Revista Electrónica de Veterinaria REDVET
ISSN 1695-7504
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet

Vol. VII, Nº 11, Noviembre/2006 –
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html

Evaluación *in vitro* del 2-bromo-5(bromo-2-nitrovinil-2)-furano: un nuevo agente antiseudomonas - In vitro evaluation of 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan: a novel antipseudomonal agent

Silveira EA,[1]* Medina R,[1] Blondeau JM,[2] Castañedo N,[1] González Oraida,[1] García Milagros,[1] Delgado María S.[1]

1.-Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central ¨Marta Abreu¨ de Las Villas. Santa Clara. Cuba.
2.-Department of Clinical Microbiology. Royal University Hospital. Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

Contacto por e_mail: esilveira@cbq.uclv.edu.cu

RESUMEN

El 2-bromo-5(bromo-2-nitrovinil-2)-furano —denominado G-1— es un nuevo compuesto antimicrobiano desarrollado en Cuba con actividad de amplio espectro frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras y hongos. En el presente trabajo se exponen los resultados de la evaluación *in vitro* de este compuesto mediante la técnica de microdilución en caldo frente a 1084 cepas de *Pseudomonas aeruginosa.* Los resultados se compararon con los obtenidos por otros investigadores en Canadá a partir de cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística y otras patologías evaluadas *in vitro* contra varios agentes antiseudomonas. También se realizaron estudios de inducción de resistencia contra este microorganismo. La CIM_{50} y CIM_{90} fueron 2 y 4 µg/mL respectivamente, con un rango entre 0,5 a 16 µg/ml. Este valor se mantuvo en cepas sensibles o resistentes a los agentes antiseudomonas. Los esfuerzos por inducir resistencia *in vitro* contra el G-1 fallaron obteniéndose una frecuencia de mutación muy baja del orden de 10^{-12} a varios múltiplos de la CIM. Un compuesto de esta naturaleza puede tener un tremendo potencial terapéutico.

Palabras claves: Evaluación *in vitro*. 2-bromo-5(bromo-2-nitrovinil-2)-furano. G-1. *Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrobinianos. Agentes antipseudomonales.

ABSTRACT

2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan —denominated G-1— is a novel antimicrobial compound developed in Cuba with reported broad-spectrum activity against Gram positive and Gram negative bacteria, yeasts and fungi. The *in vitro* evaluation of this novel compound against 1084 *Pseudomonas aeruginosa* strains by microbroth dilution is shown in the present work. These results are compared with those performed in Canada by other researchers with strains isolated from patients with cystic fibrosis and other pathologies against several antipseudomonal agents. Resistance induction studies were also performed against this microorganism. The MIC_{50} and MIC_{90} of G-1 was 2 and 4 µg/ml respectively, ranging from 0.5-16 µg/ml. This value remained the same for either sensitive or resistant strains to antipseudomonal agents. Attempts to induce resistant strains *in vitro* against G-1 failed and a low mutation rate of $< 10^{-12}$ were obtained at several MIC multiples. A compound of this nature may have tremendous therapeutic potential.

Key words: *In vitro* evaluation. 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan. G-1. *Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrobial. Antipseudomonal agent.

INTRODUCCIÓN

El 2-bromo-5(bromo-2-nitrovinil-2)-furano —denominado G-1— es un nuevo compuesto antimicrobiano desarrollado por el Centro de Bioactivos Químicos,[1] Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba. Es un derivado furiletilénico, con un amplio espectro de actividad frente a bacterias Gram positivas y negativas, bacterias anaerobias, levaduras y hongos filamentosos.[2-4] En el presente trabajo se exponen los resultados de la actividad *in vitro* de este compuesto frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* así como los resultados de estudios de inducción de resistencia *in vitro* frente a este microorganismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad *in vitro* del G-1 se determinó frente a 1084 cepas diferentes de *P. aeruginosa*, mediante la técnica de microdilución en caldo según las directrices del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).[5] Las placas de microdilución se incubaron a 35-37°C durante 18-24 h. La más baja concentración del G-1 que mostró crecimiento se consideró como la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Como control de la técnica empleada, se utilizó una cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (American Type Culture Collection).

Estudios de resistencia

El grado de mutación de *P. aeruginosa* se determinó sembrando una placa con un inóculo denso de agar Mueller-Hinton con concentraciones de G-1 del orden de 2, 4 y 8 múltiplos de la CIM. El grado de mutación se calculó dividiendo el número de UFC después de un período de 24 horas de incubación entre el inóculo inicial.

Posteriormente se realizaron siembras seriadas de *P. aeruginosa* en Caldo Mueller-Hinton conteniendo ½ de la CIM del G-1 para inducir la resistencia *in vitro.* Se realizaron comprobaciones cada 5 siembras según se describió anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la susceptibilidad *in vitro* del G-1 frente a los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y la cepa de control de calidad ATCC se resumen en la Tabla 1. La CIM_{50} y CIM_{90} fue entre 2 y 4 μg/mL respectivamente, con un rango de 0.5-16 μg/mL. Los resultados frente a la cepa de control de calidad fueron semejantes a los obtenidos con las cepas de aislamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad in vitro del G-1 frente a Pseudomonas aeruginosa

Microorganismo	n	CIM (μg/ml)		
		CIM_{50}	CIM_{90}	Rango
P. aeruginosa	1084	2	4	0.5-16
P. aeruginosa ATCC 27853	11	4	8	4-8

Los resultados acerca de los estudios para determinar la actividad microcida o microstática del G-1 se exponen en la Tabla 2. Puede apreciarse que el G-1 mató a los microorganismos

a concentraciones aproximadas al valor de la CIM. Se requiere de estudios ulteriores de tiempo-muerte para determinar el tiempo en que el G-1 mata a las bacterias.

Tabla 2. Efecto bactericida del G-1 frente a Pseudomonas aeruginosa

CIM(μg/mL)	CBM (μg/mL)			
	1	2	4	8
1	–	10	7	–
2	–	5	72	4
4	–	–	2	1
8	–	–	–	–

La Tabla 3 resume los resultados de las pruebas del G-1 frente a cepas de *P. aeruginosa* que fueron evaluadas como sensibles o resistentes a una amplia variedad de agentes antimicrobianos. Se comprobó que el G-1 no tuvo fluctuaciones en los valores de CIM_{90} para estos mismos microorganismos.

Tabla 3. Comparación de la actividad in vitro del G-1 frente a cepas P. aeruginosa sensibles o resistentes a agentes anti seudomonales

Antibiótico	Actividad	n	CIM (μg/ml)		
			CIM_{50}	CIM_{90}	Rango
Ciprofloxacina	Sensible	909	2	4	≤0.5-16
	Intermedio	60	2	4	1-4
	Resistente	83	2	4	1-8
Imipenem	Sensible	960	2	4	≤0.5-16
	Intermedio	74	2	4	1-8
	Resistente	44	2	4	1-4
Cefepime	Sensible	937	2	2	≤0.5-16
	Intermedio	72	2	2	≤0.5-8
	Resistente	72	2	4	≤0.5-8
Tobramycin	Sensible	1020	2	4	≤0.5-16
	Intermedio	15	2	4	1-4
	Resistente	41	2	2	1-4
Gentamicina	Sensible	982	2	4	≤0.5-16
	Intermedio	41	2	2	≤0.5-4
	Resistente	57	2	2	1-4
Ceftazidima	Sensible	905	2	4	≤0.5-16
	Intermedio	120	2	4	0.5-8
	Resistente	40	2	4	1-4
Piperacillin/Tazobactam	Sensible	989	2	4	≤0.5-16
	Intermedio	---	---	---	---
	Resistente	83	2	2	0.5-4
Amikacina	Sensible	1024	2	4	≤0.5-16

	Intermedio	79	2	4	≤0.5-4
	Resistente	28	2	4	1-4

Según Blondeau et al.[6] estos agentes pertenecen a familias diferentes y la resistencia de varios microorganismos a ellos indica diferentes mecanismos de acción. Algunos de estos incluyen proteínas fijadoras de penicilina alteradas. Sin embargo, debe prestarse atención al hecho de que en este estudio se incluyeron organismos que muestran resistencia a las quinolonas (girasa ADN alterada), sitios de enlace ribosomal alterados, resistencia a los β-lactámicos por la producción de la enzima β-lactamasa y quizás otros mecanismos de resistencia. Por tal razón, el G-1 no parece estar influenciado por ninguno de estos mecanismos de resistencia.

G-1 parece ser bactericida cerca de la concentración inhibitoria mínima y no parece afectarse negativamente por los mecanismos de resistencia antimicrobiana encontrada en otras clases de agentes señalados anteriormente. Por consiguiente, este compuesto puede tener un único sitio asignado a su mecanismo de acción. Se necesitan estudios más específicos a fin de estudiar algún tipo de mecanismo de resistencia en particular.[6-7]
Las Tablas 4 y 5 muestran la CIM del G-1 comparada con la CIM de diferentes agentes antimicrobianos evaluados en Canadá por otros investigadores con cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística y otras patologías. Estas cepas fueron colectadas como parte de estudios nacionales y provinciales coordinados por el Department of Clinical Microbiology of the Royal University Hospital (Saskatoon, Saskatchewan, Canada).[8-11]
Puede apreciarse que solamente la ciprofloxacina y trovafloxacina mostraron una mayor actividad frente a *P. aeruginosa* que el G-1 (CIM_{50} más baja), mientras que imipenem, aztreonam y ceftazidima tuvieron actividad semejante. Sin embargo, el G-1 posee una actividad más fuerte que el resto de los antimicrobianos.

Tabla 4. Susceptibilidad de más de 100 cepas de P. aeruginosa aisladas de pacientes con fibrosis quística en algunas provincias de Canadá. Comparación con el G-1

Agente antimicrobiano	CIM (μg/Ml)			S
	CIM_{50}	CIM_{90}	Rango	
Ciprofloxacina	1	4	<0.25->4	58
G-1	2	4	0.5-16	100
Imipenem	2	16	<0.5->16	78
Aztreonam	2	32	<1->32	79
Ceftazidime	2	32	<1-32	75
Cefoperazone	8	≥32	<4->32	73
Netilmicin	16	>16	<2->32	31
Cefotaxime	16	≥64	<2->64	38
Ticarcillin	<16	>128	<16->128	87
Ceftriaxone	32	>64	<2->64	25
Carbenicillin	<16	>128	<16->128	89
Mezlocillin	32	>128	<16->128	70
Azlocillin	< 64	>64	<64->64	75

S = % Cepas sensibles

Comparación con el G-1

= Mayor
= Semejante
= Menor

Tabla 5. Susceptibilidad de más de 6000 cepas de P. aeruginosa aisladas en algunas provincias de Canadá. Comparación con el G-1

Agente antimicrobiano	CIM (μg/mL)			S
	CIM_{50}	CIM_{90}	Rango	
Ciprofloxacin	<0.19	1	0.064/≥256	89
Trovaflaxin	0.5	3	0.094/≥32	67
Imipenem	1	8	<0.5/>16	90
G-1	2	4	0.5/16	100
Ceftazidime	2	8	<1/>64	90
Aztreonam	2	16	<1/>32	79
Netilmicin	4	16	<2/>32	77
Cefoperazone	8	32	<4/>32	85
Ticarcillin	<16	64	<16/>128	91
Carbenicillin	<16	128	<16/>128	91
Cefotaxime	16	>64	<2/>64	15
Ceftriaxone	32	>64	<2/>64	6
Mezlocillin	32	>128	<16/>128	85
Azlocillin	< 64	>64	<64/>64	90
Azithromycin	≥256	≥256	16/≥256	0
Clarithromycin	≥256	≥256	64/≥256	0
Ampicillin	≥256	≥256	≥256	0
Roxithromycin	≥256	≥256	≥256	0

S = % Cepas sensibles

Comparación con el G-1

= Mayor
= Semejante
= Menor

Se observó una frecuencia de mutación muy baja ($<1x10^{-12}$) después de la exposición a una alta densidad de inóculo de *P. aeruginosa* a 2, 4 y 8 múltiplos de la CIM del G-1 (Tabla 6). Como la carga bacteriana puede alcanzar 10^9-10^{10} células en un tejido infectado,[12] un nuevo agente antimicrobiano debe tener una frecuencia de mutación endógena de $<10^{-9}$[13]. Este resultado significa que la probabilidad de obtener un mutante de este organismo resistente al G-1 es extremadamente baja. Igualmente, subcultivos de *P. aeruginosa* a

concentraciones subinhibitorias no aumentaron los valores de la CIM después de 20 resiembras (Tabla 7), corroborándose la fuerte actividad de este compuesto frente a este microorganismo.

***Table 6. Frecuencia de mutación de P. aeruginosa frente a varios múltiplos de la CIM del G-*1**

Microorganismo	Múltiplo de la CIM	Frecuencia de mutación
P. aeruginosa ATCC 27853	2	$< 1 \times 10^{-12}$
	4	$<1 \times 10^{-12}$
	8	$<1 \times 10^{-12}$

Tabla 7. Valores de la CIM después de 5 pases a concentraciones subinhibitorias del G-1

Microorganismo
P. aeruginosa ATCC 27853
P. aeruginosa No. 91

CONCLUSIONES

El 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (G-1) posee una fuerte actividad *in vitro* frente a *P. aeruginosa*, la cual es superior a la mayoría de los agentes antiseudomonas. Este compuesto tampoco se ve afectado por los mecanismos de resistencia desarrollados por los microorganismos contra los principales agentes antimicrobianos usados en la terapéutica. Existe muy baja probabilidad de que *P. aeruginosa* se haga resistente al G-1

BIBLIOGRAFÍA

1. Castañedo NR, Goizueta RD, González Oraida, Pérez JA, González Josefa, Silveira EA, Cuesta M, Martínez AR, Lugo Estela, Estrada E, Carta Ana del C, Navia Ofelia, Delgado Maria S. Procedimiento de obtención del 1-(5-bromo-fur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno y su acción como microcida. Certificado Nº. 22446 Resolución Nº. 2190/1996. ONIITEM. Oficina Nacional de Invenciones, Información Técnica y Marcas. C. de La Habana. Cuba. 1996.
2. 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. Santa Clara. Cuba. 2003.
3. González Oraida, Silveira EA, Castañedo NR, Magariño Ofelia y Gómez R. Actividad antimicrobiana del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. 2003.
4. González Oraida, Silveira EA. Actividad antifúngica in vitro del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano frente a diferentes especies de hongos filamentosos. REDVET Dic 2003; Vol. IV No. 12. http://www.veterinaria.org/ revistas/redvet/n121203.html

5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standard M7-A2. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, 1993.
6. Blondeau JM, Castañedo N, González Oraida, Medina R, Silveira E. In vitro evaluation of G-1: a novel antimicrobial compound. Final Report. Royal University Hospital, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. 1998.
7. Hoban DJ. G-1 Mechanism of action study. Research Report. Health Sciences Centre. University of Manitoba, Canada. 1998.
8. Blondeau JM, Yaschuk Y. In vitro activities of ciprofloxacin, cefotaxime, ceftriaxone, chloramphenicol and cifampin against fully susceptible and moderately penicillin-Resistente Neisseria meningitidis. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:2577-9.
9. Blondeau JM, Yaschuk Y. Canadian ciprofloxacin susceptibility study: a comparative study from 15 medical centers. The Canadian Ciprofloxacin Study Group. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:1729-32.
10. Blondeau JM, Yaschuk Y. Canadian multicenter susceptibility study, with a focus on cephalosporins, from 15 Canadian medical centers. The Canadian Multicenter Study Group. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2773-75.
11. Blondeau JM, Suter ME, Borsos S, Misfeldt C. Canadian Pseudomonas aeruginosa susceptibility study from 48 medical centers: focus on ciprofloxacin. The Canadian Pseudomonas Study Group. Int J Antimicrob Agents 1998;10:297-302.
12. Low D. Antimicrobial drug use and resistance among respiratory pathogens in the community. Clin and Infect Dis 2001; 33 (Suppl. 3):S206-13.
13. Miller K, O'Neil AJ, Chopra I. Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes. J Antimicrob Chemother 2002;49:925-934.

Trabajo recibido el 30/08/2006, nº de referencia 110607_REDVET. Enviado por la Comisión de Villa Clara. Publicado en Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®, ISSN 1695-7504 el 01/11/06.

Veterinaria.org® - Comunidad Virtual 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/ y REDVET® http://www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en Copyright 1996 -2006