

Identificación de población de riesgo para alergia a la leche de vaca

Identification of population at risk for allergy to cow's milk

Boudet RV¹, Copioli JC², Muiño JC³, Geréz de Burgos N¹, Chaig MR¹, Damilano G⁴, Chaig R.

Resumen

ANTECEDENTES: Los genotipos asociados con la alergia a la leche de vaca (ALV) son desconocidos. Aún no han podido ser replicados en poblaciones independientes, y podrían ser responsables de la marcada variabilidad de la respuesta clínica individual a las proteínas lácteas.

OBJETIVO: Caracterizar haplogrupos, de la Región D-Loop del ADN mitocondrial, en un grupo de niños ALV, con el fin de arribar a un mejor conocimiento de la herencia biológica y genética en la etiología de la enfermedad.

POBLACION Y METODO: *Diseño:* Análisis de mutaciones o variantes de la región D-loop del genoma mitocondrial. *Población:* 41 niños de ambos sexos de 0-2 años, 11 alérgicos ALV y 30 controles. (Río Cuarto, Córdoba, Argentina) Los pacientes ALV se dividieron, según la sintomatología que presentaban en 6 casos con Dermatitis Atópica (DA) + Enfermedad Gastrointestinal (EGI) y en 5 casos con Rinitis y Asma (RA).

La Región D-Loop del genoma mitocondrial se amplificó por PCR. El análisis filogenético fue calculado usando el programa CLUSTAL OMEGA, the Neighbor-Joining, BLOSUM62, con los datos estudiados y grabados por Jukes-Cantor y luego con Kimura-2, programas específicos disponibles (software).

RESULTADOS: Se encontró una mutación o variante nucleotídica no descrita T16519C en la transición de haplogrupos asociada a pacientes ALV con DA+EGI en 6/6 casos, comparados con 5/5 casos con RA que no la presentaron, mientras que en los controles se la observó solo en 6/30, $p=0,0312$; RR 2,900.

CONCLUSIONES: Estos hallazgos sugieren que esta mutación probablemente aumente la posibilidad de padecer ALV asociada con DA+EGI.

Palabras Claves: Alergia a la leche de vaca, haplogrupos, niños, mutación no descrita, genoma mitocondrial

Abstract

BACKGROUND: Genotypes associated to cow's milk allergy (CMA) are unknown. They have not been replicated in independent populations, and could be responsible for the marked variability in individual clinical response to milk proteins.

OBJECTIVE: To characterize haplogroups of the D-Loop region of mitochondrial DNA in a group of children allergic to cow's milk in order to arrive at a better understanding of biological and genetic heritability in the etiology of the disease.

POPULATION AND METHOD: *Design:* Analysis of mutations or variants of the D-loop of mitochondrial genome region. *Population:* 41 children of both sexes from 0-2 years, 11 with CMA and 30 healthy subjects (controls). (Río Cuarto, Córdoba, Argentina). The CMA patients were divided according to the symptoms presenting in: 6 cases with Atopic Dermatitis (AD) +

Gastrointestinal disease (GID) and in 5 cases with Rhinitis and Asthma (RA). The D-Loop Region of mitochondrial genome was amplified by PCR. Phylogenetic analysis was calculated using the program CLUSTAL OMEGA, the Neighbor-Joining, BLOSUM62, with studied and recorded by Jukes-Cantor data and then with Kimura-2, available specific programs (software). RESULTS: We found a non-descript mutation or variant nucleotide T16519C in the transition of haplogroups associated with CMA patients with AD+ GID in 6/6 cases, compared with 5/5 cases with RA that failed it, whereas in controls was observed it only in 6/30, $p = 0,0312$ RR 2,900.

CONCLUSIONS: These features suggest that this mutation probably increases the possibility of suffering CMA associated with AD + GID.

Key words: Cow's Milk Allergy, haplogroups, children, not decipher mutation, mitochondrial genome..

1. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de Córdoba (UNC) 2. Cátedra de Unidad Hospitalaria de Medicina interna Nº 1 Hospital Córdoba Facultad de Ciencias Médicas (FCM), UNC 3. Cátedra de Unidad Hospitalaria de Medicina interna Nº 4 Hospital Misericordia, FCM, UNC, 4. Facultad de Ciencias Humanas, Universidad Nacional de Río Cuarto. 5. Ex Profesor Titular de La Cátedra de Operaciones 1- en la Carrera de Ingeniería Química – Universidad Tecnológica de Córdoba.

Correspondencia: Raúl Vicente Boudet, Domicilio: Mendoza 844 (5800) Río Cuarto, e-mail: rulovboudet@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

La alergia a los alimentos es un problema de salud pública a nivel global. Su incidencia ha aumentado en la última década más rápidamente de lo que permitirían los cambios en el genoma. Sin embargo, todavía no se ha podido determinar cuáles son los factores ambientales que podrían interactuar con el riesgo adquirido genéticamente para desarrollar la enfermedad (1, 2). Algunos individuos poseen factores genéticos que confieren susceptibilidad o resistencia a una determinada patología en un entorno particular.

La historia familiar es un potente factor de riesgo para el desarrollo de la alergia alimentaria. Hay buena evidencia proveniente de estudios en gemelos, que señalan la importancia de

la variación genética, más aún cuando se asocia con otras enfermedades atópicas (3, 4, 5). La predisposición genética conduce a la producción de citocinas predominantemente TH2 (IL-4, IL-5, IL-9 y IL-13) que contribuyen a la sensibilización alérgica, originada en defectos intrínsecos de células T o de células presentadoras de antígenos (6). La alergia a la leche de vaca (ALV) es la principal causa de alergia alimentaria, afecta mayormente a los niños y no existe suficiente información referente a tendencias geográficas en su desarrollo. En ese sentido, los genotipos asociados con la ALV son desconocidos (aún no han podido ser replicados en poblaciones independientes) y podrían ser responsables de la marcada variabilidad de la respuesta clínica

individual a las proteínas lácteas (7).

Por eso, en la actualidad el riesgo de padecer ALV es definido de acuerdo a los antecedentes familiares (8, 9).

La población humana ha acumulado un alto número de sustituciones de bases en el ADN mitocondrial (ADNmt) a lo largo de linajes maternos, en los cuales las combinaciones específicas constituyen los haplogrupos mitocondriales supuestos (10, 11). Los haplogrupos ADNmt específicos para una población, pueden ser funcionalmente diferentes y ejercer influencias que podrían afectar los resultados de las enfermedades, ya sea exacerbando, retrasando o bien aminorando la sintomatología dada (12, 13, 14).

El avance en los estudios de secuenciación de la Región Hipervariable uno (HVI) de la región D-Loop en el ADNmt ha revelado que la tasa de mutación es diferente a lo largo del segmento. Algunas posiciones de la Región HVI, son extremadamente variables entre los linajes, mientras que otras, relativamente constantes (15).

El objetivo de esta investigación fue caracterizar haplogrupos de la Región D-Loop del ADN mitocondrial, en un grupo de niños alérgicos a la leche de vaca, con el fin de arribar a un mejor conocimiento de la herencia biológica y genética en la etiología de la enfermedad.

POBLACION Y MÉTODOS

Se estudiaron, 41 niños de 0 a 2 años de edad y de ambos sexos, que viven en la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Once (11) de ellos tenían diagnóstico de ALV y treinta (30) individuos sanos conformaron el grupo control. En todos los pacientes el diagnóstico se confirmó, luego de dos semanas de exclusión del alimento, por medio del desafío oral abierto, atendiendo a razones prácticas como son la corta edad de los niños y la baja sensibilidad de las pruebas diagnósticas realizadas (RAST IgE específica y Prick Test con extractos estandarizados).

Los niños ALV se dividieron de acuerdo al tipo de manifestaciones clínicas con que iniciaron la enfermedad en 6 casos con Dermatitis Atópica (DA) + Enfermedad Gastrointestinal (EGI) y en 5 casos con Rinitis y Asma (RA).

La región D-Loop y sus segmentos o Regiones Hipervariables HVI, HVII y HVIII del Genoma mitocondrial (Gmt), fue amplificada por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los "primers" utilizados fueron: Fw 16033 a 16055 y Rev. 50 a 29 (RHVI); Fw 29 a 51 y Rev. 713 a 693 (HVII y III). Las condiciones de la mezcla de incubación, para amplificar los productos en la PCR, tenían una temperatura de annealing (para los diferentes segmentos) en un rango de

56°C a 58°C. Posteriormente se realizó electroforesis en geles de agarosa al 2%, para la visualización de las bandas de ADN, con luz UV. Cada fragmento fue purificado y mandado a secuenciar para su análisis (dos determinaciones). Los resultados fueron comparados con la puesta del Consenso de la secuencia de Cambridge (GenBank Accession No.: NC_012920.1). Además, se utilizó la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/MITOMAP>), y las base de datos The Human Mitochondrial Genome Database H.M.G.D. (www.mitomap.org; www.genpat.uu.se/mtDB/).

Análisis Estadístico

Para determinar la asociación entre los haplogrupos y la enfermedad, se utilizaron tablas de contingencia y cálculo de riesgo (OR). El resumen estadístico de la diversidad genética fue calculado usando el programa CLUSTAL OMEGA versión 2.0.12 (Múltiples Alineaciones de la Secuencia). Para la filogenia se utilizó el Neighbor-Joining (NJ), BLOSUM62 (BLOCKS of Amino Acid SUBstitution

Matrix, o matriz de sustitución de bloques de aminoácidos) con datos estudiados y registrados por Jukes-Cantor y luego con Kimura-2 (16, 17, 18, 19).

Finalmente, se generaron nuevos árboles filogenéticos utilizando los métodos de Average distance tree using PID; Neighbour Joining tree using PID, Average distance tree using BLOSUM62, con el fin de compararlos con los obtenidos.

Consideraciones éticas

Este estudio se realizó previo consentimiento informado y se con la normativa de la Declaración de Helsinki, Buenas Prácticas Clínicas de ANMAT y Ley Provincial N° 9694. El estudio fue aprobado Comité de Bioética del Ministerio de Salud, Gobierno de la Provincia de Córdoba. Resolución N° 296..

Se asegura protección de datos personales de los pacientes según la Ley 25.326. Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

RESULTADOS

La Región D-Loop del Gmt fue comparada con cada matriz de la Región Hipervariable (HVI, HVII y HVIII) de cada paciente (paso 1). Se observó que las variantes de la Región HVI, se distribuyen acercándose o

alejándose del Gmt. El árbol filogenético usado para guía del proceso de múltiple alineamiento final, se calculó de la distancia matriz del paso 1, usando Neighbour Joining method. Este árbol indica qué

pacientes o controles se alejan más del ADNmt. El paciente 13a BS, fue, en nuestra investigación, el más próximo al Gmt, el 2a CG el más alejado, y el 1a MJC está ancestrado con el Gmt y con 13a BS, pero se aleja ancestralmente de los otros. El árbol dibujado para la HVII y HVIII, no refleja lo mismo, aunque si lo hace para 2b CG y 17b LB. Esto demuestra los cambios sufridos en el tiempo para ciertas variables (cambios nucleotídicos). En la Tabla 1, se muestran los haplogrupos y la identificación de cada variante o mutación de la población estudiada, en las Regiones HVI, HVII y HVIII, siguiendo los datos registrados en el mapa genético

(www.mitomap.org;

www.genpat.uu.se/mtDB).

Tanto los niños ALV como los controles, presentaron prevalencia de los siguientes haplogrupos:

RXIZGDZV; A+C+B; Tjgroup; UK,HVgroup; q; z; v; A+C1B y ACB, (el signo+ indica frecuencia). En la Tabla 2, se señala su distribución porcentual por áreas geográficas. Además, se identificó cada variante, su frecuencia, su pertenencia a un haplogrupo o no, si es una variable identificada en el

(www.mitomap.org;

www.genpat.uu.se/mtDB/), con que

otras variantes se encuentra asociada y de qué región ancestral proviene. Este procedimiento permitió observar la

Tabla 1. Haplogrupos y variantes genéticas en los niños estudiados

HAPLOGRUPOS	n
WT, A+C B (Europa, Asia)	2
RXIZGDZV, A+C+B (Europa, Asia)	10
ACBV (Asia, Europa)	1
WDEG, ACB (Europa, Asia)	5
RXIZGD, UK,Hvgroup; Q, A+C1+B (Europa, Asia)	5
B++ AC1 (Asia)	1
UK, Hvgroup, Q, Z, V, A+C1B (Europa, Asia)	6
T, J, Tjgroup, WT, A+ C+ (Europa, Asia)	6
Q (Asia)	1
T, J, Tjgroup, UK, Hvgroup, Q, DE, A++C+B (Europa, Asia)	1
ACB (Asia)	3
Total	41

prevalencia del haplogrupo C; TJ group; y de la mutación o variante no descripta T16519C (Figura 1).

El diagnóstico de ALV y la presencia de la variante nucleotídica no descripta T16519C se asociaron

significativamente al 10% ($p=0,095$);

Coeficiente de contingencia=0,252

(Prueba chi-cuadrado para la asociación entre grupo de pertenencia y presencia de la mutación). Un

paciente que posea dicha mutación, tiene mayor probabilidad de ser ALV que aquel que no la presenta:

OR=3,300, IC95% 0,785; 13,879 (Tabla 3).

La evaluación del indicador pudo resumirse como: Área ROC global 64%; Sensibilidad 55%; Especificidad 73%; Predictivo Positivo 43%; Predictivo Negativo 82%.

Se halló a la variante T16519C no descripta en la transición de haplogrupos asociada con los pacientes ALV que iniciaron la enfermedad con manifestaciones clínicas de Dermatitis Atópica (DA) + Enfermedad Gastrointestinal (EGI) en

6/6 pacientes, mientras que no hubo asociación en 5/5 pacientes que presentaron manifestaciones clínicas de inicio de Rinitis y Asma (RA), $p=0.0001$.

En el grupo control solo 6/30 individuos poseían la variante T16519C no descripta con una asociación también significativa, $p = 0,0312$ RR 2,900 (Figura 2).

Tabla 2. Distribución de haplogrupos por regiones geográficas en el grupo de niños alérgicos a la leche de vaca y en los controles

HAPLOGRUPO	Controles (n)	ALV (n)	Controles (%)	ALV (%)	Total (%)
Europeo	21	9	51,22	21,95	73,17
Asiático – Europeo	5	0	12,20	0,00	12,20
Asiático - Americano	3	2	7,32	4,88	12,20
Africano	1	0	2,44	0	2,44
Sub-Total	30	11	73,17	26,83	100,00

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca

Controles=grupo de niños sanos

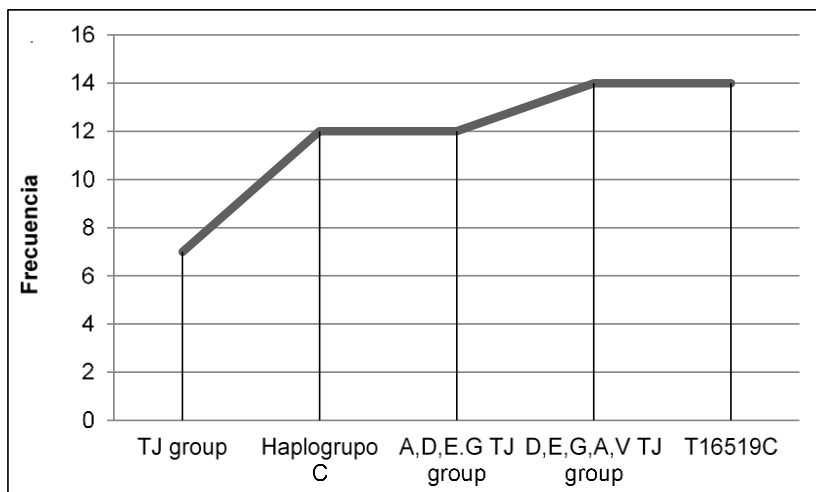


Figura 1. Prevalencia de haplogrupos y de la variante no descripta T16519C en los niños estudiados

Tabla 3. Presencia de la variante no descripta (T16519C) en niños alérgicos a la leche de vaca vs. controles

Variante no descripta (T16519)		Grupo		Total
		ALV	Controles	
NO	n	5	22	27
	% dentro de Mutación	18,5%	81,5%	100,0%
	% dentro de Grupo	45,5%	73,3%	65,9%
	% del total	12,2%	53,7%	65,9%
SI	n	6	8	14
	% dentro de Mutación	42,9%	57,1%	100,0%
	% dentro de Grupo	54,5%	26,7%	34,1%
	% del total	14,6%	19,5%	34,1%
Total	Recuento (n)	11	30	41
	% dentro de Mutación	26,8%	73,2%	100,0%
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%
	% del total	26,8%	73,2%	100,0%

ALV=grupo conformado por niños alérgicos a la leche de vaca

Controles=grupo de niños sanos

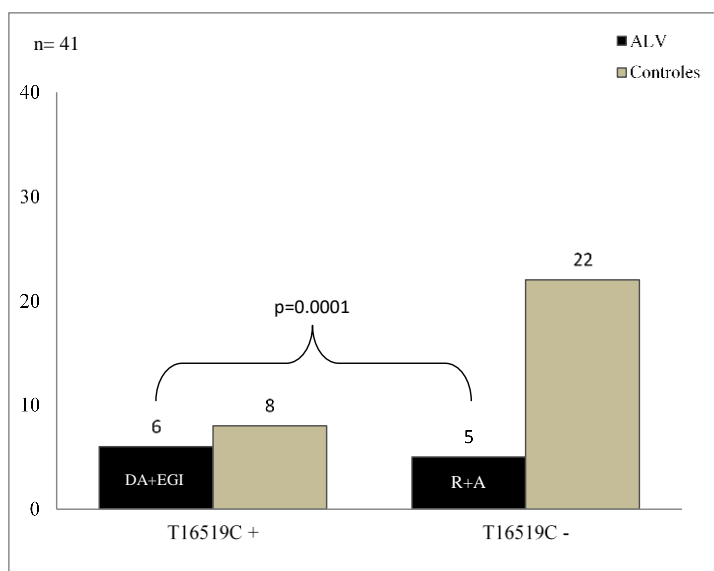


Figura 2. Relación entre manifestaciones clínicas y la presencia de la variante no descrita T16519C en niños alérgicos a la leche de vaca vs. controles
ALV= grupo de niños alérgicos a la leche de vaca; Controles: pacientes sanos
DA/EGI= Dermatitis Atópica/Enfermedad Gastrointestinal
R/A= Rinitis/Asma

DISCUSIÓN

En los últimos años se han descrito mutaciones que se han asociado con síndromes clínicos bien definidos. Las características genéticas del ADNmt, herencia materna, poliplasmia y segregación mitótica, confieren a estas enfermedades propiedades muy particulares. Las manifestaciones clínicas de estas patologías son muy heterogéneas y afectan a distintos órganos y tejidos por lo que su correcto diagnóstico implica la obtención de datos clínicos, morfológicos, bioquímicos y genéticos.

Por otra parte, la investigación de las diferencias genéticas subyacentes, heredadas por individuos predispuestos a la producción de células TH2, en

respuesta a alérgenos alimentarios, promete identificar mecanismos involucrados en determinar el desarrollo de la tolerancia inmunológica o en su defecto la enfermedad alérgica (20). En este sentido, la variabilidad clínica observada en la presentación de la ALV, podría explicarse en parte, por la presencia de polimorfismos en genes candidatos que influyen en su desarrollo.

Las variaciones nucleotídicas encontradas en el ADNmt humano determinan los haplogrupos, los cuales trazan la ascendencia matrilineal hasta los orígenes de la especie humana en África y desde allí a su dispersión geográfica global. Los haplogrupos más

antiguos son más grandes y se encuentran más dispersos y de ellos descienden numerosos subgrupos. La migración, dando por resultado el aislamiento de la población, es una de las cuatro fuerzas evolutivas junto a la selección natural, deriva genética y mutación. La disciplina de genética de la población (Gp), es el estudio de la distribución de frecuencias y del cambio en la variación del gen (alelo) bajo tales influencias (21).

La Gp observada en poblaciones modernas, ha abierto una ventana en los patrones históricos de migraciones, con una técnica iniciada por Luigi Luca Cavalli-Sforza (22).

Nuestro estudio, se concentró en conocer además de los haplogrupos nativos en América, qué otros haplogrupos en el ADNmt se presentan en la población estudiada (mediados por la inmigración y el medio ambiente u otros factores) y de qué manera influyen en el desarrollo de la enfermedad ALV.

Para observar las posibles relaciones genealógicas entre los distintos compases, utilizamos una técnica común en el análisis filogenético que nos ayudara a analizar y visualizar el conjunto de datos obtenidos en el cuadro (matriz) de distancias. Esta técnica de análisis de datos se basa en la generación de los llamados árboles filogenéticos, que son estructuras geométricas de interconexión que

representan la posible relación entre las distintas especies en estudio. El común ancestro más reciente es el ADNmt, con quién se alinearon cada uno de los niños incluidos en este estudio.

El interrogatorio realizado a sus padres, denunció un origen ancestral como descendientes de españoles, italianos y criollos. Sin embargo, la presencia del haplogrupo Q que deriva del M y éste del L3 (Africano), en este grupo de niños, indicaría migración que da origen a la diversidad del mestizaje (22, 23).

Por otra parte, no es frecuente que los niños ALV comiencen la enfermedad con la afectación del sistema respiratorio, como única manifestación clínica (8). Al respecto, la variante no descrita (cambio nucleotídico T16519C) estuvo presente solo en los niños ALV que iniciaron la enfermedad con manifestaciones clínicas gastrointestinales y dérmicas.

CONCLUSIONES

La variante no descrita (T16519C) se presentó con mayor frecuencia en los niños que habían sido diagnosticados como ALV.

El riesgo de desarrollar ALV fue 3 veces más elevado en los pacientes que la poseían.

Todos los niños ALV que iniciaron la enfermedad con manifestaciones clínicas de Dermatitis Atópica (DA) y Enfermedad Gastrointestinal (EGI), la

presentaron. Esto sugiere que la presencia de esta mutación probablemente aumente la posibilidad de padecer ALV asociada con DA+EGI. En el desarrollo de la ALV estarían involucrados además del ADN mitocondrial otros genes nucleares y factores epigenéticos que hacen al fenómeno y quizás al proteoma. Futuras

investigaciones que involucren al Gmt completo, serán necesarias para poder correlacionar las variantes de la Región Control D-Loop con el o los haplogrupos correspondientes, lo que resultaría en los haplotipos o subhaplotipos que las caracterizan, tanto para la variante no descrita T16519C como para otras hipotéticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leung PSC, Shu S-A, Chang C. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2014; 46:169-179
2. Tan N TH, Ellis JA, Saffery R, Allen KJ. The role of genetics and environment in the rise of childhood food allergy. *Clin Exp Allergy* 2012; 42:20-29.
3. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:638-46.
4. Hourihane JO, Dean TP, Warner JO. Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *BMJ* 1996; 313:518-21.
5. Tsai HJ, Kumar R, Pongracic J. Familial aggregation of food allergy and sensitization to food allergens: a family-based study. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:101-9.
6. Chinthrajah RS, Hernandez JD, Boyd SD, Galli SJ, Nadeau KC. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 ;137(4):984-97.
7. Ortolani C, Pastorello EA. Food allergies and food intolerances. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20:467-83.
8. Fiocchi A, Brozek J, Schunemann H, Bahna SL, Von Berg A, Beyer K, et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21:1-125.
9. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Hypoallergenic infant formulae. *Pediatrics* 2000; 106:346-49.
10. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Diagnosis and management of food allergy. *Allergy* 2014; 69: 1008–1025.
11. Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 1999; 238:211-30.
12. Torroni A, Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *J Bioenerg Biomembr* 1994; 26:261-71.
13. Brown MD, Torroni A, Reckord CL, Wallace DC. Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. *Hum Mutat* 1995; 6:311-25.
14. Kofler B, Mueller EE, Eder W, Stanger O, Maier R, Weger M, Hass A, et al. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med Genet* 2009; 10:35-42.

15. Wakeley J. Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 1993; 37:613-23.
16. Saitou N, Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4(4):406-425.
17. Eddy SR. Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from? *Nat Biotechnol.* 2004; 22(8):1035-6.
18. Jukes TH and Cantor CR (1969). *Evolution of Protein Molecules.* New York: Academic Press. pp. 21–132.
19. Kimura M (1980). "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". *Journal of Molecular Evolution* 16 (2): 111–120.
20. Bedoret D, Singh AK, Shaw V, Hoyte EG, Hamilton R, DeKruyff RH, et al. Changes in antigen-specific T cell number and function during oral desensitization in cow's milk allergy enabled with omalizumab. *Mucosal Immunol.* 2012; 5: 267-76.
21. Rieder MJ, Tayler SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: Analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 967-73.
22. Piazza A, Rendine S, Minch E, Menozzi P, Mountain J, Cavalli-Sforza LL. Genetics and the origin of European languages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:5836-40.
23. Fagundes N, Kanitz R, Eckert R. Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Book: Biomolecular Archaeology: An Introduction* 2008; 284-86.

