

Mejoramiento de la calidad de la leche

Biología en Producción Animal

Juan Fernando Medrano. Departamento de Ciencia Animal. Universidad de California. U.S.A. (*)

La biotecnología ofrece un enorme potencial para incrementar la producción y mejorar la calidad de los productos de origen animal a través de nuevas tecnologías que permiten la manipulación del genoma de los animales. La incorporación a la biología de las técnicas de ingeniería genética molecular o DNA recombinante han hecho esto posible en las últimas dos décadas.

La industria lechera ha sido líder en producción animal al aprovechar los frutos de las nuevas técnicas biotecnológicas, y ello contribuirá indudablemente en los próximos años a mantener el histórico crecimiento acelerado en el aumento de la producción lechera de un 2% anual por vaca (U.S. Congress, Office of Technology Assessment, 1991).

Nuevas tecnologías para el mejoramiento de la producción, la salud, reproducción y el procesamiento de alimentos están siendo desarrolladas. La producción de animales transgénicos y clones de bovinos ya es una realidad. Estas técnicas se usarán para mejorar la producción y la calidad de la leche, para desarrollar nuevos productos lácteos y para mejorar la calidad del hato y la salud de los animales.

En el presente trabajo describiré algunas aplicaciones e investigaciones biotecnológicas en producción animal en las que nosotros estamos trabajando en la Universidad de California en Davis.

MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL GANADO LECHERO

El mejoramiento genético de la población de ganado lechero mediante

(*) VIII Curso de Especialización. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.

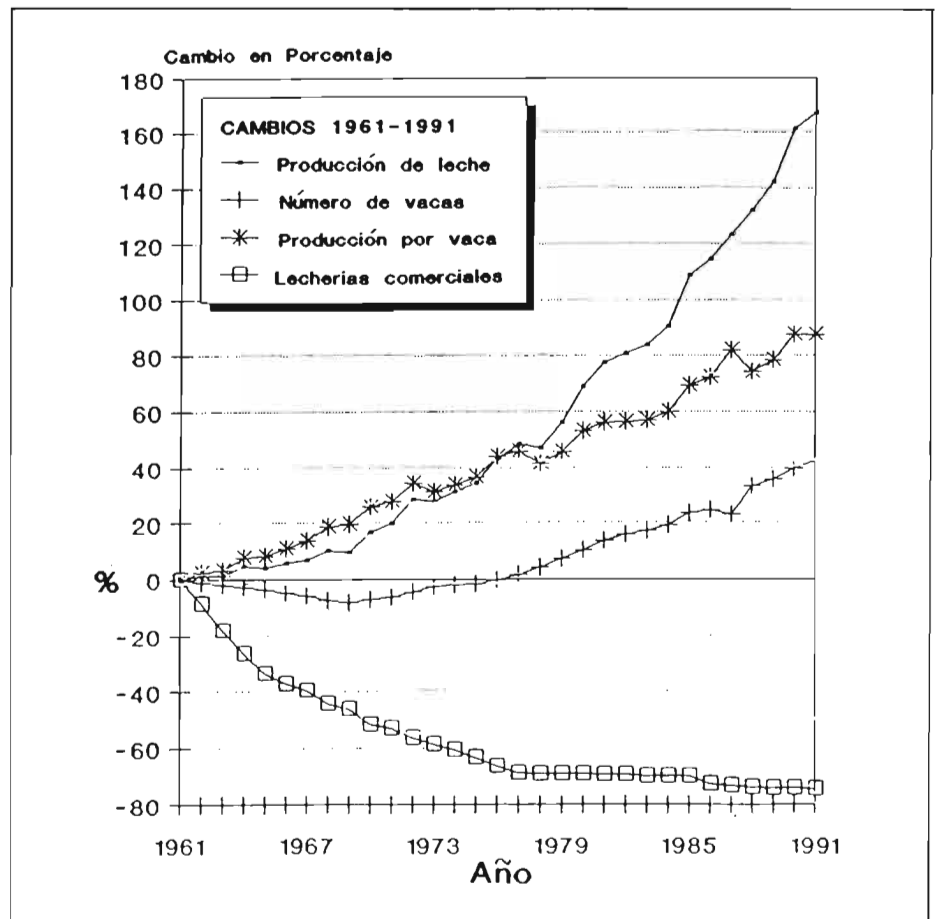


Fig. 1. Cambios comparativos en la industria lechera de California de 1961 a 1991: producción de leche de 3.629 a 9.691 t, producción por vaca de 4.463 a 8.355 k, número de vacas de 813.000 a 1.160.000 y número de lecherías de 9.302 a 2.392 (California Dairy information bulletin, Vol. II - N.º 3, May 1992).

la evaluación de toros y vacas a partir de los registros de producción en los programas nacionales de evaluación, como NCDHIP (National Cooperative Dair Herd Improvement Program) en los Estados Unidos, y mediante selección, han producido una significativa y consistente mejoría en la producción de leche.

Actualmente se estima que el aumento anual en valor genético de la población de ganado lechero en los Estados Unidos es de 123 k de leche por vaca por año (Powell, 1991). Este cambio en mejoramiento genético ha

sido alcanzado principalmente por la evaluación estadística y la aplicación de un modelo genético aditivo en la selección de toros.

La fig. 1 muestra en forma comparativa los dramáticos cambios que han ocurrido en la industria lechera de California de 1961 a 1991. La producción de leche, como resultado de los cambios genéticos en la población, ha aumentado de 4.463 a 8.355 k de leche por vaca por lactancia, y consistentemente puede proyectarse un incremento en la producción del 2 al 3% anual.

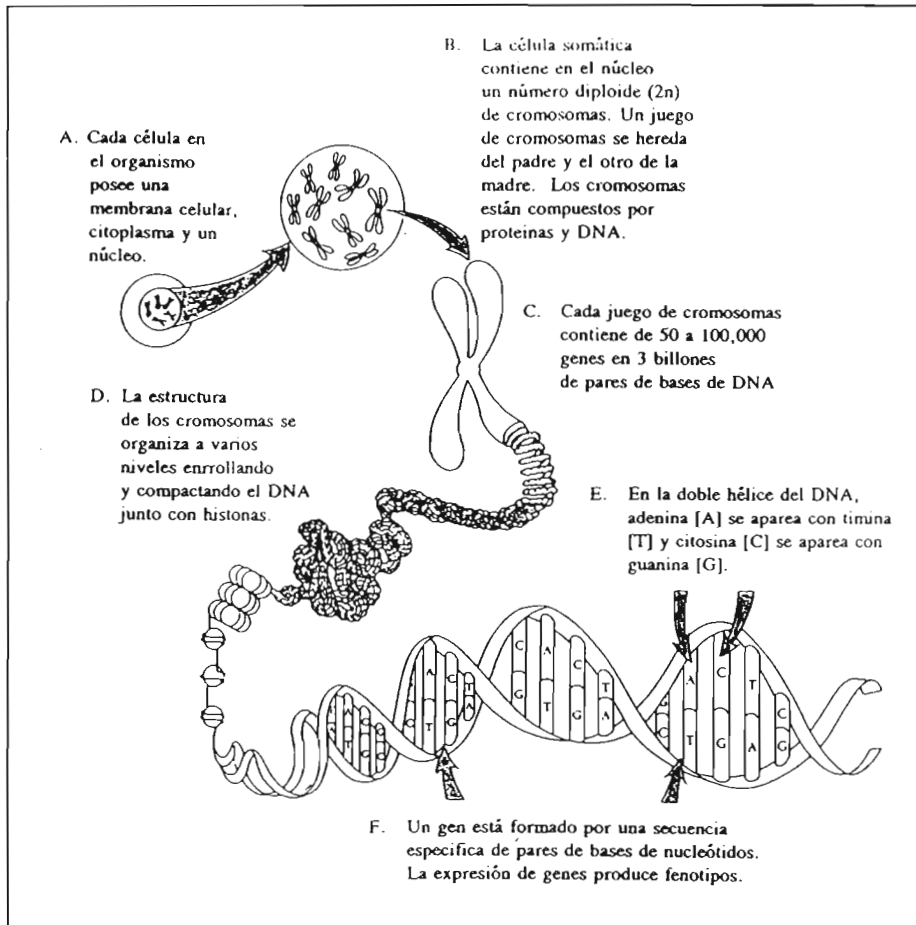


Fig. 2. Diagrama mostrando los diferentes niveles de organización del genoma animal, de los cromosomas, de los genes y del ADN (Diagrama modificado de "Human Heredity: Principles and issues" por M.R. Cummings, 2nd edition, St. Paul, MN: West Publishing Co., 1992).

La evaluación de toros utilizando pruebas de progenie es bastante precisa pero requiere un período de espera para obtener, por lo menos, registros parciales de la lactancia de las hijas, y por consiguiente ello aumenta el intervalo de tiempo entre generaciones.

Con el advenimiento de las nuevas tecnologías moleculares, se están desarrollando métodos que mejorarán las posibilidades de identificación de animales superiores en la selección de toros jóvenes, reduciendo el costo en los programas de pruebas de progenie.

En los años futuros, estos métodos se utilizarán en conjunto con las técnicas estadísticas para continuar el mejoramiento del ganado lechero. Diversos marcadores genéticos pueden identificarse en el ADN de un animal obtenido de una muestra de sangre. De estos marcadores, los que se relacionen con características de producción mejorarán la eficiencia de selección por rendimiento y calidad de la leche, mientras que marcadores de enfermedades genéticas recesivas proveerán un

medio para controlar y eliminar rápidamente estas enfermedades de la población.

**INFORMACION GENETICA/
GLOSARIO**

A continuación, como una introducción a la biotecnología, se describen principios fundamentales y terminología relacionados con la organización y funcionamiento del material genético en la célula y con la genética molecular.

El **genoma** es todo el material genético presente en una sola célula de un organismo. De este material genético, el **ADN** (ácido desoxirribonucleico) es la fuente de información para todas las actividades celulares durante toda la vida de la célula o del organismo. Todas las células de un organismo contienen esencialmente la misma información en su contenido de ADN. El ADN es una molécula formada por una doble hélice de dos cadenas complementarias de polímeros de bases nitrogenadas (adenina [A], timina [T], citosina [C] y guanina [G] unidas a un esqueleto de azúcares y fosfatos) (fig. 2). La secuencia de bases es la fuente de información que forma el código genético (Watson *et al.* 1992).

El genoma bovino contiene aproximadamente 3 billones de pares de bases de ADN, empacadas en 30 pares de cromosomas. Los cromosomas están localizados en el núcleo de la célula. Cada cromosoma contiene una sola molécula de ADN (aproximadamente 2 m de ADN) asociada con un tipo de proteínas pequeñas llamadas histonas que juegan un papel importante en la organización de la estructura de los cromosomas (fig. 2).

El gen es la unidad fundamental física y funcional de información genética o de la herencia. Cada gen es una secuencia de bases de ADN que contiene la información para sintetizar una cadena polipeptídica o un polímero de aminoácidos que forma una proteína. Los genes están localizados linealmente en los cromosomas. Se calcula que los genomas de animales superiores contienen aproximadamente de 50.000 a 100.000 genes funcionales. Los genes varían de tamaño, pudiendo contener hasta unas 30.000 bases, pero únicamente un 10% de las bases contienen información útil que se traduce en proteínas (Human Genome, 1990).

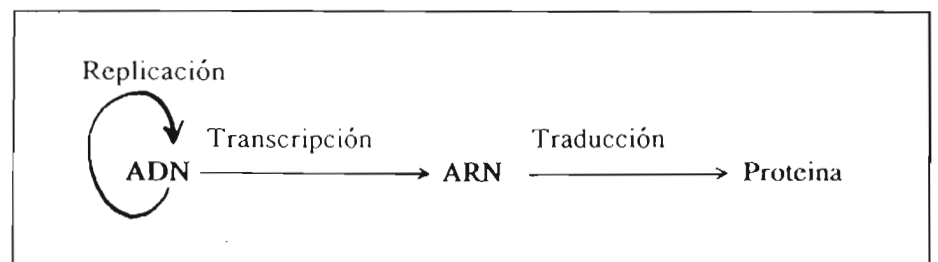


Fig. 3. Dogma central de la genética molecular. La síntesis de una proteína se lleva a cabo por medio del flujo de información genética del ADN al ARN —transcripción— y del ARN a la proteína —traducción—.

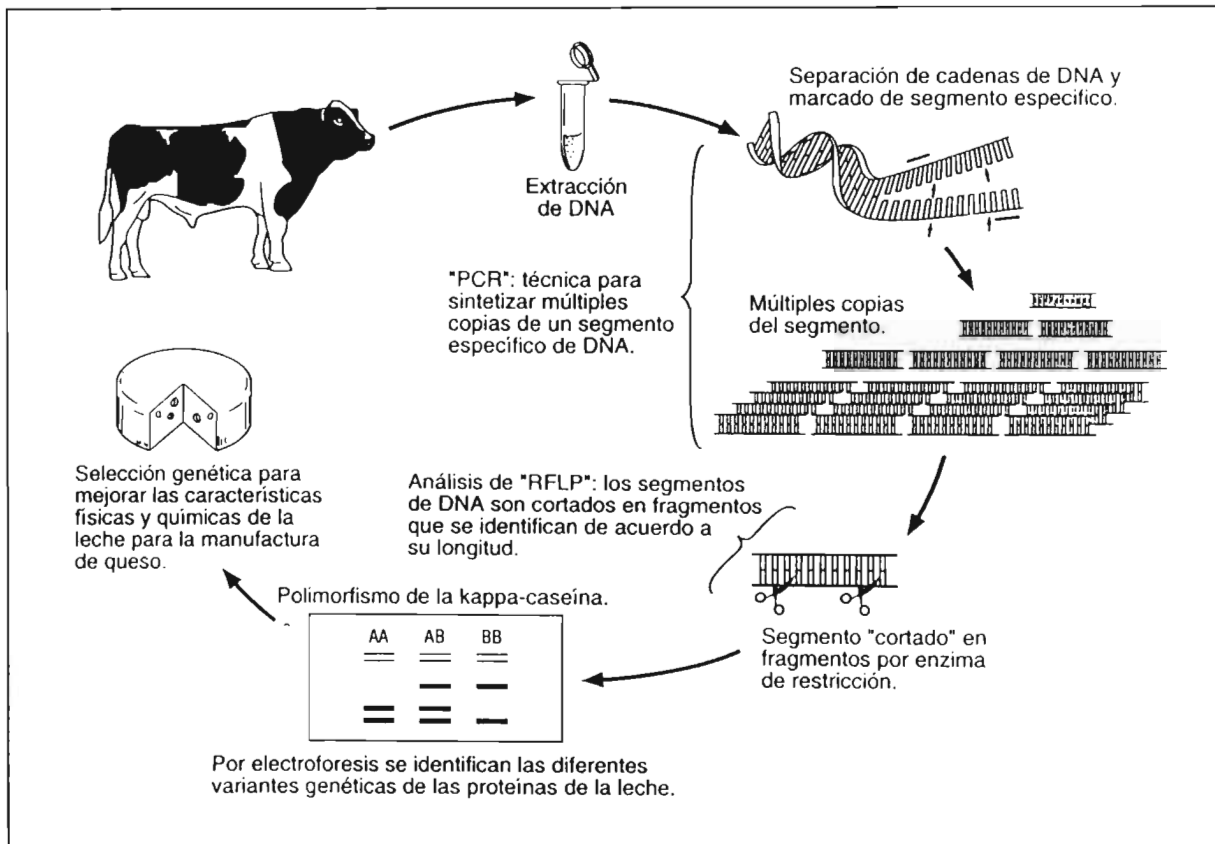


Fig. 4. Diagrama mostrando el procedimiento de análisis de una muestra de ADN para clasificar polimorfismos de la kappa-caseína utilizando la técnica de PCR.

Las proteínas son el producto de genes: la transmisión de información genética codificada en el ADN, que especifica el orden lineal de aminoácidos en una proteína, se realiza a través de otro ácido nucleico, el ARN (ácido ribonucleico). El flujo de información genética de ADN → ARN → proteína se conoce como el dogma central de la genética molecular.

El dogma central incluye (fig. 3) la transmisión de información genética a través de generaciones, o la replicación del ADN que se transmite en los gametos. La expresión del material genético requiere dos pasos: primero la información genética se copia a una molécula de ARN conocida como el ARN mensajero, o ARNm (paso de transcripción). El ARNm sale del núcleo de la célula al citoplasma, donde a partir de la información codificada en el ARNm se sintetiza la secuencia de aminoácidos de una proteína (paso de traducción) (Lewin, 1990).

El gen es una entidad relativamente estable, pero está sujeto a cambios ocasionales de su secuencia. Estos cambios en la secuencia del ADN se denominan mutaciones. Las mutaciones pueden o no generar alteraciones en la secuencia de las proteínas a las que

codifican, y por ende, afectar en forma positiva o negativa a las funciones de los organismos.

Las mutaciones son la fuente de variabilidad en las poblaciones (Falconer, 1989). Cuando una mutación ocurre en un gen, la nueva forma del gen o alelo se hereda en la misma manera que la forma normal original del gen. Un gen que tiene dos o más alelos se denomina polimórfico.

En la biología moderna la caracterización de la estructura de los genes y la elucidación de las funciones de los productos que codifican son las áreas más activas de investigación genética. Varias estrategias para alcanzar estos objetivos, que empezaron con el PROYECTO DEL GENOMA HUMANO, se han iniciado también en otras especies (U.S. Human Genome Project, 1991).

El mapeo de genes o la determinación de la posición relativa de los genes en cromosomas y de la distancia entre ellos es la parte central de este esfuerzo. De acuerdo al método que se utiliza para construir un mapa y a la unidad de medida que se utiliza para medir la distancia entre los genes, éstos se clasifican en mapas genéticos y mapas físicos (Bayrhuber, 1991). Los

mapas genéticos pueden utilizarse para identificar la asociación de genes con enfermedades hereditarias y con otras funciones biológicas del organismo. En bovinos existe ya un buen número de genes que se han mapeado o asignado a cromosomas específicos (Fries, 1989).

MARCADORES GENÉTICOS

Proteínas lácteas. En nuestro laboratorio hemos desarrollado varios métodos rápidos y exactos utilizando técnicas moleculares para clasificar el genotipo de la Kappa-caseína, betalactoglobulina y beta-caseína en bovinos, así como un método para determinar el sexo en embriones (Medrano y Aguilar-Córdoba, 1990a,b; Medrano, 1990; Aasen y Medrano, 1991; Medrano y Sharrow, 1991). Estas técnicas, que utilizan la tecnología de «PCR» (Polymerase chain reaction of gene amplification), han abierto el camino en la industria lechera para utilizar de forma práctica marcadores a nivel del ADN como asistencia en los programas de selección. La fig. 4 muestra un esquema de cómo se realiza esta clasificación de marcadores a nivel del ADN usando PCR.

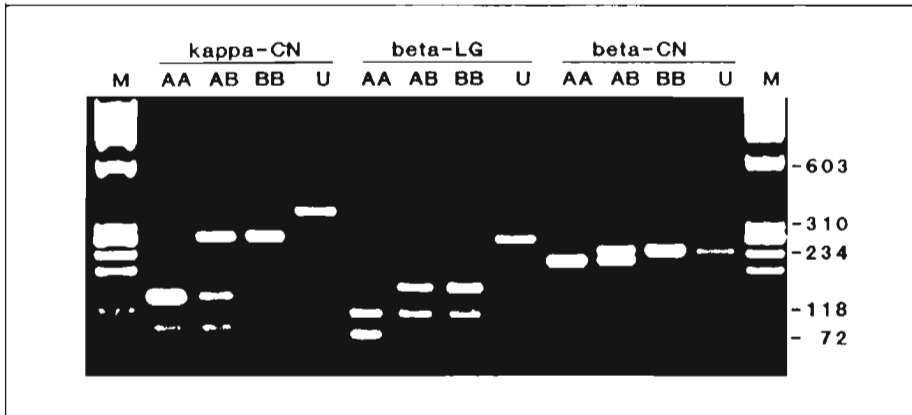


Fig. 5. Gel de agarosa mostrando la separación por electroforesis de fragmentos para clasificar los genotipos AA, AB y BB de la kappa-CN, beta-LG y beta-CN. U, fragmentos amplificados sin cortar por enzimas de restricción. M, marcador molecular (Φ X174 HaeIII).

El procedimiento de PCR o de amplificación usando la reacción en cadena de la polimerasa es una técnica molecular que esencialmente permite sintetizar en pocas horas millones de copias de un segmento específico de un gen a partir de una pequeña cantidad de ADN.

La técnica es tan precisa y sensible que la cantidad de ADN presente en una sola célula es suficiente para realizar PCR. Como resultado de una amplificación exponencial se puede determinar la presencia o no de secuencias específicas en el genoma. Así, las secuencias que se encuentran presentes pueden analizarse de varias formas para detectar mutaciones o alelos polimórficos.

El análisis de polimorfismos se puede hacer fácilmente cortando en fragmentos el segmento amplificado con enzimas llamadas «endonucleasas de restricción». Estas enzimas reconocen secuencias específicas en el ADN y lo cortan. Los fragmentos de ADN pueden entonces observarse directamente, separándolos por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida.

Este tipo de análisis con endonucleasas de restricción para clasificar polimorfismos es el denominado análisis de «RFLP» (Restriction Fragment Length Polymorphism). La fig. 5 muestra una típica separación por electroforesis de fragmentos de ADN correspondientes a genes que codifican las proteínas de la leche, amplificados por PCR y cortados con enzimas de restricción.

La clasificación de los genotipos de la kappa-caseína (kappa-CN) se ha generalizado en la industria lechera de los Estados Unidos, y es una evalua-

ción que se realiza de forma rutinaria en los toros que se usan para inseminación artificial.

Varios estudios (Grosclaude, 1988; Schaar *et al.*, 1985) han demostrado que la evaluación de los polimorfismos de la kappa-caseína y la selección de animales portadores del alelo B resulta en un mejoramiento en el contenido de proteína y calidad de la leche para la manufactura de quesos. Nosotros hemos encontrado que el alelo B de la kappa-caseína produce una mayor cantidad total de kappa-CN en la leche (Van Eenennaam y Medano, 1991).

La cantidad de kappa-CN presente determina la estructura y tamaño de los micelios de caseína; los micelios pequeños contienen una mayor proporción de kappa-CN que los micelios grandes (Schmidt, 1980). Los micelios más pequeños y uniformes de las vacas kappa-CN BB forman un coágulo firme y denso que retiene más sólidos e incrementa el rendimiento en la manufactura de quesos (Schaar, 1981).

Enfermedades hereditarias. Además de los marcadores genéticos relacionados con la producción y las características de composición de la leche, los marcadores moleculares para identificar animales portadores de genes recesivos representan un avance significativo para mejorar la salud en poblaciones animales.

Un sistema que ha sido caracterizado recientemente es la identificación en bovinos de la enfermedad autoinmune denominada deficiencia de adhesión de leucocitos, «BLAD» (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency) (Shuster y Kehrlí, 1992). BLAD es una enfermedad inmunológica de naturaleza genética que se debe

a una mutación en el gen de la proteína CD18, una proteína presente en la superficie de los leucocitos.

La mutación causa defectos en los neutrófilos, resultando en una alta susceptibilidad a infecciones bacterianas (Kehrlí *et al.* 1990). Los terneros afectados con BLAD desarrollan deficiencias de crecimiento, son susceptibles a infecciones crónicas, y generalmente mueren a una temprana edad. BLAD se ha identificado en el ganado Holstein de todo el mundo; aparentemente la mutación ocurrió inicialmente en un famoso toro de la raza Holstein llamado «Osborne Dale Ivanhoe», que fue usado activamente en las décadas de los 50 y 60.

Los sistemas de diagnóstico que se han desarrollado para identificar los portadores de BLAD son similares al procedimiento usado para clasificar los polimorfismos de las proteínas de la leche (figs. 4 y 5). En aproximadamente 1.669 toros Holstein utilizados en inseminación artificial en los Estados Unidos se encontró una frecuencia de toros portadores del 14% (Shuster *et al.* 1992). Miles de animales han sido producidos por estos toros alrededor del mundo, pero gracias a la disponibilidad de un sistema molecular rápido y exacto para identificar la mutación de BLAD los toros portadores han sido eliminados del servicio para inseminación artificial y esta seria enfermedad no hará mayor daño a la población mundial de ganado Holstein.

VACAS TRANSGENICAS

La transferencia de genes de un organismo a otro es un proceso natural que produce variación genética en los animales. A diferencia de los procesos naturales de transferencia de genes a través de cruzamientos, la ingeniería genética nos presenta un nuevo horizonte de oportunidades para alterar el genoma animal a través de la manipulación de genes y la creación de animales transgénicos. Los animales transgénicos contienen como parte permanente de su información genética un gen (una secuencia de ADN) que ha sido introducido artificialmente en las células germinales.

Modificación de la glándula mamaria. Esta habilidad de transferir

genes en las células germinales de una animal ha traído consigo innovadoras oportunidades para modificar significativamente las características de producción de los animales domésticos (Wilmot *et al.*, 1991; U.S. Congress, Office of Tech. Asses., 1991).

Existe un interés particular en aplicar esta tecnología a la vaca lechera para aprovechar la habilidad biosintética de la glándula mamaria. El interés en modificar la glándula mamaria se ha generado con dos principales objetivos: un objetivo ha sido el de mejorar la calidad nutricional y las propiedades de procesamiento de la leche (Kang *et al.*, 1985; Wilmot *et al.*, 1990; Oh y Richardson, 1991), mientras el otro se relaciona con utilizar la glándula mamaria como una fábrica para la producción comercial de proteínas de uso farmacéutico (Wilmot *et al.*, 1991; Ebert *et al.*, 1991; Wright *et al.* 1991; Clark *et al.* 1992).

La vaca es el animal ideal para la producción de proteínas farmacéuticas en la leche por los altos niveles de producción que se pueden alcanzar (10.000 k por lactancia) y por su alto rendimiento proteico, de aproximadamente 35 g de proteína por l. Sin embargo, muy pocos bovinos transgénicos se han producido, debido principalmente al alto costo de producción y manutención de bovinos y por dificultades en la obtención de un alto número de embriones (Krimpenfort *et al.* 1991).

Recientemente el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular y de fisiología de la reproducción han superado muchos de los obstáculos técnicos para producir vacas transgénicas. Nuevas técnicas como la superovulación, maduración y fertilización in-vitro de embriones, determinación del sexo y clasificación de los embriones transgénicos han permitido mejorar la eficiencia y costo para producir bovinos transgénicos (U.S. Congress, Office of Technology Assessment, 1991).

El desarrollo de esta tecnología requiere la colaboración de investigadores de diversas disciplinas. En la Universidad de California en Davis el grupo de colaboradores en el programa para producir vacas transgénicas incluye a los siguientes investigadores: Dr. G.B. Anderson (embriología y fisiología de la reproducción), Dr. J.F. Medra-

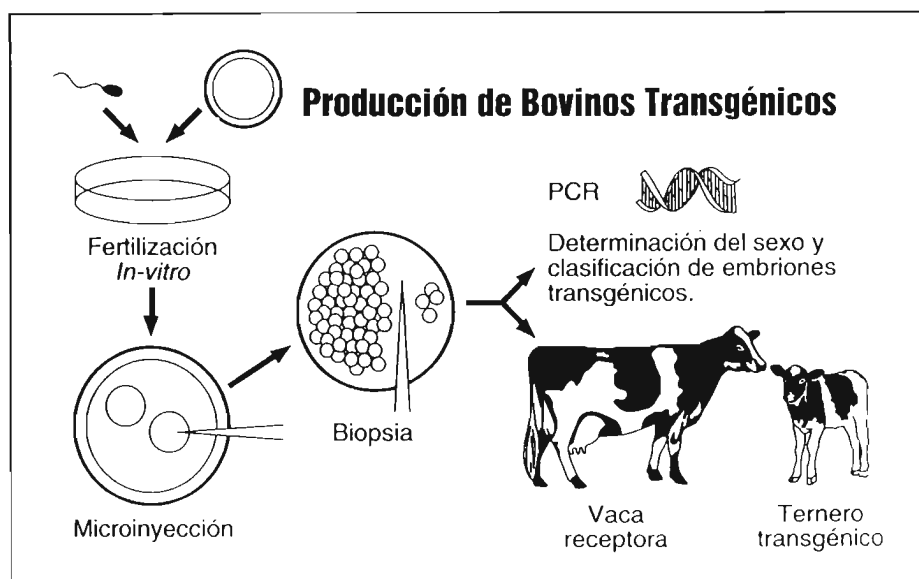


Fig. 6. Diagrama mostrando la producción de bovinos transgénicos.

no y Dr. J. Murray (genética molecular), Dr. E. Behboodi (investigador de postgrado en morfología), S. Horvat (estudiante graduado) y Dr. B. BonDurant (transferencia de embriones). Nuestro interés es el de modificar la composición de la leche para mejorar sus características nutricionales y sus propiedades de procesamiento.

Producción de vacas transgénicas. La fig. 6 muestra un diagrama de cómo las técnicas moleculares y de fisiología de la reproducción se combinan en la producción de vacas transgénicas. La producción de vacas transgénicas puede resumirse en cuatro pasos principales:

1.º **Identificación del gen.** El gen (transgen) que se desea introducir debe primero ser identificado, aislado y purificado. El transgen debe entonces combinarse con otro gen regulador que controle su expresión en un tejido específico del organismo, como la glándula mamaria. Algunos de los genes que se han usado como reguladores de expresión en la glándula mamaria son el gen bovino de la caseína alfa_{s1} (Meade *et al.*, 1990), el de la beta-lactoglobulina ovina (Whitelaw *et al.*, 1991) y el de la beta-caseína bovina y caprina.

Entre los transgenes de proteínas farmacéuticas que están siendo desarrollados para expresar en la glándula mamaria se incluyen el gen de la lactoferrina (una proteína humana que facilita la absorción de hierro para agregar a los leches infantiles artificiales), la antitripsina alfa-1 (una proteína humana para el tratamiento del enfisema) y CFTR (una proteína del epite-

lio respiratorio para el tratamiento de la fibrosis quística) (Spalding, 1992).

2.º **Producción y manipulación de embriones transgénicos.** Como fuente de óvulos inmaduros se utilizan ovarios de vacas adultas sacrificadas en matadero, los cuales se extraen directamente por succión de los folículos ováricos. Los óvulos se mantienen a 39 °C durante 22 a 24 h (maduración), se fertilizan in-vitro y 17 a 19 horas después se introduce el ADN transgénico mediante microinyección. Utilizando una finísima micropipeta, aproximadamente 10⁻⁹ ml de solución del ADN transgénico se inyectan en uno de los pronúcleos del embrión.

En los embriones bovinos es necesario, previo a la microinyección, centrifugar los embriones para estratificar el citoplasma y poder ver el pronúcleo. Los embriones microinyectados se cultivan in-vitro durante 7 a 8 días hasta la etapa de blastocito (64 a 100 células). En esta etapa mediante microdissección se toma una biopsia embrionaria (aproximadamente 20 células) para determinar el sexo e identificar los embriones transgénicos.

3.º **Determinación del sexo y clasificación de embriones transgénicos.** Utilizando la técnica de PCR (fig. 4) hemos desarrollado procedimientos rápidos y precisos de co-amplificación (Horvat *et al.* 1992) que permiten clasificar la presencia o no del transgen en el embrión y a su vez clasificar el sexo usando genes marcadores de los cromosomas X e Y (Aasen y Medrano, 1991).

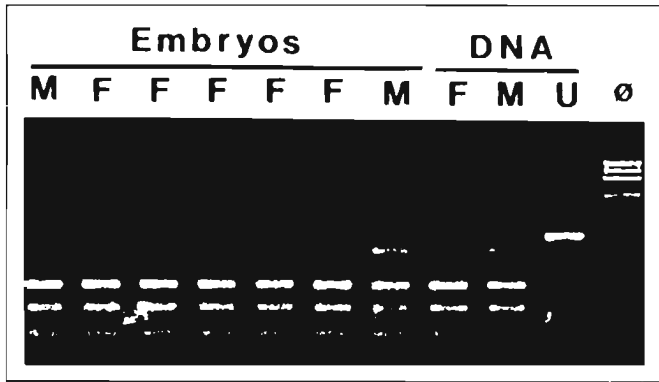


Fig. 7. Separación de ADN amplificado mediante PCR en un gel de agarosa para identificar el sexo de embriones bovinos. Un fragmento de 313 bp correspondiente a los genes marcadores ZFX y ZFY, localizados en los cromosomas X e Y de bovino, respectivamente, se amplificó usando PCR. El fragmento se clasificó cortándolo con la enzima endonucleasa de restricción, HinfI. En el fragmento proveniente del cromosoma X se producen cuatro fragmentos de 148, 101, 58 y 6 bases de largo, que se observan en el sexo femenino (F) y masculino (M). En el fragmento del cromosoma Y se producen tres fragmentos de 249, 58 y 6 bases de largo que se observan únicamente en el sexo masculino. Como control de la reacción se utilizó DNA o ADN bovino. U, fragmento amplificado sin cortar por enzima HinfI. M, marcador molecular (Φ X174 HaellI).

La clasificación de los embriones transgénicos es esencial para mejorar la eficiencia del sistema reduciendo los costos con el uso de un menor número de vacas portadoras. La determinación del sexo permite no sólo escoger el sexo de los animales transgénicos, sino también colocar en la vaca portadora varios embriones sin correr riesgos de esterilidad femenina en preñeces de gemelos de diferente sexo. La fig. 7 muestra un gel de agarosa con ADN amplificado mediante PCR para clasificar el sexo en embriones bovinos.

4.º *Transferencia de embriones a vacas receptoras.* Los embriones se transfieren directamente a vacas portadoras donde el celo se ha sincronizado previamente para coincidir con el desarrollo del embrión. La transferencia de embriones se realiza utilizando un procedimiento no quirúrgico, parecido al usado en inseminación artificial, colocando los embriones directamente en el útero de la vaca receptora. De los embriones transferidos a la vaca receptora se han observado porcentajes de preñez de un 20% (Krimpenfort *et al.* 1991).

PROYECTOS EN DESARROLLO

Modificación de la composición de ácidos grasos en la leche

Debido a una mayor educación del consumidor en relación con los temas de la salud, las industrias alimentarias se han visto en la necesidad de dedicar una mayor atención a la mejora de la calidad de sus productos. Para la industria lechera sería particularmente atractivo producir una leche con menor cantidad de grasa y con una menor cantidad de ácidos grasos saturados. En la Universidad de California en Davis

hemos iniciado un proyecto de investigación en colaboración con los Doctores E. DePeters y S. Berry para evaluar la factibilidad de modificar genéticamente la composición de ácidos grasos en la leche bovina.

Los objetivos de este proyecto de investigación son: 1) Evaluar cuál es la variabilidad de la composición de ácidos grasos en la leche bovina, en una muestra controlada de vacas que estén recibiendo la misma dieta y en la misma etapa de lactación (se analizarán muestras de leche de aproximadamente 700 vacas provenientes de 10 hatos); 2) Identificar vacas y familias de animales con un menor contenido en ácidos grasos saturados (principalmente merístico, palmítico y esteárico) y un mayor contenido en ácidos grasos insaturados (principalmente palmitoleico y oleico); y 3) Identificar posibles polimorfismos en genes importantes en el metabolismo de ácidos grasos en la glándula mamaria, que puedan utilizarse como marcadores en programas de selección.

La composición de los lípidos en la leche es bastante heterogénea. Aproximadamente un 10% son ácidos grasos de cadena corta (butírico 4:0, caproico 6:0, caprílico 8:0 y cáprico 10:0), el 60% o más son saturados (laúrico 12:0, merístico 14:0, palmítico 16:0 y esteárico 18:0); aproximadamente el 24% son monoinsaturados (oleico 18:1), y un 5% son poliinsaturados (linoléico 18:2) (DePeters *et al.* 1984).

Los ácidos grasos insaturados con una longitud de cadena de hasta 14 carbonos se sintetizan en la glándula mamaria a partir de acetato y beta-hidroxibutirato. Aproximadamente el 50% del ácido palmítico (16:0) es sintetizado en la glándula mamaria, y el otro 50% proviene de la sangre. El ácido esteárico (18:0) proviene de la

sangre, pero la glándula mamaria posee una enzima desaturasa que convierte el esteárico (18:0) en oleico (18:1). La composición de ácidos grasos de la leche es el resultado de la absorción de ácidos grasos de cadena larga provenientes de la sangre y de la síntesis en la glándula mamaria (Banks, 1987). Un incremento en el contenido de ácido oleico (18:1) presentaría la ventaja de mejorar la calidad de la grasa desde el punto de vista nutricional y de la salud del consumidor, así como el de poder manufacturar una mantequilla más suave.

En el presente proyecto se persigue aplicar un método de investigación que se denomina «reverse genetics» o de genética revertida. El objetivo final es el poder identificar un gen o genes marcadores polimórficos para utilizarlos en selección genética. Para ello se inicia el estudio identificando los límites de variabilidad fenotípica y buscando fenotipos extremos. Luego se procederá a identificar familias de animales que hereden los caracteres deseados. Estas familias, de encontrarse, se convertirán en la fuente central para el análisis molecular de genes importantes en el metabolismo de lípidos.

Reconocimientos

Se agradece a Luis A. Pérez Carrasco por sus valiosas sugerencias y correcciones para mejorar el lenguaje del presente manuscrito. La mayoría de las investigaciones descritas fueron parcialmente financiadas con fondos del «National Dairy Promotion and Research Board», Arlington, VA a través del «California Dairy Food Research Center» y por el «California Milk Advisory Board».

BIBLIOGRAFIA

Existe una amplia bibliografía en nuestra redacción a disposición del interesado.