

## Conservación del semen bovino con 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-Furano (Bovine semen conservation with 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan)

**Enrique A. Silveira Prado,<sup>1</sup> Oraida González García<sup>1</sup> y Leopoldo Espinosa Véliz<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. 2.-Establecimiento Provincial de Inseminación Artificial. Villa Clara. Santa Clara. Cuba. Ver [curriculum](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/curriculum/esilveira.htm) y [contactar:](mailto:esilveira@cbq.uclv.edu.cu) <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/curriculum/esilveira.htm> ;  
[esilveira@cbq.uclv.edu.cu](mailto:esilveira@cbq.uclv.edu.cu), [esilveira@comunidad.veterinaria.org](mailto:esilveira@comunidad.veterinaria.org)

### RESUMEN

Se evaluó la eficacia del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (denominado G-1) —ingrediente farmacéutico activo de acción bactericida de amplio espectro y fungicida—, como sustituto de los antibióticos comúnmente utilizados en la preservación del semen bovino. Con este objetivo cada uno de 20 eyaculados se dividió en tres alícuotas (grupos A, B y C); al grupo A se le adicionó penicilina (1000 UI/mL) y estreptomycin (500 µg/mL) y a los grupos B y C concentraciones del G-1 de 5 y 10 µg/mL respectivamente. A las 24 horas post congelación se descongelaron pastillas de cada grupo y se evaluaron respecto a las características físicas y calidad higiénico-sanitaria según se encuentra establecido. En las condiciones del ensayo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de calidad evaluados entre los grupos A y C, por lo que se concluyó que el G-1 en concentraciones de 10 µg/mL posee una eficacia semejante a los antimicrobianos utilizados comúnmente con este fin.

**Palabras claves:** 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Conservación de semen bovino. Inseminación artificial. Penicilina. Estreptomycin.

### Abstract

The effectiveness of 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan (denominated G-1) —on active pharmaceutical ingredient having broad spectrum bactericide and fungicide activity— as a substitute of antibiotics commonly used to preserve bovine semen was evaluated. From this purpose each one of 20 ejaculations was divided into three aliquots (groups A, B and C). Penicillin (1000 IU/mL) and streptomycin (500 µg/mL) was added to group A and G-1 at a concentrations of 5 and 10 µg/mL to groups B and C respectively. Pills were defrosted 24 hours post freezing and their physical characteristics and hygienic-sanitary qualities were evaluated according to standard procedures. There were no statistically significant differences in the parameters evaluated between groups A and C. It was concluded that G-1 at a concentration of 10 µg/mL has an effectiveness similar to that of antimicrobials commonly used to preserve semen.

**Keys words:** 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan. Bovine semen conservation. Artificial insemination. Penicillin. Streptomycin.

## INTRODUCCION

El control bacteriológico del semen de bovino cobra un interés especial en la inseminación artificial, ya que si bien esta técnica constituye la vía más eficaz para mejorar, en sentido general, la explotación de los animales, se puede convertir en un factor de diseminación de microorganismos que pueden afectar en mayor o menor grado los indicadores de fertilidad cuando el eyaculado es portador de los mismos.<sup>[1]</sup>

La importancia de la contaminación bacteriana del eyaculado no está dada solamente por la patogenicidad de los gérmenes presentes sino también por el grado de contaminación. Por estas razones es importante en la práctica disminuir la multiplicación de las bacterias que pueden llegar a contaminar el semen estableciendo normas higiénico-sanitarias durante la recolección y la manipulación que la acompañan.<sup>[2-3]</sup>

Se conoce además que a pesar de todas las precauciones higiénicas tomadas durante la recolección y manipulación, las muestras espermáticas contienen siempre una cantidad variable de gérmenes contaminantes, capaces de tener una participación desfavorable sobre la conservación del semen o eventualmente sobre la fertilidad.<sup>[2,4-5]</sup> Con el fin de reducir la microflora seminal se estableció la adición de antibióticos al menestruo, práctica que a nuestro juicio, tiene varios inconvenientes: la competencia en el uso con el hombre, el desperdicio del sobrante no utilizado al preparar el menestruo y la creciente resistencia adquirida que muestran ciertas especies de bacterias, entre otros.

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (denominado G-1) es un compuesto de reconocida acción *in vitro* antibacteriana de amplio espectro y antifúngica,<sup>[6-8]</sup> sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, a partir del furfural, materia prima obtenida en Cuba de los residuos de la industria azucarera (bagazo).

La utilización del G-1 en sustitución de los antibióticos antes señalados puede ser una solución al problema de la conservación del semen bovino, por lo que nos dimos a la tarea de evaluar su eficacia al respecto.

## MATERIALES Y METODOS

Se tomaron 20 eyaculados de 7 sementales, 3 de la raza Holstein y 4 Siboney de Cuba, entre de 4 y 6 años edad y una masa corporal de  $900 \pm 100$  kg sometidos al mismo régimen de alimentación, manejo y explotación. El semen fue colectado por el método de la vagina artificial, calificado y posteriormente se fraccionó en tres alícuotas (grupos A, B y C) y se diluyó en el medio de Nagase y Niwa, según la metodología establecida para los Centros de Inseminación Artificial de Cuba.<sup>[9]</sup>

Al grupo A de cada eyaculado se le añadió penicilina (1000 UI/mL) y dihidroestreptomomicina (500  $\mu$ g/mL)<sup>[9]</sup> y a los grupos B y C, G-1 en cantidades de 5 y 10  $\mu$ g/mL respectivamente. Posteriormente las alícuotas se colocaron en la nevera a temperatura de  $3.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$  durante 3 a 5 h y luego se congelaron en vapores de nitrógeno líquido a  $-79^{\circ}\text{C}$ .

A las 24 h post-congelación se descongelaron pastillas de cada grupo y se determinó la carga bacteriana (UFC/mL) para su calificación en categorías sanitarias.<sup>[10]</sup> La presencia de *Pseudomonas* se determinó mediante siembra de 0.2 mL de semen fresco en dos tubos caldo glucosado y de cada fracción post congelación 0.1 mL en un tubo del mismo medio de cultivo, con incubación a 37°C durante 7 días.<sup>[9]</sup>

Los eyaculados utilizados reunieron los requisitos indispensables para ser diluidos y se determinó la motilidad por fracciones en cada eyaculado antes de la congelación y a las 24 h post-congelación.<sup>[9-10]</sup>

Los resultados fueron analizados estadísticamente según la prueba de comparación múltiple de proporciones y el cálculo de la dócima de Duncan, mediante un programa computadorizado.<sup>[11]</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSION

El volumen promedio de los eyaculados fue de 8.9 mL cifra que se encuentra por encima de la media para la raza Holstein. En el 75% de los eyaculados la motilidad fue  $\geq$  de 85% con evaluaciones de bueno y excelente. En el 90% de los eyaculados la densidad fue  $\geq$  de 85 y la concentración fue  $\geq$  de  $1 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup> en el 100% (Tabla 1). Este comportamiento es excelente para la conservación, aunque la capacidad de congelación del semen constituye un factor individual.<sup>[5]</sup>

**Tabla 1. Características físicas del semen fresco (resumen)**

Semental	Eyaculados	Volumen (mL)	Motilidad (%)	Densidad	Concentración (n x 10 <sup>6</sup> células/mL)
I	6	7.3	90-95	85-95	1,2-1,9
II	5	10.3	80-90	85-90	1,1-1,4
III	4	7.4	80-95	80-95	1,0-1,8
IV	2	11.3	80	85-90	1,2-1,5
V	1	6.0	90	85	1,2
VI	1	12.0	90	90	1,4
VII	1	13.5	80	80	1,0
Totales	20	8.9	80-95	80-95	1,0-1,9

Según los resultados de motilidad post-congelación y calidad sanitaria el número de UFC/mL no influyó sobre la motilidad espermática, siendo menor este importante indicador al adicionarse los antibióticos y el G-1. El 95,0% de los eyaculados fue apto para la inseminación artificial por

los resultados de supervivencia. En el grupo B, los eyaculados aptos según la calidad sanitaria ascendieron al 35,0% por lo que el efecto antibacteriano fue menor, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación a los grupos A y C, en que las

Silveira prado, Enrique; GOnzalez Garcia,oraida; Espinosa Veliz, Leopoldo; Conservación del semen bovino con 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano.- *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*®, ISSN 1695-7504, Vol.

VI, nº 09, Septiembre/2005, *Veterinaria.org*® - *Comunidad Virtual Veterinaria.org*® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090905.html>

proporciones de eyaculados aptos ascendió al 75,0% en ambos grupos, por lo que la adición de 10 µg de G-1/mL de menstuo ejerció un efecto semejante a la combinación penicilina-dihidroestreptomicina (Tabla 2).

**Tabla 2. Eyaculados aptos por motilidad y calidad sanitaria (resumen)**

Grupo	Motilidad		Calidad sanitaria	
	n	%	n	%
A	19	95.0 <sup>a</sup>	15	75.0 <sup>a</sup>
B	19	95.0 <sup>a</sup>	7	35.0 <sup>b</sup>
C	19	95.0 <sup>a</sup>	15	75.0 <sup>a</sup>

El 60% de las muestras del grupo A y el 70% del grupo C se clasificaron en las categorías sanitarias I y II (0 y 1 a 100 UFC/mL), sin diferencias estadísticamente significativas; solo el 25% de las muestras del grupo B se clasificaron en este rango, con diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos A y C (Tabla 3).

**Tabla 3. Clasificación en categorías sanitarias (resumen)**

Categoría sanitaria (UFC/mL)	Grupos					
	A		B		C	
	n	%	n	%	n	%
I 0	4	20.0 <sup>a</sup>	0	0.0 <sup>b</sup>	3	15.0 <sup>a</sup>
II 1 a 100	8	40.0 <sup>a</sup>	5	25.0 <sup>b</sup>	11	55.0 <sup>a</sup>
III 101 a 300	3	15.0	2	10.0	1	5.0
IV 301 a 500	0	0.0	0	0.0	0	0.0
V Más de 500	5	25.0 <sup>a</sup>	13	65.0 <sup>b</sup>	5	25.0 <sup>a</sup>

Aunque los grupos A y C no difirieron en la clasificación sanitaria del semen, la adición de 10 µg de G-1/mL potencialmente es mucho más eficaz que la combinación penicilina-dihidroestreptomicina, pues es conocido que los espectros de acción antibacteriana de éstos antibióticos son estrechos, el primero frente a bacterias Gram positivas y el segundo ante las Gram negativas; también se conoce la resistencia adquirida de numerosas especies bacterianas

a estos antibióticos, en general de gérmenes que tienen importancia en la contaminación seminal. Por el contrario, el G-1 es un compuesto de reconocida acción *in vitro* antimicrobiana con un amplio espectro de actividad frente a bacterias patógenas Gram positivas y negativas, levaduras y hongos filamentosos<sup>[6-8]</sup> y hasta el presente no parece afectarse por los mecanismos de resistencia encontrados en otras clases de agentes antimicrobianos.

A pesar de la existencia de nuevos y potentes antibióticos de síntesis y de la posible aparición de antibiótico-resistencia de algunos microorganismos ambientales, en Cuba, desde 1965 se utiliza la combinación penicilina-estreptomina añadida al medio de dilución de Nagase y Niwa para la congelación ultrarrápida del semen bovino en pastillas,<sup>[9]</sup> sin que aparentemente se halla producido una disminución de la efectividad antimicrobiana de los mismos. Recientemente Alba y Silveira<sup>[12]</sup> demostraron la perdurabilidad de la efectividad que aún mantiene la combinación penicilina-estreptomina en la eliminación de los microbios contaminantes normales del semen, a pesar del tiempo transcurrido desde su introducción en la práctica de preservación del semen bovino producido en los establecimientos de inseminación artificial de Cuba.

La perdurabilidad de la actividad contra gérmenes patógenos de la combinación penicilina-estreptomina a las dosis usuales fue señalada recientemente en Brasil.<sup>[13]</sup> Los investigadores observaron un 91,1% de inactivación después de la contaminación experimental del semen con *Leptospira santarosai* serovar *guaricura*, resultados muy superiores a los obtenidos con la Amoxicilina (59%) y el Ceftiofur sódico (32,5%), antibióticos utilizados para comparar.

El empleo de la penicilina y dihidroestreptomina como preservativos del semen bovino es generalizado no sólo en Cuba sino en muchos países. En Cuba se utilizan bulbos de uso veterinario, de producción nacional cuyos ingredientes farmacéuticos activos son importados. Una vez restituidos los antibióticos en el agua para inyección el sobrante se elimina ya que la estabilidad del producto restituido es poca. Aunque pudieran utilizarse los antibióticos en forma de polvo (ingrediente farmacéutico activo), lo que eliminaría el desperdicio, esto conlleva la necesidad de medios técnicos de pesaje analítico, que complican el procedimiento además de correrse el riesgo de la influencia del error humano.

La penicilina y la dihidroestreptomina son antibióticos que compiten en su uso con el hombre y, aunque el G-1 también posee indicaciones humanas, es un quimioterapéutico de producción nacional y existen enormes posibilidades de producción, lo que no limitaría su uso veterinario.

El G-1 es estable por más de dos años en condiciones ambientales normales<sup>[14-15]</sup> y fue estudiada su estabilidad en glicerina.<sup>[16]</sup> Por lo tanto, puede prepararse un formulado en solución glicerinada en volumen suficiente para varios días para este uso específico, que eliminaría el pesaje y con el que no existirían posibilidades de desperdicio.

En el Royal University Hospital de la Universidad de Saskatoon (Canadá) se estudió la actividad *in vitro* del G-1 frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus* sp., sensibles o resistentes a una amplia gama de agentes antimicrobianos.<sup>[8]</sup> Un resumen de esta información indica que el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano no tiene grandes fluctuaciones en sus valores de CIM<sub>90</sub> para microorganismos sensibles o resistentes a una gran cantidad de agentes antimicrobianos indicados para el tratamiento de pacientes infectados por esos microorganismos en particular.

En un estudio comparativo simultáneo *in vitro* del G-1 y la Ceftazidima con cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistentes aisladas de muestras clínicas, con el G-1 se obtuvo una alta frecuencia de cepas susceptibles (98.8%) mientras que con la Ceftazidima lo fueron el 85.9% sin diferencias estadísticamente significativas. Aunque el G-1 mostró valores de la CIM<sub>50</sub> superiores a los de la Ceftazidima la frecuencia de cepas susceptibles fue superior, resultados que explican una menor CIM<sub>90</sub>.<sup>[17]</sup>

Mediante la técnica de concentraciones subinhibitorias en dos cepas de *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* se trató de inducir *in vitro* la resistencia al G-1. Los resultados confirmaron la actividad inhibitoria del producto frente a estos microorganismos, evaluada de fuerte frente a *Pseudomonas aeruginosa*, concluyendo los autores que resulta remota la posibilidad de desarrollar mutantes resistentes a concentraciones por encima del valor de la CIM para *Pseudomonas aeruginosa* y de 8 CIM para *Candida albicans*.<sup>[18]</sup>

En otro estudio se evaluaron las concentraciones del G-1 que previenen el desarrollo de mutantes (MPC) en cepas de bacterias ATCC y procedentes de aislamientos clínicos. La relación CIM/MPC para la mayoría de los microorganismos fue de una dilución y solamente de dos para el *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los autores concluyeron que en las condiciones del ensayo el G-1 previene el desarrollo de mutantes resistentes en bacterias.<sup>[19]</sup>

En ninguna de las muestras de semen fresco y congelado se aisló *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que en las condiciones del ensayo no se pudo comprobar la eficacia del G-1 frente a este microorganismo. Sin embargo, se conoce que el G-1 es un quimioterapéutico particularmente eficaz frente a *Pseudomonas aeruginosa*,<sup>[6-8,20]</sup> germen importante en la microbiología seminal y refractario a la penicilina, la dihidroestreptomocina y otros antimicrobianos. La *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo que afecta las glándulas seminales del toro estando indicado la separación inmediata de este de la producción. El sulfato de polimixín es el antibiótico indicado al respecto pero posee un alto costo y gran competencia con el humano.

El riesgo genotóxico de la molécula se evaluó según una estrategia elaborada acorde a los requerimientos planteados por las agencias regulatorias de varios países. Dicha evaluación compendió 9 ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados en Cuba y en instituciones de Norteamérica además de un estudio teórico de relación estructura-actividad mutagénica. El análisis conjunto de toda esta información permite asumir que existen fuertes evidencias de que el riesgo genotóxico para es poco probable.<sup>[21]</sup>

Entre los estudios genotóxicos *in vivo* se realizó un análisis citogenético de las células germinativas y un ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide, ambos en ratones. El primero es de gran importancia en los esquemas de evaluación de datos mediante el método del peso de la evidencia, se considera como una de las pruebas que aportan suficientes evidencias de interacción de las sustancias químicas sobre las gónadas y de hecho es crucial para la clasificación genotóxica de éstas. Los resultados de este ensayo evidenciaron la no interacción del G-1 a nivel de las gónadas. El segundo ensayo es complementario y evalúa en células germinales otro punto final de efectos genotóxicos (lesión primaria al ADN) y sus resultados proporcionaron información acerca de la no inducción de genotoxicidad *in vivo*.<sup>[22-23]</sup>

Silveira prado, Enrique; González García, Oráida; Espinosa Veliz, Leopoldo; Conservación del semen bovino con 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furan. - [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet)®, ISSN 1695-7504, Vol.

VI, nº 09, Septiembre/2005, [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - [Comunidad Virtual Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® - Veterinaria Organización S.L.® España. Mensual. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090905.html>

Aunque aún no se ha evaluado el efecto citotóxico acumulado del G-1 sobre las células germinales del toro, se realizó un estudio del efecto citotóxico sobre las células germinales de toros tratados con el G-1 mediante espermiogramas seriados por microscopía de contraste de fases.<sup>[24]</sup> Pastillas de semen de siete toros fueron congeladas y descongeladas en dos ocasiones e incubadas a 37°C durante tres horas. Los espermiogramas no revelaron efecto significativo sobre las estructuras morfológicas externas de los nemaspermos que evidenciaran cambios importantes desde el punto de vista citospermico.

Con posteridad a la presente investigación se realizó un estudio sobre la fertilidad de hembras bovinas mestizas de la raza Holstein inseminadas con estas pastillas.<sup>[25]</sup> Inseminaron dos grupos de vacas con semen conservado con G-1 y con los antibióticos usuales respectivamente. Los indicadores evaluados fueron: retorno al servicio de inseminación artificial y tiempo de éste, hembras vacías al diagnóstico de gestación, abortos, gestaciones concebidas y partos, tiempo de duración de las gestaciones, sexo de las crías y fenotipo de estas, buscando alteraciones anatómicas y del comportamiento durante 30 días en los terneros nacidos. En las hembras que retornaron al servicio de inseminación artificial no se detectaron factores que pudieran indicar que se iniciara el proceso de teratogénesis por afectación de los gametos masculinos tratados con el G-1, tales como hembras vacías al diagnóstico de gestación que hicieran suponer muertes embrionarias, abortos que representaran alteraciones del período fetal, tiempo de gestación, así como la proporción de nacidos por sexos. Se concluyó que las pastillas conservadas con G-1 no presentaron acción teratógena y su aplicación, así como, la de los antibióticos ordinarios produjeron efectos satisfactorios semejantes en los indicadores reproductivos estudiados.

## CONCLUSIONES

La adición de 10 µg/mL de G-1 al menstruó mostró igual eficacia que los antibióticos utilizados tradicionalmente en los establecimientos de inseminación artificial del país. En las condiciones del ensayo, ninguna de las concentraciones utilizadas del G-1 mostró efectos nocivos sobre las características físico-químicas del semen.

## BIBLIOGRAFIA

1. Vásquez LA. Cuidando los detalles de su programa de inseminación artificial. En: Inseminación Artificial. Publicaciones Profesionales C.A. 2002. Valencia. Venezuela. <http://www.pcca.com.ve/vb/articulos/vb49p33.htm>
2. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Parte 3 Anexos. Título 3.2 Toma y tratamiento del semen. Anexo 3.2.1 Semen de bovinos. 2004 [http://www.oie.int/esp/normes/mcode/E\\_00127.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mcode/E_00127.htm)
3. Jiménez C, Robayo I. Bioseguridad en el procesamiento del semen bovino. REDVET, ISSN 1695-7504, 2004; Vol. V, No. 10. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101004.html>
4. Ramos J, López de Herrera I. Contaminación microbial del semen bovino congelado. Rev. Univ. La Salle. 1996; 1,17-20.
5. Catena M, Cabodevila J. Evaluación de semen bovino congelado Taurus, 1999. 1(3):18-31.

6. González Oraida, Silveira EA, Castañedo NR, Magariño Ofelia, Gómez R. Actividad antimicrobiana del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1993. Santa Clara. Cuba.
7. González Oraida, Silveira EA, Medina R, Machado R, Delgado María S, Castañedo NR, Rodríguez N, Caballero A, Ramírez Teresita. Concentración inhibitoria mínima del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a bacterias y levaduras del género *Candida*. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1993. Santa Clara. Cuba.
8. Blondeau JM, Castañedo N, González Oraida, Medina R, Silveira E. In vitro evaluation 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furan: A novel antimicrobial compound. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 11(2):163-166.
9. Manual de procedimientos para los centros de inseminación artificial. 49 p. Empresa de Inseminación Artificial. Ministerio de la Agricultura. C. de La Habana. 1997.
10. Metodología complementaria para el desarrollo del trabajo en los laboratorios de bacteriología de los Centros de Inseminación Artificial. Ministerio de la Agricultura. 1983. La Habana.
11. Statgraphics Plus Windows V. 4.1, 1999.
12. Alba LO, Silveira EA. Perdurabilidad de la efectividad de la combinación penicilina-estreptomicina en la reducción de la carga bacteriana del semen de toro congelado en pastillas. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, ISSN 1695-7504, 2005. (en prensa).
13. Miraglia Fabiana, Morais Zenaide M, Cortez Adriana, Melville Priscilla A, Marvullo Maria FV, Richtzenhain LJ, Visintin JA, Vasconcellos SA. Comparação de quatro antibióticos para inativar leptospiras em sêmen bovino diluído em gema-citrato e experimentalmente contaminado com *Leptospira santarosai* serovar *guaricura*. *Braz J Microbiol* 2003; 34(2):147-151.
14. Jorge Elisa, Jiménez Ibis, Bravo LR, Díaz Mirta, Diduk Natalia, Morales S, Calvo Amalia M, Estudios de estabilidad de la materia prima para medicamentos. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1993. Santa Clara. Cuba.
15. Dalton Chemical Laboratories Inc. Estudio de estabilidad de las muestras producidas en 1992. Informe no publicado. 1999. Toronto. Canadá.
16. González Oraida. Estabilidad preliminar del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano en glicerina. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 1995. Santa Clara. Cuba. Estudio no publicado.
17. González Oraida, Silveira EA, Machado R, Medina R, Delgado María S, García Milagros, Rodríguez N y Rodríguez JA. Estudio comparativo *in vitro* del 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1) y la Ceftazidima. *REDVET*, ISSN 1695-7504, 2003; Vol. IV No. 8. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080803.html>
18. Medina R, García Milagros, Fabrè Evelin, Rodríguez JA. Inducción de resistencia *in vitro* al 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1) en cepas de *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Farm Bonaerense* 2000; 19(4):289-94.
19. González Oraida, Castañedo N, Silveira EA, Delgado María S. Concentración del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano que previene el desarrollo de mutantes en bacterias. *REDVET*, ISSN 1695-7504, 2003; Vol. IV No. 8. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080803.html>
20. Silveira EA, Medina R, Blondeau J, Castañedo N, González Oraida, García Milagro, Delgado Maria S. In vitro evaluation of 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furan: a novel



- antipseudomonal agent. Primer Simposio Internacional de infecciones por Pseudomonas. V Taller Nacional de Fibrosis Quística. Dic. 6-8, 2004. C. Habana Instituto Finlay.
21. Estudios de genotoxicidad del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1). Addendum. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. 2003. Santa Clara. Cuba.
  22. Carballo N, Pérez Gladys, Remigio Antonia, Fernández Nidia, Acebo Amadis, Carnesoltas Deyanira, Rivero Yesenia, Somosa Niurka, Contreras Belkis, Legró Maria M. Evaluación mutagénica del G-1. Análisis citogenético de las células germinativas del ratón CENP: NMRI. Informe Final. Centro de Toxicología y Experimentación Animal (CETEX). Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). 1997. La Habana.
  23. Carballo N, Pérez Gladys, Remigio Antonia, Fernández Nidia, Rivero Yesenia, Somosa Niurka, Contreras Belkis, Legró Maria M. Evaluación mutagénica del G-1. Ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide del ratón CENP: NMRI. Informe Final. Centro de Toxicología y Experimentación Animal (CETEX). Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). 1997. La Habana.
  24. Duverger O. Comportamiento de la calidad biológica a la descongelación en semen de toros tratados con un derivado de núcleo furánico. Informe Técnico. 1991.
  25. Rojas I, Silveira EA, Norman O. Comportamiento de las gestaciones y crías nacidas de hembras bovinas inseminadas con semen tratado con 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. REDVET, ISSN 1695-7504, 2004; Vol. V. No. 1. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010104.html>

Trabajo recibido el 31/08/2005, nº de referencia 1105018\_RED VET. Enviado por la Comisión de Arbitraje para REDVET en la Universidad de Santa Clara. Publicado en REDVET® el 01/11/05.

[Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet), ISSN 1695-7504

[Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) - Veterinaria Organización S.L.®. Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) - [www.veterinaria.org](http://www.veterinaria.org) y [REDVET® www.veterinaria.org/revistas/redvet](http://www.veterinaria.org/revistas/redvet) y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](http://www.veterinaria.org) 1996-2005