

INFECCION IN VITRO DE CELULAS DEL TIPO ENDOTELIAL POR EL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA (VLB)

Alfonso Barreta*
Luis Carlos Villamil*
Harvey Campo†
Victor Vera*

RESUMEN

El virus de la leucosis bovina (VLB) es un retrovirus asociado a la leucosis bovina enzootica que infecta principalmente a los linfocitos B. Rovnak et al (1991) encontraron provirus VLB integrados al genoma de células que dadas sus características corresponden a células endoteliales de venúlas poscapilares. Diferentes sistemas de cultivo celular han mostrado ser de utilidad para la propagación *in vitro* del VLB, principalmente cultivos primarios de linfocitos periféricos de ganado infectado, líneas celulares linfoblastoides y otras líneas celulares de origen bovino y ovino, entre las que sobresale la FLK-VLB. Con estos antecedentes el objetivo general de este trabajo fue presentar un modelo de células endoteliales para el estudio *in vitro* del virus de la leucosis bovina.

(1991) encontraron provirus VLB integrados al genoma de células que dadas sus características corresponden a células endoteliales de venúlas poscapilares. Diferentes sistemas de cultivo celular han mostrado ser de utilidad para la propagación *in vitro* del VLB, principalmente cultivos primarios de linfocitos periféricos de ganado infectado, líneas celulares linfoblastoides y otras líneas celulares de origen bovino y ovino, entre las que sobresale la FLK-VLB. Con estos antecedentes el objetivo general de este trabajo fue presentar un modelo de células endoteliales para el estudio *in vitro* del virus de la leucosis bovina.

METODOLOGIA

Aislamiento y Cultivo de Células Endoteliales de Aorta Bovina

Se realizó por medio de la técnica de disgregación celular mecánica (Ryan & Maxwell, 1986). Se trajeron 3 juegos de vísceras de la planta de sacrificio de la Universidad Nacional (ICTA). Bajo una cámara de flujo laminar, la preparación se limpió con etanol al 70%. Luego las arterias se disectaron dejándolas libres de tejido conectivo y se lavaron varias veces en solución salina Puck G. Las aortas se dejaron 30 minutos en agitación lenta y a 4°C en una solución salina Puck G que contenía 3 veces la concentración normal de antibióticos. En seguida, los vasos se disectaron dejando el lumen arterial expuesto. Se raspó suavemente la superficie luminal con un bisturí No. 10. Las células se resuspendieron en tubos con medio M199 con antibióticos y se

centrifugaron a 250 x g por 10 minutos a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en medio de crecimiento M199 con 20% de SFB, se sembraron sobre frascos de cultivo celular Corning T25 y se incubaron a 37°C. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se subcultivaron en proporción 1:2 por medio de un raspador celular.

Infección del Cultivo Primario de Células Endoteliales de Aorta Bovina con el VLB

Los ensayos de infección se realizaron entre los pasajes 3ero y 4to del cultivo de células endoteliales de aorta bovina. Para la infección las células se enfrentaron a linfocitos provenientes de una vaca con linfocitosis persistente (los valores hematológicos fueron suministrados por el Dr. Jorge Almansa, ICA-CEISA) y a partículas virales libres de células obtenidas de la línea celular FLK.

La sangre de la vaca con linfocitosis persistente y seroreactora a VLB, así como la de una ternera seronegativa a VLB, se colectó sobre tubos hepari izados, y se sirvió sobre un gradiente Histopaque 1.077 (Sigma) y se centrifugó a 1000 x g por 25 minutos. La banda nubosa correspondiente a las células mononucleares se colectó y lavó en medio MEM con 10% de SFB. Finalmente, se realizó un conteo celular y se sembraron 2.6 x 10⁶ células mononucleares sobre cada monocapa endotelial en confluencia. El cultivo se incubó durante 24 horas a 37°C.

Por otro lado, 100 ml de sobrenadante cosechado de la línea

celular FLK fue concentrado por ultracentrifugación a 100.000 x g durante 90 minutos. El "pellet" viral se resuspendió en 1 ml de medio MEM con 10% de SFB, y se filtró a través de una membrana de 0.45 µ para así obtener las partículas virales libres de células. La monocapa de células endoteliales se lavó con PBS y el virus se sembró e incubó por 90 minutos. Finalmente, se completó con medio M199 con 10% de SFB (Diglio & Ferrer, 1976).

Producción de Antígeno Viral

Se procesó antígeno a partir del sobrenadante de células endoteliales cocultivadas con los linfocitos, de la línea celular FLK (control positivo), y de células endoteliales que no habían sido tratadas (control negativo).

Las células siempre se mantuvieron en medio con 10% de SFB. Se cosechó el 70% del sobrenadante celular cada 48 horas durante 11 a 13 días. La línea celular FLK, antes de la cosecha, fue sometida a tres pasajes sucesivos cada 48 horas.

El sobrenadante celular cosechado fue procesado según Mariño et al (1981). Se clarificó por centrifugación a 4500 x g por 20 minutos, y luego se precipitó con sulfato de amonio (30 g/100 ml, 18 horas, agitación lenta, 4°C). El precipitado se obtuvo por centrifugación a 10.500 x g durante 40 minutos, y se resuspendió en agua destilada en un volumen equivalente a 1/20 del inicial. El precipitado se dejó estabilizar durante 24 horas a 4°C. Las sales fueron eliminadas por diálisis con-

INTRODUCCION

El virus de la leucosis bovina (VLB) es un retrovirus asociado a la Leucosis Bovina Enzootica. El VLB principalmente infecta linfocitos B, sin embargo últimamente se ha demostrado que los linfocitos T CDB+ y CD4+ (Stott et al, 1991) y los monocitos (Heeney et al, 1992) también son blancos naturales para el virus. Rovnak et al

Respectivamente: Biólogo, Universidad Nacional de Colombia y Profesores del Postgrado en Salud y Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia.

† Profesor de la Facultad de Medicina.

tra solución salina (0.85%) durante 18 a 24 horas en agitación lenta y a 4°C. El dializado se clarificó a 2500 x g por 18 minutos. El antígeno se concentró por ultrafiltración (Amicon XM50) hasta obtener un volumen cercano al 1% del inicial. Los antígenos fueron enfrentados a sueros positivos y negativos de campo en la prueba de inmunodifusión doble en gel de agarosa.

Visualización de la Formación de Sincitios

Las células endoteliales que habían sido cocultivadas con los linfocitos provenientes de la vaca con linfocitosis y las que habían sido incubadas con las partículas virales libres de células, así como las células endoteliales que habían sido cocultivadas con los linfocitos de la ternera seronegativa y células que no habían sido tratadas, fueron sometidas a la coloración de Giemsa para la visualización de sincitios.

Las células se lavaron tres veces con PBS pH 7.2 y se fijaron con metanol absoluto durante unos 2 minutos. Se dejaron secar y se les agregó el colorante de Giemsa durante 5 minutos. Se descartó el colorante y se lavó varias veces con agua destilada. Se contaron 800 células por cada frasco de cultivo, y se consideraron como sincitios a aquellas células que poseían 5 o más núcleos (Diglio y Ferrer, 1976).

RESULTADOS

Cultivo de Células Endoteliales de Aorta Bovina

A partir de una disgregación celular mecánica de la mayor cantidad posible de tejido vascular (tramos de aorta entre 25-30 cm de largo), acompañada por un subcultivo mecánico (raspador celular), se logró un cultivo de células endoteliales de aorta bovina que se mantuvo durante 8 meses y 20 pasajes.

Este cultivo primario de células endoteliales se mantuvo tanto en presencia de CO₂ como en ausencia de CO₂. Y en ambos sistemas mantuvieron las características típicas de las células endoteliales en cultivo como son: la presencia de una morfología adoquinada (Figura 1), conservación de racimos celulares a pesar del fuerte desprendimiento mecánico, baja

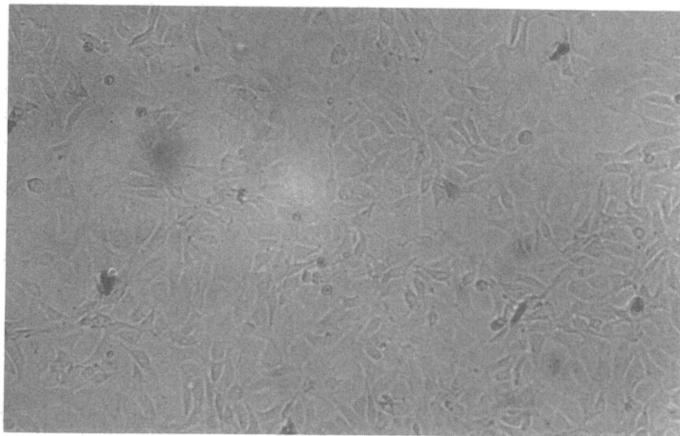


FIGURA 1. Células Endoteliales de Aorta Bovina en confluencia (objetivo 4X).

tasa de proliferación celular (períodos de 2 semanas entre subcultivo y subcultivo (Ryan & Maxwell, 1986), y la producción de un factor alterante de la morfología celular que por sus características se atribuye a la producción y secreción de componentes de la matriz extracelular (ver abajo).

Producción de Antígeno Viral

Se implementó una metodología para la producción de antígeno viral diferente a la anteriormente descrita por Mariño et al (1981) y utilizada por Niño (1992). En estos trabajos se cosechaba el sobrenadante de células mantenidas en ausencia de SFB durante 8 días. En la nueva metodología el medio de crecimiento celular se suplementó con 10% de SFB y se cosechó cada 48 horas, generando un rendimiento en la producción de antígeno viral del 1% para la línea celular FLK, que contrasta con el 0.4% descrito por Niño (1992).

Este hallazgo se explica si se considera que el VLB se encuentra en un estado reprimido en las células *in vivo*, pero en cultivo se producen cantidades detectables de ARN viral, proteínas virales y partículas virales. Se ha mostrado que la presencia de SFB aumenta enormemente la expresión de VLB en cultivos a corto término de linfocitos de sangre periférica (Zandomeni et al, 1992). Por otro

lado, se ha encontrado una máxima cantidad de antígeno a partir de linfocitos a 72 horas de cultivo en presencia de SFB (Singh et al, 1988). Y también, por medio de inmunofluorescencia indirecta han encontrado que el período de más alta producción de proteína viral (gp51 y p24) para la línea celular FLK esta entre las 20-44 horas de incubación (Roussev et al, 1993).

El antígeno viral producido por las células endoteliales cocultivadas con linfocitos infectados, debió concentrarse hasta obtener un rendimiento final del 0.5% para que formara línea de precipitación en la prueba de inmunodifusión doble en gel de agarosa.

Las células endoteliales usadas fueron positivas a la prueba de inmunoperoxidasa directa para la detección del virus de la diarrea viral bovina (VDVB). Sin embargo en trabajos con la línea celular FLK, también contaminada con VDVB, se ha demostrado que esta doble infección no interfiere en las pruebas serológicas para VLB a partir del antígeno producido de esta línea celular (Graves & Jones, 1981; Ramírez, 1995). Además, tampoco afecta la inducción de la formación de sincitios por VLB (Graves & Jones, 1981).

Formación de Sincitios

La capacidad descrita por Diglio & Ferrer (1976) del VLB para inducir la formación de sincitios sobre algunas células fue utilizada para evaluar la susceptibilidad de las células endoteliales a la infección por el virus.

El efecto citopático encontrado en las células endoteliales infectadas por cocultivación con linfocitos, presentó células multinucleadas con 5 y hasta 20 núcleos. Muy eventualmente apareció una vacuolización tanto en las células multinucleadas como en las células mononucleadas sencillas, hecho que concuerda con la descripción de Diglio & Ferrer (1976).

En algunas células sincitiales los núcleos se encontraban formando anillos alrededor del citoplasma (Figura 2). Esta característica también se encontró, cuando infectaron células endoteliales de vena umbilical humana con el virus tipo I de la leucemia de las células T humanas (VLTH-I), emparentado con el virus de la leucosis bovina (Ho et al, 1984). Como este efecto no había sido descrito en la formación de sincitios por VLB (Diglio & Ferrer, 1976; Graves & Jones, 1981), se podría sugerir que este efecto citopático particular puede ser el resultado de una interacción entre las células endoteliales y retrovirus como los VLB y VLTHs.

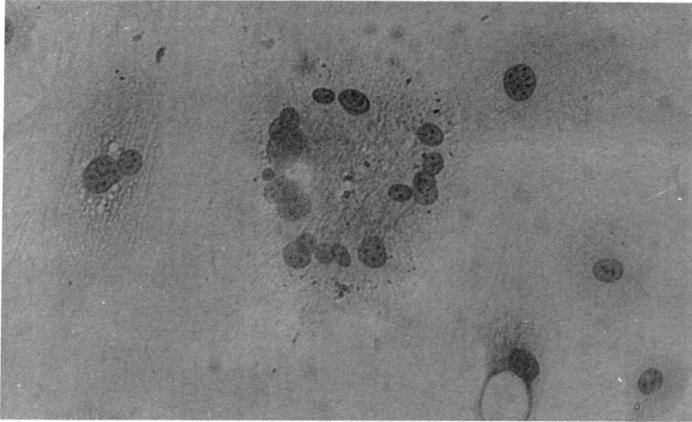


FIGURA 2. Efecto citopático ocasionado por VLB. Célula sincitial en la que los núcleos se encuentran conformando un anillo alrededor del citoplasma. Coloración de Giemsa (10X).

Se observó un incremento progresivo, comparando las células antes de subcultivar y durante los pasajes 1, 2 y 3 poscocultivo, en el porcentaje de la formación de sincitios (4, 8, 8.5 y 9.5%, respectivamente). Este incremento había sido reportado, pero de una forma más notable (hasta 30%) (Diglio & Ferrer, 1976).

Las células endoteliales, que fueron incubadas con las partículas virales libres de células, cuando se les realizó la coloración de Giemsa a los 17 días posinoculación, no revelaron formación de sincitios. Este hecho puede ser explicable por la estrecha afinidad que tienen estos virus por las células, y por la ausencia de partículas virales libres *in vivo*. Por otro lado, en trabajos anteriores, las células son tratadas con DEAE-dextran antes de la inoculación con partículas virales libres de células concentradas por ultracentrifugación a 100.000 x g (Diglio & Ferrer, 1976; Graves & Jones, 1981). El DEAE-dextran es un agente quelante que favorece la expresión de los receptores celulares y aumenta la respuesta sincitial temprana por lo menos 5 veces (Graves & Jones, 1981).

Ateraciones Morfológicas de las Células Endoteliales en cultivo

Se presentó una morfología celular alterada caracterizada por una forma estrellada, con prolon-

gaciones citoplasmáticas radiales que se originan en el cuerpo de las células y difusamente se pierden sobre el espacio extracelular, dándole un aspecto similar a las células de origen nervioso (Figura 3).

Este efecto "dendrita" apareció alrededor del día 60 de cultivo en algunas monocapas celulares en proporción muy baja (1-30% aprox. de la monocapa celular), pero se incrementó fuertemente

24 horas después del cocultivo con linfocitos de sangre periférica (60-90% aprox.), inclusive en una monocapa celular que nunca había presentado tal efecto. Esta alteración morfológica se redujo a proporciones intermedias a las 72 horas poscocultivo y durante los siguientes días fluctuó inconstantemente, hasta que prácticamente desaparece.

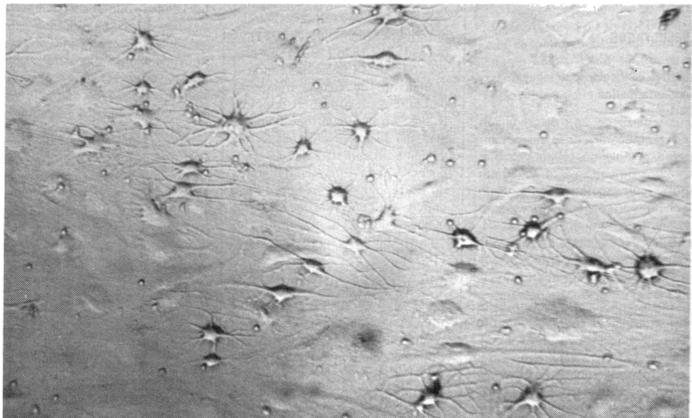


FIGURA 3. Alteraciones morfológicas presentadas después del cocultivo de células endoteliales con células mononucleares, caracterizadas por proyecciones celulares dispuestas radialmente ("efecto dendrita"). Nótese que a las 72 horas poscocultivo, aún quedan algunos pocos linfocitos (objetivo 4X).

El efecto se observó tanto 24 horas después de los cocultivos con linfocitos de la vaca infectada con VLB, aunque a un grado ligeramente superior, como en el cocultivo con linfocitos de la ternera seronegativa a VLB.

La alteración morfológica más comúnmente reportada, es la de células endoteliales bipolares distribuidas en estructuras tubulares que conforman una malla de cordones celulares (angiogénesis *in vitro*). Se ha descrito cuando las células endoteliales son cultivadas sobre proteínas de matriz extracelular suministradas exógenamente, o de forma espontánea, principalmente en cultivos de células endoteliales a largo término, con una asociación a retracción de la monocapa celular con subsecuente formación de estructuras tubulares y secreción de proteínas de matriz (Vernon et al, 1992).

Las células endoteliales de aorta bovina en cultivo, normalmente sintetizan y secretan principalmente colágeno tipo III y VIII, fibronectina, trombospodina y SPARC (una proteína asociada con morfogénesis y cambios en forma celular) (Sage et al, 1980).

Montesano et al (1985) observaron que al incubar células endoteliales de vena umbilical humana con linfoquinas, las células asu-

men una forma ahusada y fibroblástica (entre las 48 y 120 horas), y en baja densidad celular la morfología varía de muy alargada a dendrítica. La morfología dendrítica se caracteriza por numerosos procesos citoplasmáticos que se extienden lateralmente del cuerpo de la célula, oponiéndose los de un extremo con los del otro. Todo esto acompañado por la presencia de una matriz pericelular altamente organizada que contiene glicosaminoglicanos como constituyente principal.

McGuire & Orkin (1987) al cultivar células endoteliales de aorta de rata sobre una matriz de Vitrogen (colágeno tipo I), las células adquieren morfologías estrelladas y bipolares que crecen en una forma aleatoria. Sin embargo, en otro trabajo al cultivar células endoteliales de aorta bovina sobre una matriz de Vitrogen bajo condiciones similares, las células conforman monocapas adquinadas o forman mallas de cordones celulares pobremente definidas (Vernon et al, 1992).

Aunque diferentes tipos celulares pueden utilizar a la matriz extracelular de fuentes exógenas para alterar su morfología, no hay reportes que otros tipos celulares diferentes a las células endoteliales vasculares puedan organizar la matriz extracelular sintetizada endógenamente, para usarla como molde en la conformación de morfologías alteradas (Vernon et al, 1992).

DISCUSION

La susceptibilidad y per isibidad de las células endoteliales de aorta bovina en cultivo fue demostrada por medio de la producción de antígeno viral y la formación de sincitios de células endoteliales cocultivadas con linfocitos de sangre periférica de una vaca con linfocitosis persistente y seroreactiva a VLB. Este resultado apoya a Rovnack et al (1991), que encontraron la presencia de provirus VLB y altos niveles de los ARNm específicos del virus en células del tipo endotelial *in vivo*, y propusieron a las células endoteliales como blanco naturales del VLB. Así, se constituye un nuevo modelo celular para el estudio del VLB, que podrá tener trascendencia tanto a nivel diagnóstico, como a nivel del estudio de la biología y patología de este agente viral.

Este modelo celular podrá ser usado en el diagnóstico de la leucosis bovina enzótica, siendo una alternativa en la producción de antígeno viral, que debido a la naturaleza primaria del cultivo, puede conducir a la obtención de un antígeno viral VLB libre de contaminantes virales como VDVB, como ocurre en la actualidad con la línea celular productora de antígeno FLK-VLB. Además, hay que tener en cuenta que este antígeno viral proviene de cepas de campo.

La sensibilidad de las células endoteliales a la formación de sincitios por VLB, genera un método de evaluación directa de infección

nes naturales, a partir de la confrontación de células mononucleares de sangre periférica de individuos sospechosos con las células endoteliales. Este sistema puede también ser usado como prueba serológica, por medio de la inhibición en la formación de sincitios.

Una característica importante de este modelo celular es su durabilidad (cerca a 8 meses), además que en un futuro existe la posibilidad de la transformación, y así obtener una línea celular permanente productora de antígeno VLB.

La participación de las células endoteliales en la infección natural por VLB genera varios planteamientos. Primero que todo, ya que se encuentra cubriendo superficies externas o internas, el epitelio se constituye como candidato principal para ser la barrera de entrada del virus al organismo. También, se ha propuesto que la expresión viral *in vivo* nunca ocurre en los linfocitos infectados circulantes en sangre periférica, pero sí en las células localizadas en ciertos tejidos (Zandomeni et al, 1992). Entonces, dada su localización sobre los tejidos vasculares y linfoides, las células endoteliales podrían jugar algún papel en la respuesta de anticuerpos que se sostiene durante todo el tiempo de la infección persistente, a pesar de la ausencia de partículas virales libres y de la muy baja expresión viral reportada.

Por otro lado, las células endoteliales infectadas por VLB podrían ser blancos para los linfocitos

T citotóxicos (CD8+), teniendo en cuenta que la presencia de péptidos de la clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad es regulada positivamente en las células endoteliales durante una infección, dándoles una característica de célula presentadora de antígeno, y que los linfocitos T CD8+ matan particularmente los linfocitos B productores de VLB que expresan péptidos de la clase II (Mager et al, 1994).

Las células endoteliales, también podrían servir como reservorios del virus para posteriormente propagarlo a otras células blanco como los linfocitos y/o los monocitos, y así ayudar a la dispersión del virus por el organismo.

De acuerdo a la filogenia de este virus, también se constituye como un modelo aplicable al estudio de la biología y patología de otros retrovirus relacionados como VLTH-1, VLTH-2, y VIH-1.

Finalmente, se hipotetiza que la alteración morfológica encontrada es el producto de la síntesis y secreción de componentes de la matriz extracelular por las células endoteliales cultivadas, y que ésta es incrementada por factores provenientes de los linfocitos. Estos resultados incentivan a la implementación futura de técnicas de evaluación de la expresión y secreción de proteínas de matriz extracelular de las células endoteliales de aorta bovina cultivadas, y así evaluar la interacción de estos componentes con células de importancia inmunológica y virus asociados a éstas.

BIBLIOGRAFIA

- DIGLIO, C. A. & FERRER, J. F. 1976. Induction of syncytia by the bovine C-type leukemia virus. *Cancer Res.* 36:1056-1067.
- GRAVES, D. C. & JONES, L. V. 1981. Early syncytium formation by bovine leukemia virus. *Journal of Virology* 38:1055-1063.
- HEENEY, J. L.; VALLI, P. J. S.; JACOBS, R. M. & VALLI, V.E.O. 1992. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. *Lab. Invest.* 66:608-617.
- HO, D. D.; ROTA, T. R. & HIRSCH, M. S. 1984. Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81:7588-7590.
- MAGER, A.; MARENGO, R.; MAMMERICKX, M. & LETESON, J. J. 1994. T cell proliferation response to bovine leukemia virus (BLV): identification of T cell epitopes on the major core protein (p24) in BLV-infected cattle with normal haematological values. *J. of Gen. Virol.* 75:2223-2231.
- MARIÑO, O. C.; NEIRA, R.; CLAVIJO DE, E. & LOZANO, F. 1981. Preparación de antígeno para el diagnóstico de infección por el virus de linfocarcinoma bovino en Colombia. *Revista ACOVEZ* 5:3-7.
- MCGUIRE, P. G. & ORKIN, R. W. 1987. Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrato. *Lab. Invest.* 57:94-105.
- MONTESANO, R.; ORCI, L. & VASSALLI, P. 1985. Human endothelial cell cultures: phenotypic modulation by leukocyte interleukins. *J. of Cell. Phys.* 122:424-434.
- NIÑO, F. J. 1992. Leucosis bovina y sus posibles repercusiones sobre la producción de vacas afectadas en fincas del valle de Ubaté. Tesis Magister Universidad Nacional.
- RAMIREZ, G. 1995. Comunicación personal. Posgrado en Salud y Producción Animal. Facultad de Medicina Veteri-

- naria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia.
- ROTELLA, C. M.; GALL, G.; CASINI, A.; BRANCHI, S.; MANNUCCI, E.; CRESCI, B.; SCHUPPAN, D.; CONTI, A. & BRANDI, M. L. 1993. Release of extracellular matrix components by bovine bone endothelial cells in continuous culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 190:502-508.
- ROUSSEV, R.; POLIANOVA, M.; PORTETELLE, D. & IVANOVNA, O. 1993. Dynamics of mitotic activity and expression of viral proteins gp51 and p24 of bovine leukemia virus produced in sensitive collagen synthesized by aortic endothelial cells in culture. *Biochemistry* 19:5747-5753.
- SINGH, V. P.; BANSAL, M. P. & RAM, G. C. 1988. A note on isolation of glycoprotein antigen from bovine leukemia virus infected cell cultures. *Indian Veterinary Journal* 65:1040-1042.
- STOTT, M. L.; THORNDON, M. C.; DUNN, S. J.; OSBURN, B. I. & STOTT, J. L. 1991. Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic /suppressor lymphocytes. *J. of Gen. Virol.* 72:307-315.
- VERNON, R. B.; ANGELLO, J. C IRUELA-ARISPE, M. L.; LANI T. F. & SAGE, H. 1992. Reorganization of basement membrane matrices by cellulose traction promotes the formation of cellular networks in vitro. *Laboratory Investigation* 66:536-547.
- ZANDOMENI, R. O.; CARRERA ZANDOMENI, M.; ESTEBAN E.; DONAWICK, W. & FERRE, J.F. 1992. Induction and inhibition of bovine leukemia virus expression in naturally infected cells. *Journal of General Virology* 73:1915-1924.
- cing cells. *Folia Biologica (Praha)* 39:129-135.
- ROVNAK, J.; CASEY, J. W.; BOYD, A. L., GONDA, M. A., & COCKERELL, G. L. 1991. Isolation of bovine leukemia virus infected endothelial cells from cattle with persistent lymphocytosis. *Lab. Invest.* 65:192-202.
- RYAN, U. S. & MAXWELL, G. 1986. Isolation, culture, subculture of bovine pulmonary artery endothelial cells: mechanical methods. *J. Tiss. Cult. Meth.* 10:3-5.
- SAGE, H.; PRITZL, P. & BORNSTEIN, P. 1980. A unique, pep-

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA LABORATORIO DE NUTRICION ANIMAL - GUIA DE SERVICIOS

ANALISIS BROMATOLOGICOS:

CALCIO	\$ 8.200.00
CENIZAS	\$ 3.000.00
DIGESTIBILIDAD IN VITRO (EN FLUIDO RUMINAL)	\$ 23.400.00
EXTRACTO ETERE0	\$ 8.700.00
FIBRA DETERGENTE ACIDA FDA	\$ 9.300.00
FIBRA DETERGENTE NEUTRA FDN (PAREDES CELULARES)	\$ 9.300.00
FIBRA CRUDA	\$ 7.800.00
FOSFORO	\$ 8.200.00
HUMEDAD	\$ 3.100.00
PROTEINA CRUDA (Nx 6.25)	\$ 7.400.00

INFORMES:  368 1294