

# EL ADN ANTIGUO EN ARQUEOLOGÍA

Alfonso Sánchez Hermosilla

*Médico y Antropólogo Forense*

## INTRODUCCIÓN

Al igual que ocurre en el ámbito de la Medicina Legal y Ciencias Forenses, y también en la Antropología, en la Arqueología, con el paso del tiempo, cobra mayor importancia la información que aportan los estudios genéticos.

Sin embargo, la investigación genética sobre material biológico antiguo de interés en Arqueología presenta mayores complicaciones que la que pueda realizarse sobre material moderno, sea en el ámbito de la Genética Clínica, sea en la Genética Forense. Los principales motivos, sobre todo si lo comparamos con el ADN reciente, también denominado “ADN fresco” son las siguientes: su escasez, su elevado nivel de fragmentación, la contaminación con ADN exógeno, la presencia de sustancias inhibitoras y las modificaciones moleculares que ha sufrido el material genético original objeto de investigación. Se trata pues de “ADN de baja calidad”. Circunstancias todas ellas que dificultan su investigación y la obtención de conclusiones válidas.

## EL ADN ANTIGUO

En la literatura anglosajona, es frecuente encontrar el término **ancient DNA**, que puede traducirse como ADN antiguo (ADNa), y define el ADN recuperado de restos biológicos preservados de forma natural o artificial. En la comunidad científica se ha procurado consensuar la edad mínima que debe tener una muestra biológica para que podamos considerar su ADN como antiguo, estableciendo unos límites, a veces arbitrarios, puesto que en la práctica, a fecha de hoy, no parece existir una diferencia significativa entre el ADN de 100 años de antigüedad y el de más de 10.000 años (Pääbo, 1989). Con el fin de obviar este problema, la mayoría de investigadores no hace ninguna distinción, y consideran ADNa todo aquel que ha sufrido un proceso autolítico y/o diagenético, pues todos ellos se encuentran en una situación muy similar.

En otras fuentes bibliográficas, bajo el nombre de “ADN antiguo”, se reúnen una serie de técnicas químicas y genéticas orientadas a obtener información sobre el genoma procedente de muestras biológicas antiguas con el fin de comprobar su autenticidad, pero también de conocer sus características físico-químicas.

La causa se debe a una circunstancia muy concreta: el ADN es una molécula muy inestable desde la perspectiva de la Química.

La estabilidad del ADN depende por completo de que los **puentes químicos fosfato-éster** mantengan su morfología y estabilidad, (Eglinton y Logan, 1991), estos puentes se destruyen con mucha facilidad de forma espontánea por procesos de hidrólisis, lo que ocasiona un potencial de preservación extremadamente reducido.

Este tipo de daño químico, afecta especialmente a las purinas, Adenina y Guanina, lo que ocasiona una rotura de la doble cadena helicoidal (Lindahl y Anderson, 1972).

El **daño hidrolítico** también puede ocasionar una desaminación de la Citosina, lo que la convierte en Uracilo, y en menor medida a la Timina, para convertirla en Hipoxantina.

Por otra parte, el ADN se ve afectado también por otros procesos, como el **daño oxidativo**, que afecta principalmente a las pirimidinas, Citosina y Timina, este fenómeno se ocasiona de forma espontánea en soluciones acuosas de ADN, lo que produce una acumulación de modificaciones en dicho material genético procedente de restos de seres vivos que, una vez muertos, carecen ya de los necesarios mecanismos celulares de reparación, en especial cuando el ADN está completamente hidratado (Lindahl, 1993).

Debe tenerse en cuenta que no es posible deshidratar por completo una cadena de ADN, pues algunas moléculas de agua son necesarias desde el punto de vista estructural para el propio material genético, es por este motivo que no se puede evitar completamente el daño hidrolítico, con la excepción quizás de algunas esporas de seres primitivos y sencillos, en los que el ADN es empaquetado, de forma natural, adoptando una morfología condensada y deshidratada (Lindahl, 1993), algo que no ocurre con el genoma habitualmente presente en las piezas arqueológicas.

Asimismo, los aminoácidos de las proteínas que se asocian a la estructura del ADN, las histonas, también se degradan con el paso del tiempo, en especial el ácido aspártico, que experimenta una rápida **racemización**, equiparable con la tasa de **depurinización** del ADN, esto ocurre también con otros aminoácidos aunque con una tasa más lenta.

Por último, conviene tener en cuenta que la degradación autolítica del ADN comienza de forma inmediata una vez que se produce la muerte del ser vivo que lo posee, y progresa sin detenerse con el paso del tiempo; este fenómeno se debe en parte a las propias enzimas autolíticas presentes en las propias estructuras celulares, pero también en las de los organismos responsables de los fenómenos cadavéricos, es decir, bacterias, hongos, algas, insectos, etc. A su vez, estos organismos, al morir, también añaden su propio ADN, contaminando así el genoma de la materia orgánica de la que se estaban nutriendo.

Para garantizar la conservación del ADN antiguo en tejidos blandos, debe preservarse la estructura celular de los mismos, en especial la membrana nuclear.

Es muy importante evitar la contaminación de una muestra a la hora de extraerla de su contexto arqueológico. No sólo en el mismo lugar del yacimiento, sino también durante su excavación, durante su transporte, en el museo o institución donde se expone o almacena la muestra, y finalmente en el propio laboratorio de genética donde se estudia la muestra. En realidad, el mayor problema a la hora de trabajar con material genético es la contaminación con **ADN exógeno** a la muestra, puesto que las técnicas utilizadas son tan sensibles que una mínima cantidad de ADN exógeno contaminante procedente de otros organismos próximos y distintos a los de la muestra estudiada también será amplificado junto con el **ADN endógeno**, aportando así resultados erróneos. Se trata de ADN de microorganismos, hongos, fauna putrefactiva, e incluso traspaso de ADN de un espécimen a otro de la misma especie.

Los propios investigadores a su vez son una fuente de **ADN contaminante** a tener en cuenta, y es aportado a través de la descamación de la piel o de los aerosoles de la respiración. Lo mismo puede decirse del propio laboratorio de genética, donde no siempre es fácil detectar y erradicar las fuentes de ADN contaminante, que puede proceder de anteriores experimentos, es lo que se denomina “contaminación de arrastre” o “*carry over*”. Con el fin de minimizar estos riesgos se han propuesto los siguientes criterios de autenticidad (Pääbo et al. 2004):

1. Análisis en un laboratorio exclusivo de ADN antiguo.
2. Separación de las muestras de trabajo pre-PCR y post-PCR.
3. Empleo de instrumental y equipamiento exclusivo.
4. Eliminación de la capa superficial de la muestra, al ser ésta la que presenta mayor nivel de contaminación.
5. Análisis por un único investigador.
6. Procesado en paralelo de “blancos” de extracción y amplificación.
7. Empleo de diferentes cebadoras para amplificar el mismo fragmento.
8. Correlación inversa entre el tamaño del amplicón y la intensidad del producto de amplificación visualizado en un gel de agarosa.
9. Sentido filogenético. Es decir, que en muestras no humanas, las secuencias obtenidas sean similares a la de otros miembros de la misma especie o a especies próximas, y en muestras humanas, que la comparación de las secuencias obtenidas sea similar con las de otros investigadores, arqueólogos o antropólogos.
10. Realización de varias extracciones de un mismo espécimen y de diversas amplificaciones de un mismo extracto.
11. Replicación de todo el proceso experimental en un laboratorio independiente.
12. Ensayos bioquímicos de preservación de otras moléculas de la muestra. El método más utilizado cuando es posible, es el análisis de los aminoácidos de la muestra (contenido total y grado de racemización).
13. Cuantificación del número de moléculas de ADN molde en los extractos. Lo que permite evaluar la probabilidad de que las mutaciones observadas en las secuencias de ADN sean consecuencia directa de las modificaciones oxidativas postmortem del ADN original. En general, se considera que cuando el número de moléculas de ADN original supera el millar, la probabilidad de que se produzca este fenómeno es reducida.
14. Clonación bacteriana de los productos de amplificación y secuenciación de múltiples clones. Esta metodología permite detectar cualquier heterogeneidad presente en los productos de amplificación e identificar la fuente de la misma: contaminación, modificaciones moleculares y/o errores de la polimerasa.

Por otra parte, el **ADN mitocondrial** (ADNm) no está asociado a histonas, sino a **proteínas de unión** (*Binding proteins*) lo que le confiere cierto nivel de protección comparado con el ADN nuclear (ADNn) según Kelnman y Moran, 1996. Además, la membrana mitocondrial contiene una gran cantidad de enzimas que presentan una afinidad muy importante con el ADN (Cho et al. 1998), esta circunstancia también contribuye a proteger el ADNm de los fenómenos degenerativos.

Y todo ello sin olvidar el daño provocado por las condiciones ambientales a que han estado sometidos los restos biológicos desde que se produjo la muerte del individuo hasta su llegada al laboratorio de genética.

Es por todas estas causas que el ADN antiguo presente en las muestras de interés arqueológico se encuentra muy degradado, mostrando frecuentes entrecruzamientos moleculares, en parte debido al daño hidrolítico, pero también presenta modificaciones en sus bases pirimidínicas, debido principalmente al daño oxidativo. En cualquier caso, aunque se altere la morfología molecular del ADN y su integridad físico-química, sus componentes pueden persistir durante largos periodos de tiempo y son susceptibles de ser investigados.

Las dificultades que ocasiona el análisis de ADN antiguo son las siguientes:

- Su escasez, es decir el bajo número de copias (*Low Copy Number, LCN*) de moléculas de ADN procedentes de la muestra.
- La fragmentación y alteraciones postmortem que sufre éste ADN.
- La escasez de fragmentos íntegros y endógenos a la muestra, que con frecuencia está contaminada con ADN exógeno, bien procedente del medio externo, bien procedente de las personas que han estado en contacto con dicha muestra en algún momento de su historia, o incluso los propios investigadores, arqueólogos, antropólogos, personal de laboratorio, etc.
- Las impurezas aportadas por el contexto del yacimiento arqueológico, principalmente el suelo, que con frecuencia, poseen un efecto inhibitor en las reacciones químicas que hacen posible amplificar y secuenciar el ADN.
- La presencia de **Inhibidores de la PCR**, muchos de ellos de naturaleza aún desconocida, presentes tanto en la propia muestra como en el suelo; se han descrito algunos de estos agentes inhibidores, entre ellos los ácidos húmicos o fúlvicos, residuos de porfirinas, colágeno tipo I, productos de Maillard o incluso el propio daño que presenta el ADN antiguo cuando es extenso y que alcanza tal grado que los propios productos de degradación del ADN inhiben la PCR.

Con la finalidad de hacer frente a todos estos problemas se han establecido un conjunto de procedimientos estandarizados conocido como **Criterios de Autenticidad** que contemplan la aplicación de una serie de medidas preventivas a desarrollar, no sólo en el laboratorio, sino también en cuanto a la metodología de aislamiento del ADN, las propias infraestructuras, el instrumental y la aplicación de técnicas específicas. De este modo, un resultado concreto de ADN antiguo sólo estará validado por la comunidad científica cuando se observan estos criterios de autenticidad (Pääbo et al. 2004).

En ocasiones, las condiciones ambientales, o unas especiales circunstancias que facilitan la preservación, pueden reducir la tasa de degradación del ADN, sin embargo, es imposible detener completamente los daños que sufre esta frágil molécula. Esta circunstancia impone un límite temporal a la preservación del ADN en cualquier condición. Las circunstancias que favorecen la preservación del genoma antiguo son:

1. Rápida deshidratación del material biológico después de la muerte o depósito en el yacimiento arqueológico, lo que disminuye el daño hidrolítico.

2. Condiciones anaeróbicas en el medio en que se conserve la muestra a lo largo de su historia.
3. Fuerzas iónicas altas.
4. Elevada presencia de taninos o ácidos húmicos en el suelo.
5. Asociación con proteínas de origen cromosómico, o incluso de otro origen, lo que puede favorecer la preservación del ADN y retardar la actividad degradativa por parte de los microorganismos.

En realidad, son las condiciones ambientales específicas en cada caso particular las que en mayor medida determinan el grado de conservación del ADN antiguo.

## HISTORIA DE LA INVESTIGACIÓN CON ADN ANTIGUO

Los primeros estudios que se realizaron sobre ADN antiguo se remontan a la década de los ochenta del siglo XX, y se investigó sobre pequeñas secuencias genéticas procedentes de la piel de animales y humanos momificados. Ya desde los inicios se puso de manifiesto la dificultad que entrañaba esta investigación (Higuchi et al. 1984; Pääbo, 1985, 1989), pues el genoma obtenido, en su mayor parte, tenía un origen contaminante procedente de agentes microbianos y fúngicos, y en contrapartida, una pequeña parte tenía su origen en el material biológico de interés arqueológico, material que además estaba muy dañado.

La invención de **la técnica PCR** (Polimerase Chain Reaction) supuso un punto de inflexión en la situación inicial, pues al permitir amplificar pequeños fragmentos de ADN, podían estudiarse de forma satisfactoria muestras que con la metodología anterior no podían aportar información genética alguna.

Otra técnica que ha sido útil en ocasiones es la **Clonación Bacteriana** que consiste en donar múltiples copias de un fragmento de ADN al insertarlo en un elemento genético autorreplicable como es un plásmido o molécula circular de ADN, y mediante un choque térmico, insertarlo en el interior de determinadas bacterias fáciles de cultivar en medios de laboratorio. Cada bacteria recibe una única cadena del ADN amplificado que se inserta en su genoma. El problema es que el daño molecular del ADN puede impedir su integración en las bacterias, e incluso que los mecanismos de reparación del daño molecular de las propias bacterias pueden ocasionar cambios en dicho ADN.

A pesar de todo, a día de hoy, el mayor problema viene de la mano de la contaminación con ADN ajeno a la muestra original, lo que se ve agravado cuando lo que se pretende investigar es ADN antiguo humano, que puede verse contaminado no sólo en los momentos perimortem del sujeto o sujetos susceptibles de ser investigados, sino también en cualquier momento desde ese instante hasta que la muestra llega al laboratorio de genética. Esta posible contaminación, no siempre puede ser detectada de forma satisfactoria. Es por este motivo, entre otros, que es frecuente encontrar en la bibliografía al uso la palabra "ADN sucio" (*Dirty DNA*).

En la actualidad, la metodología está ampliamente consolidada y aceptada en la comunidad científica, lo que permite la identificación genética de especies biológicas, en ocasiones propicias, incluso el diagnóstico individual, es decir, si diferentes muestras biológicas

pertenecen al mismo individuo y no a un pariente próximo, así como a estudios poblacionales y cambios paleoecológicos.

En el futuro, tanto la metodología disponible, como aquella que pueda desarrollarse, sin duda encontrará nuevos campos de investigación, incluida la **Exobiología**, así como la **Paleoexobiología**, en el caso de que puedan encontrarse formas de vida ajenas al planeta tierra, y que estas, a su vez, posean material genético constituido por ADN y ARN.

### **METODOLOGÍA PARA EXTRAER EL ADN ANTIGUO**

El método estándar consensuado por la comunidad científica para extraer ADN antiguo de una muestra de interés arqueológico consta de las siguientes fases:

1. **Limpieza y trituración de la muestra** con la finalidad de extraer el material genético que contiene.
2. **Amplificación de dicho material genético mediante PCR y procesado post-PCR.** La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es un método de amplificación que permite seleccionar una parte del genoma y copiarlo numerosas veces - de forma virtualmente infinita, pues es factible obtener millones de copias de una secuencia de interés (*Target*)-, mediante síntesis *in vitro*, con lo que a partir de muestras muy pequeñas con muy poco material genético, se obtiene una cantidad suficiente de material genético con la finalidad de ser estudiado. A tal fin, se mezcla el ADN que se desea estudiar con una enzima capaz de copiar al ADN, esta enzima debe ser capaz de resistir altas temperaturas, por ejemplo, la *Taq polimerasa*, a esta mezcla se añaden dos pequeños fragmentos de ADN denominados *cebadores* o *primers*, así como nucleótidos individuales (Adenina, Citosina, Timina y Guanina), junto con un compuesto estabilizador de pH constituido por diversas sales que se denomina "tampón", y cloruro de magnesio –ambos necesarios para que actúe la Taq-.
3. En una primera fase de la PCR se produce la **separación** (desnaturalización) de las dos cadenas de ADN, para ello se somete a la mezcla antes mencionada a una temperatura de 94°C. En una segunda fase, denominada **anillamiento** (annealing), los dos cebadores, que presentan secuencias complementarias a dos regiones flanqueantes de la sección de ADN que se desea seleccionar y copiar, se unen al ADN objeto de estudio. Este proceso se realiza a una temperatura de entre 50-60°C. seguidamente, en una tercera fase, la Taq polimerasa copia cada una de las dos cadenas de ADN añadiendo nucleótidos a partir de los cebadores enganchados a cada una de ellas.
4. Seguidamente, se repite este proceso o ciclo 30-40 veces para conseguir así un copiado exponencial del fragmento de ADN objeto de estudio. Este procedimiento se denomina **amplificación**.
5. Por último, se aplica el método denominado **secuenciación**, técnica que permite conocer la secuencia de nucleótidos que conforman el fragmento que interesa analizar. La secuenciación puede ser directa, analizando el producto obtenido mediante la PCR sin haber recibido tratamiento adicional alguno, o también puede ser mediante **clonación** de los fragmentos obtenidos por amplificación. La comunidad científica da preferencia a la amplificación por el sencillo motivo de que así es posible

detectar posibles daños moleculares y errores en la amplificación, aunque también es un procedimiento más laborioso.

Este proceso puede aplicarse a cualquier material biológico antiguo, pero su rendimiento es mayor si se usan dientes o huesos, donde es mejor la conservación del ADN. En cambio, su rendimiento es menor sobre material biológico de origen vegetal, en parte también porque su contenido de ADN es menor que en material de origen animal o humano.

Utilizando esta metodología es posible estudiar los siguientes tipos de material genético:

1. ADNm de muestras antiguas mediante secuenciación automática.
2. Microsatélites (STRs) del Cromosoma Y mediante análisis de fragmentos (ALF).
3. Microsatélites (STRs) nucleares de cromosomas no sexuales mediante análisis de fragmentos (ALF).
4. Amplificación del gen de la amelogenina, presente en los cromosomas X e Y (cromosomas sexuales) mediante análisis de fragmentos (ALF).
5. Cuantificación del número de copias de ADN presentes en los extractos obtenidos a partir de muestras biológicas mediante *Real Time PCR*.
6. Clonación bacteriana de los productos de amplificación y secuenciación de múltiples clones.

El material ideal para el estudio de ADN antiguo son las piezas dentales de apariencia exterior intacta, sin daños estructurales visibles, así como los huesos largos (Tibia y Fémur) aunque también otros como costillas, radio, peroné, astrágalo, con la condición de que presenten una cortical gruesa en su diáfisis, y abundante tejido óseo compacto en su interior. En cualquier caso, se usarán piezas esqueléticas limpias y sin fisuras externas.

## APLICACIONES DE LOS ESTUDIOS DE ADN ANTIGUO EN EL ÁMBITO DE LA ARQUEOLOGÍA Y LA ANTROPOLOGÍA

Utilizando la metodología disponible, es posible hacer un diagnóstico del sexo del material genético a partir de las muestras biológicas antiguas, establecer relaciones familiares entre individuos que pudieran estar emparentados, estimar el número mínimo de individuos diferentes presentes en un mismo contexto arqueológico, por ejemplo necrópolis o fosas comunes, así como estudios poblacionales que permitan determinar si existe continuidad genética entre muestras procedentes de diferentes periodos en un mismo yacimiento arqueológico o región geográfica, evaluando así el impacto de posibles movimientos migratorios.

El **Diagnóstico molecular del sexo** es útil en aquellos casos en que la preservación de restos óseos, humanos o animales no permite determinar el sexo del individuo mediante el diagnóstico anatómico, lo que ocurre cuando los restos están muy fragmentados, o pertenecen a individuos infantiles, o en sujetos masculinos con esqueleto grácil o en sujetos femeninos con esqueleto robusto. A tal fin, se determina la secuencia del **gen de la amelogenina**, situado tanto en los cromosomas X, como en los cromosomas Y, pero que en determinadas partes de su secuencia presenta una longitud diferencial. Estas pequeñas diferencias permiten establecer la presencia de un único tipo de cromosoma en el caso de que

la muestra proceda de individuos de sexo femenino (XX), o de dos tipos diferentes como ocurre si procede de individuos de sexo masculino (XY), (Akane et al. 1992; Sullivan et al. 1993). En el caso de que en un yacimiento encontremos un grupo de individuos, la determinación del porcentaje de sexos en la población, puede contribuir a sostener, o rebatir, diferentes hipótesis en el ámbito de la antropología o de la arqueología.

En el caso de que en un yacimiento se encuentren múltiples enterramientos, puede ser útil la determinación de las **Relaciones de Filiación Biológica**, lo que puede ayudar a comprender posibles pautas de enterramiento, así como características específicas de comportamiento social. A tal efecto, se utilizan marcadores genéticos, en especial marcadores autosómicos, de origen nuclear, aunque también resulta útil la información aportada por los marcadores de herencia haploide como el ADN mitocondrial, pero también el ADN nuclear, concretamente, los polimorfismos del cromosoma Y. De todos ellos, los que son susceptibles de aportar más información son los sistemas autosómicos, sin embargo, al disponer de dos copias por núcleo celular, una procedente del padre biológico, y otra de la madre, supone un gran problema su recuperación cuando la muestra biológica está degradada, lo que lamentablemente ocurre con mucha frecuencia. Como contrapartida, el ADN mitocondrial es menos polimórfico que el ADN nuclear, pero sólo aporta información exclusiva de la herencia materna, aunque en ocasiones, de forma excepcional, se ha descrito en un mismo individuo la presencia de ADN mitocondrial de origen materno, y en menor medida, también de origen paterno. A tales efectos, las relaciones familiares pueden establecerse en términos de probabilidad matemática, tal y como ocurre en casos forenses.

La **Identificación Personal** ha sido utilizada para identificar a personajes históricos, ha sido notorio el caso de la investigación sobre de supuestos miembros de la familia real zarista, cadáveres o no (Gill et al. 1994), sobre todo en el caso de la princesa Anastasia, para ello, se empleó el conjunto de marcadores autosómicos y de ADN mitocondrial (Gill et al. 1994; Coble et al. 2009). Los resultados también se expresan en términos de probabilidad matemática.

Cada vez hay más publicaciones que hacen referencia a la determinación del grupo sanguíneo (ABO) con métodos genéticos, e incluso sobre el estudio de mutaciones puntuales (SNPs) que permiten la determinación de características fenotípicas

Otra posible aplicación es la **Paleoepidemiología**, pues es posible caracterizar de forma genética las enfermedades infecciosas que con frecuencia no pueden detectarse por otros medios en las muestras biológicas. Para ello, la amplificación y detección de secuencias específicas de determinados agentes infecciosos, puede contribuir a determinar la causa de la muerte de un individuo o grupo de individuos, e incluso a corroborar otras hipótesis de interés arqueológico e histórico. También es posible detectar enfermedades genéticas y su transmisión en poblaciones concretas.

También es posible realizar estudios de **Caracterización Genética de Poblaciones Antiguas**, lo que permite diferenciar unas poblaciones de otras, su variabilidad genética, así como elaborar estudios temporales de los cambios genéticos y elaborar hipótesis sobre sus causas: mutaciones genéticas, migraciones o mezcla de poblaciones. También es posible, siempre en términos de probabilidad, de atribuir un origen poblacional y geográfico a individuos aislados.

Ni que decir tiene, la recuperación de ADN de restos antiguos no se limita al estudio de restos humanos, sino también animales y vegetales, pudiendo incluso verificar hipótesis arqueológicas relativas a la implantación de la agricultura y la ganadería en diferentes ámbitos poblacionales, geográficos e históricos. A tales efectos, se ha investigado son semillas del género *Triticum L.*, pupas de insectos que acompañaban a momias, coprolitos, pólenes vegetales, razas de interés ganadero para distinguir entre óvidos y cápridos, e incluso especies extintas. Algunos restos investigados proceden de insectos atrapados en ámbar desde hace miles e incluso millones de años. También es posible así realizar estudios sobre la dieta de poblaciones antiguas (Paleodieta), o incluso sobre la dieta de animales ya extintos.

## BIBLIOGRAFIA

- Arqueometría y Análisis Arqueológico. **Identificación ADN antiguo.** <https://www.ucm.es/arqueoanálisis/identificación-adn-antiguo> [consultado 2017-05/15].
- Brenes G., Bustillos C., Cadena A., Díaz N., Sánchez G. **Adn Antiguo.** <https://www.clubensayos.com/Ciencia/Adn-antiguo/475811.html> [Consultado 2017-05-15].
- Laboratorio de Genética Forense y Genética de Poblaciones de la Universidad Complutense de Madrid. **Problemática de los estudios de ADN antiguo.** <http://www.bing.com/search?q=%22aden+antiguo%22&src=IE-TopResult&FORM=IE10TR> [Consultado 2015-05-16].
- Palomo Díez S., Gomes C. **Introducción al ADN antiguo en Arqueología y Antropología.** <https://www.researchgate.net/publication/281971544> [Consultado 2017-05-15].
- Pérez P. **ADN antiguo y su estudio en el campo de la arqueología.** <http://mediosantropologicos2.blogspot.com.es/2012/03/adn-antiguo-y-su-estudio-en-antropologia> [Consultado 2017-02-17] revisar pagina web.
- Sánchez Hermsilla, A. **¿Sería posible clonar a Jesucristo?** Linteum...
- Sze-wah L., Stephen C.Y. **Compatibility of DNA IQ™, QIAamp®DNA Investigator, and QIASymphony® DNA Investigator®with various fingerprint treatments.** <http://link.springer.com/article/10.1007/s00414-016-1447-8> [Consultado 2017-05-16]
- Willerslev E., Cooper A. **Ancient DNA.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1634942/> [Consultado 2017-05-15].