



RANF

An. R. Acad. Nac. Farm.

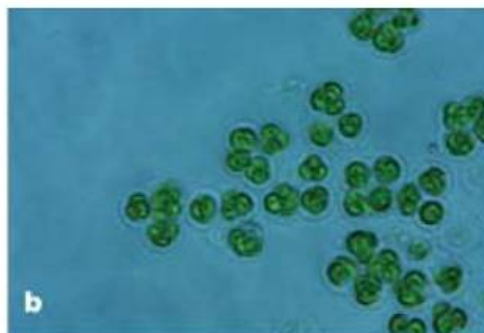
Vol. 75. n. 4 2009

ISSN 1697-4271

Publicación electrónica
trimestral



a



b



c



d



SESIONES

La nueva gripe A/H1N1 o gripe A/H1N1 (2009)

José Antonio Cabezas Fernández del Campo*

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca.

Recibido el 18 de junio de 2009.

RESUMEN

Entre 1930 y 1990 los virus del subtipo A/H1N1 de la gripe o influenza que circularon en cerdos sufrieron pocos cambios. Pero desde finales de la década de 1990 han surgido virus A/H1N1 que contienen segmentos del genoma de virus de origen aviar (aproximadamente 1/3 procedentes de América del Norte), porcino (otro 1/3 de la misma procedencia), estando el 1/3 restante integrado por los de origen humano y porcino de procedencia euroasiática. Hasta marzo de 2009, la transmisión de este virus entre seres humanos ha sido escasamente mencionada, verosímelmente por ser muy limitada. Sin embargo, desde esa fecha, en que se dio a conocer en Méjico y enseguida en EE.UU. la aparición de una forma de gripe de características inhabituales, su expansión por numerosos países de varios continentes ha sido muy rápida, a pesar de haberse tomado internacionalmente algunas medidas para reducirla. [El 28 de mayo de 2009 se contabilizaron 13.398 casos confirmados en 48 países, con 95 muertes; y el 3 de junio eran más de 17.000 los afectados en 64 países, con 180 en España, acercándose al nivel de alerta pandémica (fase 6).] Presentando hasta ahora leve patogenicidad, comparable con la de la gripe estacional, existe fundado temor a que pueda originar cepas más peligrosas, ya sea por mutación o por reagrupamiento génico con el virus A/H1N1 causante de la gripe estacional, o con otros virus como los A/H5N1 propios de la gripe aviar. De este

modo se originarían las temidas segundas o terceras oleadas de otras pandemias.

Afortunadamente, algunas de las medidas tomadas en los últimos años para prevenir o combatir la esperada pandemia que originaría el mencionado virus A/H5N1 aviar están siendo útiles en la presente ocasión. Así, los fármacos antivirales *oseltamivir* (*Tamiflu*) y *zanamivir* (*Relenza*), que inhiben la acción de la enzima vírica neuraminidasa (= sialidasa), son eficaces frente a este A/H1N1 de procedencia porcina, aunque el riesgo de que se originen cepas resistentes (como ya sucede en la gripe estacional respecto al oseltamivir) aconseja ser muy cautos en la dispensación de dichos dos medicamentos. Asimismo, la elaboración de *vacunas* (probablemente con virus vivos atenuados) por técnicas similares a las tradicionales, intentando que éstas sean algo más rápidas, es la táctica prevista y recomendada actualmente por la OMS, aunque debe realizarse sin perjuicio de la preparación de las vacunas destinadas a la gripe estacional. La posibilidad de emplear técnicas más avanzadas (mediante cultivos celulares, vacunas recombinantes, etc.) es una interesante meta, pero no aplicable aún en la actual situación como forma general.

Por otro lado, el uso de agentes como las *estatinas*, que actúan regulando la alteración funcional provocada ocasionalmente por algunas citocinas en enfermedades como la gripe, se considera como una posible terapia complementaria (o incluso sustitutoria) en el caso de una pandemia, dado su bajo coste. También puede ser muy útil en el futuro disponer de agentes que influyan sobre *proteínas* como la *no estructural NS1*, o sobre las de la *matriz* de la envoltura vírica, como la M2. Finalmente, resulta prometedora la utilización de adecuados *anticuerpos* frente algún componente vírico. Por tanto, los esfuerzos investigadores venideros se dirigen a hallar agentes que bloqueen cualquiera de las varias etapas del ciclo biológico del virus. Lógicamente, no hay que descuidar las medidas preventivas, pero sin incurrir en exceso de alarmismo.

La Directora General de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Margaret Chen, el 11 de junio de 2009, ha elevado la consideración de alarma de fase 5 reconocida hasta ahora a la máxima de 6, según la cual el virus se contagia de persona a persona en un tercer país distinto de la región de la OMS donde se detectó inicialmente.

Esto equivale a admitir la existencia de una pandemia —la primera en el siglo XXI—, por una notable ampliación de la propagación geográfica del virus; pero no significa forzosamente un aumento de su peligrosidad en los humanos. La Sanidad española parece ser que «dejará de contar casos porque es como la gripe normal».

Hasta el 12 de junio de 2009, el número de casos confirmados en el mundo ascendía a 28.774, con un total de 144 muertes, afectando a 74 países; si bien las diferencias entre éstos era muy marcadas. Así, desde los 1.317 casos (con 27 muertes) en EE.UU., y 6.241 casos (con 108 muertes) en Méjico, las cifras descienden muy significativamente en otros países, Cánada, por ejemplo, con 2.446 casos (con cuatro muertes); Chile, con 1.694 (y dos), respectivamente, etc. En España el número de afectados era de 357 (y ninguna muerte).

Tal vez estas cifras sean inferiores a las reales, ya que cabe la posibilidad de que en algunos países el control sanitario no sea muy estricto.

Por último, el riesgo de que los contagios se incrementen en zonas del hemisferio sur, en coincidencia con el invierno, es otro factor a tomar en consideración.

Palabras clave: Gripe porcina; Gripe A/H1N1; Gripe A; Gripe «mexicana»; Gripe de origen porcino; Gripe de California; Gripe de América del Norte.

ABSTRACT

The novel influenza A/H1N1 or (2009) Influenza A/H1N1 or «Swine-origin influenza A (H1N1)»

The influenza A/H1N1 subtype viruses which were in circulation between 1930 and 1990 have undergone few changes. However, at the end of 1990's an A/H1N1 virus emerged whose genome contains segments that are about one-third from «old» North American swine influenza, one-third from North American avian, and the remaining third evenly divided between swine and human origin. Until March 2009, transmission of this virus between humans has been little

mentioned, probably because it has been very limited. However, from this date, when the description of a new modality of influenza was initially reported in Mexico and immediately after in United States of America, its propagation in many other countries on several continents has been very rapid, in spite of certain international measures taken for to prevent its diffusion. [On March 28, 2009, 13.398 confirmed cases in 48 countries, with 95 deaths, were reported; and on June, 3, there were more than 17.000 patients in 64 countries, 180 in Spain, near the pandemic alert (phase 6)]. Although this virus now shows low virulence (similar to that of the seasonal influenza virus) there is well founded fear about its possible evolution giving rise to more dangerous strains, either by mutation or by genetic reassortment with the influenza A/H1N1 virus responsible for seasonal influenza or with the influenza A/H5N1 virus typical of avian influenza.

Fortunately, some of the measures that have been taken in recent years for the prevention or fight against the expected and feared pandemics that could arise from the abovementioned A/H5N1 avian virus have proved to be very useful now. Thus, the antiviral drugs *oseltamivir (Tamiflu)* and *zanamivir (Relenza)*, which are inhibitors of the viral enzyme neuraminidase (= sialidase), are very effective agents against A/H1N1 virus of swine origin. However, the risk of appearance of resistant strains (as is the case for some A/H1N1 of seasonal influenza) advises cautious dispensation. Furthermore, *vaccine* production (probably with live attenuated virus), using similar techniques to those employed for conventional vaccines (although faster), is the modality recently recommended by the WHO, with no detriment to the manufacture of the seasonal vaccine. The use of more sophisticated procedures (cell culture, recombinant vaccines, etc.) has been discarded for the time being.

On the other hand, the use of agents such as *statins*, which act as regulators in disorders occasionally produced by certain cytokines in some influenza cases, is generally considered as a possible complementary (or even replacement) therapy in possible pandemics, owing to their low cost and easy stocking. Likewise, it may be very useful in the future to have available agents that act on viral components such as *non structural NS1 protein* or on the viral matrix protein *M2*. Finally, the use of appropriate *antibodies* against certain

viral components could also be promising. Accordingly, future plans for research in this field should be aim at finding agents able to stop some of the steps of the viral biological cycle. However, this must be done without detriment to the necessary preventive measures, and should endeavour not to create public alarm.

Key words: Swine influenza; Novel influenza A; Influenza A (H1N1); Mexican flu; California flu; North American flu; Swine-origin influenza A (H1N1); Swine flu; Schweinegrippe; Grippe A.

1. INTRODUCCIÓN: DENOMINACIONES

Habiéndose detectado en Méjico, hacia el 18 de marzo de 2009, un brote de gripe que presentaba unas características inhabituales, se comenzó por denominarla *gripe mexicana* («*Mexican flu*») o simplemente, allí, *la epidemia*. Pero habiéndose presentado enseguida en el Estado norteamericano de California —y habiéndose tipificado allí el agente causal de la misma—, se sugirió llamarla *American flu* o, más concretamente, *California flu*.

Al haberse averiguado que originariamente procedía del cerdo y correspondía a una nueva cepa del subtipo A/H1N1 del virus gripal, empezó a conocerse como *swine influenza A (H1N1)*, o sea, *gripe porcina A/H1N1*; y, abreviadamente, *gripe porcina* (en alemán, *Schweinegrippe*).

El previsible rechazo comercial (aunque sin fundamento) a los productos procedentes del cerdo, por un lado; y, por otro, el comprensible recelo a asociar el nombre de países o Estados del continente americano a un brote epidémico de gripe —susceptible potencialmente éste de convertirse en una pandemia— hizo que se desaconsejase el empleo de todos estos nombres y se propusieran, el 28 de abril de 2009, por los *Centros de Control de la Enfermedad y la Prevención Norteamericanos* (= *U.S. Centers for Disease Control and Prevention, CDC*), otras denominaciones tales como *swine-origin influenza A (H1N1)*, y para el virus causante de la misma la abreviatura de S-OIV; así como la de *novel influenza A (H1N1)* (1), (= *nueva gripe A/H1N1*), a partir del 8 de mayo. Las autoridades españolas han optado por usar esta última denominación, o la de *gripe A/H1N1*, o simplemente *gripe A*.

Es evidente que, por lo menos, las dos últimas expresiones resultan demasiado genéricas y hasta imprecisas. En efecto, además de por coincidentes con la correspondiente a una de las cepas causantes de la *gripe estacional* —que se presenta con regularidad anual y, en ciertos intervalos de tiempo, con sólo ligeros cambios—, es también la denominación asignada al subtipo causante de la famosa pandemia de 1918-19 (la impropia e injustamente todavía llamada por algunos «gripe española», como es sabido).

Asimismo, el prescindir de la característica de *porcina* alegando que causa enfermedad en los humanos, no tiene mucho sentido, ya que, paralelamente, se denomina *gripe aviar* a la que se presenta con más o menos intensidad en las aves y puede ser grave en el hombre, causada por el subtipo A/H5N1.

Tal vez una denominación que evita recelos comerciales o susceptibilidades patrioterías, además de ser precisa, es la que proponemos [coincidente con la últimamente sugerida por organismos internacionales, «2009 A(H1N1)»], de **gripe A/H1N1 (2009)**, en que la indicación del subtipo viene acompañada por la del año de su detección oficial, ésta como importante dato que concreta el año de caracterización de la cepa.

2. ALGUNOS ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En el segundo viaje de Colón llegan cerdos, caballos y otros animales domésticos a la isla de Santo Domingo. Como mínimo, una cerda (comprada previamente en la isla canaria de La Gomera) padecía gripe. El 9-XII-1493, nada más desembarcar, numerosos navegantes (entre ellos Colón) y sobre todo los indígenas americanos, enfermaron y algunos fallecieron. «*Los indios murieron debido a enfermedades y no a la crueldad de los españoles*» (2).

1918-1919 Identificación del subtipo de virus H1N1 (según criterios serológicos).

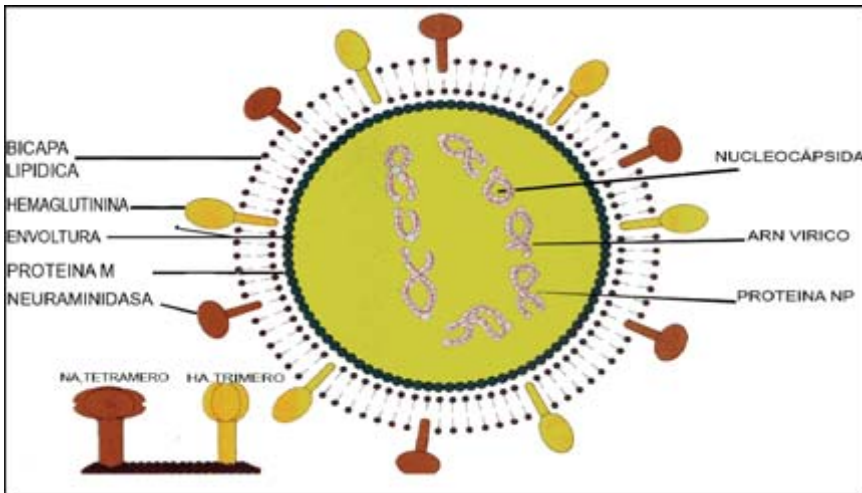
1931 El virus H1N1 es aislado del cerdo por Shope.

1932-1934 Aislamiento a partir de humanos del virus H1N1 y su caracterización por Smith, Andrewes y Laidlaw.

- 1957-1968 Aparición del subtipo H2N2.
- 1976 Reparición en cerdos del subtipo H1N1, que perdura actualmente.
- 1983 El virus H1N1 puede ser transmitido (según Scholtissek) de aves a cerdos y viceversa.
- 1983 Al menos en una cepa de H1N1, existen tres zonas antigénicas diferentes en su proteína no estructural NS1 (*Non Structural NS1*).

3. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA GRIPE TIPO A

Sus componentes mejor conocidos son: Los segmentos de ARN números 1, 2 y 3, que se hallan relacionados, respectivamente, con la polimerasa básica 2 (PB2), la polimerasa básica 1 (PB1) y la polimerasa ácida (PA). El número 4 codifica la biosíntesis de la hemaglutinina (HA); el número 5, la de la nucleoproteína integrante de la nucleocápsida; el número 6, la neuraminidasa (NA); el número 7, la de



[Especialmente en otras publicaciones del autor puede hallarse información acerca de la composición y ciclo biológico del virus de la gripe (4-7), y de forma resumida en la página de esta Real Academia www.ranf.com].

las proteínas M1 y M2, componentes de la matriz de la envoltura, y el número 8, la de las proteínas no estructurales, NS1 y NS2. (A la proteína no estructural NS1 se concede últimamente gran importancia en relación con la patogenicidad del subtipo A/H1N1 causante del brote del año 2009, según se señala más adelante.) Las actividades de la HA y de la NA radican en los «cráteres» o cavidades de sus cabezas. El monómero de la HA puede efectuar la «fusión» del virus con la membrana de la célula hospedadora. Para la NA sólo el tetrámero es la forma activa, cuya función principal estriba en la liberación de los viriones recién formados, evitando su acumulación (3).

4. «LA GRIPE PORCINA PASA A SER GLOBAL»

El 30 de abril de 2009, éste era el título de un trabajo publicado en la revista *Nature*: «Swine flu goes global» (8). En él se indica:

- Que el virus parece haber prendido inicialmente en Méjico, hacia mediados de marzo de 2009, aunque su existencia «oficial» se anunció el 23 de abril.
- Que algunos científicos piensan que pudo haber casos antes y quizá fuera de Méjico.
- Que la genética del virus es tan novedosa que es imposible que los humanos presenten mucha inmunidad frente a ella.
- Que «el riesgo y amenaza del H5N1 [aviar] permanece como antes» (8).
- También en la revista *The Lancet*, el 2 de mayo, se comenta el riesgo de esta gripe (9). Desde el 11 de marzo al 4 de mayo se han publicado en la revista *Science* del 8 de mayo (10) datos sobre el origen de este brote.
- Y, a partir del 18 de marzo y hasta el 18 de mayo, dicha cronología aparece en *Nature news* (11).
- Además, en la prensa general se vienen recogiendo informaciones, generalmente con rapidez y rigor, procedentes de organismos oficiales como la OMS, etc., relativas sobre todo a los países afectados y a las medidas preventivas recomendadas.

5. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y ORIGEN DEL VIRUS A/H1N1 (2009) QUE CIRCULA EN SERES HUMANOS

- Ya el 30 de abril de 2009 se señala en la revista *Nature* la complejidad de la composición génica y la diversa procedencia de los componentes de la cepa circulante en humanos, en los términos siguientes: «Es una cepa H1N1 que combina un triple agrupamiento primeramente identificado en 1998 —que incluye [genes de virus de] gripe humana, porcina y aviar— con dos nuevos genes de virus porcino H3N2 procedente de Eurasia, ellos mismos de origen humano reciente» (8).
- En la revista *Science* del 1 de mayo de 2009 se da a conocer que, según información aportada por el antes mencionado CDC norteamericano y la canadiense PHAC (= *Public Health Agency of Canada*), «el H1N1 en circulación combina piezas de virus porcino y aviar de América del Norte, con secuencias [de virus] humano y porcino de Europa y Asia» (12).
- Una semana más tarde, el 7 de mayo de 2009, el *New England Journal of Medicine* informa oficialmente de que «a finales de la década de 1990, múltiples cepas y subtipos [H1N1, H3N2 y H1N2] de un triple reagrupamiento —[triple-reassortant]— de virus porcino de gripe A (H1) —cuyos genomas incluyen combinaciones de segmentos de genes de virus de la gripe aviar, humana y porcina— han surgido, y llegado a ser predominantes en las piaras de América del Norte» (13).
- Datos cuantitativos se indican en la publicación de *Science* del 8 de mayo de 2009, además de advertir que su origen y su forma de evolucionar «sigue siendo un misterio»; así, se detalla que alrededor de un tercio del virus es procedente del «clásico» de América del Norte de la gripe porcina, otro tercio es del aviar de América del Norte, y el tercio restante está dividido a partes iguales entre el porcino eurasiático y el humano. Los datos numéricos son: Para el primer tercio: 30,6 por 100 [relativos a los componentes HA, NP y NS (véase apartado 3 de este artículo)]; para el segundo: 34,4 por 100 (PB2 y PA); para el tercero: 17,5 por 100 (NA y MP), y 17,5 por 100 (PB1)] (10, 14).

- Otros detalles se dan a conocer en la amplia publicación, coordinada por Nancy J. Cox, de un trabajo firmado por 58 investigadores realizado en 26 laboratorios, aparecida en *Scienceexpress* de 22 de mayo de 2009, en que se destaca que «la carencia de similitud entre virus A/H1N1 (2009) y sus allegados indica que sus segmentos de genes han estado circulando sin ser detectados durante un largo periodo. Su baja diversidad genética sugiere que su introducción en los humanos fue un suceso único o múltiples sucesos de virus similares. Generalmente no hay en los virus presentes de A/H1N1 (2009) marcadores moleculares predictibles de adaptación, sugiriendo que determinantes moleculares no reconocidos podrían ser responsables de la transmisión entre humanos. Desde el punto de vista antigénico [estos] virus son homogéneos y similares a los porcinos de América del Norte, pero distintos de los humanos H1N1 de [gripe] estacional» (15).
- La composición de la hemaglutinina del virus H1N1 de la gripe que circuló entre septiembre y diciembre de 2008 respecto a la del H1N1 de abril de 2009 muestra grandes diferencias en relación con sus aminoácidos; lo que significa que los anticuerpos frente a una de ellas no serían eficaces frente a la otra (16).
- Ahora bien, además de todo lo antes indicado, en relación con la patogenicidad del subtipo H1N1 y su cepa causante del actual brote epidémico, se ha concedido últimamente atención especial al componente vírico denominado *proteína no estructural NS1*, según se comenta a continuación.

6. PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL NS1: SU INFLUENCIA EN LA PATOGENICIDAD DEL VIRUS DE LA GRIPE

- El gen NS, que codifica las proteínas víricas NS1 y NS2, es altamente variable. Existe un ligando en el extremo de la NS1 que se une a otras moléculas implicadas en «muchas rutas de señalización intracelular» (17).
- La proteína «NS1 actúa como un antagonista de la inducción del interferón en células infectadas mediante secuestro del

ARN de doble banda o por supresión del proceso postranscripcional de los ARNm» (18).

- «Las actividades biológicas de la proteína NS1 son probablemente específicas de la cepa [vírica] y del tipo de célula. [...]. El papel principal de la NS1 es como antagonista del interferón tipo I. [...] La NS1 se une directamente a la subunidad p85 β de la fosfatidilinositol-3-cinasa» (19).
- «La proteína NS1 del virus de la gripe A es un factor importante de virulencia que es esencial para la patogénesis. La NS1 funciona dañando la inmunidad natural y la adquirida al inhibir la transformación del tipo de señal del hospedador y la expresión del gen, pero su mecanismo de acción no está del todo esclarecido. [...] La NS1 forma un complejo inhibitor con [compuestos] que son clave para la maquinaria exportadora del ARNm, que interactúa con los ARNm y las nucleoporinas» (20).
- Un nuevo determinante de la virulencia de los virus de la gripe: Los cuatro residuos C-terminales de la proteína NS1. [...] La proteína NS1 funciona de varias maneras para vencer la respuesta inmune innata. [...] Virus conteniendo secuencias de NS1 de los altamente patógenos H1N1 de 1918 y aviares H5N1 mostraron virulencia incrementada en ratones infectados» (21).
- La NS1 «es una pequeña proteína multifuncional que participa en interacciones ARN-proteína y proteína-proteína. [...] Una función importante de la NS1, como factor de virulencia, es la inhibición de la producción de ARNm del interferón β y otros ARNm antivirales» (22).
- Otra interesante aportación en este enfoque es el relativo a la proteína TRIM25 (23).

7. SITUACIÓN ACTUAL ACERCA DE LA VACUNA CONTRA EL VIRUS H1N1 Y OTROS AGENTES ANTIGRIPALES

- Parece ser que la gravedad potencial de la gripe ocasionada hasta ahora por este virus es relativamente leve, aunque la

Historia nos dice que la primera ola de la pandemia de 1918 fue también suave.

- En el Grupo Asesor Estratégico de Expertos sobre Inmunización de la OMS se preguntan si hay pruebas suficientes para recomendar a los fabricantes la elaboración de vacunas a gran escala. Por el momento, la recomendación era tener prevista la preparación necesaria para empezar.
- La capacidad de fabricación a gran escala de la nueva vacuna podría estar a punto hacia el mes de julio [de 2009]. La capacidad global de unos 700-900 millones de dosis anuales, que podría aumentarse hasta 1-2 billones de dosis, podría alcanzarse en su 50 por 100 hacia Navidad. Esto puede también depender de si se necesitaran una o dos dosis [individuales] de vacuna para ser eficaces (24-26).
- Semanalmente se celebran teleconferencias con los fabricantes de vacunas, no sólo de las grandes multinacionales, sino de las pequeñas compañías, habiendo también invitado a las de Rusia y China.
- Acerca de la preparación de la vacuna específica para esta cepa de virus H1N1, D. Butler (*Nature*, 14-V-2009) resume la información facilitada por la especialista del *New York Medical College*, la inmunóloga Doctora Bucher (27).

Aun cuando se emplean virus inactivados para la elaboración de la vacuna contra la gripe estacional, se ha propuesto (a mediados de mayo de 2009) por la OMS (25) la utilización de virus vivos atenuados para la preparación de la vacuna del brote H1N1 asociado a la nueva gripe de 2009, por:

- No necesitar estas vacunas adyuvantes para incrementar su eficacia.
- No necesitar jeringas, al poderse administrar por vía nasal.
- Prepararse con un rendimiento superior (con un huevo se pueden obtener 50-100 dosis, mientras que sólo una dosis si es para vacuna de virus inactivado).
- Así como el H1N1 de la gripe estacional está presentando resistencia al fármaco *Oseltamivir* (*Tamiflu* comercialmen-

te) (6), no es resistente la cepa de H1N1 de la gripe «porcina»; ni tampoco ésta lo es al otro fármaco autorizado: el *Zanamivir* (*Relenza*) (6). Pero dicha resistencia puede aparecer.

- El papel de los fármacos contra el H1N1 y su uso como preventivos sigue siendo un asunto controvertido (28).
- También nuevas vías de tratamiento, como las que emplearían *fármacos anti-inflamatorios* [del tipo *estatinas*], *deben ser tomadas en consideración* [por ser fácilmente accesibles y económicas], especialmente en países con dificultad para disponer de vacuna o de antivirales anti-neuraminidasa (oseltamivir y zanamivir) (7).
- Finalmente, parece lógico pensar que la experiencia adquirida en pasadas epidemias puede ser útil para evitar o remediar los problemas derivados de las posibles epidemias o pandemias previsiblemente venideras (29).

8. NOTA ADICIONAL

La Directora General de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Margaret Chen, el 11 de junio de 2009, ha elevado la consideración de alarma de fase 5 reconocida hasta ahora a la máxima de 6, según la cual el virus se contagia de persona a persona en un tercer país distinto de la región de la OMS donde se detectó inicialmente.

Esto equivale a admitir la existencia de una pandemia —la primera en el siglo XXI—, por una notable ampliación de la propagación geográfica del virus; pero no significa forzosamente un aumento de su peligrosidad en los humanos. La Sanidad española parece ser que «dejará de contar casos porque es como la gripe normal».

Hasta el 12 de junio de 2009, el número de casos confirmados en el mundo ascendía a 28.774, con un total de 144 muertes, afectando a 74 países; si bien las diferencias entre éstos era muy marcadas. Así, desde los 1.317 casos (con 27 muertes) en EE.UU., y 6.241 casos (con 108 muertes) en México, las cifras descienden muy significativamente en otros países, Canadá, por ejemplo, con 2.446 casos (con cuatro muertes); Chile, con 1.694 (y dos), respectivamente, etc. En España el número de afectados era de 357 (y ninguna muerte).

Tal vez estas cifras sean inferiores a las reales, ya que cabe la posibilidad de que en algunos países el control sanitario no sea muy estricto.

Por último, el riesgo de que los contagios se incrementen en zonas del hemisferio sur en coincidencia con el invierno es otro factor a tomar en consideración.

9. AGRADECIMIENTOS

A don Manuel Tirado Juárez (de esta Real Academia) por la transcripción del texto.

A don Javier Escudero (de la Secretaría del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca) y a doña María Jesús Marcos (de la Biblioteca de la Facultad de Medicina de Salamanca) por su colaboración en algunas búsquedas bibliográficas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Enserink, M. (2009) Swine Flu Names Evolving Faster Than Flu Itself. *Science*. 234: 871.
2. Guerra, F. (1985) La influenza, y no los españoles, acabó con los indios americanos. *El Médico*. 4-10-1985.
3. Cabezas, J. A. & Hannoun, C. (1990) La gripe y sus virus. *Inv. Ciencia*. 159: 62-69.
4. Cabezas, J. A. (1990) Datos sobre las pandemias de la gripe de 1889-90 y 1918-19 en Madrid y Salamanca, y estudios sobre la sialidasa [...]. *Discurso de recepción como Académico de Número, R. Acad. Nac. Farm.* Madrid.
5. Cabezas, J. A. (2004) Datos actuales sobre virus de la gripe de patos salvajes y pollos, y virus de la gripe tipo C. *Monografía conjunta de las R. Acad. Nac. de Medicina y Farmacia*.
6. Cabezas, J. A. (2006) Inhibidores de la neuraminidasa [...]. *R. Acad. Nac. Farm. Monografía XXI*, 187-239.
7. Cabezas, J. A. (2009) El virus de la gripe aviar: nuevos aspectos relativos a su patogenicidad y a estrategias para combatirlo. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 75: 233-254.
8. Butler, A. (2009) Swine flu goes global. *Nature*. 458: 1082-1083.
9. (Editorial) (2009) Swine influenza: how much of a global threat? *The Lancet*. 373: 1495.

10. Cohen, J. (2009) Out of Mexico? Scientists Ponder Swine Flu's Origins. *Science*. 234: 700-703.
11. (Nature) (2009) Timeline: Swine flu. *Nature news*, «on line». 29 de abril de 2009.
12. Cohen, J. & Enserink, M. (2009) As Swine Flu Circles Globe, Scientists Grapple with Basic Questions. *Science*. 234: 572-573.
13. Shinde, V.; Bridges, C. B. [...] & Finnelly, L. (2009) Triple-Reassortant Swine Influenza A (H1) in Humans in the United States, 2005-2009. *N. Engl. J. Med.*, «on line». 7 de mayo de 2009.
14. Butler, D. (2009) How severe will the flu outbreak be? *Nature*. 459: 14-15.
15. Garten, R. J.; Davis, C. T. [...] & Cox, N. J. (2009) Antigenic and Genetic Characteristics of Swine Origin 2009 A (H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Scienceexpress*. 22 de mayo de 2009.
16. Cohen, J. (2009) Flu Researchers Train Sights on Novel H1N1. *Science*. 234: 870-871.
17. Normile, D. (2006) Genomic Analysis Hints at H5N1 Pathogenicity. *Science*. 311: 457.
18. Kniken, T.; Holmes, E. C. [...] & Grenfeld, B. T. (2006) Host Species Barriers to Influenza Virus Infections. *Science*. 312: 394-397.
19. Hales, B. G.; Jackson, D. [...] & Randall, R. E. (2006) Influenza A virus NS1 protein binds p85 β and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 14194-14199.
20. Satterly, N.; Tsai, P.-L. [...] & Fontoura, B. M. A. (2007) Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 1853-1858.
21. Jackson, A.; Hossain, M. D. [...] & Lamb, R. A. (2008) A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 4321-4386.
22. Das, K.; Ma, L.-C. [...] & Montelione, G. T. (2008) Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 13093-13098.
23. Gack, M. U.; Albrecht, R. A. [...] & García-Sastre, A. (2009) Influenza A Virus NS1 Targets the Ubiquitin Ligase TRIM25 to Evade Recognition by the Host Viral RNA Sensor RIG-I. *Cell Host & Microbe*. 5: 439-449.
24. Butler, D. (2009) Marie-Paule Kieny. The Vaccine research director of the WHO, on swine flu. *Naturenews*, «on line», 13 de mayo de 2009.
25. Butler, D. (2009) Vaccine decisions loom for new flu strain. *Nature*. 459: 144-145.
26. Enserink, M. & Kaiser, J. (2009) Devilish Dilemmas Surround Pandemic Flu Vaccine. *Science*. 234: 702-04.
27. Butler, D. (2009) The virus grower. Immunologist Doris Bucher talks about cultivating the swine flu virus. *Naturenews*, «on line». 14 de mayo de 2009.
28. Couzin-Frankel, J. (2009) What Role for Antiviral Drugs? *Science*. 234: 705.
29. Cohen, J. (2009) Past Pandemics Provide Mixed Clues to H1N1's Next Moves. *Science*. 234: 996-997.

NOTA FINAL

Según la OMS, el 13-X-2009 se habían producido 4.525 muertes en el mundo por esta pandemia. El 25-IX-2009, de ellas 36 en España (la primera el 10-VII-2009).

Con posterioridad a la presentación del presente trabajo (el 9-VI-2009) han sido publicados artículos estrechamente relacionados con su contenido, que confirman y amplían lo en él expuesto. Algunos de los más destacados son los que se indican seguidamente, por orden esencialmente cronológico:

- Dawood, F. S.; Jain, S. [...] & Uyeki, T. M. (2009) Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N. Engl. J. Med.* 360: 2605-2615.
- Belshe, R. B. (2009) Implications of the Emergence of a Novel H1 Influenza Virus. *N. Engl. J. Med.* 360: 2667-2668.
- Neumann, G.; Noda, T. & Kawaoka, Y. (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 459: 931-939.
- [Editorial] (2009) Animal farm: pig in the middle. *Nature.* 459: 889.
- Fraser, C. [...] López-Gatell, H. [...] & Roth, C. (2009) Pandemic Potential of a Strain of Influenza A (H1N1): Early Findings. *Science.* 234: 1557-1561.
- Smith, G. J. D.; Vijaykrishna, D. [...] & Rambaut, A. (2009) Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature.* 459: 1122-1125.
- Soares, C. (2009) Eyes on the Swine. *Scient. Am.* Jul. 9-10.
- Lipsitch, M.; Riley, S. [...] & Ferguson, N. M. (2009) Managing and Reducing Uncertainty in an Emerging Influenza Pandemic. *N. Engl. J. Med.* 361: 112-115.
- Lange, E.; Kalthoff, D. [...] & Vahlenkamp, T. W. (2009) Pathogenesis and transmission of the novel swine origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection in pigs. *J. Gen. Virol.*, «on line». 10 de julio de 2009.
- Pérez-Padilla, R.; de la Rosa-Zamboni, D. [...] & Cordova-Villalobos, J. A. (2009) Pneumonia and Respiratory Failure from Swine-Origin Influenza A (H1N1) in Mexico. *N. Engl. J. Med.* 361: 1-10.
- Trifonov, V.; Khiabani, H. & Rabadan, R. (2009) Geographic Dependence, Surveillance, and Origins of the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *N. Engl. J. Med.* 361: 115-119.
- Butler, D. (2009) Regulators face tough flu-jab choices. *Nature.* 460: 446.
- Enserink, M. (2009) Ferrets Shed Light on New Virus's Severity and Spread. *Science.* 325: 17.
- Munster, V. J. [...] Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. (2009) Pathogenesis and Transmission of Swine Origin 2009 A (H1N1) Influenza Virus in Ferrets. *Science.* 325: 481-483.

- Maines, T. R. [...] Cox, N. J. [...] & Tumpey, T. M. (2009) Transmission and Pathogenesis of Swine-Origin 2009 A (H1N1) Influenza Viruses in Ferrets and Mice. *Science*. 325: 484-487.

*** Información de contacto:**

Doctor José Antonio Cabezas Fernández del Campo.
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Paseo Carmelitas, 43, 7.º A.
37002 Salamanca (España).

A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Río Negro, Argentina

Victoria López-Rodas, Daniel Carrera-Martínez, Eva Salgado, Aránzazu Mateos-Sanz, José C. Báez, Eduardo Costas*

Departamento de Producción Animal (Genética). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Recibido el 4 de mayo de 2009.

ABSTRACT

Nowadays, accidental spills of crude oil are one of the most worrisome environmental problems. Usually, the crude oil spills rapidly inhibited photosynthesis of microalgae (the main primary producers of aquatic ecosystems) causing a severe damage to inland waters and marine ecosystems. In order to add knowledge about microalgal response to crude oil spill, here we study a fascinating example of extreme contamination by crude oil spills continuously (at least since 1915) in Arroyo Minero, Niriñuan de Arriba, Río Negro, Argentina. This study is changing our pre-conceived ideas on the adaptation of microalgae to crude oil. Astonishingly, a high biomass of microalgae proliferates in contact with crude oil. In contrast with the paradox of the plankton (which predict that more than 30 microalgal species would coexist in the same water body) only four species were detected in the crude oil spill area. They are cosmopolitan mesophile species and not extremophile ones (as would be expected). The most abundant species was the

Chlorophyta *Scenedesmus obtusus*. Other abundant species seems to be a new *Scenedesmus* species. The other two species *Symploca dubia* Cyanobacteria and *Chlamydomonas dinobryonis* Chlorophyta are new records for flora of Argentina. These species were isolated maintained in clonal laboratory cultures and characterised. They are resistant to crude oil of Arroyo Minero and to analytical petroleum special standard. In contrast similar species isolated from areas without crude oil contamination were destroyed by petroleum.

Key Words: Adaptation; Crude oil spill; Microalgae; *Chlamydomonas dinobryonis*; *Scenedesmus obtusus*; *Symploca dubia*.

RESUMEN

Un fascinante ejemplo de adaptación de microalgas a una contaminación extrema de petróleo en un arroyo natural en Arroyo Minero, Río Negro, Argentina

En la actualidad los vertidos accidentales de petróleo constituyen uno de los más preocupantes problemas ambientales. Los vertidos de petróleo inhiben rápidamente la fotosíntesis de las microalgas (principales productores primarios en ecosistemas acuáticos) y causan un daño severo en ecosistemas continentales y marinos. Para aumentar nuestro conocimiento sobre los efectos de los vertidos de petróleo en las microalgas, estudiamos aquí un ejemplo fascinante de una contaminación extrema por un vertido continuo de petróleo que empezó al menos en 1915 en Arroyo Minero, Niriñuan de Arriba, Río Negro, Argentina. Este estudio está cambiando muchas de nuestras ideas preconcebidas sobre la adaptación de microalgas al petróleo. Sorprendentemente, una elevada biomasa algal prolifera en contacto con el petróleo. En contraste con la paradoja del plancton (que predice que más de 30 especies de microalgas deberían coexistir en la misma masa de agua) sólo se detectaron cuatro especies en el área de vertido de petróleo. Se trata de especies mesófilas cosmopolitas y no de especies extremófilas (como cabría esperar). La especie más abundante fue la Chlorophyta *Scenedesmus obtusus*. Otra especie abundante parece ser una nueva especie de *Scenedesmus*. Las otras dos especies, *Symploca dubia* Cyanobacteria y *Chlamydo-*

monas dinobryonis Chlorophyta, son nuevos registros para la flora de Argentina. Estas especies se aislaron, clonaron, mantuvieron en cultivos clónicos en el laboratorio y caracterizaron. Estos cultivos resultaron ser resistentes al petróleo del Arroyo Minero y al petróleo de estándares analíticos. En contraste, el petróleo destruyó a especies semejantes aisladas de áreas no contaminadas.

Palabras clave: Adaptación; Vertidos de petróleo; Microalgas; *Chlamydomonas dinobryonis*; *Scenedesmus obtusus*; *Symploca dubia*.

1. INTRODUCTION

Nowadays, we are living in a geological instant in which global extinction rates are 500 times background and are increasing due to those human activities that are contaminating biosphere. It is supposed that several million populations and 300 to 30.000 species go extinct annually from a total of > 10 million species (1). Distinctive features of biosphere future could include a proliferation of opportunistic species resistant to anthropogenic contaminants (2). The biodiversity crisis is reasonably understood for animals and plants, but is less predictable in microbes that succumb to anthropogenic toxins (1).

The occurrence of crude oil spills is one of the most worrisome environmental problems since the World's energy dependence on petroleum. Crude oil is a highly toxic mixture of more than 10.000 different hydrocarbons (with approx. 55% naphthenes, 20% aromatic compounds and 20% paraffin) and variable quantities of sulphur and others. Accidental spills of crude oil in environment cause severe contamination of marine and continental ecosystems. Contamination due to spill of processed petroleum derivates (especially diesel and fuel) is an important problem in continental waters (3). Crude oil spills are between the worst environmental catastrophes (i.e. Exxon Valdes, Prestige).

In aquatic ecosystems, the tolerance of microalgae and cyanobacteria to environmental stress consequence of water contamination is very relevant because these organisms are the principal primary producers of aquatic ecosystems (4). Consequently, survival and growth of phytoplankton living in contaminated environments is an interesting topic from an ecological point of view (5). There is a growing interest to study effects of crude oils and oil components on microalgae (for example, see references 6-14). Usually, crude oil spills rapidly inhibits photosynthesis and growth of these primary producers (10, 15). However, the effects of crude oil on phytoplankton are very variable (16-19), influence of dispersants (20). Recent experiments suggest that different species show a different response against crude oil contamination (15). Unfortunately, little is known about algal response to crude oil contamination.

In order to add knowledge about microalgal response to crude oil spill, we study a fascinating example of the extreme contamination by crude oil in Arroyo Minero, Niriñuan de Arriba, Río Negro, Argentina. A natural spill of crude oil has been pouring perhaps during hundreds of years. Around 50 m of natural spill there is and artificial spill from a tasting held made in 1915 for a possible exploitation of the crude. Both spills are composed of crude oil mixed with gas and fresh water. Both spill fall into the Arroyo Minero River after flowed slowly a few meters.

Surprisingly, the crude oil spill area of Arroyo Minero River has an abundant microalgal biomass living in contact with crude oil. The main aim of this study was to describe the first known community of microalgae living in permanently crude oil contaminated environment.

2. MATERIALS AND METHODS

Sampling of water and phytoplankton was carried out in Arroyo Minero, Niriñuan de Arriba, Río Negro, Argentina, on April 4th, 2008. Two samples points were studied: i) the spring of the natural oil spill, and ii) Arroyo Minero river about 25 meters down water from the petroleum spill.

In each point physicochemical characterization of the water were carried out using an YSI- 6820 Multi-parameter Water Quality Monitors Sonde (1700/1725 Brannum Lane. Yellow Springs Ohio 45387, USA). In addition water samples of 1 L (+ crude oil) were collected in dark glass (amber type) for chemical analysis. Phytoplankton was identified *in situ* directly after collection using a McArthur portable microscope (Kirk Technology, England), as well as in laboratory on fresh and a 4% PBS-buffered formalin samples using a Zeiss microscope with phase contrast and Nomarski (Oberkochen, Germany). Identification of algae was carried out in accordance with Bourrelly (21), Cox (22), Zalocar *et al.* (23), Mirande & Tracanna (24, 25), Mirande *et al.* (26). Cell densities of phytoplankton were estimated on 4% PBS-buffered formalin fixed samples in settling chambers using an inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany).

In addition, we isolated microalgae from the crude spill area of Arroyo Minero to be cultured in laboratory. Sampling was performed using 13 ml polystyrene culture sterile tubes (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co., D-51588 Nümbrecht, Germany). The samples were maintained at 20 °C until we arrive to laboratory.

Two methods were used for isolation: i) direct isolation using micropipettes with a Zeiss-Eppendorf micromanipulator connected to inverted microscope (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany), and procedures of successive dilutions in polystyrene culture sterile tubes [as previously described in Costas *et al.* (27) and Brand (28)].

Once isolated the strains were re-cloned by isolating a single cell. The strains were grown in 100 ml cell culture flasks with aerator cap (Greiner Bio-One Inc Longwood, NJ, USA), in 20 ml of culture medium BG-11 (Sigma Aldrich Chemist, Taufkirchen, Germany), under continuous light of 60- $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over the waveband 400-700 nm provided by daylight fluorescent tubes (Phillips TLD 36W/33, France), at 20 °C in growth chambers (Cámaras de Crecimiento, Modelo AGP, Ing. Climas, C/ Industria 498-500, Badalona 08918, Barcelona, Spain). BG-11 culture medium was prepared with distilled water from the distiller (Elix 3uv Millipore) and filtered through sterile-cup (Express Plus membrane, 250 ml) with filter of 0.22 μm . Cultures were maintained axenically in mid-log exponential growth phase by serial transfers of subcultures of a small inoculum (1-3 ml)

to new culture medium (20 ml) once every 30 days. The strains were added to the algal culture collection of at Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid.

The damage caused by crude oil on these Arroyo Minero strains was measured using a toxicity test. We also used the *Scenedesmus intermedius* *SiD1* wild-type strain (from algal collection of Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid) as a control. *SiD1* strain was isolated from a pristine lake in Doñana National Park (Huelva, Spain), which never has been exposed neither to crude oil nor petroleum derivatives. Crude oil collected in Arroyo Minero as well as a standard of petroleum (Fluka Analytical Petroleum special standard. Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Ch-9471, Buchs, Germany) were used at concentration of 12% v/v diluted in BG-11 medium. The mixing of petroleum and culture medium, was obtained by sonication with Vibra Cell (Sonics & Materials Inc Danbury CT, USA), maintaining the tubes within a bucket of crushed ice during the process. The pattern for sonication was of 4 pulses of 10 seconds each, with a power of 40 watts and a frequency of 16 KHz. Measuring crude oil effect on photosynthetic performance we performed the toxicity test. The change in the effective quantum yield of photosystem II (F_{PSII}) was measured on three replicates of both exposed and control cultures using a ToxY-PAM fluorimeter (Walz, Effeltrich, Germany). The measures were performed after 48 hours of petroleum exposure. Effective quantum yield was calculated as follows:

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F_t) / F'_m$$

where F'_m and F_t are the maximum and the steady-state fluorescence of light-adapted cells, respectively (29).

3. RESULTS

Apparently, the natural spill of crude oil of Arroyo Minero is a complex and variable mix of crude oil, gas and water (Figure 1a, 1b). Total hydrocarbons concentration in the spill area was 11,7% v/v. Water in the spill area was at 19 °C, pH 8.1 and 694 μS conductivity. There is a strong evaporation of the more volatile parts of the crude oil with an intense odour to hydrocarbons in all the area.

Dense patches of fuel remain in the natural emergence of spill and adjacent areas (Figure 1b). Astonishingly, all the area of petroleum spill of Arroyo Minero has important microalgal concentrations even in contact with crude oil (Figure 1c). This microalgal biomass seems to be enough to sustain a short trophic chain of few zooplankton and micro-invertebrate species. Crude oil reaches the Arroyo Minero and dilutes progressively (Figure 1d, 1e). Arroyo Minero waters 25 meters down water of crude oil spill was at 16 °C, pH 8.3 and 517 μ S conductivity. In this area total concentration of crude oil was 1,5% v/v.

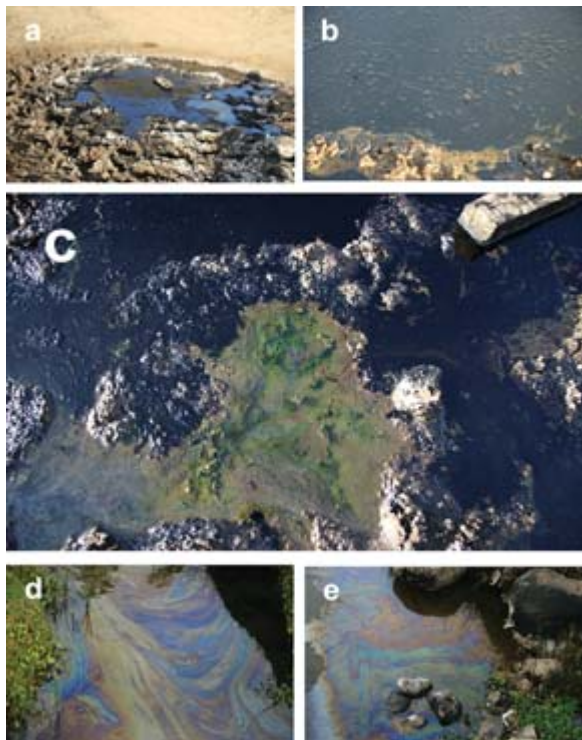


Figure 1. **a)** Natural spill of crude oil of Arroyo Minero. **b)** Crude oil with gas bubbles and water. **c)** Microalgal concentrations in contact with crude oil. **d)** Crude oil reaches Arroyo Minero. **e)** Crude oil dilutes progressively in Arroyo Minero.

However, the great microalgal biomass inhabiting the natural emergence of crude oil of Arroyo Minero is constituted only by very

few species. We only found four cosmopolitan mesophile species of phytoplankters: three Chlorophyceans and one Cyanobacteria species. They are:

Symploca dubia (Nägeli, 1849) Gomont, 1892. Cyanobacteria, Oscillatoriales, Phormidiaceae. Fascicles of filaments parallel oriented to the surface, without branched, and anastomosed. The filaments are more 1 mm of wide, and without heterocysts (Figure 2a). Cell density this species was of 98 ± 16 filaments ml^{-1} .

Chlamydomonas dinobryonis G. M. Smith, 1920. Chlorophyceae, Volvocales, Chlamydomonadaceae. The motile cells are pyriforms, and it presents a small parietal pyrenoid. $5.5 \mu\text{m}$ in diameter. The palmoid form presented three-dimensional without branched, and without spines (Figure 2b). Cell density this species was of 2100 ± 200 cells ml^{-1} .

Scenedesmus obtusus Meyen, 1829. Chlorophyceae, Chlorococcales, Oocystaceae. Cenoby usually in 2-4-cells (rarely 8 or more) retained within persistent mother cell wall. Cells of the more common 4-celled colonies laying in the same plane, however, cell can be displaced in the axis. Cells oval $7.5 \mu\text{m}$ diameter major and $6.5 \mu\text{m}$ in diameter minor (Figure 2d). Cell density this species was of 9.200 ± 700 cells ml^{-1} .

Finally, Chlorophyceae, Chlorococcales, Oocystaceae a species with cenoby usually in 2-4-cells cells, 4-celled colonies laying in the same plane, however, cell can be displaced in the axis. Cells almost spherical (only lightly oval) around $5.5 \mu\text{m}$ diameter major and around $5.0 \mu\text{m}$ in diameter minor (Figure 2c). After consult several taxonomic expertise, this species seem to be a *Scenedesmus*, perhaps a new species (*Scenedesmus rapoportii*). To confirm this, a molecular genetic characterization (DNA sequenciation, immunological and lectin binding patterns) is in process. Cell density this species was of 7.200 ± 300 cells ml^{-1} .

Clonal cultures of these four species were established in laboratory. The four strains were able to grow in BG-11 medium in absence of petroleum. The strains were propagated in cultures exclusively by asexual reproduction. The two species of *Scenedesmus* grow rapidly around one doubling every two days. *Symploca dubia*

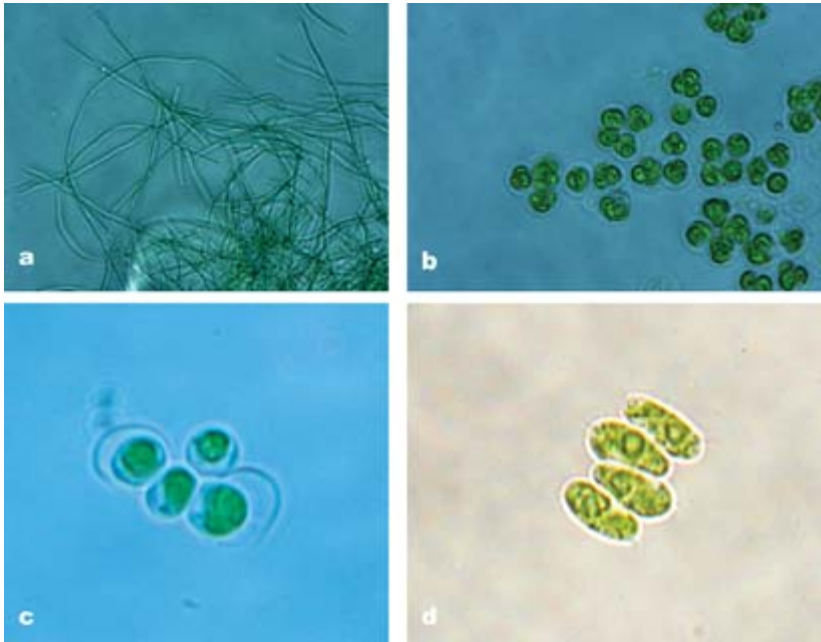


Figure 2. a) *Symploca dubia*. b) *Chlamydomonas dinobryonis*. c) *Scenedesmus* sp. (sp. nov.). d) *Scenedesmus obtusus*.

and *Chlamydomonas dinobryonis* strains grow more slowly (about one doubling in three days).

The toxicity test shows that neither crude oil from Arroyo Minero, nor Fluka Analytical Petroleum Special Standard were toxic for the species isolated from the crude oil spill of Arroyo Minero (Table 1). Photosynthesis performance was not inhibited by concentrations of 12% v/v crude oil (11,7% v/v crude oil was maximum dose detected in Arroyo Minero) after 48 hours under crude oil exposure (a complete cell cycle in *Scenedesmus* species). In contrast, both crude oil from Arroyo Minero as well as Fluka Analytical Petroleum Special Standard cause inhibition of more than 50% of effective quantum yield of photosystem II of the control species (*Scenedesmus intermedius*) isolated from Doñana National Park, after 48h of 12% v/v petroleum exposure.

Table 1. Toxicity test. Inhibition of photosynthetic performance (effective quantum yield of photosystem II; Φ PSII) of species isolated from the crude oil spill of Arroyo Minero as well as the control isolated from Doñana National Park, after 48 h. of petroleum exposure (10% v/v in BG-11 medium)

		Inhibition of photosynthesis by crude oil of Arroyo Minero	Inhibition of photosynthesis by Fluka Analytical Petroleum Special Standard
<i>Species from crude oil spill</i>	<i>Symploca dubia</i>	Undetectable	Undetectable
	<i>Chlamydomonas dinobryonis</i>	Undetectable	Undetectable
	<i>Scenedesmus sp</i>	Undetectable	Undetectable
	<i>Scenedesmus obtusus</i>	Undetectable	Undetectable
<i>Species from pristine environment</i>	<i>Scenedesmus intermedius</i>	> 50%	> 52%

4. DISCUSSION

The crude oil spill of Arroyo Minero is a natural laboratory to study adaptation of phytoplankton to extreme petroleum contamination, because at least crude oil spills continuously at least since 1915. A series of astonishing finding in Arroyo Minero are

changing our pre-conceived ideas on the adaptation of microalgae to crude oil in this fascinating example of the extremely contaminated freshwater ecosystem.

First of all, a surprisingly high biomass of microalgae proliferates even in the more contaminated areas of Arroyo Minero. Microalgae have been able to grow in contact with recalcitrant contamination by fuel patches. These algae are the base for a few species of zooplankton and micro-invertebrates.

The coexistence of more than 30 species of microalgae in the same water body is a usual characteristic of all inland freshwater and marine ecosystems that has been called «the Paradox of the Plankton» (30). After thousand studies on the most diverse aquatic ecosystems, the Paradox of the Plankton is a well-established fact (31, 32). Even in red tide events there several species coexist (33). In contrast, only four species were detected in the crude oil spill area of Arroyo Minero. However, many phytoplankton species inhabits Arroyo Minero River previously to the crude oil spill area (we identify 39 microalgal species of Cyanobacteria, Bacillariophyta, Chlorophyta, Dinophyta and others). Apparently, adaptation to crude oil contamination is not easy and most of microalgal species are unable to adaptation at toxic effect of petroleum.

Extreme environments (characterized by extreme values of pH, toxic minerals, temperature, and other factors) frequently support unusual communities of phytoplankters (34). It is frequently assumed that extremophile species more than mesophile species inhabit the extreme environments. However, the 4 species living in the crude oil spill area of Arroyo Minero are mesophile species. Only species of Chlorophyta and Cyanobacteria Division were able to proliferate in the crude oil spill area.

Recent works suggest only a few mesophile species (mainly Chlorophyta) are able to proliferate in extreme environments. This pattern was observed by first time in the Guadiamar River (S, Spain) after the toxic heavy metal spill of Aznalcollar mine (35) and confirmed in the heavy metal contaminated environments of Aguas Agrias, Spain (36), Mynydd Parys, Wales, UK (37), and Rio Tinto, Spain (38). In la Hedionda, Spain, an example of extreme sulphureus waters, also proliferate a few mesophile Chlorophyta species (39).

This fact seems to be the pattern followed by microalgae in extreme geothermal waters of Eolias islands, Italia and Argentina (38, 40).

The most abundant species in the crude oil area was the cosmopolite mesophile Chlorophyta *Scenedesmus obtusus*. This species is able to grow rapidly under the extreme crude oil contamination of Arroyo Minero as well as under a Fluka Analytical Petroleum Special Standard. However, crude oil of Arroyo Minero and Petroleum Special Standard caused inhibition of more than 50% of effective quantum yield of photosystem II of *Scenedesmus intermedius*, with died afterwards. This species closely related with *Scenedesmus* was isolated from a pristine lagoon in Doñana National Park, which never was exposed to petroleum prior to the experiment. This fact suggest the four species proliferating in the spill area of Arroyo Minero are the result of some kind of genetic evolutionary change occurs in the past, which allows the adaptation of phytoplankton to extreme crude oil contamination.

In extreme environments characterized by values of environmental contaminants exceeding the physiological limits of organisms, survival of microbes depends exclusively of selection on pre-existing genetic variability that occurs spontaneously by rare spontaneous mutation [i.e. mutations occur exclusively by chance and independently of the selective agent; reviewed by Sniegowski (41)]. However, some microbiologist debates this neo-Darwinian theory suggesting an alternative explanation called adaptationist process [reviewed by Creager (42)]. In some cases, adaptive mutation mutations occur in bacteria as a direct and specific response to the selective agent (43, 44). However a lot of works on adaptation of algae to antibiotics, toxic substances and extreme environments have find that adaptation depends exclusively of selection on rare spontaneous mutants that occurs prior to exposure at selective agent (45-52).

Finally, although several studies recorded phytoplankton flora from N Argentina (i.e. 23-26, 53), the knowledge of the flora of phytoplankters of Patagonia Argentina is very scant. We identify two species from crude oil spill of Arroyo Minero (*Symploca dubia* and *Chlamydomonas dinobryonis*) that are new records for flora of Argentina. Other species could be a new species (*Scenedesmus*

rapoportii). However, Mirande *et al.* (26) previously recorded *S. obtusus* from Tucumán province (N Argentina).

5. CONCLUSION

A high microalgal biomass proliferates in contact with crude oil patches in Arroyo Minero, Nirihuan de Arriba, Río Negro, Argentina, an area extremely contaminated by continuous spills of crude oil at least since 1915. Only four species of phytoplankton are able to grow (the Chlorophyta *Scenedesmus obtusus*, other *Scenedesmus* species (perhaps a new species), the Chlorophyta *Chlamydomonas dinobryonis* and the Cyanobacteria *Symploca dubia*). They are cosmopolitan mesophile species and not extremophile ones (as would be expected). These species (isolated and maintained in clonal laboratory cultures) are resistant to crude oil of Arroyo Minero as well as to analytical petroleum special standard.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks are given to Professors Eduardo Rapoport and Sergio Lambertuci Laboratory of Ecotono, University of Bariloche (Argentina). Supported by Grants CTM2008-05680-C02-02 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain) and CGL2008-00652/BOS (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).

7. REFERENCES

1. Woodruff, D. S. (2001) Declines of biomes and biotas and the future of evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98: 5471-5476.
2. Myers, N. & Knoll, A. H. (2001) The biotic crisis and the future of evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98: 5389-5392.
3. Dawes, C. J. (1998) *Marine Botany* (2nd ed). J. Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
4. Falkowski, P. G. & Raven, J. A. (1997) *Aquatic Photosynthesis*. Malden, MA, USA. Blackwell Science.
5. Fogg, G. E. (2001) Algal adaptation to stress, some general remarks. In: Rai LC, Gaur JP, eds. *Algal Adaptation to Environmental Stresses. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. Springer, Berlin, Germany, pp. 1-20.

6. O'Brien, P. & Dixon, P. S. (1976) The effects of oils and oil components on algae a review. *Brit. Phycol. J.* 11(2): 115-142.
7. Tokuda, H. (1979) Fundamental-studies on the influence of oil pollution upon marine organisms. 4. Toxicity of mixtures of oil products and oil spill emulsifiers to phytoplankton. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries.* 45(10): 1289-1291.
8. Shin, P. K. S. (1988) Effects of a spill of bunker oil on the marine biological communities in Hon-Kong. *Environ. Int.* 14(6): 545-552.
9. Siron, R.; Pelletier, E.; Delille, D., & Roy, S. (1993) Fate and effects of dispersed crude-oil under icy conditions simulated in mesocosms. *Marine Environm. Res.* 35(3): 273-302.
10. Siron, R.; Pelletier, E. & Roy, S. (1996) Effects of dispersed and adsorbed crude oil on microalgal and bacterial communities of cold seawater. *Ecotoxicology.* 5(4): 229-251.
11. Fiala, M. & Delille, D. (1999) Annual changes of microalgae biomass in Antarctic sea ice contaminated by crude oil and diesel fuel. *Polar Biol.* 6: 391-396.
12. Tewari, A.; Joshi, H. V.; Trivedi, R. H.; Sravankumar, V. G.; Raghunathan, C.; Khambhaty, Y.; Kotiwar, O. S. & Mandal, S. K. (2001) The effect of ship scrapping industry and its associated wastes on the biomass production and biodiversity of biota in *in situ* condition at Alang. *Marine Pollution Bulletin.* 42(6): 462-469.
13. Piehler, M. F.; Winkelmann, V.; Twomey, L. J.; Hall, N. S.; Currin, C. A. & Paerl, H. W. (2003) *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 297(2): 219-237.
14. Salas, N.; Ortiz, L.; Gilcoto, M.; Varela, M.; Bayona, J. M.; Groom, S.; Álvarez-Salgado, X. A. & Albaiges, J. (2006) Fingerprinting petroleum hydrocarbons in plankton and surface sediments during the spring and early summer blooms in the Galician coast (NW Spain) after the Prestige oil spill. *Marine Environ. Res.* 62(5): 388-413.
15. González, J.; Figueiras, F. G.; Aranguren-Gassis, M.; Crespo, B. G.; Fernández, E., Morán, X. A. G. & Nieto-Cid, M. (2009) Effect of simulated oil spill on natural assemblages of marine phytoplankton enclosed in microcosms. *Estuarine Coastal Shelf Science.* 83(3): 265-276.
16. Banks, S. (2003) SeaWIFS satellite monitoring of oil spill impact on primary production in the Galapagos Marine Reserve. *Marine Pollution Bulletin.* 47(7-8): 325-330.
17. Suderman, K. & Thistle, D. (2004) The relative impacts of spills of two alternative fuels on the microalgae of a sandy site: a microcosm study. *Marine Pollution Bulletin.* 49(5-6): 473-478.
18. Verlecar, X. N.; Desai, S. R.; Sarkar, A. & Dalal, S. G. (2006) Biological indicators in relation to coastal pollution along Karnataka coast, India. *Water Res.* 40(17): 3304-3312.
19. Varela, M.; Bode, A.; Lorenzo, J.; Álvarez-Ossorio, M. T.; Miranda, A.; Patrocinio, T.; Anadón, R.; Viesca, L.; Rodríguez, N.; Valdés, L.; Cabal, J.; Urrutia, A.; García-Soto, C.; Rodríguez, M.; Álvarez-Salgado, X. A. & Groom, S. (2006) The effect of the «Prestige» oil spill on the plankton of the N-NW Spanish Coast. *Marine Pollution Bulletin.* 53(5-7): 272-286.

20. Wolfe, M. F.; Schlosser, J. A.; Schwartz, G. J. B.; Singaran, S.; Mielbrecht, E. E.; Tjeerdema, R. S. & Sowby, M. L. (1998) Influence of dispersants on the bioavailability and trophic transfer of petroleum hydrocarbons to primary levels of a marine food chain. *Aquatic Toxicol.* 42(3): 221-227.
21. Bourrelly, P. (1966) Les algues d'eau douce. In: N. Boubée et Cia. (Ed.), *Initiation à la systématique. I: Les algues vertes*. Paris, France.
22. Cox, E. J. (1996) Identification of freshwater diatoms from liver material. Chapman and Hall, London. U.K.
23. Zalocar, Y.; Asselborn, V. M. & Casco, S. L. (1998). Variaciones espaciales y temporales del fitoplancton en un lago subtropical de Argentina. *Revista Brasileira de Biología.* 58: 359-382.
24. Mirande, V. & Tracanna, B. C. (2004) Fitoplancton del río Gastona (Tucumán, Argentina): Cyanophyta, Chlorophyta, Euglenophyta y Rhodophyta. *Iheringia Serie Botánica.* 59: 35-58. *Porto Alegre.*
25. Mirande, V. & Tracanna, B. C. (2005) Fitoplancton de un río del noroeste argentino contaminado por efluentes azucareros y cloacales. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica.* 40: 169-182.
26. Mirande, V.; Tracanna, B. C.; Seeligmann, C. T.; Cangemi, R.; Aulet, O.; Cecilia, M.; Silva, C. & Binsztein, N. (2007) Ecología de *Vibrio cholerae* en relación al fitoplancton y variables fisicoquímicas en ríos de Tucumán (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica.* 42: 195-209.
27. Costas, E.; Bao, R.; Maneiro, E.; Rodríguez, B.; Larrañaga, A. & Varela, M. (1988) Cultivos experimentales de microalgas marinas. *Infor. Tec. Ins. Esp. Ocean.* MAPA. n.º 62. 22 pp.
28. Brand, L. E. (1990) The isolation and culture of microalgae for biotechnological applications. In: D. P. Labeda (Ed.). *Isolation of biotechnological organisms from nature* (pp. 81-115). McGraw-Hill, New York.
29. Schreiber *et al.* (1986).
30. Hutchinson, G. E. (1961) The paradox of the plankton. *American Naturalist.* 95: 137-145.
31. Roy, S. & Chattopadhyay, J. (2007) Towards a resolution of «the paradox of the plankton»: a brief overview of the proposed mechanisms. *Ecological Complexity.* 4: 26-33.
32. Huisman, J.; Johansson, A. M.; Folmer, E. O. & Weissing, F. J. (2001) Towards a solution of the plankton paradox: the importance of physiology and life history. *Ecol. Lett.* 4: 408-411.
33. López-Rodas, V.; Maneiro, E.; Martínez, J.; Navarro, M. & Costas, E. (2006) Harmful algal blooms, red tide and human health: diarrhetic shellfish poisoning and colorectal cancer. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 72: 391-408.
34. Seckbach, J. & Oren, A. (2007) Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments: possibilities and limitations. In: J. Seckbach (Ed.). *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. Springer: Dordrecht, Netherlands.
35. Baos, R.; García-Villada, L.; Agrelo, M.; López Rodas, V.; Hiraldo, F. & Costas, E. (2002) Short-Term adaptation of microalgae in highly stressfull environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus*

- intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcollar mine spill. *Eur. J. Phycol.* 37: 593-600.
36. López-Rodas, V.; Marva, F.; Costas, E. & Flores-Moya, A. (2008a) Microalgal adaptation in the stressful acidic, metal-rich mine waters from Mynydd Parys (N Wales, UK) could be due to selection of preselective mutants. *Environ. Exp. Botany.* 61: 43-48.
 37. López-Rodas, V.; Marva, F.; Rouco, M.; Costas, E. & Flores-Moya A. (2008b) Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to the stressful acidic, mine metal-rich waters from Aguas Agrias Stream (SW Spain) as result of pre-selective mutations. *Chemosphere.* 72: 703-707.
 38. Costas, E.; Flores-Moya, A. & López-Rodas V. (2008) Rapid adaptation of algae to extreme environments (geothermal waters) by single mutation allows «Noah's Arks» for photosynthesizers during the Neoproterozoic «snowball Earth»? *New Phytol.* 189: 922-932.
 39. Flores-Moya, A.; Costas, Bañares-España, E.; García-Villada, L.; Altamirano, M. & López-Rodas, V. (2005) Adaptation of *Spirogyra insignis* (Chlorophyta) to an extreme natural environment (sulphureous waters) through pre-selective mutations. *New Phytologist.* 166: 655-661.
 40. López-Rodas, V.; Perdigones, N.; Marva, F.; Maneiro, E.; Rouco, M.; Delgado, A.; Flores-Moya, A. & Costas, E. (2009) Living in Vulcan's forge: Algal adaptation to stressfull geothermal ponds on Vulcano Island (southern Italy) as result of pre-selective mutation. *Phycological Res.* 57: 111-117.
 41. Sniegowski, P. D. (2005) Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa. *New Phytologist.* 166: 360-362.
 42. Creager, A. N. H. (2007) Adaptation or selection? Old issues and new stakes in the postwar debates over bacterial drug resistance. *Stud. Hist. Phil. Biol & Biomed. Sci.* 38: 159-190.
 43. Cairns, J.; Overbaugh, J. & Miller, S. (1988) The origin of mutants. *Nature.* 335: 142-145.
 44. Foster, P. L. (2000) Adaptive mutation: implications for evolution. *Bioessays.* 22: 1067-1074.
 45. Sager, R. (1954) Mendelian and non-mendelian inheritance of streptomycin resistance in *Chlamydomonas*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 40: 356-363.
 46. Sager, R. (1962) Streptomycin as a mutagen for nonchromosomal genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 48: 2018-2026.
 47. Sager, R. (1977). Genetic analysis of chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Advances in Genetics.* 19: 287-340.
 48. Sager, R. (1985) Chloroplast genetics. *Bioessays.* 3: 180-184.
 49. López-Rodas, V.; Agrelo, M.; Carrillo, E.; Ferrero, L.; Larrauri, A.; Martín-Otero, L. & Costas E. (2001) Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol.* 36: 179-190.
 50. López-Rodas, V.; Flores-Moya, A.; Maneiro, E.; Perdigones, N.; Marva, F.; García M. E. & Costas E. (2007) Resistance to glyphosate in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* as result of preselective mutations. *Evol. Ecol.* 21: 535-547.

51. Costas, E.; Carrillo, E.; Ferrero, L. M.; Agrelo, M.; García-Villada, L.; Juste, J. & López-Rodas, V. (2001) Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: the ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1 dimethylurea herbicide. *Phycologia*. 40: 391-398.
52. García-Villada, L.; López-Rodas, V.; Bañares, E.; Flores-Moya, A. & Costas, E. (2002) Evolution of microalgae in highly stressing environments: an experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by rare preselective mutation. *J. Phycology*. 38: 1074-1081.
53. Fernández, C. & Parodi, E. R. (2005) Chlorococcales nuevas para el embalse paso de las piedras (Buenos Aires, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 40: 199-205.

*** Información de contacto:**

Dr. Eduardo Costas.

Dpto. de Producción Animal (Genética).

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid.

Email: ecostas@vet.ucm.es

Over-expression of P2Y₂ receptor after silencing in corneal wound healing

Aránzazu Mediero[§], Almudena Crooke[§], Jesús Pintor^{*}

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV.
Escuela Universitaria de Óptica. Universidad Complutense de Madrid.

[§] Estos autores contribuyeron de la misma manera al trabajo.

Recibido el 15 de septiembre de 2009.

ABSTRACT

Diadenosine polyphosphates are a family of dinucleotides with relevant properties in the eye and in other tissues. Diadenosine polyphosphates can activate P2Y and P2X receptors present on the ocular surface, anterior segment and retina. In the cornea, the presence of a P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₆ receptor has been identified. Both diadenosine polyphosphates and other purinergic agonists modified corneal wound healing depending on the receptor that is activated by these substances. To confirm the involvement of the P2Y₂ receptor in the wound healing process after the challenge with Ap₄A, we have designed siRNA against P2Y₂ receptor. We have observed that P2Y₂ is localized in the most external layer of the corneal epithelium. The pre-treatment with siRNA produced a disappearance of the receptor at 12 and 24 hours after the wound, being the location for P2Y₂ restored 36 hours after the wound. We have also observed that in half of the tested corneas, there was an increase in the P2Y₂ expression after silencing compared to control and Ap₄A treated corneas, being this receptor localized both in corneal epithelium and stroma.

Key Words: Ap₄A; P2Y₂; siRNA; Corneal wound healing.

RESUMEN

Sobreexpresión del receptor P2Y₂ tras su silenciamiento durante el proceso de cicatrización corneal

Los diadenosina polifosfatos son una familia de dinucleótidos con gran relevancia en las propiedades del ojo y de otros tejidos. Estos diadenosina polifosfatos pueden activar los receptores P2Y y P2X presentes en la superficie ocular, en el segmento anterior y en la retina. En la cornea, se ha identificado la presencia de receptores P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆. Tanto los diadenosina polifosfatos como los receptores purinérgicos modifican el proceso de cicatrización corneal dependiendo del tipo de receptor activado por los distintos dinucleótidos. Para localizar el receptor P2Y₂ en córneas lesionadas y tratadas con Ap₄A en presencia o ausencia de un siRNA para el receptor P2Y₂, hemos realizado un ensayo de inmunohistoquímica. Hemos observado que el receptor P2Y₂ se localiza en el epitelio tras la lesión corneal y el consecuente tratamiento con Ap₄A. El pre-tratamiento con el siRNA produce la desaparición de la señal para este receptor tanto a las 12 como a las 24 horas de la lesión corneal, siendo la localización de este receptor P2Y₂ recuperada a las 36 horas de la lesión en presencia del siRNA. Además, hemos observado que en la mitad de las córneas analizadas, existía un incremento en la expresión del receptor P2Y₂ tras el silenciamiento del mismo comparado con las córneas control y con las tratadas con Ap₄A, localizando la presencia de este receptor tanto en el epitelio como en el estroma corneal.

Palabras clave: Ap₄A; P2Y₂; siRNA; Cicatrización corneal.

1. INTRODUCTION

The cornea is one of the most important components of the optical pathway. It is a multilayered tissue characterized by its transparency, avascularity, the ability to refract light and to filter out incoming ultraviolet radiation. Within the five layers that compound the cornea —epithelium, Bowman's membrane, stroma, Descemet's membrane and endothelium— the epithelium is the outer layer and the one that is easily damaged due to diverse factors. These include

the entry of a foreign body, any traumatic process, a defect in contact lenses or the use of refractive surgery to correct refractive alterations.

When this happens, a process named corneal wound healing starts to regenerate normal epithelium in order to maintain the correct refraction of light. Corneal wound healing involved three consecutive phases that are part of a continuous process. Animal studies have shown that these three stages are: lag phase (from 0 hours to 10 hours after the wound), cell migration (until 24 to 36 hours after the wound) and cell proliferation (lasting from 24-36 hours after the wound to weeks) (1).

There are many substances present in tears, aqueous humour or released from corneal nerves, that modified the wound healing process after ocular surface injuries (2, 3). Within these molecules we find nucleotides and dinucleotides (3, 4). In our previous works we demonstrated that the dinucleotides can modify rate of corneal re-epithelialization in New Zealand White Rabbits both *in vivo* and *in vitro* (3, 5). We have demonstrated, both pharmacologically and with the used of the RNA interference (RNAi) technology, that Ap₄A produces acceleration in the rate of corneal re-epithelialization by stimulating to P2Y₂ receptors. On the contrary other dinucleotides, Ap₃A and Ap₅A exert the opposite effect delaying corneal re-epithelialization by binding to a P2Y₆ receptor (5, 6).

The aim of this manuscript is to describe the presence of the P2Y₂ receptor in the cornea and to see the effect of a siRNA against the P2Y₂ receptor in the presence and in the absence of Ap₄A.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Male, adult New Zealand White Rabbits were used. All the animals were kept in individual cages with free access to food and water, under controlled cycles (12 hours light:12 hours dark), and the experimental procedures were carried out in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, and the European Communities Council Directive (89/609/EEC).

2.2. P2Y₂ silencing

To design P2Y₂ receptor-specific siRNA duplexes, rabbit P2Y₂ receptor coding sequence (GenBank accession number **EU886321**) was submitted to the Ambion siRNA target Finder website (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) for siRNA prediction. One sequence of nine (max. GC content 60%) suggested candidates was selected (6). Nucleotide sequence of the siRNA target sites was as follows: P2Y₂ siRNA #2, 5'-AACCTGTACTGCAGCATCCTC-3'. This siRNAs was obtained from Applied Biosystems, in annealed and lyophilized forms and were suspended in 0.9% NaCl before *in vivo* use.

2.3. *In vivo* delivery of P2Y₂ siRNA and wounding procedure

The siRNA was applied in one single eye in 10 nmol 0.9% NaCl drops (volume instilled 40 µl) along four consecutive days. The contralateral eye received the same volume of saline solution (0.9% NaCl). Slit-lamp biomicroscopy was performed during instillation process to evaluate possible changes in the cornea.

Corneal wounds were performed 10 hours before the fourth siRNA instillation. After topical anaesthesia (0.4% oxibuprocaine and 1% tetracaine, Alcon Cusi, Barcelona, Spain), corneal wound were made to the epithelium of both eyes by applying a 5-mm disc of Whatman no. 1 paper soaked in n-heptanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as previously described (3). Briefly, discs were place in the centre of the cornea and left there for 30 seconds (7) and after removal of the disc, the eyes were washed with isotonic saline solution.

Ap₄A treatment was performed every six hours as described previously (3).

2.4. Immunohistochemistry

12, 24 and 36 hours after epithelium wounding (72, 84 and 96 hours after the first siRNA instillation), rabbits were euthanized with sodium pentothal and eyes were enucleated. Corneas were dissected

and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS 0.15M at 4 °C for 6 hours. After fixation, corneas were embedded in Jung Tissue Freezing Medium (Leica Microsystems, Barcelona, Spain) and 10 µm sections were done. P2Y₂ immunocytochemical assay was performed as previously described for cells. Briefly, sections were permeabilized with blocking solution (PBS 1X BSA 3% Triton X-100 FBS 5%) for 1 hour to block the non-specific binding, and after washing with PBS 1X BSA 3%, sections are incubated with primary goat polyclonal anti-P2Y₂ (1:50) or PBS 1X BSA 3% for negative controls overnight at 4 °C. Sections were washed twice in PBS 1X BSA 3% and incubated with the secondary antibody donkey anti-goat IgG-FITC (1:200) for 1 hour at room temperature. Finally, after washing in PBS 1X slices were mounting with Vectashield mounting medium and observed under confocal microscope (Axiovert 200M; Carl Zeiss Meditec GmbH, Jena, Germany), equipped with a Pascal confocal module (LSM 5; Zeiss). All images were managed with the accompanying Pascal software.

3. RESULTS

3.1. P2Y₂ location in the cornea

Immunocytochemical analysis for P2Y₂ in the cornea reveals that this receptor is mainly localized in the outer layer of the epithelium (Figure 1), while the inner layers of the epithelium are barely marked. We have not found any P2Y₂ signal in the other layers of the cornea, neither in the stroma nor in the endothelium.

3.2. Inhibition of P2Y₂ receptor expression by siRNA

After performing the treatments described in Methods, corneas were wounded and the effect of the siRNA against the P2Y₂ receptor was tested by immunohistochemical analysis 12, 24 and 36 hours after the healing (72, 84 and 96 hours after the first siRNA instillation). As we can observe, after the corneas were wounded, the P2Y₂ receptor was still localized in the outer layer of the epithelium, being this signal higher in control corneas than in Ap₄A treated corneas,

both at 12 and 24 hours after wounding (Figure 2A and 2B). 36 hours after the wounds were performed, P2Y₂ staining was similar in the three different treatments, including the siRNA treated corneas, revealing a full recovery of the P2Y₂ receptor (Figure 2C).

These results indicate that silencing the P2Y₂ receptor in our model was detected 12 hours after the wound was performed. Nevertheless, P2Y₂ receptor signal was again visible 36 hours after the wound had been made.

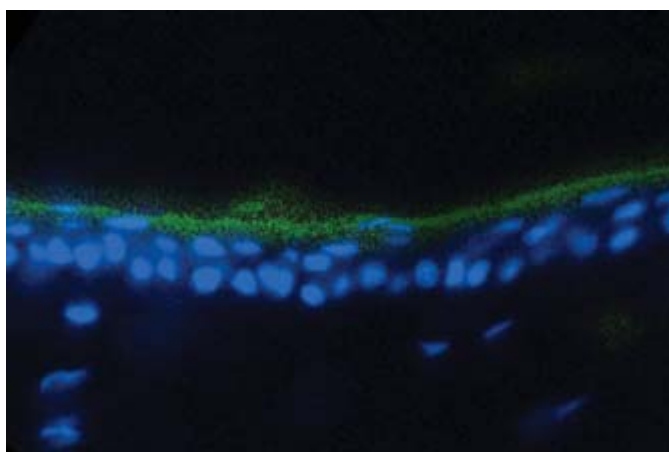


Figure 1. P2Y₂ receptor location in the cornea. Immunocytochemical analysis for the P2Y₂ in the cornea revealing the presence of the P2Y₂ receptor in the corneal epithelium (green fluorescence by FITC). Image managed with the Pascal software of the Axiovert 200M confocal microscope at 40X magnification.

3.3. Over-expression of P2Y₂ receptor after silencing

In half of the siRNA treated corneas, and 36 hours after the wounding (96 hours after the first siRNA instillation), we have observed an increase in the expression of P2Y₂ receptors compared with control and Ap₄A (Figure 3). In this case, the P2Y₂ signal was not constrained to the outer layer of the epithelium, and it was possible to localize P2Y₂ receptors in the whole epithelium and in the stroma (Figure 3).

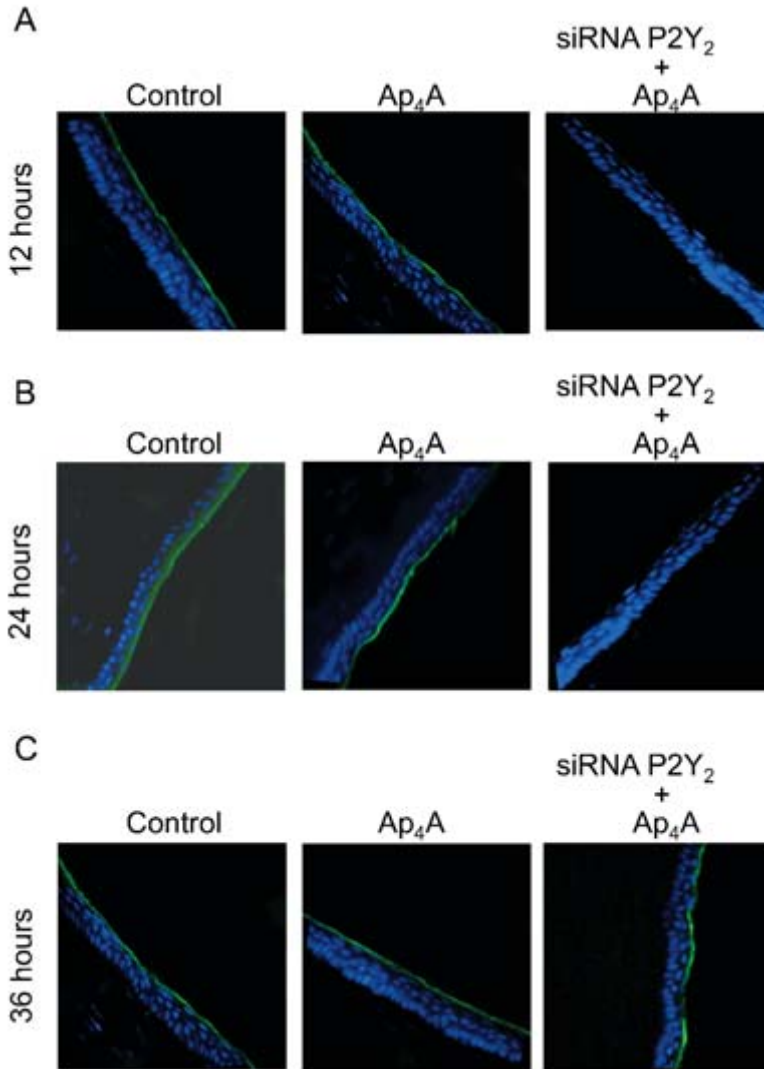


Figure 2. P2Y₂ immunostaining of treated corneas after wound. (A) A series of micrographs showing the P2Y₂ signal in corneas treated with saline 0.9%, Ap₄A 100 μM and siRNA + Ap₄A 100 μM, 12 hours after wound. (B) Immunostaining for P2Y₂ in treated corneas 24 hours after the wound. (C) A series of micrographs showing the P2Y₂ signal in corneas treated with saline 0.9%, Ap₄A 100 μM and siRNA + Ap₄A 100 μM, 36 hours after wound. Green fluorescence (FITC) localizes P2Y₂ receptor while in blue we can observe the nuclear staining for DAPI. Images are managed at a magnification of 40X.

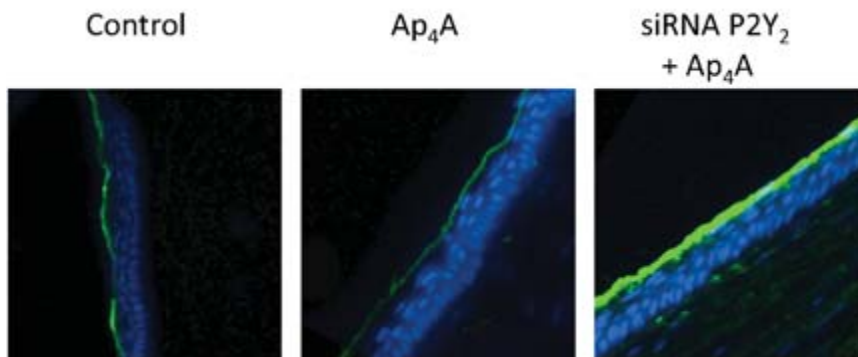


Figure 3. Over-expression of P2Y₂ receptor after silencing. Immunostaining for P2Y₂ 36 hours after wound (96 hours after the first siRNA instillation) where we can observe an increase in P2Y₂ expression after siRNA instillation compared with control and Ap₄A treated corneas. Green fluorescence (FITC) localizes P2Y₂ receptor while in blue we can observe the nuclear staining for DAPI. Images are managed at a magnification of 40X.

4. DISCUSSION

As we have previously mentioned, the cornea is formed by five to six different layers, including the outer one, the epithelium. The distribution of the purinergic receptors present in the cornea revealed that P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ and P2Y₆ receptor are present in this part of the eye (8).

The present experimental work confirms the location of the P2Y₂ receptor after corneal wound healing and how when using a siRNA against this receptor there is an initial disappearance of the receptor followed by an over-expression of this protein.

The presence of the P2Y₂ receptor in the epithelium is related to the ability of some nucleotides to increase the rate of re-epithelialization after a corneal wound (6). The involvement of metabotropic P2 receptors in corneal wound healing has been also reported by other groups and in all the cases the different researchers report that ATP, UTP and Ap₄A accelerate the rate of healing (9-11).

Our IHC results reveal that after wounded, the P2Y₂ staining in Ap₄A treated lesions is less intense than in control wounds. As happens

with many other agonists (for example insulin), when Ap₄A binds to its receptor P2Y₂ on the cell surface, the Ap₄A-P2Y₂ complex undergoes down-regulation and presumably endocytosis and is subsequently intracellular lysosomal/proteosomal degradation (12, 13). This down-regulatory mechanism together with the receptor rate of synthesis permits to maintain a minimal number of P2Y₂ receptor on epithelial cell surface. This is absolutely relevant since in case that an injury occur the cornea needs to trigger the wound healing mechanism to keep this ocular structure perfectly transparent.

All this equilibrium between the production and degradation of the P2Y₂ receptor is altered when a selective siRNA against the P2Y₂ mRNA is tested. When the siRNA starts its effect, there are still receptors both in their way to degradation and from the Golgi to the membrane. This fact produces a delay between the moment the siRNA is applied to the moment when it is possible to see a decrease in the P2Y₂ expression. There is a mechanism of repression of the protein synthesis that the epithelial cells try to resist, possibly by increasing the synthesis of P2Y₂-mRNA, but which is destroyed by the siRNA. Nevertheless, when the ability of the oligonucleotide decreases, it is possible that the overproduction of P2Y₂-mRNA can start to synthesize the protein reason by which we see an over-expression of P2Y₂ receptor 96 hours after the first siRNA instillation.

It is clear that more experiments should be done to confirm this hypothesis and also it would be interesting to see whether or not this effect is tissue selective or if this is a general feature of siRNA.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by research grants from Comunidad de Madrid, NEUROTRANS-CM Ref.: S-SAL-0253-2006, RETICS RD07/006/0004 and BSCHUCM (GR58/08). AM holds a fellowship from Universidad Complutense de Madrid. We thank Penny Rollinson for her help in the preparation of this manuscript.

6. REFERENCES

1. Steele, C. (1999) Corneal wound healing: a review. *Optometry Today*. 24: 28-32.
2. Muller, L. J.; Marfurt, C. F.; Kruse, F. & Tervo, T. M. (2003) Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 76(5): 521-42.
3. Pintor, J.; Bautista, A.; Carracedo, G. & Peral, A. (2004) UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea. *Ophthalmic Physiol. Opt.* 24(3): 186-93.
4. Bowman, K. A. & Green, K. (1981) Corneal epithelial healing rates after topical nucleotides. *Curr. Eye Res.* 1(10): 619-22.
5. Mediero, A.; Peral, A. & Pintor, J. (2006) Dual role of Diadenosine Polyphosphates on Corneal Epithelial Cell Migration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47(10): 4500-4506.
6. Cintron, C.; Hassinger, L.; Kublin, C. L. & Friend, J. (1979) A simple method for the removal of rabbit corneal epithelium utilizing n-heptanol. *Ophthalmic Res.* 11: 90-6.
7. Crooke, A.; Mediero, A.; Guzmán-Aranguéz, A. & Pintor, J. (2009) Silencing of P2Y₂ receptor delays Ap₄A-corneal re-epithelialization process. *Mol. Vis.* 15: 1169-78.
8. Pintor, J.; Sánchez-Nogueiro, J.; Irazu, M.; Mediero, A.; Peláez, T. & Peral, A. (2004) Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye. *Purinergic Signalling*. 1: 83-90.
9. Yang, L.; Crason, D. & Trinkaus-Randall, V. (2004) Cellular injury induces activation of MAPK via P2Y receptors. *J. Cell. Biochem.* 91(5): 938-950.
10. Klepeis, V. E.; Weinger, I.; Kaczmarek, E. & Trinkaus-Randall, V. (2004) P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *J. Cell. Biochem.* 93(6): 1115-1133.
11. Weinger, I.; Klepeis, V. E. & Trinkaus-Randall, V. (2005) Tri-nucleotide receptors play a critical role in epithelial cell wound repair. *Purinergic Signalling*. 1: 281-292.
12. McArdle, C. A.; Davidson, J. S. & Willars, G. B. (1999) The tail of the gonadotrophin-releasing hormone receptor: desensitization at, and distal to, G protein-coupled receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151(1-2): 129-36.
13. Borgland, S. L. (2001) Acute opioid receptor desensitization and tolerance: is there a link? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28(3): 147-54.

* Información de contacto:

Doctor Jesús Pintor.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV. Escuela Universitaria de Óptica. Universidad Complutense de Madrid.

C/ Arcos de Jalón, 118. 28037 Madrid (Spain).

Telf.: +34 91 394 68 59. Fax: +34 91 394 68 85.

Email: jpintor@vet.ucm.es

Formulación de soluciones oftálmicas de ciclosporina en colirio al 2 por 100 para la práctica clínica

Elena Pérez Hernando^{1*}, Luis Alberto del Río Álvarez²

¹ Italfarmaco, S. A.

² Sección de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad CEU San Pablo.

Recibido el 28 de septiembre de 2009.

RESUMEN

Los colirios de ciclosporina existentes en la práctica farmacéutica presentan deficiencias que hacen que su calidad y seguridad no sea aceptable, máxime cuando se emplea como fuente de materia prima un medicamento comercializado. En el presente trabajo se define la fuente de principio activo, los excipientes empleados, los métodos de elaboración de las formulaciones y su evaluación que incluye su solubilización, fabricación y estabilidad física, así como la tolerancia de los vehículos en voluntarios sanos. Se han elaborado formulaciones acuosas y oleosas de colirios de ciclosporina al 2 por 100 con vehículos como miristato de isopropilo, macroglicéridos de oleilo, triglicéridos de cadena media, aceite de oliva y suero fisiológico. La fórmula de ciclosporina y miristato de isopropilo resulta la más adecuada por lo que se propone al Formulario Nacional español.

Palabras clave: Solubilización; Vehículos; Formulario Nacional; Calidad; Seguridad.

ABSTRACT

Formulation of cyclosporine 2% eyedrops solutions for clinical practice

The cyclosporine eyedrops in the current pharmaceutical practice display deficiencies that cause their quality and safety not acceptable, especially when a commercialized made up drug is used like source of raw material. In the present investigation, the source of active principle is defined, the ingredients, the methods of making-up of the formulations and their evaluation that includes solving, manufacturing and physical stability as well as the tolerance of the vehicles in healthy volunteers. Aqueous and oily formulations cyclosporine 2% eyedrops have been manufactured using vehicles like isopropyl myristate, oleoyl macrogolglycerides, medium chain triglycerides, olive oil and saline solution. Cyclosporine and isopropyl myristate formula is the most suitable and it is proposed to be included into the Spanish National Formulary.

Key words: Solubilisation; Pharmaceutical vehicles; National Formulary; Quality; Safety.

1. INTRODUCCIÓN

Ciertas patologías oculares son tratadas por vía sistémica al no existir medicamentos comercializados para administración local. Esto hace que, al ser la mucosa oftálmica una zona poco vascularizada, se requieran dosis elevadas de fármaco lo que lleva asociado, necesariamente, problemas de toxicidad y aparición de efectos secundarios. Uno de estos casos es la prevención del rechazo en el trasplante de córnea (1). Dicho trasplante es uno de los más exitosos pero, a pesar de que se realizan más de dos mil trasplantes de este tipo cada año en España (2), se trata de uno de los menos estudiados (3). Existe la creencia de que en este tipo de trasplantes no existen rechazos por ser la córnea una zona inmunoprivilegiada, pero la realidad es distinta, ya que en el 10 por 100 de los casos se producen rechazos agudos y en el 25 por 100, las córneas trasplantadas son rechazadas en un periodo de 4-5 años (4) debido a la inflamación producida tras la intervención quirúrgica (5).

La ciclosporina es un péptido aislado de un hongo por Thiele en 1969 (6) y en donde se estudiaron sin resultados sus propiedades antifúngicas, no sucediendo así con sus propiedades inmunosupresoras no citotóxicas. El uso de ciclosporina por vía oral se propuso en oftalmología a dosis bajas y por períodos de tiempo limitados a causa del riesgo de efectos secundarios sistémicos (7). Acheampong *et al.* (8) estudiaron su distribución tisular encontrando concentraciones máximas en la conjuntiva y menores en el humor acuoso y en el suero por lo que Chast *et al.* (9) ensayaron en animales un colirio de ciclosporina al 2 por 100 a partir de la solución oral disponible en el comercio (Sandimum® Neoral® Novartis) a un régimen diario de seis gotas, con escasa absorción sistémica, y Behrens-Bauman *et al.* describieron irritación local en conejos si se emplea etanol como vehículo (10). En el hombre, los estudios realizados (11) con la solución oral de Sandimmun® demuestran epitelio patía y sensación de quemadura ocular (12).

Estas formulaciones, al no existir como medicamentos de fabricación industrial, son elaboradas por farmacéuticos en oficina de farmacia u hospital como formulación magistral. En distintas publicaciones y formularios aparecen descritos colirios de ciclosporina para este fin que presentan diferente composición y una metodología no unificada. Aunque la legislación española (13) no prohíbe el empleo de las especialidades para la elaboración de formulaciones, tampoco lo permite abiertamente, por lo que se trata de un vacío legal. El empleo de la especialidad farmacéutica lleva asociados otros problemas como son los de una inadecuada esterilización, una menor precisión en la dosis de principio de activo empleado, mayor coste de la formulación (que establecemos en cuatro veces) y una menor seguridad y calidad en la fórmula, debido a los excipientes que se incluyen.

Dichas formulaciones deben estar respaldadas por los denominados formularios nacionales. En España, el Formulario Nacional y su revisión (14) no llegan al centenar de preparaciones entre fórmulas magistrales tipificadas y preparados oficinales. Este número es superado ampliamente por cualquiera de los formularios que se encuentran actualmente en circulación como el del Hospital Son Dureta de Palma de Mallorca (15). A nivel cualitativo, la mayoría de los preparados expuestos, son de utilidad terapéutica baja o están cubiertos

por especialidades existentes en el mercado. Se debe hacer mención, también, a las monografías de principios activos que incluyen materias primas obsoletas cuya utilidad es cuanto menos dudosa. En el apartado de excipientes apenas se describen excipientes simples y los excipientes compuestos descritos no aportan novedades a la práctica farmacéutica.

Por estos motivos, en la presente investigación se han trazado como objetivos:

- Estudiar las formulaciones de ciclosporina existentes para la vía ocular.
- Proponer una alternativa de mejora desarrollando métodos de estudio sobre solubilidad, estabilidad y tolerancia.
- Proponer la inclusión de la fórmula desarrollada como fórmula magistral tipificada en el Formulario Nacional.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Como ingredientes de uso farmacéutico se han elegido Miristato de isopropilo (Panreac Química SAU, Barcelona, España), Aceite de oliva (Fagron Ibérica SAU, Barcelona, España), Ricinoleato de macroglicérol (Cremophor[®] EL, BASF, Alemania), Triglicéridos de cadena media (Fagron Ibérica SAU, Barcelona, España), Macroglicéridos de oleilo (Labrafil[®] M 1944 CS, Gattefossé, Barcelona, España), Aceite de ricino (Acofarma, S. A., Barcelona, España), Propilenglicol (Panreac Química SAU, Barcelona, España), Cloruro de benzalconio (Fagron Ibérica SAU, Barcelona, España), Lágrimas artificiales a base de alcohol polivinílico (Liquifilm[®] Allergan, España) y Suero fisiológico (Salinet[®] Grifols, España).

Como fuentes de materia prima, Ciclosporina (Fagron Ibérica SAU, Barcelona, España), Sandimmun[®] inyectable 50 mg/mL (que contiene como solventes Etanol y Ricinoleato de macroglicérol y como antioxidante Nitrógeno), Sandimmun[®] Neoral[®] 100 mg/mL solución oral y Sandimmun[®] Neoral[®] 100 mg cápsulas (ambos contienen como solventes Etanol absoluto, Propilenglicol, Aceite de ricino polioxilo-40-hidrogenado y Mono-di-triglicéridos de aceite de

maíz y como antioxidante DL- α -tocoferol). La solución oral presenta un período de validez de tres años y por debajo de 20° C tienden a solidificar los componentes oleosos que posee de origen natural de forma reversible (16).

La ciclosporina (Figura 1) es un compuesto rico en aminoácidos hidrofóbicos insoluble en agua, pero muy soluble en etanol (17) con un LogP de 4.1 (18). Para estudiar su solubilidad en solventes de interés farmacéutico se empleó el método gravimétrico (19), que consiste en pesar una cantidad conocida de la materia prima y añadir progresivamente un volumen pequeño del solvente objeto de estudio hasta que se consiga la disolución por desaparición de la turbidez originada.



Figura 1. Estructura química de ciclosporina.

Para el envasado de las formulaciones se eligieron envases estériles (Envases Sirep, Tarragona, España) que constan de frasco y gotero de polietileno de baja densidad y tapón (con cierre de seguridad) de polietileno de alta densidad y viales transparentes clase I (Auxlaper, S. A., Barcelona, España), previamente esterilizados en autoclave (P-Selecta, Barcelona, España) durante 20 minutos a 121° C. Para la esterilización de las fórmulas se empleó filtración en entorno aséptico de campana de flujo laminar (NuAire II A/B3, Plymouth, USA) con filtros de nylon de 0,22 μ m estériles (Millipore Co, EEUU).

Las formulaciones que emplean como fuente de ciclosporina a especialidades farmacéuticas se muestran en la Tabla 1. La metodología es la de los propios autores.

Los colirios formulados con ciclosporina materia prima, tanto oleosos como acuosos propuestos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. **Composición (metodología) de las fórmulas a base de medicamentos industriales**

Medicamentos (dosis equivalente a ciclosporina 2 g)	Solventes (csp 100 mL)		
	Fórmula A	Fórmula B	Fórmula C
Sandimmun® Neoral® 100 mg/m	Aceite de oliva (20)		
Sandimmun® inyectable 50 mg/mL		Aceite de maíz (21)	
Sandimmun® Neoral® cápsulas 100 mg			Lágrimas artificiales (22)

Tabla 2. **Composición de los colirios de ciclosporina**

Materias primas	Formulaciones % (p/v)					
	D	E	F	G	H	I
Ciclosporina A Ph. Eur.	2	2	2	2	2	2
Ricinoleato de macroglicérol	40	—	—	—	—	—
Cloruro benzalconio	0,01	—	—	—	—	—
Miristato de isopropilo	—	csp 100	—	—	—	—
Aceite de ricino	—	—	—	csp 100	—	—
Triglicéridos de cadena media	—	—	—	csp 100	—	—
Macroglicéridos de oleilo	—	—	—	—	csp 100	—
Aceite de oliva	—	—	—	—	—	csp 100
Suero fisiológico	csp 100	—	—	—	—	—

La elaboración de las fórmulas ha consistido en pesar la cantidad de ciclosporina determinada junto con el solvente determinado y disolver el principio activo mediante agitación magnética. En el caso del empleo de cloruro de benzalconio, se prepara previamente una solución al 0,01% (23) en suero fisiológico y se homogeneiza mediante agitación magnética. Cuando la mezcla es homogénea, se filtra la solución en campana de flujo laminar sobre un gotero estéril empleando un filtro de Nylon de 0,22 μm estéril acoplado a una jeringa estéril de 10 mL. Se cierra el envase y etiqueta correctamente.

Se evalúa el aspecto, para lo que se observa si el preparado cumple con el ensayo de limpidez descrito en la Real Farmacopea Española (24) y se envejecen las fórmulas en cámara climática (Vötsch VC 0057, Vötsch Industrietechnik, Alemania) en condiciones aceleradas reconocidas (40° C/75% HR) durante cuatro semanas.

Para la evaluación de la tolerancia de los vehículos, el estudio se llevó a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki y las generales directrices de la legislación española. Al entrar en el estudio, los individuos firmaron un consentimiento informado por escrito. Para su inclusión o exclusión, los voluntarios del estudio se reclutaron en nuestra Sección de Farmacia y Tecnología Farmacéutica previo anuncio. Eran de ambos sexos y su edad se situaba entre veinticinco y cincuenta y cinco años. No presentaban tratamiento farmacéutico oftálmico relacionado alguno. El campo visual no se tuvo en cuenta para su inclusión. Se excluyó a los sujetos con patología asociada, alergia conocida a las sustancias a ensayar, tratamiento que pudiese afectar a la visión o pérdida significativa de transparencia del cristalino, síntomas oculares de picor, sequedad, sensación de arenilla, sensibilidad al humo, aire acondicionado o piscinas y molestias al levantarse por las mañanas.

Se les administró a diez voluntarios sanos, una gota de cada uno de los vehículos en uno de los ojos dejando el otro como control. A continuación, se les hacía completar un cuestionario en el que se valoraban en una escala de 1 a 5 (1 como valor mínimo y 5 como máximo) los parámetros de la Tabla 3.

Tabla 3. **Parámetros de tolerancia de los vehículos**

1. Visión borrosa. Se crea una película en el ojo que impide o disminuye la visión normal.
2. Aparición de picor o quemazón.
3. Se estimula, en exceso, parpadeo o lacrimo.
4. Duración de los síntomas anteriores: menos de un minuto, entre dos y tres minutos, entre tres y cuatro, entre cuatro y cinco y más de cinco minutos, respectivamente.
5. Grado de intolerancia general.

Los resultados obtenidos de esta evaluación se han sometido a tratamiento estadístico mediante ANOVA bidireccional en forma de

suma de cuadrados Tipo III para discriminar entre cada media con el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para una $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Los resultados de solubilidad de ciclosporina hallados en diferentes solventes se exponen en la Tabla 4. Los vehículos de características orgánicas son los apropiados para disolver la dosis requerida de ciclosporina.

Tabla 4. **Solubilidad de ciclosporina en vehículos de interés farmacéutico**

Vehículo	Masa de solvente para disolver 2 g de ciclosporina	Solubilidad de ciclosporina
Miristato de isopropilo	10,2 g	Fácilmente soluble
Propilenglicol	20,6 g	Soluble
Aceite de ricino	23,0 g	Soluble
Triglicéridos de cadena media	29,5 g	Soluble
Macroglicéridos de oleilo	30,0 g	Soluble
Ricinoleato de macroglicérol	39,4 g	Soluble
Aceite de oliva	57,6 g	Soluble
Glicerina	> 1000 g	Muy poco soluble
Suero fisiológico	> 10000 g	Prácticamente insoluble

En la Tabla 5 se hallan los valores encontrados de todas las formulaciones ensayadas en cuanto a su grado de estabilidad física como mantenimiento del aspecto de solución transparente.

En lo que respecta a las formulaciones realizadas a partir de las especialidades farmacéuticas registradas, no se han podido lograr preparados en solución. Todo esto lleva a considerar que ninguna de las fórmulas resulta adecuada. Las formulaciones propuestas con el empleo de la materia prima original son inicialmente conformes, al tratarse todas ellas de disoluciones y cumplir con el ensayo de limidez descrito en la Real Farmacopea Española. La fórmula que

utiliza aceite de ricino no pudo ser esterilizada debido a la elevada viscosidad que presentaba, lo que es una limitación para el empleo de la filtración esterilizante (25) a pesar de describirse este método de esterilización (26).

Tabla 5. **Estabilidad física de las formulaciones de ciclosporina**

Fórmulas	Inicial	Envejecimiento
A	Conforme	No conforme. Separación de fases
B	No dispersable. No conforme	—
C	No dispersable. No conforme	—
D	Conforme	No conforme. Separación de fases
E	Conforme	Conforme
F	Soluble. No Esterilizable. No conforme	—
G	Conforme	Conforme
H	Conforme	Conforme
I	Conforme	No conforme. Separación de fases

En cuanto a la estabilidad física, tras cuatro semanas en cámara climática a 40° C y 75 por 100 de humedad relativa, ninguna de las formulaciones acuosas resultó ser estable debido a que se produjo precipitación del principio activo que ya aparecía en la primera semana en las citadas condiciones.

La formulación con aceite de oliva, que es la que sirve de referencia en la práctica, no resultó estable. Las formulaciones oleosas restantes, compuestas con miristato de isopropilo, triglicéridos de cadena media y macroglicéridos de oleilo, resultaron conformes al no presentar ningún tipo de inestabilidad física y seguir cumpliendo, tras ese periodo, con el ensayo de limpidez de la Real Farmacopea Española.

En cuanto a la evaluación de la tolerancia de los vehículos empleados en las fórmulas D, E, G, H e I, sus resultados se encuentran

en la Tabla 6. Por medio de un estudio estadístico ANOVA bidireccional en forma de suma de cuadrados Tipo III para discriminar entre cada media con el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para una $P < 0,05$, los vehículos más adecuados indistintamente son miristato de isopropilo y una mezcla de ricinoleato de macroglicérol en suero fisiológico. Habida cuenta de la inapropiada estabilidad hallada para la formulación con esta última, se propone la formulación que emplearía miristato de isopropilo para incluirse en el Formulario Nacional.

Tabla 6. **Valores de tolerancia de los vehículos**

Vehículos	Visión borrosa	Picor/ Quemazón	Parpadeo/ Lagrimeo	Duración síntomas	Grado de intolerancia	Media/ Grupos homogéneos
Aceite de oliva	3,9 ± 0,7	4,8 ± 0,6	4,1 ± 0,5	4,8 ± 0,6	4,8 ± 0,6	4,5 A
Macroglicéridos Oleilo	4,0 ± 0,7	3,2 ± 0,7	3,7 ± 0,8	4,1 ± 0,6	3,7 ± 0,7	3,7 B
Triglicéridos Cadena Media	2,8 ± 0,8	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,8	4,6 ± 0,8	3,0 ± 0,4	3,3 C
Ricinoleato Macroglicérol + Suero fisiológico	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,9 ± 0,6	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,4	1,4 D
Miristato Isopropilo	1,7 ± 0,8	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,6	1,2 ± 0,5	1,3 ± 0,5	1,4 D

4. DISCUSIÓN

Tras haber realizado un estudio experimental para obtener una formulación de colirio de ciclosporina al 2 por 100, se establece que las fórmulas existentes en la práctica farmacéutica presentan deficiencias a distintos niveles que hacen que su calidad no sea aceptable. A partir de esto, se han diseñado y elaborado alternativas con distintos vehículos de interés farmacéutico. De todas las formulaciones propuestas, la de ciclosporina en colirio al 2 por 100, que incluye miristato de isopropilo como vehículo, ha demostrado ser la más adecuada en lo que respecta a la formulación, elaboración, esterili-

zación y estabilidad física. Asimismo, el vehículo ha presentado una adecuada tolerancia al nivel estudiado, por lo que se propone dicha formulación para ser incluida, como fórmula magistral tipificada, en el Formulario Nacional.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha obtenido el Premio Normon dentro del Concurso Científico 2005 convocado por la Real Academia Nacional de Farmacia.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Niederkorn, J. Y. (2003) Immunology and immunomodulation of corneal transplantation. *Int. Rev. Immuno.* 21 (2-3): 173-96.
2. ONT, Organización Nacional de Trasplantes (2008) <http://www.ont.es>
3. George, A. J. T. & Larkin, D. F. P. (2004) Corneal Transplantation: The Forgotten Graft. *American Journal of Transplantation* 4: 678-685.
4. Wilson, C. G. (2004) Topical drug delivery in the eye. *Experimental Eye Research* 78: 737-743.
5. Coster, D. J. & Williams, K. A. (2003) Management of high-risk corneal grafts. *Eye.* 17(8): 996-1002.
6. Stähelin, H. F. (1996) The history of cyclosporin A (Sandimmune®) revisited: Another point of view. Birkhäuser Basel. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 52 (1).
7. Pfau, B.; Kruse, F. E.; Rohrschneider, K.; Zorn, M.; Fiehn, W.; Burk, R. O. & Volcker, H. E. (1995) Comparison between local and systemic administration of cyclosporin A on the effective level in conjunctiva, aqueous humor and serum. *Ophthalmologie.* 92 (6): 833-9.
8. Acheampong, A. A.; Schackleton M.; Tang-Liu D. D.; Ding S.; Stern, M. E. & Decker, R. (1999) Distribution of cyclosporin A in ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs. *Curr. Eye Res.* 18: 91-103.
9. Chast, F. L.; Legeais, J. M.; Batista, R.; Bardin, C. & Renard, G. (2004) Préparation d'un collyre de ciclosporine à 2%. *J. Fr. Ophthalmol.* 27: 567-76.
10. Behrens-Bauman W.; Theuring, S. & Brewitt, H. (1986) The effect of topical cyclosporin A on rabbit cornea: a clinical and electron microscope study. *Graefes Arch. Clin Ex.p Ophthalmol.* 224: 520-4.
11. Bouchard, C. S. & Belin, M. W. (1988) Topical cyclosporin A: improved graft survival in high risk corneal transplant patients. *ARVO Annual Meeting Abstract Issue.* Bethesda: 450.

12. Secchi, A. G.; Tognon, M. S. & Leonardi, A. (1990) Topical use of cyclosporine in the treatment of vernal keratoconjunctivitis. *Am. J. Ophthalmol.* 110: 641-5.
13. Boletín Oficial del Estado (2006), Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, núm. 178, de 27 de julio.
14. Ministerio de Sanidad y Consumo (2007), Formulario Nacional + CD-ROM. Editorial BOE. Madrid.
15. Guía Farmacoterapéutica HUSD (2007), <http://www.elcomprimido.com/FAR-HSD/ENLACESVADEMECUMS.htm>
16. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2008), Ficha técnica Sandimmun Neoral. <https://sinaem4.agemed.es/consaem/>
17. Hassan, M. M. A. & Al-Yahya, M. A. (1987) Cyclosporine. Analytical profiles of Drug substances. *American Pharmaceutical Association.* 16: 145-206.
18. VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY (2008) <http://www.vcclab.org/lab/alogps/>
19. Gibson, M. (2001) Pharmaceutical Preformulation and Formulation. A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. HIS Health Group, Englewood, CO.
20. Robert, P. Y.; Leconte, V.; Olive, C.; Ratsimbazafy, V.; Javerliat, M. & Adenis, J. P. (2001) Collyre à la cyclosporine A: fabrication, toxicité, pharmacocinétique et indications en l'an 2000. *J. Fr. Ophthalmol.* 24 (5): 527-535.
21. Mcelhiney, L. F. (2005) Comunicación - Foro de formulación magistral. International Society of Pharmaceutical Compounding. <http://www.isphc.com>
22. Alonso, J. M. (2003) *Preparación de medicamentos y formulación magistral para oftalmología*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid.
23. Furrer, P.; Mayer, J. M. & Gurny, R. (2002) Ocular tolerance of preservatives and alternatives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53 (3): 263-80.
24. Ministerio de Sanidad y Consumo (2005) *Real Farmacopea Española*, III edición (Farmacopea Europea, IV edición). Boletín Oficial del Estado. Madrid.
25. Obiols, J. R. & Beaus, R. (2005) Validación de los sistemas de filtración esterilizante. *Industria Farmacéutica*, mayo/junio: 86-97.
26. Arco Ortiz, J. *et al.* (2004) *Formulación magistral de medicamentos*. Colegio Oficial de Farmacéuticos de Vizcaya.

*** Información de contacto:**

Elena Pérez Hernando.

e-mail: ephernando@hotmail.com

Las farmacopeas de México y Estados Unidos en el Nuevo Milenio: paralelismos y divergencias

**Liliana Schifter Aceves¹, Javier Puerto Sarmiento²,
Patricia Aceves Pastrana^{3*}**

¹ Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México.

² Universidad Complutense de Madrid.

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

³ Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México.

Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Recibido el 11 de mayo de 2009.

RESUMEN

Las primeras farmacopeas nacionales del continente americano surgidas en el siglo XIX fueron la Farmacopea de los Estados Unidos (1820) y la Farmacopea Mexicana (1846). En la actualidad, ambos códigos son los únicos que continúan siendo revisados y publicados con regularidad en este continente.

En el presente trabajo se describen algunos rasgos del entorno en el que se originaron las dos farmacopeas mencionadas, para después comparar la última edición de ambos textos. La discusión está centrada en especial en los capítulos y monografías relacionados con las plantas medicinales de cada farmacopea, ya que es precisamente en este punto donde aparecen las principales diferencias entre ellas. En la medida de lo posible, se establecen algunos paralelismos y diferencias, así como algunas perspectivas de cara al nuevo milenio.

El análisis de las distintas ediciones de la Farmacopea Mexicana muestra que a partir de 1930 es evidente la progresiva exclusión de

las drogas de origen vegetal de la terapéutica oficial mexicana para ser reemplazadas por los medicamentos sintéticos. No obstante, la aparición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos en el año 2000, marca un corte en esta tendencia, ya que apuesta por el rescate de la fitoterapia en México y por una orientación del texto semejante a la de sus homólogos estadounidense y europeo en este rubro.

Palabras clave: Plantas medicinales; Fitoterapéutica; Estatutos biofarmacéuticos.

ABSTRACT

The Mexican and United States of America pharmacopoeias in the new millennium: similarities and differences

The XIXth century witnessed the appearance of the first pharmacopoeias in the american continent; the United States Pharmacopoeia (1820) and the Farmacopea Mexicana (1846). These texts are the only ones that are reviewed and republished regularly in this continent.

In this paper some of the circumstances surrounding their publication are discussed and a comparison between their last editions is laid out. Medicinal plants and the monographs dedicated to them in both texts are carefully considered because it is here that the mayor differences between these two codes arise. Their similarities and differences are discussed as well as their perspectives for the future.

The study of the different editions of the mexican pharmacopoeia clearly show that after the publication of the 1930 text, a progressive exclusion of medicinal plants and their drugs takes place. These products were substituted in the official therapy by synthetic drugs. This process continued during the whole century until the arrival of the new millennium and a new edition of the text which included a new volume called Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos and implies a step in a different direction. This text includes a number of monographs of medicinal plants and their

products and tries to rescue these materials from oblivion and give them a place in official therapy again. This tendency is in accordance with the American and European texts which have always included them in their pages.

Key words: Medicinal plants; Phytotherapeutics; Biopharmaceutical status.

1. INTRODUCCIÓN

La Farmacopea de los Estados Unidos de América y la Farmacopea Mexicana se encuentran entre las primeras farmacopeas nacionales del continente americano surgidas en el siglo XIX. En ambos casos, su aparición buscó responder a las emergentes necesidades de sus países de origen en el turbulento escenario de la centuria decimonónica; desde entonces y hasta la actualidad continúan haciéndolo. Buena prueba de ello es que son los últimos códigos farmacéuticos oficiales —junto con el argentino— que son revisados y actualizados de forma periódica y continua. En el caso del código argentino, hubo una larga pausa entre la sexta edición de 1979 y la aparición, en 2003, de la primera parte de su séptima edición.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se describen algunos rasgos del entorno en el que se originaron las dos farmacopeas mencionadas, para después comparar la última edición de ambos textos. La discusión está centrada, en especial, en los capítulos y monografías relacionados con las plantas medicinales de cada farmacopea, ya que es precisamente en este punto donde aparecen las principales diferencias entre ellas. En la medida de lo posible, se establecen algunos paralelismos y diferencias, así como algunas perspectivas de cara al nuevo milenio.

3. EL CONTEXTO DE LA APARICIÓN DE LA USP Y LA FARMACOPEA MEXICANA

La *United States Pharmacopeia (USP)* apareció en 1820 como producto de una serie de circunstancias que coadyuvaron a su publicación (2). El estallido de la guerra de independencia en esa colonia inglesa marcó fuertemente las décadas finales del siglo XVIII, provocando un descontrol generalizado de los oficios e instituciones que, aunado a la creciente necesidad de medicamentos por todo el territorio, convergieron para que florecieran las «tiendas» de especialidades y preparados cuya finalidad era la venta de mercancía al por mayor sin tomar en cuenta la naturaleza sanitaria de la empresa y sus productos. Además, la notable evolución en la eficiencia de los medios de transporte y el alcance de la tecnología hicieron de este negocio una fuente de grandes riquezas. Los mercaderes y drogueros de antaño derivaron en magnates al frente de empresas millonarias, las cuales además de distribuir a gran escala medicamentos y compuestos químicos, se especializaron en la producción de medicamentos de patente de dudosa calidad, que eran dispensados en sus tiendas.

Al término de la guerra, lo anterior derivó en dos consecuencias principales. Por un lado, la farmacia pasó a considerarse una profesión relativamente importante que, a la par de la medicina, coadyuvaba a salvar vidas y restaurar la salud; por el otro, era un próspero y floreciente negocio (3). La enorme demanda de medicamentos durante los años de conflicto fomentó la aparición de los antecesores de las grandes compañías farmacéuticas productoras de simples y medicamentos a gran escala, quienes conjugaban un poco de química y farmacia con los negocios, y crearon un modelo que paulatinamente fue ganándole terreno al de los médicos, hasta asentarse de manera definitiva en la nueva república (4).

Es también a principios del XIX cuando los profesionales nacionales publican los primeros textos de temas médicos y farmacéuticos, donde se abordan de forma sistemática y ordenada los recursos naturales y químicos tanto locales como del exterior y, cuando estos últimos se ponen a disposición de los organismos encargados de la atención de la salud. Asimismo, la urgencia por establecer estándares de referencia como indicativos de la calidad de los productos se

hacía imperativa para asegurar su inocuidad y efectividad a lo largo del territorio nacional.

Entre los sectores más descontrolados estaba el de las plantas medicinales y otros simples importados de fuera, que llegaban adulterados o eran sustituidos por otros. La solución implicaba uniformar el texto de referencia, empresa nada fácil, dada la gran cantidad de códigos farmacéuticos en circulación. Ello implicó la elaboración de una farmacopea nacional que los suplantara a todos y aprovechara la riqueza de los recursos locales, símbolo de la recién adquirida independencia.

La aparición de la *USP* en 1820 marcó un precedente importante en los Estados Unidos. Por un lado, puede tomarse como la declaración de independencia del sector médico nacional frente a Europa. Por el otro, es el punto de partida para que los profesionales de este sector mostraran su gran capacidad y competitividad por medio de sus trabajos de innovación y revisión en materia de medicamentos, incluida su legislación.

En el caso mexicano, el paralelismo circunstancial e ideológico en esta coyuntura es muy evidente. El final de la guerra de independencia en 1821, es el inicio de una nueva etapa de inestabilidad política, social y económica que se extendió durante la mayor parte del siglo y que tiene sus repercusiones en el ámbito farmacéutico. La lista de los principales problemas que enfrentaban los profesionales de la farmacia incluía: la competencia desleal de los médicos que preparaban y dispensaban sus propios medicamentos, la existencia de herbolarios, curanderos y mercaderes que abundaban en las calles y mercados y, finalmente, la falta de regulación y vigilancia en las boticas para asegurar la calidad y pureza de los medicamentos dispensados y la metodología empleada en su preparación. En este contexto, la *Farmacopea Mexicana*, publicada en 1846, pretendía armonizar la práctica farmacéutica en todo el territorio y desterrar las divergencias y confusiones derivadas de la utilización simultánea de códigos farmacéuticos de procedencias diversas. Asimismo buscaba sustituir al máximo las plantas de origen extranjero por las nacionales, en una clara manifestación del espíritu nacionalista.

4. LOS EDITORES Y LAS FUENTES DE CONSULTA

El segundo paralelismo tiene que ver con el origen de las fuentes de ambos códigos y sus autores. En el caso estadounidense, la *Massachusetts Pharmacopoeia* publicada en 1808 por la *Massachusetts Medical Society*, es una de las fuentes principales de la *United States Pharmacopoeia* aparecida en 1820 (5). Si bien, la primera está ampliamente basada en la *Pharmacopoeia Edinburgensis*, tal y como lo anticipan sus autores en el prólogo de la obra, aún así son notables las adaptaciones a las circunstancias americanas, especialmente en la sección de materia médica, donde se adicionaron simples de origen nacional que no estaban contemplados en el código escocés (6).

El texto de la *Massachusetts Pharmacopoeia* fue ampliamente aplaudido por el resto de las sociedades médicas del país que decidieron lanzarse a la tarea de escribir uno de envergadura nacional. Para que esto sucediese, todos los estados tenían que involucrarse activamente desde su gestación; y precisamente esto fue lo que sucedió gracias a la iniciativa de la *New York County State Medical Society* a través de dos médicos ilustres: Lyman Spalding (1775-1821) y Samuel Mitchill (1764-1831). Fue Spalding, que además de académico, era congresista, quien el 6 de enero de 1817 sometió a consideración de la *New York County Medical Society*, un proyecto para la elaboración de una Farmacopea Nacional, con la anuencia y participación de todas las sociedades médicas y escuelas de medicina de los Estados Unidos (7).

El proyecto de Spalding fue aceptado y consecuentemente se puso en práctica vía la *New York State County Medical Society* que comenzó a emitir circulares a todas las sociedades médicas y escuelas del país para ponerlas al tanto de tan colosal iniciativa. Como Presidente de la Convención Nacional encargada del compendio y publicación del texto, se eligió a Samuel Mitchill y como Secretario se nombró a Thomas Hewson. Años más tarde, este organismo sería el responsable de la creación de la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos, encargada del proceso de revisión y actualización del texto.

Una vez que el trabajo estuvo listo, el texto de la *United States Pharmacopoeia* fue publicado el 15 de diciembre de 1820 en la ciu-

dad de Boston; en sus páginas se describían 221 fármacos considerados de interés, además de otros 71 recogidos en una lista secundaria. Las preparaciones y composiciones ascendían a 329 y estaba escrito en inglés y latín.

No es un hecho fortuito que el 90 por 100 del contenido del texto de la *Massachussetts* aparezca en la *USP* de 1820, primero por la destacada inclusión de los simples y preparaciones nacionales *ad hoc* con el espíritu nacionalista del momento, y segundo porque sus representantes e instituciones estaban entre las más desarrolladas del país, y era lógico que hiciesen sentir su influencia. El otro estado que podía equipararse con *Massachussetts* y *Philadelphia*, era *New York*, en cuyo territorio —específicamente en el seno de sus Sociedades Médicas— se gestó y desarrolló el proyecto inicial llevado a buen término en gran medida por el tesón y la excelente preparación de sus representantes *Spalding* y *Mitchill* (8).

En el caso de México, también es clara la predominancia de la residencia de los autores de una región específica de la República, donde la actividad científica era más intensa; los editores de la *Farmacopea Mexicana* (1846) fueron casi exclusivamente capitalinos. Sin embargo, en cuanto al sector involucrado en el proceso existe una clara diferencia, ya que incluía no sólo a médicos sino también a farmacéuticos. Cabe precisar que durante la primera mitad del siglo XIX, la comunidad científica mexicana conformaba un estrecho grupo social, en el cual los farmacéuticos representaban una minoría cuyos intereses y ambiciones raramente encontraban apoyo en las esferas más influyentes del país.

Como es de suponer no faltaron los inconformes ante esta situación, como fue el caso de *Leopoldo Río de la Loza* (1807-1876), destacado farmacéutico y médico, quien tenía la inquietud de editar una farmacopea nacional para así cubrir la necesidad de un formulario actualizado y moderno, en el que se tratara de manera exclusiva la materia médica nacional y se uniformaran de una vez por todas la nomenclatura y la metodología para preparar medicamentos (9). Con el propósito de sistematizar el ejercicio de la profesión y escribir una farmacopea nacional, *Río de la Loza* convocó a varios médicos y farmacéuticos para establecer una Academia de Farmacia. El 28 de febrero de 1839, este grupo solicitó al gobierno un permiso

para fundar dicha Academia, mismo que les fue concedido inmediatamente. Acto seguido, Río de la Loza asumió la presidencia.

Vale la pena aclarar que el uso de la *Farmacopea Mexicana* editada en 1846 no fue obligatorio en todo el territorio nacional, debido a que la legislación sanitaria era prácticamente inexistente en las condiciones de inestabilidad política imperantes en la joven nación mexicana durante la primera mitad de la centuria decimonónica. En este aspecto, la máxima autoridad en cuestiones sanitarias era el Consejo Superior de Salubridad, donde Leopoldo Río de la Loza se desempeñaba en el importante cargo de secretario.

La *Farmacopea Mexicana* está escrita en español y sus fuentes son principalmente dos, en lo que a materia médica se refiere. La primera es el *Ensayo a la materia médica vegetal de México* (1791) y la segunda es el *Ensayo para la materia médica mexicana* (1832). El farmacéutico español Vicente Cervantes (1758-1829), célebre personaje en la institucionalización de la farmacia en México, fue el autor de la primera y en ella describe alrededor de 400 plantas (10-15).

Su tarea fue facilitada por el hecho de que el estudio de las plantas medicinales no era desconocido para los antiguos mexicanos, como tampoco para los habitantes de la Nueva España, donde los usos y abusos de las mismas eran bien conocidos. Basta poner como ejemplo al famoso *Códice de la Cruz Badiano* —que marca el nacimiento de los textos sobre la materia médica mexicana— concluido hacia 1552 en el Colegio de la Santa Cruz de Tlatelolco (16-17). Otra recopilación temprana de la terapéutica vegetal indígena fue la realizada por el protomédico Francisco Hernández, quien logró hacer la descripción de 2.901 especies mexicanas (18).

Hoy en día muchas de las plantas descritas en el *Ensayo* de Cervantes aún forman parte de la terapéutica nacional. Es necesario enfatizar que uno de los propósitos de este *Ensayo* era el de recoger la tradición botánica local con la intención de sustituir, siempre que fuera posible, las drogas provenientes del exterior. Este mismo espíritu es el que impulsa a la Comisión que elaboró la *Farmacopea Mexicana* de 1846.

La otra fuente de consulta fundamental en esta primera *Farmacopea* fue el *Ensayo para la Materia Médica Mexicana* del español

Antonio de la Cal y Bracho (1766-1833), publicado en 1832 (19). De las 180 plantas descritas en este *Ensayo*, únicamente 32 están ausentes en el código de 1846 (20).

De estos hechos se desprende que en ambos países, las fuentes principales para la sección de productos naturales de sus farmacopeas fueron textos nacionales con un gran número de especies vegetales locales.

En cuanto al contenido, la materia médica de la *USP* de 1820 refleja la terapéutica usada en la época. Los médicos consideraban que la mayoría de las enfermedades eran provocadas por algún desequilibrio en el funcionamiento del cuerpo y por lo tanto, el equilibrio se restablecía utilizando laxantes fuertes (como la jalapa), diaforéticos (como el antimonio), eméticos (como la ipecacuana), diuréticos (como la digitalis) y agentes abrasantes (como las cantáridas). Por otro lado, los tónicos que se prescribían para fortalecer a los organismos debilitados estaban representados a través de la quina, que era la panacea en ese tiempo. Para los trastornos del sueño se recomendaba el opio y cerraban la selección algunas hierbas aromáticas y otros tónicos más suaves.

Por su parte, la sección dedicada a la materia médica de la *Farmacopea Mexicana* es mucho más extensa; solamente los productos de origen vegetal rebasan sobradamente los 450, mientras que en el caso de la *USP*, la suma de todos los fármacos no supera los 300. De todas formas, las propiedades de las especies vegetales compendiadas y el retrato de la terapéutica que se obtiene a través de ellas es muy semejante al de su homóloga. Además de las plantas mencionadas líneas arriba, en la *Farmacopea Mexicana* también abundan los sudoríficos (como la dulcamara), los sedantes o narcóticos, algunos de ellos muy potentes (como el acónito o el estramonio), los tónicos fuertes (como el ahuehuete y la almáciga), los eméticos (como el azafrancillo), laxantes, estimulantes, diuréticos y una gran variedad de hierbas aromáticas. Asimismo, hay que mencionar a las especies autóctonas cuyo uso está relacionado con las enfermedades de la mujer y entre las que destacan las utilizadas por los indígenas antes de la llegada de los españoles; tal es el caso del zoapatle, el muicle, el nopalillo y la tescalama, todas ellas previamente descritas en el texto de Antonio de la Cal.

5. EL FINANCIAMIENTO Y EL CARÁCTER OFICIAL

Otro paralelismo reside en la naturaleza de las organizaciones detrás de la publicación del texto y la procedencia de los recursos financieros destinados a tal fin. En el caso estadounidense, la iniciativa fue totalmente financiada por el sector privado. En el contrato firmado con Charles Ewer, reconocido editor médico y científico bostoniano, los editores acordaban la cesión de los derechos de autor de la obra durante un periodo de diez años a cambio de 1.600 copias del texto y 1.600 dólares para solventar los gastos de toda la gestión. De los 1.600 dólares obtenidos, casi 1.400 se utilizaron para compensar los gastos de viaje de los delegados y miembros del comité, y los 200 restantes fueron asignados a la *County Medical Society of New York* donde se había gestado el proyecto.

Hoy en día, las responsabilidades de publicación recaen todavía en la Convención de la *USP*, una organización privada formada principalmente por voluntarios y totalmente desvinculada de las dependencias estatales sanitarias. Al ser un producto de la empresa privada, la *USP* nunca ha sido un estándar farmacéutico oficial en el estricto sentido de la palabra. Sus autores carecen de la capacidad legislativa para establecerlo así. Sin embargo, la *Federal Food and Drug Law* de 1906 y su sucesora, la *Food, Drug and Cosmetic Act* de 1938, eligieron a la *USP* y al *National Formulary (NF-14)*, como los «estándares americanos legales» para medicamentos, dado el rigor científico de sus contenidos (21-22). Esto quiere decir que las especificaciones de los fármacos contenidos en ambos textos son consideradas por la FDA (*Food and Drug Administration*) como los parámetros más confiables de pureza, potencia y calidad. Vale la pena mencionar que el *National Formulary* cuando fue publicado por primera vez en 1888, incluía fórmulas y preparaciones no oficinales y funcionaba como una farmacopea secundaria semi-oficial.

El caso de México es bastante particular. Si bien es cierto que actualmente la responsabilidad de la publicación de la *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* recae exclusivamente en el Estado a través de la Secretaría de Salud, esto no siempre fue así. Aunque los fondos para la publicación de la *Farmacopea* de 1846 salieron de las arcas del gobierno de la República —lo cual es una muestra del apoyo dispensado por las autoridades a los integrantes de tan impor-

tante empresa— al igual que en el caso de los Estados Unidos, la organización encargada de la publicación de la primera *Farmacopea* del país era de tipo privado. De hecho, a partir de la segunda edición, la financiación del texto comenzó a correr por cuenta exclusiva de la *Sociedad Farmacéutica Mexicana*, que fue la heredera de los miembros y los intereses de la *Academia de Farmacia*, disuelta apenas publicada la edición de 1846. En cuanto a su oficialidad, es importante destacar que en 1883 la *Farmacopea Mexicana* fue reconocida como texto legal para el Distrito Federal y algunos estados, y que posteriormente habría de ampliar su ámbito de influencia legal, aunque su uso continuó siendo moderado y su carácter no obligatorio en todo el territorio.

La diferencia con el código norteamericano aparece en 1930, cuando el Estado Mexicano a través del Departamento de Salubridad Pública —hoy Secretaría de Salud—, tomó bajo su responsabilidad la publicación de la *Farmacopea*, labor que mantiene hasta la fecha y que implica su obligatoriedad en todo el territorio.

6. EN EL CORRER DEL TIEMPO

Han pasado muchos años desde la primera edición de ambos textos. En el caso de los Estados Unidos la evolución de las funciones y el alcance de la *USP* han sido muy considerables. Durante sus primeros ochenta años de vida, la *USP* se sostenía gracias a una docena de hombres responsables de las siete ediciones aparecidas en el siglo XIX.

En nuestros días, los profesionales involucrados en su publicación son numerosos, sin embargo, el espíritu de voluntarismo se mantiene, lo mismo que el arduo trabajo de revisión que ha permitido cumplir sus 26 ediciones. La década de 1930 trajo la confirmación de la *USP* y el *NF* como estándares de su género por la ya mencionada *Food and Drug Cosmetic Act* de 1938.

En las dos décadas siguientes, se dio la consolidación de las relaciones entre la Convención y la industria farmacéutica, hecho importantísimo en la historia de la *USP*. Para los años sesenta, hubo un incontenible aumento de los contenidos de la *USP*; sólo la edición

de 1975 incrementó unas 1.077 monografías más que su antecesora. Siguiendo esta tendencia, a partir de 1980 se publica el texto titulado *USP Dispensing Information*, que incluye las dosis y cantidades recomendadas de algunos fármacos, el cual está dirigido a los farmacéuticos, enfermeras y médicos responsables de procurar atención hospitalaria, más que para aquellos que se dedican a la prescripción.

La década de los ochenta también significó un cambio notable en los contenidos de la *USP*. Su indivisibilidad del *National Formulary (NF)* quedó sellada cuando se estableció que «*todos los fármacos y sus productos*» se recogerían en la *USP*, que hasta entonces contenía únicamente los *mejores* fármacos reconocidos (23). Para complementar la información, el *NF* recogería exclusivamente monografías de ingredientes farmacéuticos (excipientes, reactivos y colorantes, entre otros). Esta organización se mantiene en la actualidad, la *USP* y el *NF* se publican en el mismo volumen y hasta cierto punto son indispensables entre sí. Las últimas décadas del siglo XX marcaron también la expansión de las oficinas, el personal, las responsabilidades, influencia y relaciones internacionales de la Convención.

En el caso de México, el siglo XIX vio la publicación de otras tres ediciones de la *Nueva Farmacopea Mexicana*, en 1874, 1884 y 1896, todas bajo el auspicio de la Sociedad Farmacéutica Mexicana. El cambio de la centuria no fue testigo de un panorama más favorable para la farmacia, y apenas pasaron diez años cuando las contradicciones sociales se manifestaron en el estallido de la Revolución Mexicana.

A pesar de las adversidades y la inestabilidad, la *Nueva Farmacopea Mexicana* siguió modernizándose. En 1904 apareció una nueva edición auspiciada por la Sociedad Farmacéutica, que también fue la responsable de la edición de 1925. Sin embargo, las cosas habrían de cambiar mucho para este código farmacéutico cuando a partir de 1930, el Estado asumió la publicación y financiamiento del texto, rebautizado como *Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos*, la cual cambiaría su nombre por el *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)* a partir de 1974 (24). Esta nueva edición marca un punto de inflexión en la futura orientación, estructura y contenidos de la obra, ya que desde entonces existe una clara preferencia por los artículos y metodologías experimentales de la indus-

tria química y farmacéutica que en estos años tuvieron un floreciente desarrollo. Aspecto que trajo aparejada una mayor influencia de la *USP* en este código nacional. Para entender mejor esta situación, a continuación se transcribe un párrafo contenido en el *Prólogo* de la *Farmacopea Nacional* de México:

*Debe aclararse que las drogas rechazadas de la Farmacopea Nacional de 1930 y muchas otras de gran consumo en la República, pero que igualmente tienen una acción muy secundaria en comparación con las sustancias que aparecen en esta edición, podrán seguirse utilizando por los médicos que tengan costumbre inveterada de prescribirlas. Esta Secretaría fijará las exigencias oficiales que deban satisfacer tales sustancias sobre constantes físicas y químicas, límites de pureza y la manera de cuantificar sus principios activos o su acción farmacodinámica en un libro que se editará en los próximos años. La labor de la Comisión, en los aspectos anteriormente expuestos, fue grandemente orientada por la benevolencia del Comité Directivo de la Farmacopea Americana, el que atendió nuestra solicitud de «patrones» por intermedio de la Oficina Sanitaria Panamericana y nos autorizó el empleo de la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (*USP*), en sus ediciones XII, XIII y XIV (25).*

Así, a partir de 1930 se fue haciendo más fuerte la presencia de la *USP* en la Farmacopea mexicana y se inicia el decremento de las plantas medicinales en sus páginas, tal como se puede observar en el Gráfico 1. Es evidente que de 1846 a 1925 hubo un aumento en las plantas con actividad terapéutica incluidas en las diferentes ediciones de la Farmacopea; mientras que a partir de 1930 y hasta 1994, la considerable diversidad biológica de la flora local y su reconocida utilidad terapéutica, sobre todo en el ámbito popular, no se encontraron reflejadas en la Farmacopea de México (26).

Así, la exclusión progresiva de los productos naturales es una constante en las farmacopeas publicadas por el Estado hasta 1994, a pesar de que en México están en uso a nivel popular, más de seis mil plantas medicinales y que la tendencia general es a reconocerlas como fuentes terapéuticas valiosas (27).

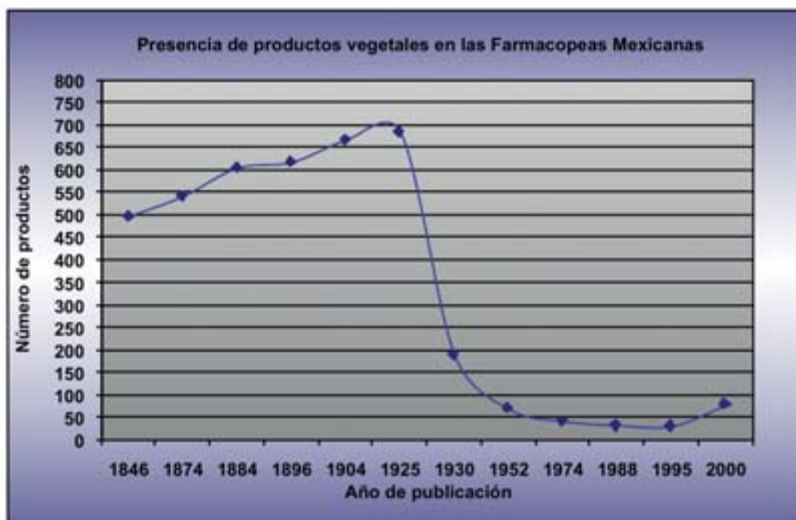


Gráfico 1. Presencia de productos vegetales en las Farmacopeas Mexicanas.

También es notorio en el gráfico el cambio de orientación que al respecto ha marcado la llegada del nuevo milenio. Cabe mencionar que en el año 2000 apareció la séptima edición de la *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)* y como parte de ella se publicó la *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. Las cuarenta monografías de plantas que contiene esta última marcan el inicio del rescate de la terapéutica vegetal, que en su gran mayoría habían sido compendiadas en las ediciones decimonónicas, dada su actividad farmacológica y valor terapéutico. Además, la *Farmacopea Herbolaria* en su última sección denominada *Extrafarmacopea* incorpora 18 monografías de plantas, como candidatas a formar parte del código en futuras ediciones. Lo que parece mantener la tendencia al aumento de incorporar las plantas medicinales en la terapéutica oficial de México.

Como punto de comparación, en los códigos farmacéuticos oficiales de Alemania y Francia, el número de especies vegetales compendiadas en cada uno de ellos rebasa ampliamente las 1.000 monografías.

7. LA *USP* Y LA *FEUM* EN EL NUEVO MILENIO

Hoy en día no cabe duda de que la *USP* es probablemente el código oficial de medicamentos más consultado del mundo y definitivamente la principal referencia de la gran mayoría de los países latinoamericanos, que incluso, en muchos casos, la han declarado su código oficial de consulta (28). Es claro que la *USP* ha marcado un hito, sobre todo en los últimos cincuenta años, en lo que se refiere a técnicas instrumentales, métodos de identificación y su aplicación para determinar la calidad y potencia de simples, compuestos y preparaciones farmacéuticas terminadas.

Por su parte, la *FEUM* ha seguido actualizándose y publicando suplementos sobre diversos temas, que le han permitido ganarse un puesto entre en los códigos farmacéuticos americanos modernos; al grado de ser la única farmacopea de América Latina continuamente revisada y publicada (29). A continuación abordaremos de forma específica las características de ambos textos en su última versión para en un primer momento conocerlos de forma general y luego entrar en la discusión, en torno a las monografías pertenecientes a la materia médica vegetal y otras relacionadas con las mismas. En las páginas siguientes aclararemos el por qué de esta preferencia.

Con anterioridad se mencionó que en México, que desde la séptima edición del año 2000, las plantas medicinales y los métodos e informaciones que les atañen, se publican por separado en un volumen titulado *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. Lo anterior pone en evidencia el interés de la *FEUM* en dar impulso y desarrollar los trabajos concernientes a la materia médica vegetal autóctona, hecho que de alguna forma establece una diferencia con su homóloga del país del norte que incluye plantas de origen diverso en mayor proporción. Por ello orientaremos nuestra atención a analizar esta diferencia y su relevancia en el apartado siguiente.

8. LOS PRODUCTOS VEGETALES EN LA *USP* Y LA *FEUM*

La *USP* presenta 76 monografías relacionadas con productos de origen vegetal, ver Tabla 1. Es necesario precisar, que si bien existe

una farmacopea herbolaria bastante completa editada con el título de *American Herbal Pharmacopoeia*, ésta no tiene carácter oficial.

Tabla 1. **Productos de origen vegetal de la USP26/2003-NF21**

United States Pharmacopoeia	United States Pharmacopoeia	National Formulary	National Formulary
Aloe (<i>Aloe vera</i>) L.*	Opio (<i>Papaver somniferum</i>) L.	Acacia (<i>Acacia senegal</i>) L.	Aceite de algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>) L.*
Belladona (<i>Atropa belladonna</i>) L.*°	Papaína (<i>Carica papaya</i>) L.	Agar (<i>Gelidium cartilagineum</i>) L.*	Arándano (<i>Vaccinium oxycoccos</i>) L.
Alcánfor (<i>Cinnamomum camphora</i>) L.*	Pectina	Aceite de almendras (<i>Prunus amygdalus</i>) Batsch*	Equinacea (<i>augustifolia, pallida y purpurea</i>) DC Nuttall L.*
Aceite de ricino (<i>Ricinus communis</i>) L.*	Plantago (<i>Plantago psyllium</i>) L.*	Ginseng americano (<i>Panax quinquefolius</i>) L.*	Eleuteurio (<i>Eleutherococcus senticosus</i>) Rupr. et Maxim
Digitalis (<i>Digitalis purpurea</i>) L.	Podophyllum (<i>Pododphyllum peltatum</i>) L.	Aceite de anís (<i>Pimpinella ansium</i>) L.*°	Aceite de hinojo (<i>Foeniculum vulgare</i>) Mill.
Digitoxina (<i>Digitalis purpurea</i>) Linné	Psyllium, corteza (<i>Plantago ovata</i>) Forskal	Ginseng asiático (<i>Panax ginseng</i>) L.*	Hierba de Santa María (<i>Tanacetum parthenium</i>) L.*
Digoxina (<i>Digitalis lannata</i>) Ehrhartt	Quina (<i>Cinchona pubescens</i>) L.*°	Caramelo	Galagenina (<i>Rodophyceae-Euchema gelatinae</i>) L.
Elmo (<i>Ulmus rubra</i>) L.	Rauwolfia serpentina (<i>Rauwolfffia</i>) L.	Caraway (<i>Carum carvi</i>) L.	Ajo (<i>Allium sativum</i>) L.

Tabla 1. **Productos de origen vegetal de la USP26/2003-NF21 (cont.)**

United States Pharmacopoeia	United States Pharmacopoeia	National Formulary	National Formulary
Eucaliptol	Aceite de girasol (<i>Carthamus tinctorius</i>) L.	Cardamomo (<i>Elettaria cardamomum</i>) L.*	Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>) Roscoe
Eugenol (<i>Syzygium aromaticum</i>) L.*	Senna (<i>Cassia acutifolia</i>) Delila*	Carragenina (<i>Rhodophyceae</i>) L.*	Gingko (<i>Ginkgo biloba</i>) L.*
Green Soap	Aceite de soya (<i>Glycine soja</i>) L.*	Camomila (<i>Matricaria recutita</i>) L.*	Glucosa líquida
Guta Percha (<i>Palaquium Gutta</i>) Hooker	Bálsamo de Tolú (<i>Myroxylon balsamum</i>) L.* ^o	Cereza (<i>Prunus cerasus</i>) L.	Cúrcuma canadiense (<i>Hydrastis canadensis</i>) L.*
Enebro de la miera (<i>Juniperus oxycedrus</i>) L.	Fibra de trigo (<i>Triticum aestivum</i>) L.	Chocolate (<i>Theobroma cacao</i>) L.	Goma Guar (<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>) L*
Mirra (<i>Commiphora molmol</i>) Engler	Hamamelis (<i>Hamamelis virginiana</i>) L.*	Aceite de clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>) L.*	Espino blanco (<i>Crataegus monogyna</i>) Jacq. Emend Lindman*
Manteca de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) L.*	Aceite de oliva (<i>Olea europaea</i>) L.*	Hierba de San Juan (<i>Hypericum perforatum</i>) L.*	Valeriana (<i>Valeriana officinalis</i>) L.
Aceite de maíz (<i>Zea mays</i>) L.*	Naranja (<i>Citrus sinensis</i>) L. Osbeck* ^o	Sabal (<i>Serenoa repens</i>) Bartram	Vanilla (<i>Vanilla planiflora</i>) Jacks*
Aceite de limón (<i>Citrus x limon</i>) L.	Aceite de cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>) L.*	Aceite de Sésamo (<i>Sesamum indicum</i>) L.*	Cera Carnauba (<i>Copernicia cerifera</i>) Mart.

Tabla 1. **Productos de origen vegetal de la USP26/2003-NF21 (cont.)**

United States Pharmacopoeia	United States Pharmacopoeia	National Formulary	National Formulary
Regaliz (<i>Glycyrrhiza glabra</i>) L.	Hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>) L.*°	Maíz (<i>Zea mays</i>) L.*	Zein (prolamina del <i>Zea mays</i>) L.*
Cardo Mariano (<i>Silybum marianum</i>) L.*	Aceite de Rosas (<i>Rosa gallica</i>) L.	Tragacanto (<i>Astragalus gumifer</i>) Labillardiere*	

° Citada en la primera edición de la Farmacopea Mexicana.

* Citada en la séptima edición de la FEUM.

La FEUM contiene 56 títulos diferentes (40 de la *Farmacopea Herbolaria*, más los relativos a aceites esenciales y aditivos). De los cuales, 28 ya aparecen en la *Farmacopea Mexicana* de 1846, con lo cual tienen casi 160 años de presencia en los códigos farmacéuticos nacionales, ver Tabla 2. Sin embargo, no hay que olvidar que muchas de ellas ya habían sido reportadas y utilizadas en otros tratados mexicanos anteriores al siglo XIX (30).

Tabla 2. **Monografías oficiales de plantas medicinales compendiadas en la FEUM 2008 (Farmacopea alopática y herbolaria)**

Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	Sen, hoja (<i>Cassia senna</i> L.)*°	Epazote (<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.)	Almidón de papa (<i>Solanum Tuberosum</i> , L.)
Ácido algínico (<i>Phaeophyceae</i>)	Sacarosa (<i>Saccharum officinarum</i>)	Alhucema (<i>Lavandula officinalis</i> Chaix et Villars)	Canela [<i>Cinnamomum cassia</i> (Nees)]
Ajenjo, hierba (<i>Artemisia absinthium</i> L.)°	Belladona, raíz (<i>Atropa belladonna</i> L.)*	Eucalipto, hoja (<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.)*	Jamaica, flor (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)
Alholva, semilla (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.)°	Boldo, hoja (<i>Peamus boldus</i> Molina)	Gayuba, hoja (<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> L.)°	Junípero, fruto (<i>Juniperus communis</i> L.)°

Tabla 2. Monografías oficiales de plantas medicinales compendiadas en la FEUM 2008 (Farmacopea alopática y herbolaria) (cont.)

Aloe (<i>Aloe vera</i> Burm. F.)*°	Borraja, flor (<i>Borago officinalis</i> L.)°	Genciana, raíz (<i>Gentiana lutea</i> L.)°	Lúpulo, flor (<i>Humulus Lupulus</i> L.)°
Angélica japonesa, raíz (<i>Angelica acutiloba</i> Siebold & Zucc.)	Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> N.)°	Gingko, hojas (<i>Gingko biloba</i> L.)*	Manzanilla, flor (<i>Matricaria Recutita</i> L.)*°
Angélica, raíz (<i>Angelica archangelica</i> L.)	Cardamomo, fruto (<i>Elettaria cardamomum</i> Maton)*°	Ginseng, raíz (<i>Panax ginseng</i> C.A. Mey)*	Naranja amarga, cáscara (<i>Citrus aurantium</i> L.)*°
Anís de estrella, semilla (<i>Illicium verum</i> Hokker)*°	Cáscara sagrada, corteza (<i>Rhamnus purshiana</i> DC)	Hamamelis, hojas (<i>Hamamelis virginiana</i> L.)*	Plantago, semilla (<i>Plantago psyllum</i> L.)*
Árnica, flores (<i>Arnica montana</i> L.)°	Centaurea menor, hierba (<i>Centaureum erythrae</i> Rafn.)°	Harpagofito, raíz (<i>Harpagophytum procumbens</i> DC)	Polígala, raíz (<i>Polygala senega</i> L.)°
Bálsamo de Perú (<i>Myroxylon balsamum</i> L.)*°	Colombo, raíz (<i>Jateorhiza palmata</i> (Lam.) Miers.)°	Hierbabuena, hojas (<i>Mentha x piperita</i> L.)*°	Quina, corteza (<i>Cinchona pubescens</i> Vahl.)*°
Beleño, hoja (<i>Hyoscyamus niger</i> L.)°	Damiana, hojas (<i>Turnera diffusa</i> Willd.)°	Hinojo amargo, fruto (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)*°	Ruibarbo, raíz (<i>Rheum Palmatum</i> L.)°
Belladona, hoja (<i>Atropa belladonna</i> L.)*°	Espino blanco, fruto (<i>Crataegus monogyna</i> (Lindm.)*	Ipecacuana, raíz (<i>Cephaelis ipecacuanha</i> (Brot.) A. Rich.)°	Santa María, hierba (<i>Tanacetum parthenium</i> L.)*°
Azahar (<i>Citrus aurantium</i> L.)	Coco (<i>Cocos nucifera</i> L.)	Limón Mexicano (<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swing)	<i>Psyllium plantago</i>
Agar			

* Citada en la USP.

° Citada en primera edición de la Farmacopea Mexicana (1846).

Además, la última sección de la *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos* contiene la *Extrafarmacopea* que abarca 18 monografías más de plantas medicinales, para las cuales se describen parámetros macroscópicos y microscópicos, así como ensayos de identidad, valoración, conservación y otros. En la introducción, los miembros del Comité de la Farmacopea exponen los criterios adoptados en la selección de los vegetales incluidos:

El propósito de esta sección es consignar especies medicinales existentes en México que presentan sustento suficiente desde el punto de vista etnobotánico y taxonómico, aun cuando todavía no cuentan con suficientes estudios controlados (químicos o clínicos), que hagan posible validar su uso terapéutico en el marco de la biomedicina actual... (31).

Podríamos decir entonces, que en esta sección se encuentran recogidas las especies medicinales nacionales potencialmente utilizables en el futuro. De las 18 especies consignadas, sólo cuatro no son nativas (dos europeas y dos asiáticas), y once se mantienen desde la primera edición de 1846. Este hecho ratifica su añeja tradición dentro de la herbolaria mexicana y su uso hasta la actualidad. Ver Tabla 3.

Tabla 3. **Especies vegetales de la Extrafarmacopea de la FEUM**

Nombre del producto	Nombre del producto
Árnica mexicana, flor (<i>Heterotheca inuloides</i> Cass.)	Gordolobo mexicano, flor (<i>Gnaphalium semiamplexicaule</i> DC)
Cancerina, corteza de raíz (<i>Hippocratea excelsa</i> HBK)	Jalapa, raíz (<i>Ipomoea purga</i> (Wender) Hayne) ^o
Chaparro amargoso, planta [<i>Castela texana</i> (T & G) Rose]	Santa María, hojas (<i>Tanacetum parthenium</i> L.) ^{*o} Origen Europa
Chicalote, hierba (<i>Argemone mexicana</i> L.) ^o	Simonillo, hierba [<i>Conyza</i> <i>Filaginoides</i> (DC) Hieron]

Tabla 3. Especies vegetales de la Extrafarmacopea de la FEUM (cont.)

Nombre del producto	Nombre del producto
Cocolmea, raíz (<i>Smilax spp.</i>)°	Tamarindo, fruto (<i>Tamarindus indica L.</i>)° Origen Asia
Cola de caballo, tallo (<i>Equisetum Robustum</i> Br. R. spp.)° Origen Europa	Tejocote mexicano, hojas [<i>Crataegus pubescens</i> (Kunth) Steud]° y Tejocote mexicano, fruto°
Cuachalalate, corteza (<i>Amphipteryngium adstringens</i> Schiede ex Schltedl)°	Tepezcohuite, corteza (<i>Mimosa tenuiflora</i> (Will) Pioret)°
Cúrcuma, raíz (<i>Curcuma longa L.</i>)° Origen Asia	Toronjil [<i>Agastache mexicana</i> (Kunth) Lint et Epling]°
Equinácea púrpura, hierba (<i>Echinacea purpurea L.</i>)*	Valeriana mexicana, raíz (<i>Valeriana edulis spp.</i>)

* Citada en la USP.

° Citada en la edición de 1846.

9. CARACTERÍSTICAS DE LOS VEGETALES CONTENIDOS EN LA USP Y LA FEUM

Ambos códigos farmacéuticos manifiestan un interés por incluir productos de origen vegetal en sus páginas; asimismo, más de la mitad de las monografías de plantas medicinales aparecen en ambos textos. En términos generales, la USP y la FEUM comparten principalmente fármacos —sin tomar en cuenta los aditivos y aceites esenciales— de elevada potencia. En las dos farmacopeas coexisten los productos de origen americano con los aclimatados para crecer en América, cuyos usos varían ya que incluyen desde tónicos suaves, hasta otros con efecto sedante-hipnótico. Si bien, su origen es diverso ya que provienen de América, Europa, Asia y África, abarcan plantas conocidas en distintas regiones del mundo desde siglos atrás. En el caso mexicano, también hay que tomar en cuenta a la *Extrafarmacopea* con sus especies en su mayoría autóctonas de reconocida activi-

dad terapéutica, muchas de ellas ya presentes, en la primera farmacopea de 1846.

10. CONSIDERACIONES FINALES

A través del estudio realizado pudimos poner en evidencia algunas particularidades y semejanzas compartidas por la primera edición de la Farmacopea estadounidense y la Farmacopea mexicana. Los dos códigos, en sus inicios, contenían principalmente simples de origen vegetal, pero a partir de la tercera década del siglo XX la situación cambia y se observa la exclusión mayoritaria de las plantas a favor de inclusión de los preparados sintéticos.

En la actualidad, ambas Farmacopeas contienen un número reducido de monografías de productos vegetales en comparación al que registran sus homólogas europeas. En el caso del código mexicano, esta ausencia es aun más pronunciada y fue hasta el año 2000 cuando se empezó a dar un cambio con la publicación de la *Farmacopea Herbolaria*, la cual forma parte de la FEUM. Esta publicación marca el inicio del rescate del arsenal terapéutico conocido y usado en México desde siglos atrás. Avanzar en esta dirección implica el desarrollo de una fitoterapia racional y de profesionales conscientes de las posibilidades de esta herramienta terapéutica.

En el caso de América Latina, la *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos* ha ayudado a subsanar el vacío existente en la bibliografía oficial acerca de las plantas medicinales autóctonas. La larga tradición de este continente en el empleo de una materia médica vegetal que llega hasta el presente, requiere de textos de referencia bien calificados y avalados por las autoridades pertinentes, que proporcionen los lineamientos y las normas para la correcta identificación, recolección, preparación, dosificación y usos terapéuticos de las plantas medicinales. De ahí que la séptima edición de la FEUM, incluida su *Farmacopea Herbolaria*, sea tan valiosa.

11. AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Gobierno de México y a la Universidad Complutense de Madrid por el apoyo otorgado a la presente investigación.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Schifter, L. (2006) *Historia de la Farmacopea Mexicana y a su comparación con otras farmacopeas en el contexto actual*. Tesis de Doctorado en Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Complutense de Madrid. Doctor Francisco Javier Puerto Sarmiento, Director de Tesis.
2. *The Pharmacopoeia of the United States of America* (1820). Charles Ewer Pub., Boston, Massachusetts.
3. Sonnedecker, G. (1976) *Kremers and Urdang's History of Pharmacy*, Lippincott, Philadelphia.
4. Sonnedecker, G. (1993) «The Founding Period of the United States Pharmacopoeia». *Pharmacy in History*. 35: 151-162.
5. *The Pharmacopoeia of the Massachusetts Medical Society* (1808). E. & J. Larkin, Boston, Massachusetts.
6. *Pharmacopoeia Edinburgensis Additamenta* (1784). E. G. Baldinger, Edinburgh.
7. Sonnedecker, G. (1994) «The Founding Period of the United States Pharmacopoeia: II. A National Movement Emerges». *Pharmacy in History*. 36: 3-14.
8. Anderson, L. & Higby, G. (1995) *The Spirit of Voluntarism: The United States Pharmacopoeia (1820-1995)*. USP Convention Inc., Maryland.
9. Urbán G. (2000) *La obra científica del Doctor Leopoldo Río de la Loza* (Aceves, P. ed.). UAM-Xochimilco-Sociedad Química de México. IPN, México.
10. Cervantes, V. (1889) «Ensayo a la materia médico-vegetal de México». *Estudio*. Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. México, pp. 1-43.
11. Pastor, J. (2007) «Vicente Cervantes Mendo: lugar y fecha de nacimiento, bicentenario no conmemorado y próximo 250 aniversario». *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España*. 73: 747-762.
12. Aceves, P. (1998) «Hacia una farmacia nacional: la primera farmacopea del México independiente» (Aceves, P. ed.). *Farmacia, Historia Natural y Química Intercontinentales, Estudios de la historia social de las ciencias químicas y biológicas*, v. 3. UAM-X, México, pp. 160-177.
13. Aceves, P. (2004) «La renovación de la farmacia a finales del periodo colonial». *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Instituto de España. LXX, 1: 127-145.
14. Morales, A. (2002) «El Hospital General de San Andrés: la modernización de la medicina novohispana (1770-1833)». *Biblioteca de Historia de la Farmacia*, v. 2. UAM-Xochimilco-Sociedad Química de México-Colegio Nacional de QFB. México.

15. De la Cal y Bracho, A. (1832) *Ensayo para la Materia Médica Mexicana*. Oficina del Hospital de San Pedro. Puebla.
16. Cruz, M. & Badiano, J. (1991) *Libellus de medicinalibus indorum herbis*. FCE-Instituto Mexicano del Seguro Social. México.
17. Viesca, C. (1990) «Los médicos indígenas frente a la medicina europea» [Aguirre, B. *et. al.* (coord.)]. *Historia General de la Medicina en México*, tomo II. UNAM, México.
18. Somolinos, G. (1960) «Vida y obra de Francisco Hernández» (en *Obras completas de Francisco Hernández*, vol. 1). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
19. Huerta, A. M. (1996) «El Jardín de Cal. La botánica y las ciencias de la salud en Puebla». *Colección Catalejos*, num. 14. Secretaría de Cultura de Puebla, Puebla.
20. Aceves, P. (1993) *Química, botánica y farmacia en la Nueva España a finales del siglo XVIII*. UAM-X. México.
21. Anderson, L. & Higby, G. (1995) «The Spirit...», *op. cit.*, pp. 152-155.
22. Wiley, H. & Kebler, L. (1908) «The Pharmacopoeia as a Legal Standard». *Journal of the American Medical Association*. 51: 2020-2022.
23. Citado por Anderson, L. & Higby, G. (1995) «The Spirit...», *op. cit.*, p. 314.

SESIONES CIENTÍFICAS

24 de septiembre

Conferencia por el Ilmo. Señor don Francisco Tomás Lorente, Académico Correspondiente, titulada: «Aportaciones al estudio de los Fitofenoles. Resveratrol y Bioactividad».

1 de octubre

Conferencia por el Doctor José López-Barneo, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, CSIC, Universidad de Sevilla, titulada: «Terapia celular neuro-regeneradora en la enfermedad de Parkinson».

8 de octubre

Mesa Redonda en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF, titulada: «Las Sociedades y los Centros Españoles en el Descubrimiento de Nuevos Fármacos». Presentación a cargo del Excmo. Señor don Antonio Monge, Académico de Número de la RANF. Intervienen las Doctoras doña Ana San Félix García, Secretaria General de la Sociedad Española de Química Terapéutica: «La Sociedad Española de Química Terapéutica», y doña Pilar Goya Laza, Directora del Instituto de Química Médica del CSIC: «El Instituto de Química Médica en el Descubrimiento de Fármacos».

15 de octubre

Presentación de los nuevos portales web de la Real Academia Nacional de Farmacia y la red de Enfermedades Olvidadas, por el Excmo. Señor don Antonio L. Doadrio Villarejo, Académico Secretario de la RANF.

22 de octubre

Conferencia por el Profesor Doctor don Miguel Fernández Braña, Académico Correspondiente, titulada: «Química Farmacéutica de las 4-acilaminometilpiridinas».

27 de octubre

Jornada en colaboración con la Fundación Tomás Pascual y el COF de Madrid sobre «Dietas mágicas, mitos y realidades».

29 de octubre

Tertulia científica titulada: «De la nada al hombre». Intervinieron los Excmos. Señores don Francisco González de Posada, Académico Correspondiente: «Origen del universo y principio antrópico», y don Juan-Ramón Lacadena Calero, Académico de Número de la RANF: «Creacionismo *versus* evolucionismo: Teoría del diseño inteligente».

29 de octubre

Sesión científica titulada: «Conmemorando a Darwin». Presentación a cargo del Excmo. Señor don Juan-Ramón Lacadena Calero, Académico de Número de la RANF. Ponente: Excmo. Señor don Antonio R. Martínez Fernández, Académico de Número de la RANF: «Reconstrucción filogénica».

3 de noviembre

Presentación del Libro Homenaje al Excmo. Señor don Pedro García Barreno, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid y Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y de la Real Academia Española, titulado: «Paz y bien. La biomedicina en España».

5 de noviembre

Mesa Redonda sobre Drogadicción. Con la participación de los Doctores don José Antonio Ramos Atance, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UCM: «La drogodependencia, una enfermedad de nuestro tiempo», y doña Isabel Martín Fontelles, Catedrática de Farmacología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid: «La adición suicida al tabaco».

12 de noviembre

Mesa Redonda sobre Seguridad del paciente oncológico. Intervinieron: don Daniel Almenar Cubells, Jefe de Servicio de Oncología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia: «Visión del oncólogo»; don N. Víctor Jiménez Torres, Académico de Número de la RANF, Catedrático de la Universidad de Valencia y Jefe de Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia: «Visión del farmacéutico»; doña Adela Máñez Mañez, Enfermera del Hospital Universitario La Fe de Valencia: «Visión de la enfermera»; doña Marta Esteban Benavides, Coordinadora de la Sección de Normativa. Diario Médico. Madrid: «Visión del periodista», y don Francisco de Asís Silla, Magistrado de Instrucción de Valencia: «Visión del Magistrado».

19 de noviembre

Mesa Redonda sobre el Plan de Estudios de Bolonia. Organizada por el Excmo. Señor don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número de la RANF. Intervinieron los Doctores: don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé: «La farmacia ante el espacio europeo de educación superior»; don Agustín García Asuero, Director del Departamento (interfacultativo) de Química Analítica de la Universidad de Sevilla y Académico Correspondiente de la RANF: «El Libro Blanco, tierra de llegada o punto de partida, ¿*Quo vadis* Farmacia?», y don Rafael Lozano Fernández, Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y Académico Correspondiente de la RANF: «Proceso Bolonia: enseñanza/aprendizaje».

26 de noviembre

Sesión científica conmemorativa de los Premios Nobel 2009 de Fisiología o Medicina y de Química. Presentación a cargo del Excmo. Señor don Juan Ramón Lacadena Calero, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia: «El Premio Nobel 2009 de Fisiología o Medicina: Telómeros y telomerasa: de la investigación citogenética básica a la aplicación clínica». El premio Nobel 2009 de Química: «Estructura atómica del ribosoma: estructura y función en el corazón de la Genética». Intervendrán los Doctores: doña María A. Blasco, Directora del Programa de Oncología Molecular del CNIO, Vicedirectora de Investigación Básica del CNIO y Jefa de Grupo de telómeros y telomerasa: «Papel de la telomerasa en cáncer y envejecimiento», y don Carlos Fernández Tornero, Científico Titular. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC: «Nobel de Química: estructura atómica de la maquinaria celular para sintetizar proteínas».

Los días 11 al 14 de mayo se celebró en Buenos Aires (Argentina) el III Encuentro Iberoamericano de Academias de Farmacia (AIAF). El Encuentro resultó de gran calidad; en la primera sesión, en la que hablaron los Presidentes de las Academias participantes, hubo un emotivo recuerdo para quien fue nuestro Presidente de Honor, Excmo. Señor don Juan Manuel Reol Tejada, que se transformó en un sentido homenaje expresado en los más diversos acentos de la lengua castellana. También se recordó con todo cariño a don Ernesto Fernández Bernardo, quien fue Presidente de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile.

* * *

Los días 2 al 5 de junio ha tenido lugar en Montevideo (Uruguay), la III Reunión Científica Regional de ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science), bajo el título de «Biomodelos aplicados al desarrollo e innovación tecnológica», en la que el Doctor Alberto Giráldez, Académico de Número de esta Real Academia Nacional de Farmacia, fue invitado a participar en el Seminario número 4, relativo al tema «Modelos animales utilizados en neurociencias: una visión desde la academia, las ciencias básicas y la industria farmacéutica».

* * *

En la última reunión de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP), celebrada el 18 de junio de 2009, en el Centro Cultural «Matadero» en Huesca, se conmemoró su 50 aniversario y se celebró un acto académico conmemorativo de esta fundación y de homenaje a varios de los socios de honor de la sociedad, entre ellos al Doctor Gaspar González González, fundador, socio número 1 de la SEEP y ex-presidente.

La SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DE LOS PASTOS (SEEP) es una Asociación Científica de ámbito nacional, fundada en 1960, que tiene como objetivo fomentar el conocimiento y mejora de

los pastos españoles, contemplando una amplia y diversa gama de disciplinas que configuran la ciencia denominada Pascolología: Tipología, Ecología y Funcionamiento de los Sistemas Pastorales; Edafología; Fitosociología, Fisiología Vegetal y Botánica Sistemática; Producción Vegetal y Genética-Mejora Vegetal; Nutrición-Alimentación Animal y Producción Animal; Economía, Sociología y Política Agrarias; Historia y Derecho Agrarios; etc. Todo ello referido al caso concreto de los pastos.

El Profesor Gaspar González es doctor en veterinaria y Académico de Número de las Reales Academias Nacional de Farmacia y de Doctores de España.

* * *

Nos comunican que el Excmo. Señor don Benito del Castillo, Académico de Número, ha sido distinguido con los siguientes honores: Presidente Honorario del Comité Organizador del Congreso de COIFFA (Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia) y Visitante distinguido de la Ciudad de Cajamarca (Perú), en el mes de mayo, y Miembro de Número (Honorario extranjero) de la Academia Boliviana de Historia de la Medicina, Capítulo Chuquisaca, Benefactor de la Facultad de Ciencias Químico-Farmacéuticas y Bioquímicas de la «Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca», Sucre (Bolivia), Organizador y Expositor del Curso Internacional de Formación Continua en el Área de Farmacia, Sucre (Bolivia), Reconocimiento de la Carrera de Farmacia de la Universidad Autónoma «Gabriel René Moreno», Facultad de Ciencias de la Salud Humana, Santa Cruz de la Sierra (Bolivia), Medalla Mariscal Andrés de Santa Cruz en Grado de Servicio por la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz (Bolivia) y Redactor y Firmante de la Declaración de Sucre, para la creación de la Federación de Carreras y Facultades de Farmacia de Bolivia, durante el mes de julio.

* * *

En el Congreso Internacional de Historia de la Farmacia, celebrado en Viena (Austria), del 16 al 19 de septiembre de 2009, María del Carmen Francés Causapé, Académica de Número, ha sido galardo-

nada con la Schelenz Plakette en reconocimiento a su prestigio mundial, dada la excelencia en su trayectoria profesional en este campo científico. Se da la circunstancia que sólo otro español, Guillermo Folch Jou, y Académico de Número, recibió este premio en el año 1982.

* * *

El Doctor Wolf-Dieter Müller-Jahncke, Académico Correspondiente en Alemania, ha recibido en el Congreso Internacional de Historia de la Farmacia, celebrado en Viena del 16 al 19 de septiembre, los siguientes galardones por este orden: Schelenz Plakette, Carmen Francés Medal, Urdang Medal y Cestoni Medal.

* * *

Los días 13, 15, 19 y 20 de octubre se celebró en el Instituto de España el Curso «Células madre y terapia regenerativa», coordinado por María Cascales Angosto, de la Real Academia Nacional de Farmacia, y Flora de Pablo, Profesora de Investigación del CSIC.

* * *

El 13 de octubre, el Secretario de la Academia Nacional de Farmacia, Doctor Doadrio Villarejo, impartió una conferencia sobre el calentamiento global en el Ateneo de Madrid. En su intervención mostró pruebas de un inequívoco calentamiento del planeta y advirtió sobre la problemática que para el ser humano tendría un cambio climático brusco, aunque expresó que no debería ocurrir en el presente siglo.

* * *

El 25 de noviembre la Real Academia Nacional de Farmacia, el Instituto Tomás Pascual y el COF de Madrid, organizaron la Jornada sobre la recomendación de hábitos de vida saludable y el ejercicio físico desde la Oficina de Farmacia orientada al profesional farmacéutico de oficina de farmacia, que tuvo lugar en la sede de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Nuestro Académico de Número, Excmo. Señor don Bartolomé Ribas Ozonas, impartió una conferencia en la sede de la Real Academia Nacional de Medicina, el pasado 22 de octubre, sobre: «Metalotioneína y elementos minerales en la osteoporosis» en la conmemoración del Día Mundial de la OMS de la Osteoporosis. El Doctor Ribas es Doctor en Farmacia y licenciado en Medicina y el actual tesorero de nuestra Corporación. Su investigación sobre las metalotioneínas tiene una gran repercusión internacional.

* * *

El Instituto Tomás Pascual para la Nutrición y la Salud, la Real Academia Nacional de Farmacia y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, organizaron en la sede de la RANF, el 27 de octubre, una jornada sobre: «Dietas mágicas, mitos y realidades», con la intervención de las catedráticas de nutrición de la Universidad Complutense, Rosa Ortega y Esperanza Torija. El evento contó con una alta asistencia, especialmente de la clase profesional farmacéutica con oficina de farmacia.

* * *

La Doctora María Cascales Angosto, Académica de Número de esta Institución, participó el pasado 12 de noviembre, en la IV Jornada Farmacéutica en la Universidad Autónoma de Hidalgo (México), por invitación especial del Director del Instituto de Ciencias de la Salud de dicha Universidad. La Doctora Cascales versó sobre el tema: «¿Envejecen las células madre?»

En la sesión de la tarde se presentó el libro «Los antioxidantes y las enfermedades crónico-degenerativas», en el cual la Doctora Cascales escribió tres capítulos.

ÍNDICES DEL AÑO 2009

- I. ÍNDICE DE AUTORES**
- II. ÍNDICE DE MATERIAS**

Índice de autores

- ACEVES PASTRANA, P.—Véase SCHIFTER ACEVES, L.—**Pág. 923**
- AGUIAR, J.—Véase ÁLVAREZ, J. L.—**Pág. 365**
- ALONSO BEATO, M. T.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 799**
- ÁLVAREZ, J. L.; GIL, R.; AGUIAR, J.; ZINSOU, C., GIL, A.—Implementing a dispensary in a rural area in Benin. Comparison between the new private centre and the old public centre's consultation.—**Pág. 365**
- AMOR MORALES, A.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 799**
- ARAGÓN FERNÁNDEZ, J.; GONZÁLEZ SANTOS, R., FUENTES ESTÉVEZ, G.—Cinética de liberación de cefalexiana desde un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃.—**Pág. 345**
- AUNIS, D.—Véase GOUMON, Y.—**Pág. 389**
- BÁEZ, J. C.—Véase LÓPEZ-RODAS, V.—**Pág. 883**
- BASANTE POL, R.—Andrés Alcón (1782-1850): semblanza de un farmacéutico decimonónico comprometido con la sociedad española.—**Pág. 577**
- BENITO DE LAS HERAS, M.—Véase OTERO, Y. F.—**Pág. 5**
- CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A.—El virus de la gripe aviar: nuevos aspectos relativos a su patogenicidad y a estrategias para combatirlo.—**Pág. 233**
- CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO, J. A.—La nueva gripe A/H1N1 o gripe A/H1N1 (2009).—**Pág. 947**
- CABRERA FIGUEROA, S.; VALVERDE MERINO, M. P.; GARCÍA SÁNCHEZ, M. J.; SÁNCHEZ MARTÍN, A.; GONZÁLEZ MARTÍN, M. C.—Intervención farmacéutica en el seguimiento de la terapia anti-retroviral.—**Pág. 43**
- CARRERA-MARTÍNEZ, D.—Véase LÓPEZ-RODAS, V.—**Pág. 883**
- CASAS, J. D.—Véase DOADRIO, A. L.—**Pág. 217**
- CASCALES ANGOSTO, M.—Dieta hipocalórica y longevidad.—**Pág. 273**
- COLAPINTO, L.—La vida y obra de Carlo Erba, pionero de la industria farmacéutica italiana.—**Pág. 679**
- COSTAS, E.—Véase LÓPEZ-RODAS, V.—**Pág. 883**
- CROOKE, A.—Véase MEDIERO, A.—**Pág. 901**

- DE LA ROSA JORGE, M. C.; PINTADO GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, C.; MOSSO ROMEO, M. A.—Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres.—**Pág. 763**
- DEL CASTILLO GARCÍA, B.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López.—**Pág. 145**
- DEL RÍO ÁLVAREZ, L. A.—Véase PÉREZ-HERNANDO, E.—**Pág. 911**
- DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M. T.; MORENO FRIGOLS, J. L.—Mono and biexponential models in radioimmunoassay of insulin.—**Pág. 25**
- DOADRIO, A. L.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada.—**Pág. 315**
- DOADRIO, A. L.; MADRIGAL, P.; CASA, J. D.—(Cu)II *in vivo* interaction with cefotaxime.—**Pág. 217**
- DOMÍNGUEZ CARMONA, M.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera.—**Pág. 113**
- ESTEBAN RODRÍGUEZ, M.—Un Nobel esperado: descubrimiento de los agentes causales del SIDA y cáncer cervical.—**Pág. 77**
- ESTEVA DE SAGRERA, J.—La farmacia española durante la Guerra de la Independencia (1808-1812).—**Pág. 513**
- FERRER MONTIEL, A.—Inflamación neurogénica: mecanismos y oportunidades dermocosméticas.—**Pág. 255**
- FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C.—La conservación de la salud.—**Pág. 497**
- FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C.; LÓPEZ GONZÁLEZ, M.—El Balneario de Alicún de las Torres (Granada). Historia y Generalidades.—**Pág. 711**
- FRANCÉS CAUSAPÉ, M. C.; RODRÍGUEZ DE LA TORRE, F.—Un villancico con numerosas plantas medicinales (Santa Fe de Bogotá, Colombia, ca. 1722).—**Pág. 639**
- FUENTES ESTÉVEZ, G.—Véase ARAGÓN FERNÁNDEZ, J.—**Pág. 345**
- GALVÁN RAMÍREZ, Y.—Véase MANTERO SÁENZ, F. J.—**Pág. 781**
- GARCÍA-ÍÑIGO, F. J.—Véase MENOLASINA, S.—**Pág. 373**
- GARCÍA MATA, M.—Véase TORIJA ISASA, M. E.—**Pág. 737**
- GARCÍA SÁNCHEZ, M. J.—Véase CABRERA FIGUEROA, S.—**Pág. 43**
- GASCÓ LEONARTE, C.—Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.—**Pág. 753**

- GIL, A.—Véase ÁLVAREZ, J. L.—**Pág. 365**
- GIL, R.—Véase ÁLVAREZ, J. L.—**Pág. 365**
- GONZÁLEZ IGLESIAS, F. J.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 799**
- GONZÁLEZ MARTÍN, M. C.—Véase CABRERA FIGUEROA, S.—**Pág. 43**
- GONZÁLEZ SANTOS, R.—Véase ARAGÓN FERNÁNDEZ, J.—**Pág. 345**
- GOUMON, Y.; LAUX, A.; MULLER, A.; AUNIS, D.—Central and peripheral endogenous morphine.—**Pág. 389**
- HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.; SUÁÑEZ FIDALGO, A. M.; GASCÓ LEONARTE, C.; ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.; TRINIDAD RUIZ, J. A.; SIMÓN ARAUZO, M. A.—Análisis de la radiactividad en aguas del Balneario de Alicún de las Torres.—**Pág. 753**
- JIMÉNEZ, R.—Véase MONTURIOL, F.—**Pág. 831**
- JIMÉNEZ TORRES, N. V.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada.—**Pág. 310**
- LACADENA, J. R.—El premio Nobel de Fisiología o Medicina 2008: deshaciendo el nudo gordiano. El premio Nobel de Química 2008: otra herramienta genética al servicio de la ciencia.—**Pág. 65**
- LADERO ÁLVAREZ, M.; AMOR MORALES, A.; LUENGO UGIDOS, M. A.; SANTOS BOBILLO, M. T.; ALONSO BEATO, M. T.; SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, M. E.; GONZÁLEZ IGLESIAS, F. J.; LADERO SANTOS, I.; VALLE TENDE-RO, F.—Vegetación del entorno del Balneario de Alicún de las Torres (Granada).—**Pág. 799**
- LADERO SANTOS, I.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 799**
- LAUX, A.—Véase GOUMON, Y.—**Pág. 389**
- LÓPEZ GONZÁLEZ, M.—Véase FRANCÉS CUASAPÉ, M. C.—**Pág. 711**
- LÓPEZ-RODAS, V.; CARRERA-MARTÍNEZ, D.; SALGADO, E.; MATEOS-SANZ, A.; BÁEZ, J. C.; COSTAS, E.—A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Río Negro, Argentina.—**Pág. 883**
- LÓPEZ-RUIZ, B.—Véase MENO-LASINA, S.—**Pág. 373**
- LOZANO FERNÁNDEZ, R.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Antonio Doadrío López.—**Pág. 137**
- LUCAS LOZANO, J. J.—El descubrimiento de las proteínas fluorescentes y su utilidad en

- la investigación biomédica.—**Pág. 99**
- LUENGO UGIDOS, M. A.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 799**
- MADRIGAL, P.—Véase DOADRIO, A. L.—**Pág. 217**
- MANTERO SÁENZ, F. J.; GALVÁN RAMÍREZ, Y.—Climatología del Balneario de Alicún de las Torres.—**Pág. 781**
- MARTÍN-FERNÁNDEZ, B.—Véase MENOLASINA, S.—**Pág. 373**
- MATEOS-SANZ, A.—Véase LÓPEZ-RODAS, V.—**Pág. 883**
- MEDIERO, A.; CROOKE, A.; PINTOR, J.—Over-expression of P2Y₂ receptor after silencing in corneal wound healing.—**Pág. 901**
- MENOLASINA, S.; MARTÍN-FERNÁNDEZ, B.; GARCÍA-ÍÑIGO, F. J.; LÓPEZ-RUIZ, B.—Comportamiento electroquímico de la dopamina en un electrodo de carbón vítreo modificado con laponita/glutaraldehído.—**Pág. 373**
- MIRAS PORTUGAL, M. T.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Antonio Doadrío López.—**Pág. 161**
- MIRAS PORTUGAL, M. T.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada.—**Pág. 324**
- MONTURIOL, F.; JIMÉNEZ, R.—Los suelos presentes en el Balneario de Alicún de las Torres.—**Pág. 831**
- MORENO FRIGOLS, J. L.—Véase DÍEZ MONTORO, R.—**Pág. 25**
- MOSSO ROMEO, M. A.—Véase DE LA ROSA JORGE, M. C.—**Pág. 763**
- MULLER, A.—Véase GOUMON, Y.—**Pág. 389**
- NAVARRO GALLO, J. A.—La Farmacia militar española durante la Guerra de la Independencia.—**Pág. 593**
- NOMBELA CANO, C.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada.—**Pág. 304**
- ORZÁEZ VILLANUEVA, M. T.—Véase TORIJA ISASA, M. E.—**Pág. 737**
- OTERO, Y. F.—Nuevo modelo celular para el estudio de la señalización de insulina en miocardio.—**Pág. 5**
- PASCUAL-LEONE PASCUAL, A. M.—Diferenciación sexual: el factor de Jost.—**Pág. 419**
- PÉREZ-HERNANDO, E.; DEL RÍO ÁLVAREZ, L. A.—Formulación de soluciones oftálmicas de ciclosporina en colirio al 2 por 100 para la práctica clínica.—**Pág. 911**
- PINTADO GARCÍA, C.—Véase DE LA ROSA JORGE, M. C.—**Pág. 763**
- PINTOR, J.—Véase MEDIERO, A.—**Pág. 901**

- PUERTO SARMIENTO, F. J.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López.—**Pág. 127**
- PUERTO SARMIENTO, F. J.—La ciencia durante la Ilustración y la Guerra de la Independencia.—**Pág. 527**
- PUERTO SARMIENTO, F. J.—Véase SCHIFTER ACEVES, L.—**Pág. 923**
- RODRÍGUEZ DE LA TORRE, F.—Véase FRANCÉS CAUSAPE, M. C.—**Pág. 639**
- RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, C.—Véase DE LA ROSA JORGE, M. C.—**Pág. 763**
- ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.—Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.—**Pág. 753**
- SALABERT SALVADOR, M. T.—Véase DÍEZ MONTORO, R.—**Pág. 25**
- SALGADO, E.—Véase LÓPEZ-RODAS, V.—**Pág. 883**
- SAN MARTÍN BACAICOA, J.; VALERO CASTEJÓN, A.—Estudio de la acción terapéutica de las aguas del Balneario de Alicún de las Torres (Granada).—**Pág. 849**
- SÁNCHEZ MARTÍN, A.—Véase CABRERA FIGUEROA, S.—**Pág. 43**
- SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, M. E.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 799**
- SANTOS BOBILLO, M. T.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 799**
- SANZ PÉREZ, B.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera.—**Pág. 467**
- SCHIFTER ACEVES, L.; PUERTO SARMIENTO, J.; ACEVES PASTRANA, P.—Las farmacopeas de México y Estados Unidos en el Nuevo Milenio: paralelismos y divergencias.—**Pág. 923**
- SIMÓN ARAUZO, M. A.—Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.—**Pág. 753**
- SUÁÑEZ FIDALGO, A. M.—Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.—**Pág. 753**
- TENORIO SANZ, M. D.—Véase TORIJA ISASA, M. E.—**Pág. 737**
- TORIJA ISASA, E.—La alimentación en la época de la Guerra de la Independencia.—**Pág. 613**
- TORIJA ISASA, M. E.; ORZÁEZ VILLANUEVA, M. T.; GARCÍA MATA, M.; TENORIO SANZ, M. D.—Análisis físico-químico de las aguas del Balneario de Alicún de las Torres.—**Pág. 737**
- TRINIDAD RUIZ, M. A.—Véase HERAS ÍÑIGUEZ, M. C.—**Pág. 753**

VALERO CASTEJÓN, A.—Véase
SAN MARTÍN BACAICOA, J.—
Pág. 849

VALLE TENDERO, F.—Véase
LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág.**
799

VALVERDE MERINO, M. P.—
Véase CABRERA FIGUEROA,
S.—**Pág. 43**

ZINSOU, C.—Véase ÁLVAREZ, J.
L.—**Pág. 365**

Índice alfabético de materias

- ACC.—Pág. 5
Ácidos grasos.—Pág. 5
Adaptación.—Pág. 883
Adherencia.—Pág. 43
Agua minero-medicinal.—Págs. 711, 849
Aguas mineromedicinales.—Pág. 737
Ajustes posológicos.—Pág. 43
Alcaloide.—Pág. 389
Alicún de las Torres.—Págs. 711, 799
Alimentos.—Págs. 613, 679
Ambulatorios.—Pág. 365
AMPK.—Pág. 5
Analgésia.—Pág. 389
Análisis físico-químico.—Pág. 737
Andrés Alcón.—Pág. 577
Ap₄A.—Pág. 901
Archivo musical.—Pág. 639
Atención farmacéutica.—Pág. 43
Balneario.—Págs. 711, 849
Balneario Alicún de las Torres.—Págs. 737, 763, 849
Balneoterapia.—Pág. 849
Bioclimatología.—Pág. 781
Biodiversidad.—Pág. 763
Biomateriales.—Pág. 345
Biotapetes.—Pág. 763
Calidad.—Pág. 911
Canales TRP.—Pág. 255
Canales Wolff y Müller.—Pág. 419
Características.—Pág. 639
Características y propiedades.—Pág. 831
Carlo Erba.—Pág. 679
Cardiomiocitos.—Pág. 5
Cefotaxima.—Pág. 217
Chlamydomonas dinobryonis.—Pág. 883
Cicatrización corneal.—Pág. 901
Cinética.—Pág. 25
Citocinas.—Pág. 233
Cobre(II).—Pág. 217
Concentración.—Pág. 25
Confort.—Pág. 781
Crisis de subsistencia.—Pág. 613
Cuidados médicos urgentes.—Pág. 365
Desinfección.—Pág. 497
Dieta hipocalórica.—Pág. 273
Difusión Fickian.—Pág. 345
Dopamina.—Pág. 373
Ejército.—Pág. 497
Electrodos de carbón vítreo modificado.—Pág. 373
Enseñanzas.—Pág. 513
Envejecimiento.—Pág. 273
Epidermis.—Pág. 255
España.—Pág. 799
Estatinas.—Pág. 233
Estatutos biofarmacéuticos.—Pág. 923
Factores y procesos de formación.—Pág. 831
Facultades de Farmacia.—Pág. 513
Farmacia.—Pág. 513

- Farmacia Militar.—**Pág. 593**
 Farmacéuticos.—**Págs. 513, 711**
 Farmacocinética.—**Pág. 217**
 Farmacodinamia.—**Pág. 217**
 Farmacopeas.—**Pág. 513**
 Fitosociología.—**Pág. 799**
 Fitoterapéutica.—**Pág. 923**
 Formulario Nacional.—**Pág. 911**
 Fuerza Iónica.—**Pág. 25**
 Genes.—**Pág. 419**
 Glucosa.—**Pág. 5**
 Granada.—**Pág. 799**
 Gripe A.—**Pág. 947**
 Gripe A/H1N1.—**Pág. 947**
 Gripe aviar.—**Pág. 233**
 Gripe de América del Norte.—
Pág. 947
 Gripe de California.—**Pág. 947**
 Gripe de origen porcino.—**Pág.**
947
 Gripe «mexicana».—**Pág. 947**
 Gripe porcina.—**Pág. 947**
 Gripe 1918-19.—**Pág. 233**
 Guerra de la Independencia.—
Págs. 527, 577, 593, 613
 Hambre.—**Pág. 613**
 Hierbas medicinales citadas.—
Pág. 639
 Higiene.—**Pág. 497**
 Hipotálamo.—**Pág. 419**
 Historia de la Ciencia.—**Pág. 527**
 Historia de la Farmacia.—**Págs.**
527, 577
 Hormona anti-Müllerian (AMH).—
Pág. 419
 HPLC.—**Pág. 217**
 Ilustración en España.—**Pág.**
527
In vitro.—**Pág. 345**
 Industria farmacéutica en Ita-
 lia.—**Pág. 679**
 Influenza aviar.—**Pág. 233**
 Inmunocomplejo.—**Pág. 25**
 Legislación.—**Pág. 513**
 Manantiales termales.—**Pág. 763**
 Medicamentos.—**Pág. 679**
 Microalgas.—**Pág. 883**
 Microbiota autóctona.—**Pág. 763**
 Mitocondria.—**Pág. 273**
 Monitorización de concentracio-
 nes plasmáticas.—**Pág. 43**
 Morfina.—**Pág. 389**
 Morfina-6-Glucorónido.—**Pág.**
389
 Napoleón.—**Pág. 593**
 Nociceptor.—**Pág. 255**
 Organización y administración
 de los servicios sanitarios.—
Pág. 365
 Pacientes.—**Pág. 711**
 Países en vías de desarrollo.—
Pág. 365
 Patogenicidad.—**Pág. 233**
 Periodo de semidesintegración.—
Pág. 753
 Plantas medicinales.—**Pág. 923**
 Productos químicos.—**Pág. 679**
 Propiedades.—**Pág. 639**
 P2Y₂.—**Pág. 901**
 Química.—**Págs. 513, 577**
 Radiactividad.—**Pág. 753**
 Radionucleido.—**Pág. 753**
 Reacción de sustitución.—**Pág.**
25
 Receptor opioide μ .—**Pág. 389**
 Reinado de José I.—**Pág. 527**
 Resveratrol.—**Pág. 273**
 Salud.—**Pág. 497**

- Santa Fe de Bogotá (Colombia).—**Pág. 639**
Scenedesmus obtusus.—**Pág. 883**
 Seguridad.—**Pág. 911**
 Sensibilización.—**Pág. 255**
 Series radiactivas.—**Pág. 753**
 Siglo XVIII.—**Pág. 527**
 Siglo XIX.—**Págs. 527, 577**
 Siglos XIX-XX.—**Pág. 679**
 siRNA.—**Pág. 901**
 Sirtuinas.—**Pág. 273**
 Sistema de liberación.—**Pág. 345**
 Sistema inmune.—**Pág. 255**
 Solubilización.—**Pág. 911**
 Suelos.—**Pág. 831**
Symploca dubia.—**Pág. 883**
 Testículos.—**Pág. 419**
 Testosterona.—**Pág. 419**
 Temperatura.—**Pág. 25**
 Temperatura efectiva.—**Pág. 781**
 Tirosinasa.—**Pág. 373**
 Uso del suelo.—**Pág. 831**
 Vacunas anti-gripe aviar.—**Pág. 233**
 Vegetación.—**Pág. 799**
 Vehículos.—**Pág. 911**
 Vertidos de petróleo.—**Pág. 883**
 VIH.—**Pág. 43**
 Villancico a Santa Teresa, *circa* 1722.—**Pág. 639**
 Viscosidad.—**Pág. 25**
 Voltamperometría cíclica.—**Pág. 373**

RELACIÓN DE PUBLICACIONES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

1. Publicaciones Periódicas

1.1. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*

Tomo I, Año 1932, núms. 1-4
Tomo II, Año 1933, núms. 1-4
Tomo III, Año 1934, núms. 1-4
Tomo IV, Año 1935, núms. 1-4
Tomo V, Año 1936, núms. 1-4
2.^a Época (Año VI), Tomo I, Año 1940, núms. 1-6
2.^a Época (Año VII), Tomo II, Año 1941, núms. 1-6
2.^a Época (Año VIII), Tomo III, Año 1942, núms. 1-6
Año IX, 1943, núms. 1-6
Año X, 1944, núms. 1-6
Año XI, 1945, núms. 1-4
Año XII, 1946, núms. 1-4
Año XIII, 1947, núms. 1-6
Año XIV, 1948, núms. 1-6
Año XV, 1949, núms. 1-6
Año XVI, 1950, núms. 1-6
Año XVII, 1951, núms. 1-6
Año XVIII, 1952, núms. 1-6
Año XIX, 1953, núms. 1-6
Año XX, 1954, núms. 1-6
Año XXI, 1955, núms. 1-6
Año XXII, 1956, núms. 1-6
Año XXIII, 1957, núms. 1-6
Año XXIV, 1958, núms. 1-6
Año XXV, 1959, núms. 1-6
Volumen XXVI, Año 1960, núms. 1-6
Volumen XXVII, Año 1961, núms. 1-6
Volumen XXVIII, Año 1962, núms. 1-6
Volumen XXIX, Año 1963, núms. 1-6
Volumen XXX, Año 1964, núms. 1-6

Volumen XXXI, Año 1965, núms. 1-6
Volumen XXXII, Año 1966, núms. 1-6
Volumen XXXIII, Año 1967, núms. 1-4
Volumen XXXIV, Año 1968, núms. 1-4
Volumen XXXV, Año 1969, núms. 1-4
Volumen XXXVI, Año 1970, núms. 1-4
Volumen XXXVII, Año 1971, núms. 1-4
Volumen XXXVIII, Año 1972, núms. 1-4
Volumen XXXIX, Año 1973, núms. 1-4
Volumen XL, Año 1974, núms. 1-4
Volumen XLI, Año 1975, núms. 1-4
Volumen XLII, Año 1976, núms. 1-4
Volumen XLIII, Año 1977, núms. 1-4
Volumen XLIV, Año 1978, núms. 1-4
Volumen XLV, Año 1979, núms. 1-4
Volumen XLVI, Año 1980, núms. 1-4
Volumen XLVII, Año 1981, núms. 1-4
Volumen XLVIII, Año 1982, núms. 1-4
Volumen XLIX, Año 1983, núms. 1-4
Volumen L, Año 1984, núms. 1-4
Volumen LI, Año 1985, núms. 1-4
Volumen LII, Año 1986, núms. 1-4
Volumen LIII, Año 1987, núms. 1-4
Volumen LIV, Año 1988, núms. 1-4
Volumen LV, Año 1989, núms. 1-4
Volumen LVI, Año 1990, núms. 1-4
Volumen LVII, Año 1991, núms. 1-4
Volumen LVIII, Año 1992, núms. 1-4
Volumen LIX, Año 1993, núms. 1-4
Volumen LX, Año 1994, núms. 1-4 y apéndice
Volumen LXI, Año 1995, núms. 1-4 y apéndice
Volumen LXII, Año 1996, núms. 1-4
Volumen LXIII, Año 1997, núms. 1-4
Volumen LXIV, Año 1998, núms. 1-4
Volumen LXV, Año 1999, núms. 1-4 y extraordinario
Volumen LXVI, Año 2000, núms. 1-4
Volumen LXVII, Año 2001, núms. 1-4 y extraordinario
Volumen LXVIII, Año 2002, núms. 1-4 y extraordinario
Volumen LXIX, Año 2003, núms. 1-4 y extraordinario

Volumen LXX, Año 2004, núms. 1-4 y extraordinario
Volumen LXXI, Año 2005, núm. 1-4
Volumen LXXII, Año 2006, núms. 1-4 y extraordinario
Volumen LXXIII, Año 2007, núms. 1-4 y extraordinario
Volumen LXXIII, Año 2008, núms. 1-4 y extraordinario
Volumen LXXIV, Año 2009, núms. 1-4 y 2 extraordinarios

Agotados los años desde 1932 a 1969 completos.

Agotado núm. 2, Año 1977. Vol. XLIII; núms. 1 y 2, Año 1978.
Vol. XLIII; núm. extraordinario, Año 2002. Vol. LXVIII.

1.2. Anuarios

- Anuario núm. 1, Año 1948
- Anuario núm. 2, Año 1949
- Anuario núm. 3, Año 1950
- Anuario núm. 4, Año 1951
- Anuario núm. 5, Año 1952
- Anuario núm. 6, Año 1953
- Anuario núm. 7, Año 1954
- Anuario núm. 8, Año 1955
- Anuario núm. 9, Año 1956
- Anuario núm. 10, Año 1957
- Anuario núm. 11, Año 1958
- Anuario núm. 12, Año 1959
- Anuario núm. 13, Año 1960
- Anuario núm. 14, Año 1961
- Anuario núm. 15, Año 1962
- Anuario núm. 16, Año 1963
- Anuario núm. 17, Año 1964
- Anuario núm. 18, Año 1965
- Anuario núm. 19, Año 1966
- Anuario núm. 20, Año 1967
- Anuario núm. 21, Año 1968
- Anuario núm. 22, Año 1969
- Anuario núm. 23, Año 1970
- Anuario núm. 24, Año 1971
- Anuario núm. 25, Año 1972

- Anuario núm. 26, Año 1973
- Anuario núm. 27, Año 1974
- Anuario núm. 28, Año 1975
- Anuario núm. 29, Año 1976
- Anuario núm. 30, Año 1977
- Anuario núm. 31, Año 1978
- Anuario núm. 32, Año 1979
- Anuario núm. 33, Año 1980
- Anuario núm. 34, Año 1981
- Anuario núm. 35, Año 1982
- Anuario núm. 36, Año 1983
- Anuario núm. 37, Año 1984
- Anuario núm. 38, Año 1985
- Anuario núm. 39, Año 1986
- Anuario núm. 40, Año 1987
- Anuario núm. 41, Año 1988
- Anuario núm. 42, Año 1989
- Anuario núm. 43, Año 1990
- Anuario núm. 44, Año 1991
- Anuario núm. 45, Año 1992
- Anuario núm. 46, Año 1993
- Anuario núm. 47, Año 1995
- Anuario núm. 48, Año 1996
- Anuario núm. 49, Año 1997
- Anuario núm. 50, Año 1998
- Anuario núm. 51, Año 1999
- Anuario núm. 52, Año 2000
- Anuario núm. 53, Año 2001
- Anuario núm. 54, Año 2002
- Anuario núm. 55, Año 2003
- Anuario núm. 56, Año 2004
- Anuario núm. 57, Año 2005
- Anuario núm. 58, Año 2006
- Anuario núm. 59, Año 2007
- Anuario núm. 60, Año 2008
- Anuario núm. 61, Año 2009

Agotados núms. 1 al 27 (1948-1974); núm. 31 (1978); núm. 33 (1980); núm. 52 (2000).

2. Monografías

2.1. *Monografías de Aguas Mineromedicinales*

Caldelas de Tuy (Agotada)	1968
Caldas de Cuntis	1974
Montemayor (Agotada)	1975
Corconte (Agotada)	1976
Ledesma (Agotada)	1977
Solán de Cabras (Primera edición agotada)	1978
(Segunda edición) (Agotada)	1980
Lanjarón	1980
Carabaña	1981
Alhama de Aragón	1983
Caldas de Montbui	1984
Fuente Amarga de Chiclana de la Frontera	1985
Archena	1986
Fortuna	1987
Arnedillo	1988
Caldas de Bohi	1989
Alange	1990
El clima en algunos balnearios	1990
Fitero	1991
La Toja	1993
Lugo	1994
Blancafort	1995
Hervideros de Cofrentes	1998
Carratraca	1999
El Paraíso de Manzanera	2001
Alhama de Granada (Agotada)	2002
Balneario de Jaraba (Agotada)	2004
Balneario de Cervantes	2006
Balneario de Puente Viesgo	2007
Balneario de Valdelateja	2008
Balneario de Alicún de las Torres	2009

2.2. *Serie de monografías de actualización en Ciencias Farmacéuticas*

- «Diseño de medicamentos». Publicada en colaboración con Farmaindustria en 1994.
Coordinador: Doctor Arturo Mosqueira Toribio.
- «Proliferación celular y cáncer». Publicada en colaboración con la Asociación Española Contra el Cáncer en 1994.
Coordinadores: Doctora María Cascales y Doctor Julio Rodríguez Villanueva.
- «Autoinmunidad. Algunos aspectos básicos y clínicos». Publicada en colaboración con la Hermandad Farmacéutica del Mediterráneo en 1996.
Coordinador: Doctor Antonio Portolés Alonso.
- «Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo». Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia.
Coordinador: Doctora María Cascales Angosto.
- «Los residuos y sus riesgos para la salud». Publicada en colaboración con ENRESA, TEDEC-MEIJ I FARMA, CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1998.
Coordinador: Doctor Segundo Jiménez Gómez.
- «Alimentos y Salud», 2000.
Coordinador: Doctor Bernabé Sanz Pérez.
- «Salud, educación y energía. Recursos cualificados para el siglo XXI». Publicada en colaboración con ENRESA y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2001.
Coordinador: Doctor Segundo Jiménez Gómez.
- «Proliferación celular y cáncer, 2000». Publicada en colaboración con la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer, 2001.
Coordinador: Doctora María Cascales Angosto.
- «Antecedentes históricos de las Facultades de Ciencias Químicas, Biología y Farmacia de la Universidad de Salamanca», 2001.
Coordinador: Doctor José Antonio Cabezas Fernández del Campo.

- «La salud, prioridad en el VI Programa de Medio Ambiente de la Unión Europea». Foro de reflexión y difusión del conocimiento (29 de octubre a 8 de noviembre del 2001), 2002.
Coordinador: Doctor León Villanúa Fungairiño.
- «Bioquímica y fisiopatología del envejecimiento», 2003.
Coordinadores: Doctora María Cascales Angosto, Doctor José Antonio Cabezas Fernández del Campo y Doctor Pedro García Barreno.
- «Temas escogidos de Seguridad Alimentaria», 2003.
Coordinadores: Doctor Bernabé Sanz Pérez y Doctor Manuel Domínguez Carmona.
- «Citocromo P450», 2004.
Coordinadores: Doctora María Cascales Angosto y Doctora M.^a José Gómez Lechón.
- «Nuevos avances en medicamentos», 2004.
Coordinadores: Doctora M.^a Carmen Avendaño y Doctor Juan Tamargo Menéndez.
- «Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y el terrorismo», 2005.
Coordinador: Doctor Manuel Domínguez Carmona.
- «Las Ómicas: Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica. Nuevas tecnologías para el desarrollo de fármacos», 2005.
Coordinadores: Doctora María Cascales Angosto, Doctora M.^a José Gómez-Lechón y Doctor José E. O'Connor Blasco.
- «Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías», 2005.
Coordinador: Doctora Ana María Pascual-Leone Pascual.
- «Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: avances y perspectivas». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2006.
Coordinadores: Doctora María Vallet Regí y Doctor Antonio Luis Doadrio Villarejo.
- «Enfermedades metabólicas». Publicada en colaboración con CAJA MADRID, Fundación Ramón Areces y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2006.

Coordinadores: Doctor Federico Mayor Zaragoza y Doctora María Cascales Angosto.

- «Influenza aviar y gripe humana de origen aviario», 2006.
Coordinador: Doctor Bernabé Sanz Pérez.
- «Contaminación y salud». Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2007.
Coordinadores: Doctor Segundo Jiménez Gómez y Doctor Antonio L. Doadrio Villarejo.
- «Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas». Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, Fundación Ramón Areces, Instituto de España, 2008.
Coordinadores: Doctora Ana M.^a Pascual-Leone Pascual y Doctor José M.^a Medina.
- «Redes de señalización y estrategias terapéuticas». Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2009.
Coordinadores: Doctor José Miguel Ortiz Melón y Doctora María Cascales Angosto.
- «Avances en neurociencia: Neurotransmisores y patologías nerviosas». Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, 2009.
Coordinadores: Doctora María Teresa Miras Portugal y Doctor Antonio Rodríguez Artalejo.
- «José Celestino Mutis en el Bicentenario de su fallecimiento (1808-2008)». Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Coordinador: Doctor Bartolomé Ribas Ozonas, 2009.
- «Células madre y terapia regenerativa». Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, Fundación Vodafone España, 2009.

Coordinadores: Doctora Flora de Pablo Dávila y Doctora María Cascales Angosto.

- «Nanotecnología farmacéutica». Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2009. Coordinador: Doctor José Luis Vila Jato.

2.3. *Otras Monografías*

- Sesión Científica en homenaje al Excmo. Señor Don Rafael Roldán y Guerrero en el centenario de su nacimiento. Año 1989 (agotado).
- Número monográfico conmemorativo del II Centenario de la muerte de Lavoisier. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1994.
- Número monográfico sobre temas de Actualidad Farmacológica. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1995.
- Sesión Científica en homenaje a Severo Ochoa, 1996.
- «Ayer y hoy de las Academias». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «El genoma humano. Ciencia y ética». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «Toxicología ambiental». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «Farmacocinética». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «Biotecnologías aplicadas a la producción de medicamentos y vacunas». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «Patentes y biopatentes». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «Parasitismo y desarrollo». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.

- «Patogenia de iones metálicos». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «Uso actual de las plantas medicinales cultivadas». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «El uso ilegítimo de los agentes químicos». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «El SIDA. Un reto a la ciencia y a la sociedad». Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
- «Clausura de las Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas», 1996.
- «Investigación y siglo XXI». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
- «Prescripción, dispensación y evidencia científica (Medicina basada en la evidencia)». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
- «Las especialidades farmacéuticas genéricas y los precios de referencia». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia.
- «Genómica y farmacogenómica». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
- «La Universidad de hoy y los farmacéuticos de mañana». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
- «Infección por VIH y SIDA». Publicada en colaboración con SEISIDA (Sociedad Española Interdisciplinaria del SIDA); Instituto de Salud Carlos III; GlaxoSmithKline y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.
- «Farmacoeconomía e investigación de resultados en la salud. Principios y práctica». Publicada en colaboración con CAJA MA-

DRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2002.

Coordinador: Doctor Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y Doctor Javier Soto Álvarez.

- Sesión extraordinaria conmemorativa del centenario del nacimiento del Excmo. Señor Don José María Albareda Herrera. Coordinador: Antonio Portolés Alonso (separata del núm. 2; Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia), 2002.
- «Modificadores de la respuesta biológica». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2003.
- «Autocuidado de la Salud». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Coordinación: Asociación para el Autocuidado de la Salud (ANEFP), 2003.
- «Transferencias y coordinación farmacéutica». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2003.
- «Investigación y siglo XXI». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2003.
- «Síndrome agudo respiratorio grave y gripe aviar». Publicada en colaboración con la Real Academia Nacional de Medicina, 2004.
- Mesa Redonda: «Regeneración hepática». Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2006.
- Mesa Redonda: «El descubrimiento de nuevos fármacos en 2006». Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 2008.
- Mesa Redonda: «La seguridad en el paciente oncológico. Estándares internacionales para el manejo de citotóxicos». Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2009.

3. Facsímiles

- «Prontuario de química, farmacia y materia médica de Pedro Gutiérrez Bueno» (Madrid, 1815). Prologado por la Doctora M.^a del Carmen Francés Causapé, 1994.
- «Dissertacion hydraulico-pharmaceutica sobre el origen de las aguas de Hardales, su verdadero analysis chymico, y medicinales virtudes», de Juan José García (Málaga, 1759). Prologada por la Doctora M.^a del Carmen Francés Causapé, 1995.
- «Concordia Aromatariorum Caesaraugustanensium DDLIII». Prologada por la Doctora M.^a del Carmen Francés Causapé. Publicada con la colaboración de la Real Academia de Farmacia y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.
- Edición facsímil de los discursos pronunciados en la Real Academia de Farmacia por el Excmo. Señor Don José María Albareda Herrera, 2002.
- Edición facsímil del Diccionario Biográfico y Bibliográficos de Autores Farmacéuticos Españoles, por el Excmo. Señor Don Rafael Roldán y Guerrero. Tomo I. Presentación por el Doctor Don Antonio Portolés Alonso y prologado por la Doctora M.^a del Carmen Francés Causapé, 2003.

4. Sesiones necrológicas

- Excmo. Señor Don Enrique Otero Aenlle, 1992.
- Excmo. Señor Don Felipe Calvo y Calvo, 1992.
- Excmo. Señor Don Alfredo Carrato Ibáñez, 1995.
- Excmo. Señor Don Juan Manuel López de Azcona, 1996.
- Excmo. Señor Don Octavio Carpena Artés, 1997.
- Excmo. Señor Don Víctor Villanueva Vadillo, 1998.
- Excmo. Señor Don Eugenio Sellés Martí, 1998.
- Excmo. Señor Don Ángel Vian Ortuño, 2000.
- Excmo. Señor Don Arturo Mosqueira Toribio, 2000.
- Excmo. Señor Don Rafael Cadórniga Carro, 2000.
- Excmo. Señor Don Manuel Martel San Gil, 2001.
- Excmo. Señor Don Manuel Gómez-Serranillos, 2004.

- Excmo. Señor Don Pablo Sanz Pedrero, 2005.
- Excmo. Señor Don Gregorio González Trigo, 2005.
- Excmo. Señor Don León Villanúa Fungairiño, 2005.
- Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez, 2005.
- Excmo. Señor Don Segundo Jiménez Gómez, 2005.
- Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz, 2005.
- Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso, 2005.
- Excmo. Señor Don Emilio Fernández-Galiano, 2007.
- Excmo. Señor Don Eduardo Primo Yúfera, 2008.
- Excmo. Señor Don Gregorio Varela Mosquera, 2009.
- Excmo. Señor Don Antonio Doadrio López, 2009.
- Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, 2009.

5. Discursos leídos en las sesiones inaugurales de Curso

- «La vida *in vitro*», por el Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz. Año 1969. Agotado.
- «El alma de la Farmacia», por el Excmo. Señor Don Eugenio Sellés Martí. Año 1970. Agotado.
- «La contaminación del ambiente y su influencia en la vida», por el Excmo. Señor Don Juan Manuel López de Azcona. Año 1971.
- «Los medicamentos de ayer y de hoy», por el Excmo. Señor Don Guillermo Folch Jou. Año 1972.
- «La química médica ante el futuro», por el Excmo. Señor Don Ramón Madroñero Peláez. Año 1973.
- «La revolución farmacéutica», por el Excmo. Señor Don Manuel Jáuregui González. Año 1974.
- «Consideraciones sobre la crisis de energía y de materias primas», por el Excmo. Señor Don Víctor Villanueva Vadillo. Año 1975.
- «El problema de la creación de nuevos medicamentos», por el Excmo. Señor Don Arturo Mosqueira Toribio. Año 1976.
- «El Real Colegio de Farmacia de San Fernando», por el Excmo. Señor Don Guillermo Folch Jou. Año 1977. Agotado.
- «Momentos estelares del pensamiento científico», por el Excmo. Señor Don Enrique Otero Aenlle. Año 1978.

- «Problemas de la utilización de la microbiología con fines bélicos», por el Excmo. Señor Don Eliseo Gastón de Iriarte. Año 1979. Agotado.
- «La edafología como ciencia. El problema de las clasificaciones de suelos», por el Excmo. Señor Don Ángel Hoyos de Castro. Año 1980.
- «Consideraciones históricas sobre la porcelana», por el Excmo. Señor Don Vicente Aleixandre Ferrándiz. Año 1981.
- «Anecdotario microbiano», por el Excmo. Señor Don Lorenzo Vilas López. Año 1982.
- «Consideraciones sobre la evolución farmacognóstica», por el Excmo. Señor Don Manuel Gómez Serranillos. Año 1983.
- «Técnica y medio ambiente», por el Excmo. Señor Don Ángel Vian Ortuño. Año 1984.
- «Álvaro Alonso Barba. Un metalurgo del Siglo de Oro», por el Excmo. Señor Don Felipe Calvo y Calvo. Año 1985.
- «La ultracentrífuga de Svedberg. Un punto de partida de la Biología Molecular», por el Excmo. Señor Don Pablo Sanz Pedrero. Año 1986. Agotado.
- «La biosfera y el hombre», por el Excmo. Señor Don Emilio Fernández Galiano. Año 1987.
- «Del complejo droga a fármaco estructuralmente específico», por el Excmo. Señor Don Gregorio González Trigo. Año 1988.
- «Bases experimentales en la farmacología y terapéutica del dolor», por el Excmo. Señor Don Perfecto García de Jalón y Hueto. Año 1989.
- «El grave peligro de pensar», por el Excmo. Señor Don Román de Vicente Jordana. Año 1990.
- «La contaminación ambiental y sus consecuencias biológicas y climatológicas», por el Excmo. Señor Don Antonio Doadrio López. Año 1991.
- «Sistema Nervioso Central (SNC)», por el Excmo. Señor Don Alfredo Carrato Ibáñez. Año 1992.

- «El universo del medicamento», por el Excmo. Señor Don Rafael Cadórniga Carro. Año 1993.
- «Alimentación y cáncer», por el Excmo. Señor Don Manuel Ortega Mata. Año 1994.
- «Legislación y métodos en el control toxicológico de compuestos, residuos y vertidos», por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas. Año 1995.
- «Las plantas medicinales. Ejemplo de nuevo escenario en una clásica aproximación para el descubrimiento del medicamento», por el Excmo. Señor Don Antonio Monge Vega. Año 1996.
- «Impresiones sobre Severo Ochoa», por el Excmo. Señor Don Julio Rodríguez Villanueva. Año 1997.
- «Métodos cuánticos semiempíricos en el diseño de medicamentos», por el Excmo. Señor Don Arturo Mosqueira Toribio. Año 1998.
- «Farmacología de la inflamación», por el Excmo. Señor Don Domingo Espinós Pérez. Año 1999.
- «Moléculas y comunicación biológica», por el Excmo. Señor Don Manuel Ruiz Amil. Año 2000.
- «Supervivencia e individualidad en Biología», por el Excmo. Señor Don Antonio Portolés Alonso. Año 2001.
- «Proteínas del estrés. Implicaciones clínicas y objetivos terapéuticos», por la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto. Año 2002.
- «Terapéutica farmacológica en el anciano», por el Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. Año 2003.
- «La conservación del suelo. Base de su sostenibilidad y soporte de salud», por el Excmo. Señor Don Segundo Jiménez Gómez. Año 2004.
- «Avances en Geobotánica», por el Excmo. Señor Don Salvador Rivas Martínez. Año 2005.
- «Europa y globalización de la Sanidad», por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas. Año 2006.

- «El desarrollo de fármacos. A propósito de la insuficiencia cardiaca: luces, sombras, reflexiones y perspectivas», por el Excmo. Señor Don Juan Tamargo Menéndez. Año 2007.
- «Desarrollo de mamíferos a la luz de los conocimientos científicos actuales: su interés sanitario», por la Excma. Señora Doña Ana M.^a Pascual-Leone Pascual. Año 2008.
- «Consideraciones sobre creencias, farmacia y terapéutica», por la Excma. Señora Doña María del Carmen Francés Causapé. Año 2009.

6. Otras publicaciones

- «Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles», por el Excmo. Señor Don Rafael Roldán Guerrero. Tomo I, Año 1963. Agotado. Tomos II y III, año 1975. Tomo IV, año 1976.
- «Código Deontológico Farmacéutico». Editado por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Año 1991.
- «Estatutos y Reglamento de la Real Academia de Farmacia. Textos refundidos». Año 1992.
- «Tríptico explicativo de “El Museo de la Real Academia de Farmacia”». Año 1995.
- «Colección de tarjetas postales sobre el “Museo de la Real Academia de Farmacia”», por la Excma. Señora Doña M.^a del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1998.
- «Jornada sobre Atención Farmacéutica». Año 1998.
- «Avances de las ciencias a través del Premio Nobel», por el Excmo. Señor Don Ángel Santos Ruiz. Año 1998.
- «El Museo de la Real Academia de Farmacia», por la Excma. Señora Doña M.^a del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1999.

- «Historia de la Real Academia de Farmacia», por el Excmo. Señor Don Toribio Zúñiga Sánchez-Cerrudo. Revisado anotado e ilustrado por la Excma. Señora Doña M.^a del Carmen Francés Causapé. Año 2002.
- Lecturas Singulares 1: «Del corazón y la mente», por el Excmo. Señor Don Manuel Losada Villasante. Año 2005.
- Lecturas Singulares 2: «Recuerdo y desagravio a León Felipe», por el Excmo. Señor Don Mariano Turiel de Castro. Año 2006.
- Lecturas Singulares 3: «La Farmacia en tiempos de Miguel de Cervantes Saavedra». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2006.
- «Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas: Obdulio Fernández y Enrique Molés». Coordinador: Excmo. Señor Don Francisco González de Posada. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia y Amigos de la Cultura Científica. Academia de Ciencias e Ingeniería de Lanzarote. Año 2006.
- «En memoria de un maestro. Ángel Santos Ruiz». Editora: Doctora María Cascales Angosto. Año 2006.
- «Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas». Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2007.
- Lecturas Singulares 4: «Fe, esperanza y caridad en el mundo del medicamento: desde la Grecia clásica a la molecularidad del siglo XXI», por el Excmo. Señor Don Mario Sapag-Hagar. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2007.
- Lecturas Singulares 5: «Farmacia y Arte (Ligera visión de la pintura española a través de Goya, Velázquez y Murillo)», por el Excmo. Señor Don Guillermo Tena. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2007.

- «II Encuentro Iberoamericano de Academias de Farmacia (AIAF)». Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2007.
- Lecturas Singulares 6: «Breve historia de la experimentación animal», por el Excmo. Señor Don Alberto Giráldez Dávila. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2008.
- «Homenaje a José Celestino Mutis en el bicentenario de su fallecimiento». Sesión Científica coordinada por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2008.
- Lecturas Singulares 7: «El dilema de muchos españoles en 1808: ser leales a Fernando VII o colaboracionistas con José I», por el Excmo. Señor Don José Antonio Cabezas Fernández del Campo. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2009.
- «En el 250 aniversario del nacimiento de Vicente Cervantes (1758-1829): Relaciones científicas y culturales entre España y América durante la ilustración». Coordinadores: María Teresa Miras Portugal, Antonio González Bueno y Antonio Doadrio Villarejo. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2009.
- «La Triaca Magna». Discurso de Recepción de Académico de Número del Excmo. Señor Don Javier Puerto Sarmiento. Año 2009.
- «La Farmacia y la química: un país, dos culturas». Discurso de Recepción de Honor del Excmo. Señor Don José Elguero Bertolini. Año 2009.
- «Pharmacology of synaptic transmission: an electrophysiologist's view». Discurso de Recepción de Académico de Honor del Excmo. Sr. Erwin Neher. Año 2009.

