concentraciones de alérgenos que con las concentraciones de polen (Brito *et al.*, 2011; Galán *et al.*, 2013). Sin embargo, en el presente estudio, esto sólo ocurrió en el 50 % de los casos, lo que sugiere que las concentraciones de alérgenos no son siempre más sensibles que el polen a los parámetros meteorológicos.

Respecto a la velocidad del viento, aunque la correlación con ambos captadores fue significativa, el grado de significación fue generalmente mayor con Cyclone,

lo que reafirma la importancia en la captación de alérgenos de la veleta que posee este captador.

Aunque ambos captadores se muestran apropiados en la detección de aeroalérgenos, en cualquier caso, el captador empleado dependerá del objetivo del estudio a realizar, de la zona de muestreo y del tipo de datos que se quieran recopilar.

Conclusiones



8. CONCLUSIONES

Capítulo I

“Correlation between airborne Olea europaea pollen concentrations and levels of the major allergen Ole e 1 in Córdoba, Spain, 2012–2014”.

1. La correlación entre las concentraciones del polen aerovagante de olivo y su alérgeno mayoritario Ole e 1 es positiva y significativa. Sin embargo, la relación alérgenos/polen varía a lo largo de los años estudiados y no siempre un aumento de los granos de polen en el aire supone una mayor concentración de alérgenos y viceversa.
2. Se detectan pequeñas concentraciones de alérgenos cuando las concentraciones de polen son muy bajas o nulas, como ocurre al principio y al final de la estación polínica. Por ello, aunque los datos de concentraciones polínicas en la atmósfera proporcionan información útil, la monitorización de los alérgenos es una herramienta importante para la evaluación de la exposición real al alérgeno, especialmente para la prevención de alergias.
3. La correlación entre la concentración diaria de Ole e 1 y la humedad durante la estación polínica no es significativa, debido a las características específicas del clima de la zona de estudio, muy seco y cálido la mayor parte del año. No obstante, los aumentos específicos de humedad observados durante episodios tormentosos pueden causar una liberación puntual de aeroalérgenos.

Capítulo II

“Mismatch in aeroallergens and airborne grass pollen concentrations”

1. Existe una correlación positiva y significativa ($p < 0,01$) entre las concentraciones del alérgeno mayoritario Phl p 5 y de polen de Poaceae durante la estación de polen. Sin embargo, se observan determinados días con discrepancias de forma esporádica y valores variables de alérgenos/polen en los distintos años de estudio.
2. Concentraciones elevadas de granos de polen de gramíneas en el aire no siempre implican concentraciones altas de alérgenos, ya que ambas partículas están bajo diferentes procesos de producción, liberación y transporte. Las correlaciones varían dependiendo del año y de las condiciones climáticas predominantes.
3. Fundamentalmente, la intensidad y duración de la estación polínica depende de la temperatura mínima, la lluvia y la humedad relativa. Sin embargo, las concentraciones de alérgenos dependen también de otros factores externos. Por lo tanto, para determinar de forma precisa la exposición a los aeroalérgenos, es importante analizar tanto el polen como la concentración de alérgenos.

Capítulo III

“Aeroallergens: a comparative study of two monitoring methods”

1. Los datos de aeroalérgenos obtenidos con ambos captadores, Cyclone y ChemVol, están correlacionados entre sí y con la concentración de polen. Por ello, ambos son apropiados en el muestreo de alérgenos. No obstante, se observan variaciones en los resultados debido a diferencias en el procedimiento de muestreo y en la extracción de alérgenos. El uso de uno u otro dependerá del tipo de datos que se van a recopilar.

2. El captador Cyclone recoge mayor cantidad de aeroalérgenos, probablemente debido a su diseño, ya que posee una veleta que orienta el orificio de captación en la dirección del viento.
3. El uso de diferentes protocolos para el muestreo, complica la comparación de resultados de diferentes estudios. Existe una clara necesidad de estandarización de los procedimientos de muestreo y analíticos que permitan estimar la exposición a aeroalérgenos.

8.1. CONCLUSIONS

Chapter I

"Correlation between airborne Olea europaea pollen concentrations and levels of the major allergen Ole e 1 in Córdoba, Spain, 2012-2014"

1. The correlation between olive airborne pollen concentrations and its major allergen Ole e 1 is positive and significant. However, Allergy Potency varies over the three studied years and not always an increase of pollen grains in the air implies a greater allergen concentration and vice versa.
2. Small allergens concentrations are detected when pollen concentrations are very low or even zero, as occurs at the beginning and at the end of the pollen season. For this reason, although pollen concentrations in the atmosphere provide useful information, allergen monitoring is an important tool for the evaluation of allergen exposure mainly for allergy prevention.
3. The correlation between the daily allergen concentration and the humidity during the pollen season is not significant, due to the specific characteristics of the climate in the study area, very dry and warm most of the year. Nevertheless specific increases in humidity observed during stormy episodes may cause an aeroallergens release.

Chapter II

"Mismatch in aeroallergens and airborne grass pollen concentrations"

1. There is a positive and significant correlation ($p < 0.01$) between Phl p 5 concentrations and Poaceae pollen during the pollen season. However,

certain days are observed with sporadic discrepancies and variable Allergy Potency in the different years of study.

2. High grass pollen concentrations do not always imply high allergen concentrations, since both particles are under different production, release and transport processes. The correlations vary depending on the year and the prevailing climatic conditions.
3. The intensity and duration of the pollen season depends mainly on the minimum temperature, rainfall and relative humidity. However, allergens concentrations depend also on other external factors. Therefore, in order to determine a precise exposure to aeroallergens, it is important to analyze both: pollen and aeroallergens concentration.

Chapter III

"Aeroallergens: a comparative study of two monitoring methods"

1. Aeroallergens concentration obtained with both sensors, Cyclone and Chem-Vol, are correlated and also with the pollen concentration. Therefore, both samplers are suitable for allergen detection. However, variations are observed in the results due to differences in the sampling procedure and extraction of allergens. The use of a specific method will depend on the type of data to be collected.
2. The Cyclone sampler collects a greater amount of aeroallergens, probably due to its design, since it has a vane that directs the capture hole in the direction of the wind.
3. The use of different protocols for sampling complicates the comparison of results from different studies. There is a clear need for standardization of sampling and analytical procedures that allow estimation of aeroallergen exposure.

Bibliografía



9. BIBLIOGRAFÍA

- Aalberse**, R. C. (2000). Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 106: 228-238.
- Abou**, O. R., Sutra, J. P., Demey, E., Vinh, J., Lacroix, G., Poncet, P., *et al.* (2012). Proteomic analysis of major and minor allergens from isolated pollen cytoplasmic granules. *J Proteome Res*, 11(2): 1208-1216.
- Aguilar**, J., Fernández, E., Fernández, E., Rodríguez, T. (1995). Jerarquización de parámetros edáficos en la evaluación de la productividad del olivo. *Edafología*, 1(1): 101-110.
- Aguilera**, F., Dhiab, A. B., Msallem, M., Orlandi, F., Bonofiglio, T., Ruiz-Valenzuela, L., *et al.* (2015). Airborne-pollen maps for olive-growing areas throughout the Mediterranean region: spatio-temporal interpretation. *Aerobiología*, 31(3), 421-434.
- Aguilera**, F., Ruiz, L., Fornaciari, M., Romano, B., Galán, C., Oteros, J., *et al.* (2014). Heat accumulation period in the Mediterranean region: phenological response of the olive in different climate areas (Spain, Italy and Tunisia). *Int J Biometeorol*, 58(5): 867-876.
- Albertine**, J. M., Manning, W. J., DaCosta, M., Stinson, K. A., Muilenberg, M. L., Rogers, C. A. (2014). Projected carbon dioxide to increase grass pollen and allergen exposure despite higher ozone levels. *PLoS One*, 9(11): 111712.
- Alcázar**, P., Galán, C., Cariñanos, P., Domínguez, E. (1999). Diurnal variations of airborne pollen at two different heights. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 9(2): 89-95.
- Alcázar**, P., Galán, C., Torres, C., Dominguez-Vilches, E. (2015). Detection of airborne allergen (Pla a 1) in relation to *Platanus* pollen in Córdoba, South Spain. *Ann Agric Environ Med*, 22(1): 96-101.

- Alcázar**, P., Stach, A., Nowak, M., Galán, C. (2009). Comparison of airborne herb pollen types in Córdoba (Southwestern Spain) and Poznan (Western Poland). *Aerobiologia*, 25(2): 55-63.
- Alché**, J. D., Castro, A. J., Olmedilla, A. Fernández, M. D. C., Rodríguez, R., Villalba, M., *et al.* (1999). The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER. *J Cell Sci*, 112: 2501-2509.
- Alché**, J. D., M'rani-Alaoui, M., Castro, A. J., Rodríguez-García, M. I. (2004). Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the cultura médium during in vitro germination. *Plant cell Physiol*, 45 (9): 1149-1157.
- Aleksić**, I., Vučković, O., Smiljanić, K., Gavrović-Jankulović, M., Krsmanović, V., Burazer, L. (2014). The importance of cross-reactivity in grass pollen allergy. *Arc Biol Sci*, 66(3): 1149-1155.
- Allen**, Y. (1981). Particle size measurement, 3rd ed. Chapman and Hall, London.
- Andersen**, A. A. (1958). New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J Bacteriol*, 76(5): 471.
- Andersen**, A. A. (1958). New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J Bacteriol*, 76(5): 471.
- Andersson**, K. y Lidholm, J. (2003). Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*, 130: 87-107.
- Annesi-Maesano**, I., Rouve, S., Desqueyroux, H., Jankovski, R., Klossek, J. M., Thibaudon, M., *et al.* (2012). Grass pollen counts, air pollution levels and allergic rhinitis severity. *Int Arch Allergy Immunol*, 158 (4): 397-404.
- Asturias**, J. A., Ibarrola, I., Bartolome, B., Ojeda, I., Malet, A., Martinez, A. (2002). Purification and characterization of Pla a 1, a major allergen from *Platanus acerifolia* pollen. *Allergy*, 57 (3): 221-227.

- Ayres, J. G., Forsberg, B., Annesi-Maesano, I., Dey, R., Ebi, K. L., Helms, P. J., et al.** (2009). Climate change and respiratory disease: European Respiratory Society position statement. *Eur Respir J*, 34(2): 295-302.
- Barber, D., Moreno, C., Ledesma, A., Serrano, P., Galán, A., Villalba, M., et al.** (2007). Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 17(1): 11–16.
- Barber, D., de la Torre, F., Feo, F., Florido, F., Guardia, P., Moreno, C., et al.** (2008). Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy*, 63 (11): 1550–1558.
- Barderas, R., Purohit, A., Rodríguez, R., Pauli, G., Villalba, M.** (2006). Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: comparison of the natural and recombinant forms. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 96 (4): 557–563.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L.** (1998). The culture of the olive tree. Mundi-Prensa, Madrid.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L.** (2008). El cultivo del olivo (6^a edición). Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Bartra, J., Mullol, J., Del Cuvillo, A., Dávila, I., Ferrer, M., Jáuregui, I., et al.** (2007). Air pollution and allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 17(2): 3-8.
- Bauchau, V. y Durham, S. R.** (2004). Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J*, 24(5): 758-64.
- Beaubien, E. y Hamann, A.** (2011). Spring flowering response to climate change between 1936 and 2006 in Alberta, Canada. *Bio Science*, 61(7): 514-524.
- Beggs, P. J.** (2004). Impacts of climate change on aeroallergens: past and future. *Clin Exp Allergy*, 34(10): 1507-1513.

- Behrendt, H.** y Becker, W. M. (2001). Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Curr Opin Immunol*, 13 (6): 709-715.
- Behrendt, H.**, Tomczok, J., Sliwa-Tomczok, W., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Becker, W. M., *et al.* (1999). Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response. *Int Arch Allergy Immunol*, 118(2-4): 414-418.
- Belmonte, J.** (1985). Datos para el estudio de la dinámica de la circulación del polen aerovagante de Catalunya. *Actas de Palinología*, 177 - 182.
- Belver, M. T.**, Jurado-Palomo, J., Bobolea, I., López-Serrano, M. C., Quirce, S. (2009). Immunoglobulin E reactivity to nOle e 1 as a diagnostic marker of allergy to *Olea europaea* pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 19(6): 515-516.
- Blackley, C.** (1873). Experimental researches on the causes and nature of catarhus aestivus (hay-fever or hay-asthma). London, Bailliere, Tindal and Cox.
- Bostock, J.** (1819). Case of a periodical affection of the eyes and chest. *Medico-Chirurgical Transactions*, 10: 161-165.
- Bousquet, P. J.**, Chinn, S., Janson, C., Kogevinas, M., Burney, P., Jarvis, D. (2007). Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy*, 62(3): 301-309.
- Bousquet, P. J.**, Guerin, B., Hewitt, B., Lim, S., Michel, F. B. (1985). Allergy in the Mediterranean area III: cross reactivity among Oleaceae pollens. *Clin Exp Allergy*, 15 (5): 439-448. doi:10.1111/j.1365-2222.1985.tb02293.x
- Branzi, G. P.** y Zanotti, A. L. (1992). Estimate and mapping of the activity of airborne pollen sources. *Aerobiologia*, 8(1), 69-74.

- Brito**, F. F., Gimeno, P. M., Carnés, J., Fernández-Caldas, E., Lara, P., Alonso, A.M., *et al.* (2010). Grass pollen, aeroallergens, and clinical symptoms in Ciudad Real, Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 20(4): 295-302.
- Brito**, F. F., Gimeno, P. M., Carnés, J., Martín, R., Fernández-Caldas, E., Lara, P., *et al.* (2011). *Olea europaea* pollen counts and aeroallergen levels predict clinical symptoms in patients allergic to olive pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 106(2): 146–152.
- Bruex**, A., Kainkaryam, R. M., Wieckowski, Y., Kang, Y.H., Bernhardt, C., Xia, Y., *et al.* (2012). A gene regulatory network for root epidermis cell differentiation in Arabidopsis. *PLoS Genet*, 8(1): e1002446.
- Buckland**, G. y González, C. A. (2015). The role of olive oil in disease prevention: a focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. *Br J Nutr*, 113(2): 94–101.
- Burbach**, G. J., Heinzerling, L. M., Edenharter, G., Bachert, C., Bindslev-Jensen, C., Bonini, S., *et al.* (2009). GA(2)LEN skin test study II: clinical relevance of inhalant allergen sensitizations in Europe. *Allergy*, 64(10): 1507 -1515.
- Buters**, J., Prank, M., Sofiev, M., Pusch, G., Albertini, R., Annesi-Maesano, I., *et al.* (2015). Variation of the group 5 grass pollen allergen content of airborne pollen in relation to geographic location and time in season. *J Allergy Clin Immunol*, 136(1), 87-95.
- Buters**, J. T., Thibaudon, M., Smith, M., Kennedy, R., Rantio-Lehtimäki, A., Albertini, R., *et al.* (2012). Release of Bet v 1 from birch pollen from 5 European countries. Results from the HIALINE study. *Atmos Environ*, 55: 496-505.
- Buters**, J. T., Weichenmeier, I., Ochs, S., Pusch, G., Kreyling, W., Boere, A. J., *et al.* (2010). The allergen Bet v 1 in fractions of ambient air deviates from birch pollen counts. *Allergy*, 65(7): 850–858.

- Cabrera Sierra, M.** (2011). Cuantificación de alérgenos de "poaceae, oleaceae, platanaceae y cupressaceae" en la atmósfera de Madrid y su correlación con los recuentos de pólenes y las variables meteorológicas y de contaminación (2009-2010). Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Cabrera, M.,** Martínez-Cócera, C., Fernández-Caldas, E., Carnés Sánchez, J., Boluda, L., Tejada, J., *et al.* (2002). *Trisetum paniceum* (wild oats) pollen counts and aeroallergens in the ambient air of Madrid, Spain. *Int Arch Allergy Immunol*, 128(2), 123-129.
- Candau, P.,** González Romano, M. L., Golfín, C., Fernández-Paniagua, I. M. (1989). Variations quantitatives de Poaceae (Gramineae) et d'Urticaceae dans l'atmosphère de Seville (Espagne). Premiers résultats. *Palynosciences*, 1, 199-206.
- Cariñanos, P.,** Alcázar, P., Galán, C., Domínguez, E. (2002). Privet pollen (*Ligustrum* sp.) as potential cause of pollinosis in the city of Córdoba, South-west Spain. *Allergy*, 57(2): 92-97.
- Casas, C.,** Márquez, J., Suárez-Cervera, M. Seoane-Camba, J. A. (1996). Immuno cytochemical localization of allergenic proteins in *Parietaria judaica* L. (Urticaceae) pollen grains. *Eur J Cell Biol*, 70(2): 179-188.
- Castillo, R.,** Fernández, J. A., Gómez-Gómez, L. (2005). Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives. *Plant Physiol*, 139(2): 674-689.
- Cebrino, J.,** de la Cruz, S., Barasona, M. J., Alcázar, P., Moreno, C., Domínguez-Vilches, E., *et al.* (2017). Airborne pollen in Córdoba City (Spain) and its implications for pollen allergy. *Aerobiología*, 1-11. doi:10.1007/s10453-016-9469-8.

- Cebrino, J., Galán, C., DomínguezVilches, E.** (2016). Aerobiological and phenological study of the main Poaceae species in Córdoba City (Spain) and the surrounding hills. *Aerobiologia*, 32(4): 595–606.
- Cecchi, L.** (2013). From pollen count to pollen potency: the molecular era of aerobiology. *Eur Respir J*, 42 (4): 898-900.
- Cecchi, L., D’Amato, G., Ayres, J.G., Galán, C., Forastiere, F., Forsberg, B., et al.** (2010). Projections of the effects of climate change on allergic asthma: the contribution of aerobiology. *Allergy*, 65(9): 1073-1081.
- Cenci, C.A. y Ceschia, M.** (2000). Forecasting of the flowering time for wild species observed at Guidonia, central Italy. *Int J Biometeorol*, 44(2): 88-96.
- Chapman, M. D.** (2008). Allergen Nomenclature. In: Richard F., Lockey, D. & Ledford, K. (Eds). *Allergens and Allergen Immunotherapy*, 4th edition. Informa Healthcare, New York, 47-58.
- Cirera, L., García-Marcos, L., Giménez, J., Moreno-Grau, S., Tobías, A., Pérez-Fernández, V., et al.** (2012). Daily effects of air pollutants and pollen types on asthma and COPD hospital emergency visits in the industrial and Mediterranean Spanish city of Cartagena. *Allergol Immunopathol*, 40(4): 231-237. doi:10.1016/j.aller.2011.05.012.
- Clary, J., Savé, R., Biel, C., Herralde, F.** (2004). Water relations in competitive interactions of Mediterranean grasses and shrubs. *Ann Appl Biol*, 144(2): 149-155.
- Costa-Pérez, J. C. y Valle-Tendero, F.** (2004). Modelos de Restauración Forestal: datos botánicos aplicados a la gestión del medio ambiente andaluz. Manual de Restauración Forestal. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente. Sevilla.
- Cour, P.** (1974). Nouvelles techniques de detection des flux et des retombees polliniques: Etude de la sedimentation des pollens et des spores a la surface du sol. *Pollen Spores*, 16: 103-141.

- D'Amato, G.** (2000). Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clin Exp Allergy*, 30(5): 628-636.
- D'Amato, G.** (2002). Urban air pollution and respiratory allergy. *Monaldi arch chest dis*, 57(2), 136-140.
- D'Amato, G.** y Cecchi, L. (2008). Effects of climate change on environmental factors in respiratory allergic diseases. *Clin Exp Allergy*, 38(8): 1264-1274.
- D'Amato, G.,** Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., *et al.* (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, 62(9): 976-990.
- D'Amato, G.,** Cecchi, L., D'Amato, M., Liccardi, G. (2010). Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 20 (2): 95-102.
- D'Amato, G.,** Gentili, M., Russo, M., Mistrello, G., Saggese, M., Liccardi, *et al.* (1994). Detection of *Parietaria judaica* airborne allergenic activity: comparison between immunochemical and morphological methods including clinical evaluation. *Clin Exp Allergy*, 24(6): 566-574.
- D'Amato, G.,** Holgate, S. T., Pawankar, R., Ledford, D. K., Cecchi, L., Al-Ahmad, M., *et al.* (2015). Meteorological conditions, climate change, new emerging factors, and asthma and related allergic disorders. A statement of the World Allergy Organization. *World Allergy Organ J*, 8(1): 25.
- D'Amato, G.,** Spieksma, F. T. M., Liccardi, G., Jäger, S., Russo, M., Kontou-Fili, K., *et al.* (1998). Pollen-related allergy in Europe. Position paper of the European Academy of Allergology and clinical Immunology. *Allergy*, 53(6): 567-578.
- Dahl, A.,** Galán, C., Hajkova, L., Pauling, A., Sikoparija, B., Smith, M., *et al.* (2013). The onset, course and intensity of the pollen season. In: Allergenic pollen (pp. 29-70). Springer Netherlands.

- Davies, J. M., Dang, T. D., Voskamp, A., Drew, A. C., Biondo, M., Phung, M., et al.** (2011). Functional immunoglobulin E cross-reactivity between Pas n 1 of Bahia grass pollen and other group 1 grass pollen allergens. *Clin Exp Allergy*, 41(2): 281–291.
- De Linares, C., Nieto-Lugilde, D., Alba, F., Díaz de la Guardia, C., Galán, C., Trigo, M.M.** (2007). Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to *Olea europaea* pollen in Spain. *Clin Exp Allergy*, 37(1): 125–132.
- De Weger, L. A., Bergmann, K. C., Rantio-Lehtimäki, A., Dahl, Å., Buters, J., Déchamp, C., et al.** (2013). Impact of pollen. In: Allergenic pollen (pp. 161-215). Springer Netherlands.
- Domínguez-Vilches, E., Ubera, J.L., Galán, C.** (1984). Polen alergógeno de Córdoba. Edn. Publicaciones del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba, Córdoba.
- Durham, O. C.** (1946). The volumetric incidence of atmospheric allergens: IV. A proposed standard method of gravity sampling, counting, and volumetric interpolation of results. *J Allergy*, 17(2): 79-86.
- Dyer, M. I., Detling, J. K., Coleman, D. C., Hilbert, D. W.** (1982). The role of herbivores in grasslands. Grasses and grasslands: systematics and ecology (pp. 255-295). University of Oklahoma Press, Norman.
- EAS QC Working Group.** (2011). Minimum requirements to manage aerobiological monitoring stations included in a national network involved in the EAN. IAA Newsletter, 72(1).
- Edlung, A. F., Swanson, R., Preuss, D.** (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell*, 16(1): 84-97.
- Emberlin, J.** (1995). Plant allergens on pauci-micronic airborne particles. *Clin Exp Allergy*, 25(3): 202-205.

- Emberlin, J., Mullins, J., Cordon, J., Jones S., Millington, W., Brooke, M., et al.** (1999). Regional variations in grass pollen seasons in the UK, long-term trends and forecast models. *Clin Exp Allergy*, 29: 347–356.
- Estrella, N., Menzel, A., Krämer, U., Behrendt, H.** (2006). Integration of flowering dates in phenology and pollen counts in aerobiology: analysis of their spatial and temporal coherence in Germany (1992–1999). *Int J Biometeorol*, 51(1): 49–59.
- Fernández-Caldas, E., Carnés, J., Iraola, V., Casanovas, M.** (2007). Comparison of the allergenicity and Ole e 1 content of 6 varieties of *Olea europaea* pollen collected during 5 consecutive years. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 98(5): 464–470.
- Fernández-Caldas, E., Dandele, E. O., Dunnette, S. L., Swanson, M. C., Reed, C. E.** (1992). Rye grass cross-reacting allergens in leaves from seven different grass species. *Grana*, 31(2), 157–159.
- Fernández-Escobar, R., Ortiz-Urquiza, A., Prado, M., Rapoport, H. F.** (2008). Nitrogen status influence on olive tree flower quality and ovule longevity. *Environ Exp Botany*, 64(2): 113–119.
- Fernández-González, D., González-Parrado, Z., Mega-Maray, A. M., Valencia-Barrera, R.M., Camazón-Izquierdo, B., De Nuntiis, P., et al.** (2010). *Platanus* pollen allergen, Pla a 1: quantification in the atmosphere and influence on a sensitizing population. *Clin Exp Allergy*, 40(11): 1701–1708.
- Fernández-González, D., Rodríguez-Rajo, F. J., González-Parrado, Z., Valencia-Barrera, R.M., Jato, V., Moreno-Grau, S.** (2011). Differences in atmospheric emissions of Poaceae pollen and Lol p 1 allergen. *Aerobiologia*, 27(4): 301–309.
- Fernández-González, F., Loidi, J., Moreno, J. C., Del Arco, M., Fernández-Cancio, A., Galán, C., et al.** (2005). Impacts on plant diversity. Impacts on

climatic change in Spain. OCCE, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 183-248.

Fernández-González, M., Guedes, A., Abreu, I., Rodríguez-Rajo, F. J. (2013). Pla a 1 aeroalergen immunodetection related to the airborne *Platanus* pollen content. *Sci Total Environ*, 463: 855-860.

Ferreira, F., Hawranek, T., Gruber, P., Wopfner, N., Mari, A. (2004). Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy*, 59(3): 243–267.

Fornaciari, M., Pieroni, L., Ciuchi, P., Romano, B. (1997). A statistical model for correlated airborne pollen grains (*Olea europaea* L.) with some meteorological parameters. *Mediterranean Agriculture*, 127: 134-137.

Frei, T., y Gassner, E. (2008). Climate change and its impact on birch pollen quantities and the start of the pollen season an example from Switzerland for the period 1969–2006. *Int J Biometeorol*, 52(7): 667.

Frenguelli, G. (2003). Pollen structure and morphology. *Postep Derm Alergol*, 20(4): 200-204.

Frenz, D. A. (2000). The effect of windspeed on pollen and spore counts collected with the Rotorod Sampler and Burkard spore trap. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 85 (5): 392-394. [http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62553-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62553-7).

Galán, C. (1987). Catalogación y modelos de variación de polen aerovagante de la ciudad de Córdoba. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Córdoba.

Galán, C., Alcázar, P., Oteros, J., García-Mozo, H., Aira, M. J., Belmonte, J., et al. (2016). Airborne pollen trends in the Iberian Peninsula. *Sci Total Environ*, 550: 53–59.

Galán, C., Antunes, C., Brandao, R., Torres, C., Garcia-Mozo, H., Caeiro, E., et al. (2013). Airborne olive pollen counts are not representative of exposure to the major olive allergen Ole e 1. *Allergy*, 68(6): 809–812.

- Galán, C.**, Cariñanos, P., Alcázar, P., Domínguez-Vilches, E. (2007). Manual de Calidad y Gestión de la Red Española de Aerobiología. Serv. Publicaciones la Univ. Córdoba. https://www.uco.es/rea/infor_rea/manual_eng.pdf.
- Galán, C.**, Emberlin, J., Domínguez, E., Bryant, R. H., Villamandos, F. (1995). A comparative analysis of daily variations in the Gramineae pollen counts at Córdoba, Spain and London, UK. *Grana*, 34(3): 189-198.
- Galán, C.**, García-Mozo, H., Cariñanos, P., Alcázar, P., Domínguez-Vilches, E. (2001). The role of temperature in the onset of the *Olea europaea* L. pollen season in southwestern Spain. *Int J Biometeorol*, 45(1), 8-12.
- Galán, C.**, García-Mozo, H., Vázquez, L., Ruiz, L., Díaz de La Guardia, C., Domínguez-Vilches, E. (2008). Modeling olive crop yield in Andalusia, Spain. *Agron J*, 100(1): 98-104.
- Galán, C.**, García-Mozo, H., Vázquez, L., Ruiz, L., Díaz de La Guardia, C., Trigo, M. M. (2005). Heat requirement for the onset of the *Olea europaea* L. pollen season in several sites in Andalusia and the effect of the expected future climate change. *Int J Biometeorol*, 49(3): 184-188.
- Galán, C.**, Smith, M., Thibaudon, M., Frenguelli, G., Oteros, J., Gehrig, R., *et al.* EAS QC Working Group. (2014). Pollen monitoring: minimum requirements and reproducibility of analysis. *Aerobiologia*, 30(4): 385-395.
- Gangl, K.**, Niederberger, V., Valenta, R. (2013). Multiple grass mixes as opposed to single grasses for allergen immunotherapy in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*, 43(11): 1202-1216.
- García-Hernández, J. J.** (2010). Detección de los niveles de proteínas alergénicas en el aire de *Olea europaea* (Ole e 1). Cuantificación por métodos inmunológicos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cartagena.
- García-Mozo, H.**, Galán, C., Belmonte, J., Bermejo, D., Candau, P., de la Guardia, C. D., *et al.* (2009). Predicting the start and peak dates of the

Poaceae pollen season in Spain using process-based models. *Agric For Meteorol*, 149(2): 256-262.

García-Mozo, H., Oteros, J., Galán, G. (2015). Phenological changes in olive (*Olea europaea* L.) reproductive cycle in southern Spain due to climate change. *Ann Agric Environ Med*, 22(3): 421–428.

García-Mozo, H., Yaezel, L., Oteros, J., Galán, C. (2014). Statistical approach to the analysis of olive long-term pollen season trends in southern Spain. *Sci Total Environ*, 473(4): 103–109.

González, F., Castro, M. P., Narayan, P., Walker, R., Zeller, L. (2011). Development of an autonomous unmanned aerial system to collect time-stamped samples from the atmosphere and localize potential pathogen sources. *J Field Robot*, 28(6): 961–976.

González-Parrado, Z., Fernández-González, D., Camazón, B., Valencia-Barrera, R. M., Vega-Maray, A. M., Asturias, J. A., *et al.* (2014). Molecular aerobiology-Plantago allergen Pla 1 1 in the atmosphere. *Ann Agric Environ Med*, 21(2): 282–289.

Gregory, P. H. (1973). *The microbiology of the atmosphere*, 2nd ed. Leonard Hill, Bucks, UK.

Grinshpun, S. A., Buttner, M. P., Mainelis, G., Willeke, K. (2016). Sampling for airborne microorganisms. In *Manual of Environmental Microbiology*, Fourth Edition (pp. 3-2). American Society of Microbiology.

Guedes, R. S., Quirino, Z. G. M., Gonçalves, E. P. (2009). Reproductive phenology and pollination biology of *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth (Fabaceae). *Biotemas*, 22(1): 27-37.

Guidos, G. A. y Almeida, V. M. (2005). Polinosis y aeroalérgenos. *Alergia asma e inmunología pediátrica*, 14 (2): 52-55.

- Heard**, S. y West, J. S. (2014). New developments in identification and quantification of airborne inoculum. In *Detection and Diagnostics of Plant Pathogens* (pp. 3-19). Springer Netherlands.
- Hernández**, J. C., Hernández, P. C., Tejerina, M. T., Alcañiz, M. A., Alcañiz, E. M., Moreira, P. C., *et al.* (2002). Antigenic and allergenic differences between 16 different cultivars of *Olea europaea*. *Allergy*, 57(71): 60–65
- Hernández-Ceballos**, M. A., García-Mozo, H., Adame, J. A., Domínguez-Vilches, E., Benito, A., Bolívar, J. P., *et al.* (2011a). Synoptic and meteorological characterisation of olive pollen transport in Córdoba province (south-western Spain). *Int J Biometeorol*, 55(1): 17-34.
- Hernández-Ceballos**, M. A., García-Mozo, H., Adame, J. A., Domínguez-Vilches, E., Bolívar, J. P., De la Morena, B. A., *et al.* (2011b). Determination of potential sources of *Quercus* airborne pollen in Córdoba city (southern Spain) using back-trajectory analysis. *Aerobiologia*, 27(3): 261-276.
- Heywood** V. H., Moore, D. M., Richardson, I. B. K., Stearn, W. T. (1985). *Las Plantas con Flores*. Editorial Reverté S.A. España. (pp. 145-148).
- Hillel**, D. y Rosenzweig, C. (2013). *Handbook of climate change and agroecosystems. Global and regional aspects and implications* (Vol. 2). Imperial College Press. Danvers, MA, USA.
- Hirst**, J. (1952). An automatic volumetric spore-trap. *Ann Appl Biol*, 39(2): 257-265.
- Hjern**, A. (2012). Migration and public health: Health in Sweden: The National Public Health Report. Chapter 13. *Scand J Public Health*, 40(9): 255-267.
- Huynen**, M. M. T. E., Menne, B., Behrendt, H., Bertollini, R., Bonini, S., Brandao, R., *et al.* (2003). Phenology and human health: allergic disorders (No. 1). *Health and global environmental change*.

- IPCC WGII** (2014). Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), Climate Change 2007-Impacts, Adaptation and Vulnerability, Cambridge. Geneva: IPCC Secretariat.
- Jablonski**, L. M., Wang, X., Curtis, P. S. (2002). Plant reproduction under elevated CO₂ conditions: a meta-analysis of reports on 79 crop and wild species. *New Phytol*, 156(1): 9-26.
- Jato**, V., Rodríguez-Rajo, F. J., González-Parrado, Z., Elvira-Rendueles, B., Moreno-Grau, S., Vega-Maray, A., *et al.* (2010). Detection of airborne Par j 1 and Par j 2 allergens in relation to Urticaceae pollen counts in different bioclimatic areas. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 105(1): 50-56.
- Jato**, V., Rodríguez-Rajo, F. J., Saijo, M. C., Aira, M. (2009). Poaceae pollen in Galicia (NW Spain): characterization and recent trends in atmospheric pollen season. *Int J Biometeorol*, 53(4): 333-344. doi: 10.1007/s00484-009-0220-9.
- Jiang**, S. Y., Jasmin, P. X. H., Ting, Y. Y., Ramachandran, S. (2005). Genome-wide identification and molecular characterization of Ole_e-I, Allerg_1 and Allerg_2 domain-containing pollen-allergen-like genes in *Oryza sativa*. *DNA Res*, 12(3): 167-179.
- Jochner**, S., Lüpke, M., Laube, J., Weichenmeier, I., Pusch, G., Traidl-Hoffmann, C., *et al.* (2015). Seasonal variation of birch and grass pollen loads and allergen release at two sites in the German Alps. *Atmos Environ*, 122: 83-93.
- Johnsen**, C. R., Weeke, E. R., Nielsen, J., Jensen, J., Mosbech, H., Frølund, L., *et al.* (1992). Aeroallergen analyses and their clinical relevance. *Allergy*, 47(5): 510-516.
- Jones**, A. M. y Harrison, R. M. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—a review. *Sci Total Environ*, 326(1): 151-180.

- Khattab**, A. y Levetin, E. (2008). Effect of sampling height on the concentration of airborne fungal spores. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 101(5): 529–534.
- Knox**, R.B. (1993). Grass pollen, thunderstorms and asthma. *Clin Exp Allergy*, 23(5): 354-359.
- Knox**, R. B., Suphioglu, C., Taylor, P., Desai, R., Watson, H. C., Peng, J. L., *et al.* (1997). Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy*, 27(3): 246-251.
- Laaidi**, M., Chinet, T., Aegerter, P. (2011). Allergies au pollen, pollution et climat: revue de la littérature. *Rev Fr Allergol*, 51(7): 622-628.
- Lavee**, S. (2009). The revolutionary impact of introducing irrigation-intensification to the olive oil industry. In International Symposium on Olive Irrigation and Oil Quality 888 (pp. 21-30).
- León-Ruiz**, E., Alcázar, P., Domínguez-Vilches, E., Galán, C. (2011). Study of Poaceae phenology in a Mediterranean climate. Which species contribute most to airborne pollen counts? *Aerobiología*, 21(1): 37–50.
- Levetin**, E. (2004). Methods for Aeroallergen Sampling. *Curr Allergy Asthma Rep*, 4(5): 376–383.
- Lombardero**, M., Obispo, T., Calabozo, B., Lezaun, A., Polo, F., Barber, D. (2002). Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e 1-related proteins. *Allergy*, 57(71): 29-34. doi:10.1034/j.1398-9995.2002.057s71029.x
- Martinelli**, F., Basile, B., Morelli, G., d’Andria, R., Tonutti, P. (2012). Effects of irrigation on fruit ripening behavior and metabolic changes in olive. *Sci Horti*, 144: 201-207.

- Martínez, A., Asturias, J. A., Monteseirín, J., Moreno, V., García-Cubillana, A., Hernández, M., et al.** (2002). The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from *Olea europaea* pollen. *Allergy*, 57(71): 17-23.
- Martínez-Bracero, M., Alcázar, P., Díaz de la Guardia, C., González-Minero, F. J., Ruiz, M., Trigo, M., et al.** (2015). Pollen calendars: A guide to common airborne pollen in Andalusia. *Aerobiologia*, 31(4): 549–557.
- May, K. R.** (1945). The cascade impactor: an instrument for sampling coarse aerosols. *J Sci instrum*, 22(10): 187.
- McLauchlan, K. K., Barnes, C. S., Craine, J. M.** (2011). Interannual variability of pollen productivity and transport in mid-North America from 1997 to 2009. *Aerobiologia*, 27(3): 181-189.
- Moreno-Grau, S., Aira, M. J., Elvira-Rendueles, B., Fernández-González, M., Fernández-González, D., García-Sánchez, A., et al.** (2016). Assessment of the *Olea* pollen and its major allergen Ole e 1 concentrations in the bioaerosol of two biogeographical areas. *Atmos Environ*, 145: 264–271.
- Moreno-Grau, S., Elvira-Rendueles, B., Moreno, J., García-Sánchez, A., Vergara, N., Asturias, J. A., et al.** (2006). 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*, 96(6): 858-864.
- Motta, A. C., Marliere, M., Peltre, G., Sterenberg, P. A., Lacroix, G.** (2006). Traffic-related airpollutants induce the release of allergen containing cytoplasmic granules from grasspollen. *Int Arch Allergy Immunol*, 139(4): 294-298.
- Noh, Y. M., Müller, D., Lee, H., Choi, T. J.** (2013). Influence of biogenic pollen on optical properties of atmospheric aerosols observed by lidar over Gwangju, South Korea. *Atmos Environ*, 69: 139–147.

- Omar**, S. H. (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm J*, 18(3): 111–121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2010.05.005>.
- Orlandi**, F., Aguilera, F., Galán, C., Msallem, M., Fornaciari, M. (2017). Olive yields forecasts and oil price trends in Mediterranean áreas: a comprehensive analysis of the last two decades. *Exp Agric*, 53(1): 71-83. doi: 10.1017/S0014479716000077
- Oteros**, J., García-Mozo, H., Alcázar, P., Belmonte, J., Bermejo, D., Boi, M., *et al.* (2015a). A new method for determining the sources of airborne particles. *J Environ Manage*, 155: 212-218.
- Oteros**, J., Pusch, G., Weichenmeier, I., Heimann, U., Möller, R., Röseler, S., *et al.* (2015b). Automatic and online pollen monitoring. *Int Arch Allergy Immunol*, 167(3): 158-166.
- Pacini**, E. y Hesse, M. (2005). Pollenkitt: its composition, forms and functions. *Flora*, 200(5): 399-415.
- Parry**, M. L., Canziani, O. F., Palutikof, J. P., van der Linden, P. J., Hanson, C. E. (2007). IPCC, 2007: climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.
- Pashley**, C. H., Fairs, A., Free, R.C., Wardlaw, A. J. (2012). DNA analysis of outdoor air reveals a high degree of fungal diversity, temporal variability, and genera not seen by spore morphology. *Fungal Biology*, 116(2): 214–224.
- Pehkonen**, E. y Rantio-Lehtimäki, A. (1994). Variations in airborne pollen antigenic particles caused by meteorologic factors. *Allergy*, 49(6): 472-477.
- Pereira**, C., Valero, A., Loureiro, C., Davila, I., Martinez-Cocera, C., Murio, C., *et al.* (2006). Iberian study of aeroallergens sensitisation in allergic rhinitis. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 38(6): 186.

- Pérez-Badia**, R., Rapp, A., Morales, C., Sardinero, S., Galán, C., García-Mozo, H. (2010). Pollen spectrum and risk of pollen allergy in central Spain. *Ann Agric Environ Med*, 17: 139-151.
- Perkins**, W. A. (1957). The Rotorod sampler. Second semiannual report of the Aerosol Laboratory, CML Stanford University, 186, 66.
- Piotrowska**, K. y Weryszko-Chmielewska, E. (2003). Pollen count of selected taxa in the atmosphere of Lublin using two monitoring methods. *Ann Agric Environ Med*, 10(1): 79–86.
- Postigo**, I., Guisantes, J. A., Negro, J. M., Rodríguez-Pacheco, R., David-García, D., Martínez, J. (2009). Identification of 2 new allergens of *Phoenix dactylifera* using an immunoproteomics approach. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 19(6): 504-507.
- Puc**, M. (2011). Threat of allergenic airborne grass pollen in Szczecin, NW Poland: the dynamics of pollen seasons, effect of meteorological variables and air pollution. *Aerobiologia*, 27(3): 191-202.
- Quiralte**, J., Palacios, L., Rodríguez, R., Cárdaba, B., Arias de Saavedra, J. M., Villalba, M., *et al.* (2007). Modelling diseases: the allergens of *Olea europaea* pollen. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 17(1), 24-30.
- Rantio-Lehtimäki**, A., Viander, M., Koivikko, A. (1994). Airbone birch pollen antigens in different particles sizes. *Clin Exp Allergy*, 24(1): 23-28.
- Rapoport**, H. F., Hammami, S. B., Martins, P., Pérez-Priego, O., Orgaz, F. (2012). Influence of water deficits at different times during olive tree inflorescence and flower development. *Environ Exp Bot*, 77: 227-233.
- Raulf**, M., Buters, J., Chapman, M., Cecchi, L., de Blay, F., Doekes, G., *et al.* (2014). Monitoring of occupational and environmental aeroallergens – EAACI Position Paper. *Allergy*, 69(10), 1280-1299. doi: 10.1111/all.12456.

- Rezanejad, F.** (2009). Air pollution effects on structure, proteins and flavonoids in pollen grains of *Thuja orientalis* L. (Cupressaceae). *Grana*, 48(3): 205-213.
- Ridolo, E., Albertini, R., Giordano, D., Soliani, L., Usberti, I., Dall'Aglio, P. P.** (2006). Airborne pollen concentrations and the incidence of allergic asthma and rhinoconjunctivitis in northern Italy from 1992 to 2003. *Int Arch Allergy Immunol*, 142(2): 151-157.
- Riedl, M. y Diaz-Sanchez, D.** (2005). Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol*, 115(2): 221-228.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., González, E. M., Monsalve, R. I., Huecas, S., et al.** (2002). Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy*, 57(71): 6-16.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Salamanca, G., et al.** (2007). Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 17(1): 4-10.
- Rodríguez-Rajo, F. J., Jato, V., González-Parrado, Z., Elvira-Rendueles, B., Moreno-Grau, S., Vega-Maray, A., et al.** (2011). The combination of airborne pollen and allergen quantification to reliably assess the real pollinosis risk in different bioclimatic areas. *Aerobiologia*, 27:1-12.
- Rogers, C. A., Wayne, P. M., Macklin, E. A., Muilenberg, M. L., Wagner, C. J., Epstein, P. R., et al.** (2006). Interaction of the onset of spring and elevated atmospheric CO₂ on ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen production. *Environ Health Perspect*, 114: 865-869.
- Rajo, J., Orlandi, F., Pérez-Badia, R., Aguilera, F., Dhiab, A. B., Bouziane, H., et al.** (2016). Modeling olive pollen intensity in the Mediterranean region through analysis of emission sources. *Sci Total Environ*, 551: 73-82.

- Rajo**, J. y Pérez-Badia, R. (2015). Models for forecasting the flowering of Cornicabra olive groves. *Int J Biometeorol*, 59(11): 1547-1556.
- Rajo**, J., Salido, P., Pérez-Badia, R. (2015). Flower and pollen production in the 'Cornicabra' olive (*Olea europaea* L.) cultivar and the influence of environmental factors. *Trees*, 29(4): 1235-1245. doi:10.1007/s00468-015-1203-6.
- Rosenzweig**, C., Casassa, G., Karoly, D. J., Imeson, A., Liu, C., Menzel, A., *et al.* (2007). Assessment of observed changes and responses in natural and managed systems. In: Parry, M.L., Canziani, O.F., Palutikof, J.P., van der Linden, P.J., Hansons, C.E., editors. *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. pp. 79–131.
- Salas-Salvado**, J., Bullo, M., Estruch, R., Ros, E., Covas, M. I., Ibarrola-Jurado, N., *et al.* (2014). Prevention of diabetes with Mediterranean diets: a subgroup analysis of a randomized trial. *Ann Intern Med*, 160 (1): 1-10.
- Sánchez**, A. M., Bosch, M., Bots, M., Nieuwland, J., Feron, R. Mariani, C. (2004). Pistil factors controlling pollination. *Plant Cell*, 16(1): 98-106.
- Sánchez-Mesa**, J. A., Galán, C., Hervas, C. (2005a). The use of discriminant analysis and neural networks to forecast the severity of the Poaceae pollen season in a region with a typical Mediterranean climate. *Int J Biometeorol*, 49(6): 355-362.
- Sánchez-Mesa**, J. A., Serrano, P., Cariñanos, P., Moreno, C., Guerra, F., Galán, C. (2005b). Pollen allergy in Cordoba city: frequency of sensitization and relation with antihistamines sales. *J Invest Allergol Clin Immunol*, 15(1): 50-56.
- Sánchez-Mesa**, J. A., Smith, M., Emberlin, J., Allitt, U., Caulton, E., Galán, C. (2003). Characteristics of grass pollen seasons in areas of southern Spain and the United Kingdom. *Aerobiologia*, 19(3): 243-250.

- Schäppi**, G. F., Monn, C., Wüthrich, B., Wanner, H. U. (1996). Direct determination of allergens in ambient aerosols: methodological aspects. *Int Arch Allergy Immunol*, 110(4): 364-370.
- Šikoparija**, B., Skjøth, C., Kübler, K. A., Dahl, A., Sommer, J., Radišić, P., *et al.* (2013). A mechanism for long distance transport of Ambrosia pollen from the Pannonian Plain. *Agric For Meteorol*, 180: 112-117.
- Silva** Palacios, I., Tormo Molina, R., Muñoz Rodríguez, A. F. (2000). Influence of wind direction on pollen concentration in the atmosphere. *Int J Biometeorol*, 44(3): 128-133.
- Singer**, B. D., Ziska, L. H., Frenz, D. A., Gebhard, D. E., Straka, J. G. (2005). Increasing Amb a 1 content in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen as a function of rising atmospheric CO₂ concentration. *Funct Plant Biol*, 32(7): 667-670.
- Smith**, M., Berger, U., Behrendt, H., Bergmann, K. C. (2014). Pollen and Pollinosis. In *History of Allergy* (Vol. 100, pp. 228-233). Karger Publishers.
- Smith**, M. y Emberlin, J. (2006). A 30-day-ahead forecast model for grass pollen in north London, United Kingdom. *Int J Biometeorol*, 50(4): 233.
- Smith**, M., Emberlin, J., Stach, A., Rantio-Lehtimäki, A., Caulton, E., Thibaudon, M., *et al.* (2009). Influence of the North Atlantic Oscillation on grass pollen counts in Europe. *Aerobiologia*, 25(4): 321-332.
- Spieksma**, F. T. M., Nikkels, B. H. Dijkman, J. (1995). Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration. *Clin Exp Allergy*, 25(3): 234-239.
- Suárez-Cervera**, M., Castells, T., Vega-Maray, A., Civantos, E., del Pozo, V., Fernández-González, D., *et al.* (2008). Effects of air pollution on Cup a 3 allergen in *Cupressus arizonica* pollen grains. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 101(1): 57-66.

- Subba-Reddi, C.**, Reddi, N. S., Atluri Janaki, B. (1988). Circadian patterns of pollen release in some species of Poaceae. *Rev Palaeobot Palynol*, 54(1): 11-42. [http://dx.doi.org/10.1016/0034-6667\(88\)90003-6](http://dx.doi.org/10.1016/0034-6667(88)90003-6).
- Subiza, E.** (1987). Incidencia del grano de polen en Madrid. Método volumétrico. *Allergol Immunopathol*. Supplementum VII.
- Subiza, J.** (2001). Polinosis de Madrid. In: Gutiérrez, M., Sáenz, C., Aránguez, E. Ordóñez, J. M. (eds). Polen atmosférico de la Comunidad de Madrid. Documentos Técnicos de Salud Pública, 70: 27-35.
- Subiza, J.** (2003). Gramíneas: Aerobiología y polinosis en España. *Allergol Immunol Clin*, 18(3): 7-23.
- Valle, B.** (2016). La Sierra Morena cordobesa: naturaleza, génesis del paisaje y patrimonio ambiental. Bienes, paisajes e itinerarios. *Revista pH*, 90: 30-47. www.iaph.es/revistaph/index.php/revistaph/article/view/3838
- Vara, A.**, Fernández-González, M., Aira, M. J., Rodríguez-Rajo, F. J. (2016). Oleaceae cross-reactions as potential pollinosis cause in urban areas. *Sci Total Environ*, 542 (A): 435–440.
- Velasco-Jiménez, M. J.**, Alcázar, P., Galán, C., Domínguez-Vilchez, E. (2013). Comparative study of airborne pollen counts located in different areas of the city of Córdoba (south-western Spain). *Aerobiologia*, 29(1): 113–120.
- Villalba, M.**, Batanero, E., Monsalve, R. I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C., Rodríguez, R. (1994). Cloning and expression of Ole e 1, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J Biol Chem*, 269(21): 15217-15222.
- Villalba M.**, Rodríguez R., Batanero E. (2014). The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. *Methods*, 66(1): 44-54. [10.1016/j.ymeth.2013.07.038](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.038).

- Takahashi**, Y., Ohashi, T., Nagoya, T., Sakaguchi, M., Yasueda, H., Nitta, H. (2001). Possibility of real-time measurement of an airborne *Cryptomeria japonica* pollen allergen based on the principle of surface plasmon resonance. *Aerobiologia* 17(4): 313-318.
- Tauber**, H. (1967). Investigations of the mode of pollen transfer in forested areas. *Rev Palaeobot Palynol*, 3(1-4): 277-286.
- Taylor**, P. E., Flagan, R. C., Miguel, A. G., Valenta, R., Glovsky, M. M. (2004). Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clin Exp Allergy*, 34(10): 1591-1596.
- Taylor**, P. E., Flagan, R. C., Valenta, R., Glovsky, M. M. (2002). Release of allergens as respirable aerosols: a link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 109(1): 51-56.
- Thibaudon**, M. y Lachasse, C. (2006). *Alternaria*, *Cladosporium*: dispersion atmosphérique, rythmes nyctéméral et saisonnier. *Rev Fr Allergol*, 46(3): 188-196.
- Tripodi**, S., Frediani, T., Lucarelli, S., Macri, F., Pingitore, G., Di Rienzo Businco, A., *et al.* (2012). Molecular profiles of IgE to *Phleum pratense* in children with grass pollen allergy: implications for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 129(3): 834-839.
- Wan**, S., Yuan, T., Bowdish, S., Wallace, L., Russell, S. D., Luo, Y. (2002). Response of an allergenic species, *Ambrosia psilostachya* (Asteraceae), to experimental warming and clipping: implications for public health. *Am J Bot*, 89(11): 1843-1846.
- Watson**, L. y Dallwitz, M. J. (1992). The grass genera of the world: Descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. Version: 18th August 1999. <https://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/delta/grass/index.htm>

- Weber**, R. W. (2007). Cross-reactivity of pollen allergens: Impact on allergen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 99(3): 203-212.
- West**, J. S. y Kimber, R. B. E. (2015). Innovations in air sampling to detect plant pathogens. *Ann Appl Biol*, 166: 4-17. doi:10.1111/aab.12191.
- Wheeler** A. W., Hickman, B. E., Fox B. (1990). Heterogeneity of a major allergen from olive (*Olea europea*) pollen. *Mol Immunol*, 27(7): 631-636.
- Williams**, R. H., Ward, E., McCartney, H. A. (2001). Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Appl Environ Microbiol*, 67(6): 2453-2459.
- Wolf**, H. W., Skaliy, P., Hall, L. B., Harris, M. M., Decker, H., Buchanan, L. M., *et al.* (1959). Sampling Microbiological Aerosols. *Public Health Monogr*, 60.
- Zhang**, Y., Bielory, L., Mi, Z., Cai, T., Robock, A., Georgopoulos, P. (2015). Allergenic pollen season variations in the past two decades under changing climate in the United States. *Glob Change Biol*, 21(4): 1581-1589.
- Ziello**, C., Sparks, T. H., Estrella, N., Belmonte, J., Bergmann, K. C., Bucher, E., *et al.* (2012). Changes to airborne pollen counts across Europe. *PloS one*, 7(4): e34076.
- Ziska**, L. H. (2003). Climate change, plant biology and public health. *World Resour Rev*, 15(3): 271-288.
- Ziska**, L. H., Epstein, P. R., Schlesinger, W. H. (2009). Rising CO₂, climate change, and public health: exploring the links to plant biology. *Environ Health Perspect*, 117(2): 155-8.
- Ziska**, L., Knowlton, K., Rogers, C., Dalan, D., Tierney, N., Elder, M.A. *et al.* (2011). Recent warming by latitude associated with increased length of ragweed pollen season in central North America. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(10): 4248-4251.