

Análisis histotafonómico de una fosa común

Alba Nistal Barbero¹, Javier Iglesias Bexiga^{1,2} y Enrique Martínez Campos³

¹Asociación Científica ArqueoAntro, Av. dels Tamarindos, nº 3, puerta 9, 46015 València, España.

²Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Comisión Docente de Antropología Física, C. Darwin, nº 2, 28049, Madrid, España.

³Grupo de Síntesis Orgánica y Bioevaluación, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Unidad Asociada al ICTP-IQM-CSIC, Paseo Juan XXIII, nº 1, 28040 Madrid, España.

Corresponding Author: albanistalbarbero@gmail.com

RESUMEN

En el cementerio municipal de Paterna (Valencia) existen más de un centenar de fosas comunes, donde fueron arrojadas más de dos mil doscientas víctimas de la represión franquista una vez finalizada la Guerra Civil. En las sucesivas labores de exhumación se ha documentado una gran heterogeneidad respecto a la preservación macroscópica de los restos óseos, no solo entre las diferentes fosas, sino también dentro de las mismas. De este modo, mientras que algunos restos mostraron una buena preservación, otros han aparecido fragmentados, especialmente aquellos localizados en el fondo y centro de la fosa. En este trabajo, se seleccionaron pequeños fragmentos de metacarpos o metatarsos procedentes de seis individuos arrojados a la fosa 94, no identificados genéticamente, a diferente profundidad de enterramiento y posición respecto a las paredes de la fosa. Las muestras fueron sometidas a un proceso de descalcificación, inclusión en parafina, corte en microtomo y tinción específica para colágeno. Gracias al posterior análisis histotafonómico se han podido observar diferentes estados de preservación microscópica del tejido, consistentes con el estado macroscópico documentado durante la excavación. Las alteraciones, provocadas por una variedad de agentes tafonómicos, serían especialmente compatibles con la acción bacteriana. Realizar estos mismos estudios involucrando tanto muestras de otras fosas como identificadas genéticamente permitirá estudiar más de cerca cuál ha sido el efecto de los distintos agentes tafonómicos a lo largo de los años sobre los restos óseos enterrados en Paterna.

Palabras claves

Tafonomía
Colágeno
Fosa común
Histología
Tejido óseo

Recibido: 05-12-2024

Aceptado: 06-02-2025

Keywords:

Taphonomy
Collagen
Mass grave
Histology
Bone tissue

ABSTRACT

In the municipal cemetery of Paterna (Valencia), there are more than a hundred mass graves where over two thousand two hundred victims of Franco's repression were thrown once the Civil War ended. In successive exhumation efforts, it has been documented a great heterogeneity regarding the macroscopic preservation of bone remains, not only among different mass graves, but also within the same. Thus, while some remains showed good preservation, others have appeared fragmented, especially those located at the bottom and centre of the grave. In this work small fragments of metacarpals or metatarsals were selected from six genetically unidentified individuals thrown into mass grave 94, at different burial depths and distance to the walls of the pit. The samples underwent a process of decalcification, paraffin inclusion, microtome sectioning and specific staining for collagen. Thanks to the subsequent histotaphonomic analysis, different states of microscopic bone tissue preservation have been observed, consistent with the macroscopic state documented during the excavation. The alterations, caused by a variety of taphonomic agents, would be particularly compatible with bacterial action. Carrying out similar studies, involving both samples from other communal graves and genetically identified ones, will allow a closer examination of the effect of the various taphonomic agents over the years on the buried bone remains in Paterna.

Introducción

En el cementerio municipal de Paterna se han documentado más de un centenar de fosas comunes, conteniendo a gran parte de las 2237 víctimas asesinadas en el municipio en el periodo de posguerra civil, entre 1939 y 1956 (Gabarda, 2007). Los restos óseos, recuperados por la Asociación Científica ArqueoAntro en el año 2018, se caracterizan por una muy diferente preservación a nivel macroscópico, desde restos óseos altamente fragmentados hasta estados de preservación especiales como casos de saponificación. Una de las singularidades de Paterna radica en que estas diferencias se han dado de forma muy notable no solo entre diferentes fosas, sino que también dentro de la misma fosa, a diferentes niveles de enterramiento.

Por otro lado, en la fosa 94 del cementerio de Paterna se consiguieron extraer 18 perfiles genéticos completos y 6 parciales de ADN, con los que se ha logrado un porcentaje de identificación superior al global observado en Paterna (en torno al 15%). Actualmente, se han podido identificar a 12 de las 39 víctimas inhumadas en la fosa 94, lo que supone un porcentaje de identificación del 30%. Sin embargo, varios de los individuos no han podido ser identificados genéticamente debido a un rendimiento insuficiente en los análisis genéticos, hecho que estudios previos han relacionado con la degradación mineral y molecular del tejido óseo (Allentoft et al., 2012; Campos et al., 2012; Sosa et al., 2013). Se propone un estudio histotafonómico de parte de estos restos óseos, con el objetivo de estudiar las alteraciones tafonómicas que puedan estar interfiriendo en la obtención de los perfiles genéticos de las víctimas del franquismo enterradas en el cementerio de Paterna.

Degradación del tejido óseo y material genético por agentes tafonómicos

Cuando se recuperan restos óseos en excavaciones científicas, a menudo estos han estado sometidos a diferentes modificaciones *post mortem*, tanto intrínsecas como extrínsecas. Las primeras serían aquellas inherentes al tejido óseo (estructura

química y molecular, edad del individuo, etc.). Wittenburg et al. (2009) señalan que existe una relación entre la disminución del colágeno contenido en el hueso y la edad. Las segundas serían aquellas relacionadas con el medio de enterramiento (microorganismos, pH del sedimento, hidrología del suelo, entre otros). Ambos tipos de factores afectan conjuntamente al hueso a lo largo del tiempo de enterramiento, debilitando el vínculo proteico-mineral de la matriz ósea, haciendo al hueso susceptible de alterarse a nivel microscópico (Lloveras, Rissech y Rosado-Méndez, 2016).

En la matriz ósea se distingue un componente inorgánico (65%), formado principalmente por fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita y otro orgánico (35%), formado en su mayoría por fibras de colágeno tipo I (Flores-Silva et al., 2015). El colágeno tipo I, insoluble en condiciones fisiológicas debido a su estructura tridimensional, se une estrechamente a los cristales de hidroxiapatita, lo que le otorga estabilidad y resistencia a la acción microbiana, uno de los principales factores que contribuyen a la degradación ósea (Nielsen-Marsh et al., 2000; Hedges, 2002). Los cristales de hidroxiapatita también protegen el ADN, al adsorberlo en su superficie (Allentoft et al., 2012). Aunque las interacciones entre el colágeno y ADN no han sido ampliamente estudiadas, varios estudios han asociado la pérdida de colágeno con el deterioro del material genético (Campos et al., 2012; Sosa et al., 2013).

Degradación del tejido óseo y material genético por agentes tafonómicos

Un mecanismo con gran relevancia en la destrucción del tejido óseo es la disolución del componente mineral debido a la acción del agua, ya sea por fluctuaciones en el régimen hidrológico o por el pH. Esta acción intensifica el deterioro de los restos esqueléticos, provocando la formación de poros en el tejido y facilitando el acceso de microorganismos (Nielsen-Marsh et al., 2000). En el municipio de Paterna, aunque las precipitaciones son escasas, las inundaciones e infiltraciones de agua son comunes. Además, las sucesivas exhumaciones en el

cementerio municipal de Paterna han demostrado que, cuando llueve, las fosas actúan como pozos artesianos, quedando el nivel del agua por encima del nivel freático. Por otro lado, el componente inorgánico se altera notablemente con pH ácidos (Turner-Walker, 2007), mientras que un pH básico afectaría al colágeno (Iglesias Bexiga, 2017).

Las enzimas secretadas por diferentes microorganismos afectan también a la integridad del tejido óseo. Las bioerosiones se clasifican según su origen: fúngico o bacteriano (Jans et al., 2004). Las segundas, conocidas como "destrucciones focales microscópicas" o "MFD", presentan una morfología de túnel con diámetros de 5-10 μm , formando áreas discretas de 10-40 μm (Turner-Walker, 2012).

Los agentes diagenéticos que comprometen la integridad tisular también son responsables de la degradación del material genético (Kendall et al., 2018). Entre otros, la elevada presencia de bacterias del género *Clostridium*, productoras de colagenasas, se relaciona con peores rendimientos en la extracción de ADN de restos esqueléticos (Emmons et al., 2020). El ADN es especialmente sensible a los ambientes con agua subterránea, ya que ataca y rompe los enlaces glucosídicos y fosfodiéster (Brown y Brown, 2011). Aunque la bibliografía sobre el efecto directo de la cal viva sobre el ADN es limitada, estudios con tampones alcalinos han mostrado que medios altamente alcalinos pueden causar roturas en puntos sensibles de las cadenas de ADN (Afanasieva, Zazhytskaya y Sivolob, 2009).

Objetivos del trabajo

El objetivo principal de este estudio es comprender, mediante técnicas histológicas, cómo el medio de enterramiento afecta la preservación molecular del hueso y su relación con la obtención de ADN en los restos óseos exhumados de las fosas del cementerio de Paterna, planteando que tanto la profundidad como la ubicación de los restos en las fosas, así como las condiciones ambientales, desempeñan un papel crucial. Los objetivos específicos son: I) implementar una metodología histotafonómica adecuada para evaluar la

microestructura ósea; II) analizar las diferencias cualitativas en las modificaciones histotafonómicas según la profundidad y localización de los restos; y III) comprobar la relación entre la pérdida de la estructura ósea y el deterioro del material genético. Este trabajo amplía estudios previos e integra metodologías relevantes para la tafonomía médico-legal (Iglesias Bexiga, 2017).

Materiales y métodos

Tras la autorización por parte de los familiares y de la Asociación Científica ArqueoAntro, se reservó un fragmento de diáfisis de metacarpo o metatarso para realizar pruebas complementarias a la identificación genética de los individuos. Se establecieron tres niveles de enterramiento basados en las cotas registradas: superficial (<1,20 metros), medio (1,20-1,40 metros) y profundo (>1,40 metros). En cada nivel se tomaron dos muestras óseas, una de la zona central y otra de la lateral, delimitada a 0,5 metros desde los bordes de la fosa, de 2x2 metros de dimensión (Tabla 1). Como controles se utilizaron huesos frescos del género *Sus*. Las muestras fueron cortadas con la herramienta DREMEL® 200 Series en fragmentos de aproximadamente 1 cm^3 , de la región central de la diáfisis. Para solubilizar el mineral de calcio se empleó ácido nítrico al 10% durante 9 horas en un volumen de 10 mL. El control tuvo que ser sometido a un tiempo superior, de 17 horas. A continuación, se procedió a la inclusión en parafina de las muestras (Iglesias Bexiga, 2017). Los fragmentos se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol. Posteriormente, se sumergieron en xilol, compuesto intermediario miscible tanto en alcohol absoluto como con la parafina. Los bloques solidificados a temperatura ambiente fueron cortados en microtomo (Leica® RM2155, Leica Biosystems).

Tabla 1. Resumen de las seis muestras seleccionadas para el análisis histotafonómico, procedentes de la fosa 94 del cementerio municipal de Paterna. Cada muestra se identificó con un código (Ejemplo: PS-L-2), donde P indica el origen (Paterna), S el nivel de profundidad (superficial), L la posición (lateral) y 2 el número del individuo.

Nivel	Cota media (m)	Posición	Muestra	Individuo	Sexo	Edad	Código
Superficial	(0,97)	Lateral	Metacarpo	2	M	18-25	PS-L-2
	(1,13)	Central	Metacarpo	4	M	25-35	PS-C-4
Medio	(1,26)	Lateral	Metatarso	23	M	18-25	PM-L-23
	(1,25)	Central	Metacarpo	7	M	30-40	PM-C-7
Profundo	(1,43)	Lateral	Metatarso	32	M	>60	PP-L-32
	(1,39)	Central	Metacarpo	35	M	>60	PP-C-35

Se empleó la tinción tricrómica de Masson, específica para detectar colágeno (Figura 1). La reconstrucción y análisis histológico de cada sección se llevó a cabo empleando el microscopio óptico Leica DFC3000 G, junto con el software informático Cell D (Olympus). Mediante una escala numérica

propuesta por los autores, se designó el estado de preservación de la integridad de la cortical externa e interna, de las líneas de cemento, laminillas y osteonas, además de la tinción específica para el colágeno (Tabla 2).

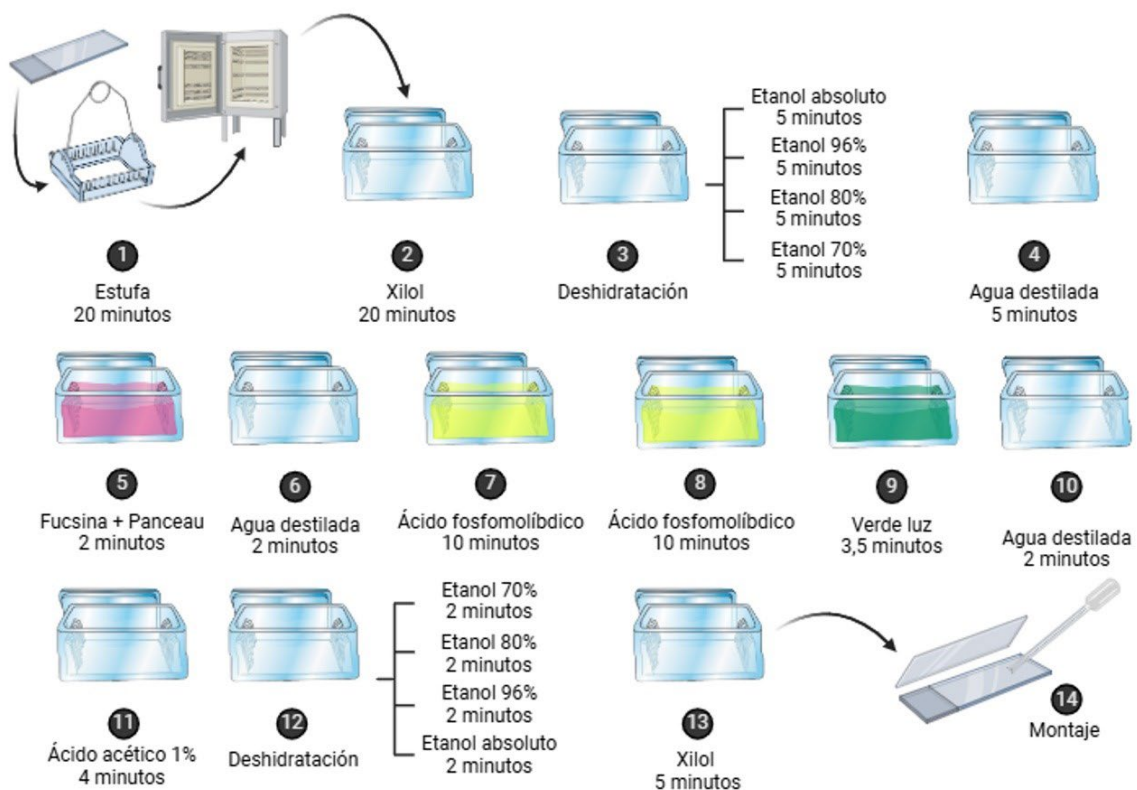


Figura 1. Protocolo de tinción tricrómica de Masson adaptado para hueso seco. Elaboración propia.

Tabla 2. Escala numérica empleada para describir la integridad de la cortical externa e interna. Los valores más bajos se corresponden con peores estados de preservación.

Grado	Descripción
1	No se puede distinguir la estructura laminar de la cortical subperióstica o medular.
2	La cortical aparece degradada en su práctica totalidad, separándose del resto del tejido y adquiriendo un aspecto bandeado.
3	Presencia de numerosas alteraciones en forma de porosidad entre la estructura laminar. Delaminación en determinadas zonas de la cortical externa o interna.
4	Se mantiene la integridad de la estructura laminar en la mayor parte de la sección, apareciendo leves alteraciones.
5	No presenta ninguna alteración visible en el corte histológico.

Resultados

Tras haber sometido a las muestras óseas al proceso de corte y tinción mediante tricrómico de Masson, la observación de los cortes histológicos procedentes de la muestra control no mostró alteraciones estructurales atribuibles al agente

descalcificante (Figura 2a). Tanto la cortical externa como la medular se preservaron intactas, alcanzando el valor máximo de preservación (Figura 2b). La línea de cemento era visible alrededor de las osteonas intactas (Figura 2c). La especificidad de la tinción para el colágeno mostró la idoneidad de la metodología aplicada.

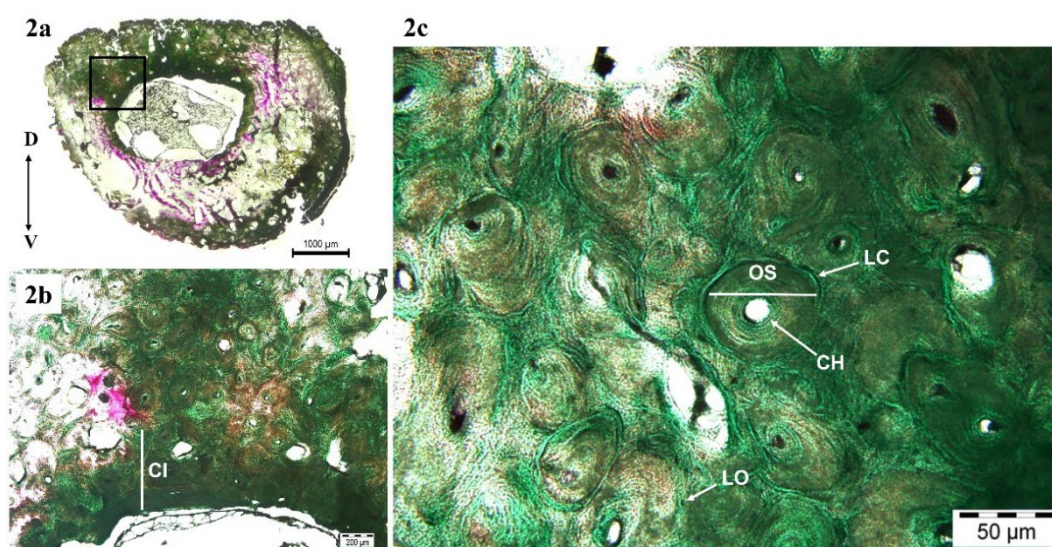


Figura 2a. Reconstrucción de un corte histológico de 8µm de metacarpo de cerdo fresco. 4x. D: dorsal; V: ventral. **Figura 2b.** Ampliación a 10x de la zona señalada. **Figura 2c.** Micrografía a 20x donde se observa la organización harvesiana del hueso. CI: cortical interna; OS: osteona; CH: canal de Havers; LC: línea de cemento; LO: lagunas osteocíticas.

Muestras procedentes del nivel de enterramiento superficial

En las muestras lateral (Figura 3a) y central (Figura 4a) de la fosa 94 se observaron diferencias en la preservación de la cortical externa con áreas moderadamente preservadas, que se asocian al grado de integridad 3 y 4. La cortical interna de ambas muestras presentó una preservación óptima, de grado

4 (Figuras 3b y 4a). En la muestra lateral, las líneas de cemento y las osteonas estaban alteradas (Figura 3c), y la cortical media mostró una notable porosidad debido a la pérdida de la integridad de las laminillas circunferenciales. En la muestra central, las líneas de cemento y las osteonas también presentaron porosidades, aunque en menor grado (Figura 4c), y la cortical media evidenció una desorganización total

del tejido. La tinción del colágeno fue más intensa en las corticales externa e interna, mientras que la

cortical media de la muestra central presentó tinción inespecífica en varias zonas.

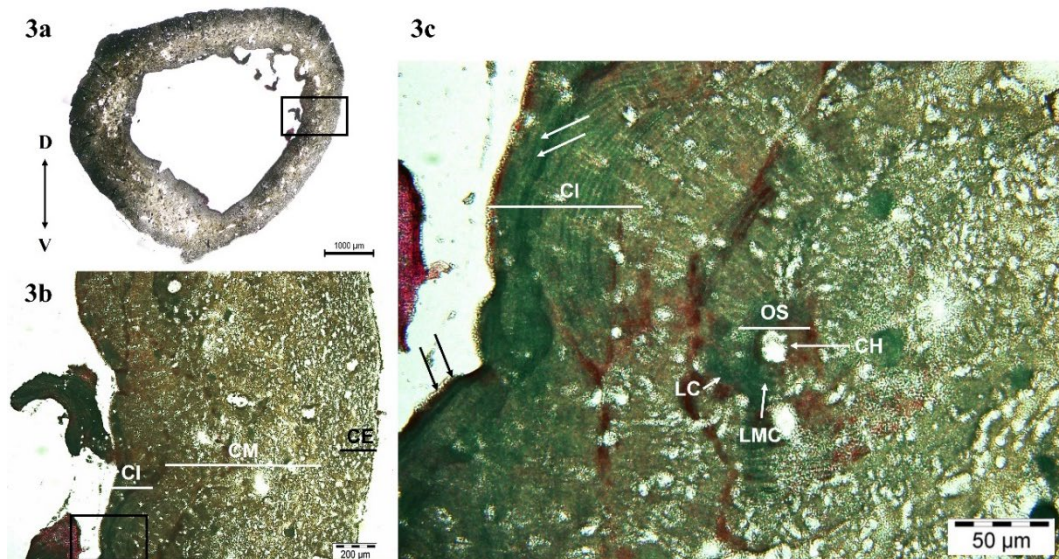


Figura 3a. Reconstrucción del corte histológico de 8 µm del metacarpo del individuo situado en el lateral de la fosa 94, en el nivel de enterramiento superficial. 4x. Figura 3b. Ampliación a 10x de la zona señalada. Figura 3c. Ampliación a 20x de la micrografía anterior. Las flechas blancas señalan la estructura preservada de las laminillas en la medular. Las flechas negras señalan el halo de tinción inespecífica. CE: cortical externa; CM: cortical media; LMC: laminillas circunferenciales.

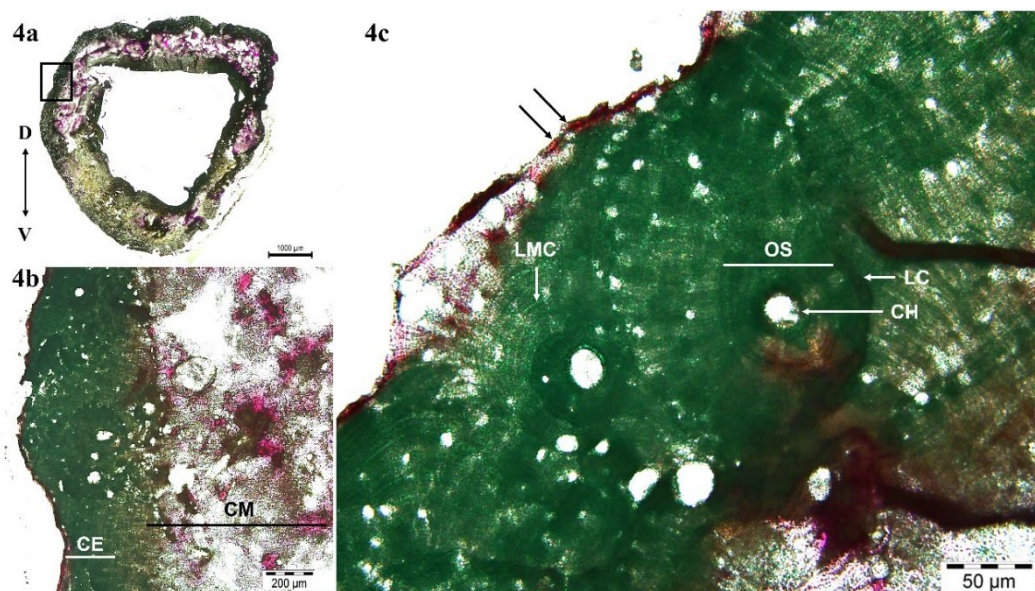


Figura 4a. Reconstrucción del corte histológico de 10 µm del metacarpo del individuo situado en el centro de la fosa 94, en el nivel de enterramiento superficial. 4x. Figura 4b. Ampliación a 10x de la zona señalada. Figura 4c. Micrografía tomada a 20x de la cortical externa.

Muestras procedentes del nivel de enterramiento intermedio

En la muestra lateral (Figura 5a) se observó una extensa degradación con porosidad significativa, lo que le otorgó un grado de integridad de 2 (Figura 5b). En la muestra central (Figura 6a), la cortical externa mostró delaminación en varios puntos, con un grado de integridad de 3 (Figuras 6b y 6c). La cortical interna, aunque alterada, mantuvo su estructura laminar en ambas muestras, alcanzando un grado 4 en la muestra central y un grado 3 en la

lateral. La muestra lateral presentó poros de entre 10 y 30 μm , de mayor diámetro que los canales de Havers, lo que dificultó la distinción de las líneas de cemento. Las osteonas estaban severamente degradadas, separadas del tejido y desorganizadas (Figura 5c). En la muestra central, los poros eran menos extensos y más pequeños ($<10 \mu\text{m}$), y las osteonas mantenían su integridad (Figuras 6b y 6c). La tinción de colágeno en ambas mostró un halo inespecífico en la cortical externa, siendo más tenue en la muestra lateral.

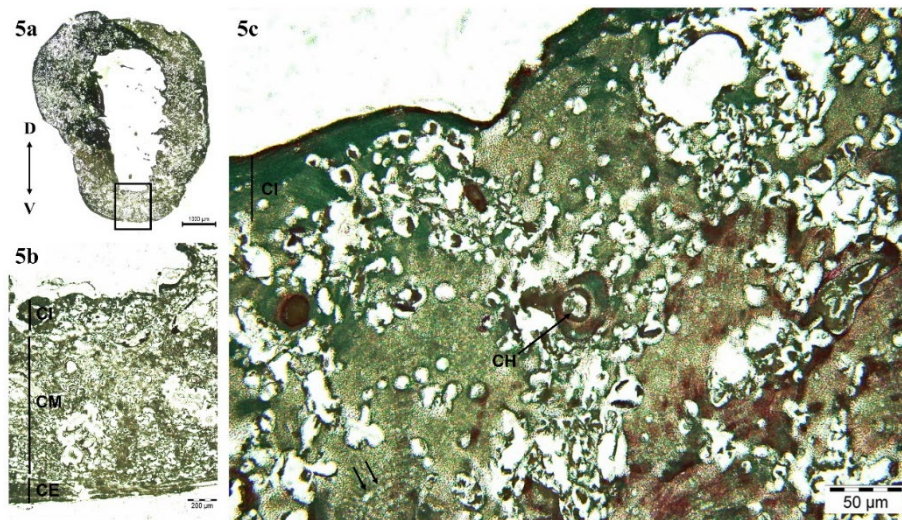


Figura 5a. Reconstrucción del corte histológico de 8 μm del metatarso del individuo situado en el lateral de la fosa 94, en el nivel de enterramiento intermedio. 4x. **Figura 5b.** Ampliación a 10x de la zona señalada. Se percibe la delaminación de la cortical externa. **Figura 5c.** Micrografía tomada a 20x de la cortical interna.

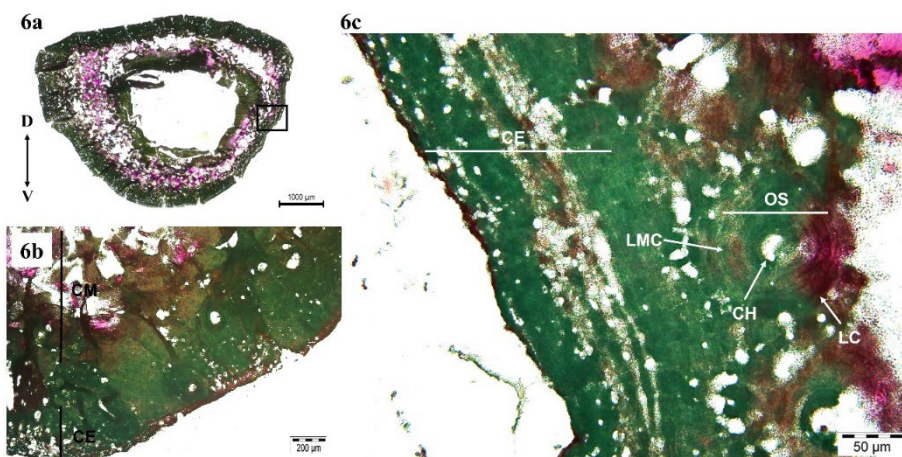


Figura 6a. Reconstrucción del corte histológico de 10 μm del metacarpo del individuo situado en el centro de la fosa 94, en el nivel de enterramiento intermedio. 4x. **Figura 6b.** Ampliación a 10x de la zona enmarcada. **Figura 6c.** Micrografía tomada a 20x de la cortical externa.

Muestras procedentes del nivel de enterramiento profundo

Ambas muestras mostraron un alto grado de degradación (Figuras 7a y 8a). La cortical externa de la muestra lateral presentó un grado de preservación 2, mientras que la central alcanzó un grado 1, denotando la mayor alteración. La cortical interna, en ambas, obtuvo el grado más bajo de integridad

(Figuras 7b y 8b). Ambas compartieron características similares: líneas de cemento porosas, laminillas separadas y osteonas degradadas, más intensificadas en la muestra central, donde solo se preservaba el esqueleto de colágeno (Figura 8c). La tinción de colágeno fue más intensa en las capas corticales, aunque más leve en la muestra central.

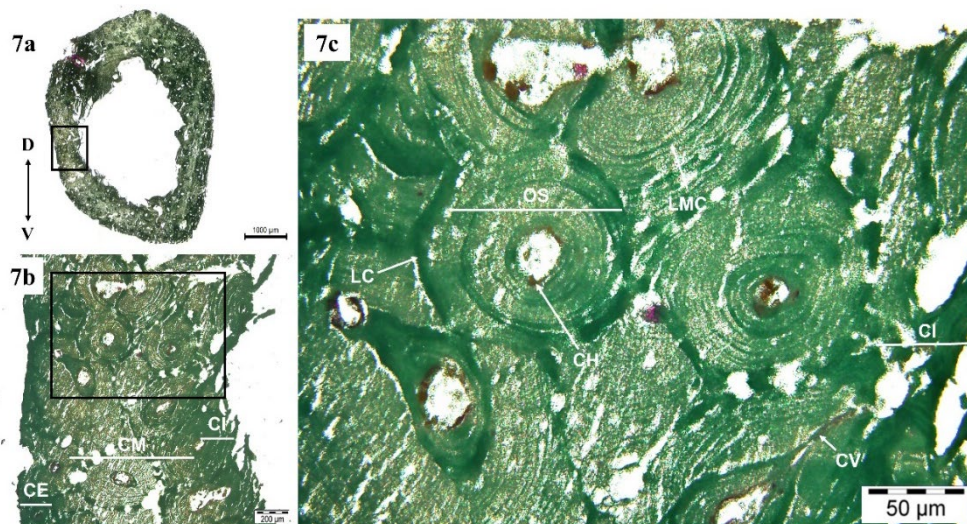


Figura 7a. Reconstrucción del corte histológico de 8 µm del metatarso del individuo situado en el lateral de la fosa 94, en el nivel de enterramiento profundo. Se aprecia una tinción específica más intensa en los bordes de la cortical externa e interna. 4x. **Figura 7b.** Micrografía a 10x de la zona señalada. **Figura 7c.** Ampliación a 20x de la imagen anterior. CV: canal de Volkmann.

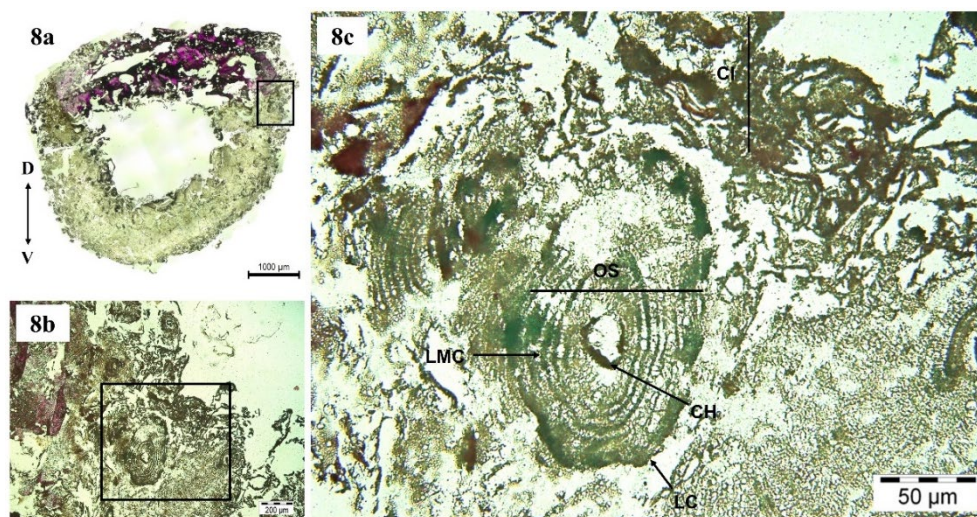


Figura 8a. Reconstrucción del corte histológico de 8 µm del metacarpo del individuo situado en el central de la fosa 94, en el nivel de enterramiento profundo. 4x. **Figura 8b.** Ampliación a 10x del recuadro negro de la Figura a. **Figura 8c.** Micrografía tomada a 20x mostrando una osteona.

Discusión

La inclusión en parafina es un método económico y rutinario que permite obtener cortes de calidad micrométrica (Hira et al., 2019). Su aplicación a tejidos mineralizados resulta un tema controvertido debido al tratamiento químico previo, que puede deteriorar el tejido. Estos daños pueden minimizarse ajustando la concentración y tiempo de exposición al ácido. Aunque este proceso disuelve cristales de hidroxiapatita, la fase orgánica, como el colágeno y las proteínas no colágenas (NCPs), permanece intacta (Caruso et al., 2018; Miquelstorena-Standley et al., 2020).

En este trabajo, las muestras control, al ser hueso fresco, requirieron un tratamiento con ácido nítrico significativamente más prolongado que el resto, sin sufrir modificaciones estructurales destacables. Los artefactos observados, como espacios vacíos o bandeado, no se atribuyen al ácido (Figura 2). Si bien estudios previos emplearon tiempos de descalcificación mucho mayores (Caruso et al., 2018; Astolphi et al., 2019), tanto los resultados previos como los aquí obtenidos indican que las alteraciones observadas en las muestras estudiadas, descalcificadas durante 9 horas, derivan de la acción de agentes tafonómicos. La tinción tricrómica de Masson permitió observar las fibras de colágeno tipo I y detectar alteraciones histotafonómicas a través de variaciones en la intensidad de tinción. Técnicas como la inmunohistoquímica podrían complementar el análisis al identificar NCPs relacionadas con la preservación ósea y genética (Wittenburg et al., 2009).

Antes de realizar el análisis histotafonómico, ya era posible advertir diferencias macroscópicas de coloración entre los fragmentos óseos embebidos en parafina, lo que sugiere distintas trayectorias tafonómicas. La muestra correspondiente al individuo en posición central del nivel de enterramiento más profundo mostró una coloración marrón oscura, que podría ser atribuida a la presencia de ácidos húmicos del suelo, resultado de la descomposición de materia orgánica por

microorganismos (Fernández-Jalvo y Andrews, 2016).

A nivel histológico, se han observado diferentes estados de preservación entre las muestras. Las más superficiales, a pesar de estar más expuestas a las lluvias, han sido menos afectadas por los agentes tafonómicos, incluso al haber estado en mayor contacto con la cal. La muestra lateral (Figura 3a) mostró zonas casi intactas en la cortical externa e interna, pero con alteraciones en otras áreas (Figura 3b). Un patrón similar se observó en la muestra central (Figura 4a). Estas diferencias dentro de una misma muestra sugieren una actuación diferencial de los agentes tafonómicos a escalas menores (Crowther, 2002).

Un buen estado de preservación de la microestructura ósea se relaciona con mejores resultados en los análisis genéticos (Kendall et al., 2018). Ambas muestras se han teñido intensamente con verde luz, lo que indica que gran parte del colágeno aún perdura. Este resultado sugiere que la cal no tendría un efecto destructivo sobre los huesos, a diferencia de lo documentado en tejidos blandos (Etxeberria, 1994). Sin embargo, la incapacidad para identificar estos restos sugiere que la cal podría haber degradado la molécula de ADN (Afanasyeva, Zazhytskaya y Sivolob, 2009).

En las muestras del nivel medio, la preservación empeoró en comparación con las superiores. El aumento en el tamaño de los poros, especialmente en la muestra lateral, de unos 10 μm (Figura 5c), podría ser compatible con las firmas de bioerosión causadas por bacterias (Turner-Walker, 2007). Además, se apreciaron halos oscuros a su alrededor, junto con una desorganización del tejido, posiblemente debido a la reorganización de la matriz ósea que provoca el ataque bacteriano (Jans, 2004). Además, la presencia de ADN contaminante de microorganismos podría interferir en la reacción de PCR, generando productos no específicos y dando como resultado un falso negativo (Solla, 2002).

Las muestras procedentes del fondo de la fosa 94 muestran la mayor alteración diagenética de la cortical ósea, quedando prácticamente indistinguible (Figuras 7 y 8). La porosidad observada es compatible con la actividad bacteriana. Además,

debido a las características del terreno, estas muestras habrían estado más expuestas a flujos de agua intermitentes (Nielsen-Marsh et al., 2000). También podrían haber estado sometidas a pH más bajos, al haber estado expuestas a la descomposición de los cuerpos situados encima. Estos factores podrían explicar en parte el aspecto de estas dos muestras, similar a los efectos observados al tratar restos óseos con ácido (Iglesias Bexiga, 2017).

Es relevante señalar que las dos muestras seleccionadas de este nivel de enterramiento pertenecerían a individuos seniles según los estudios antropológicos. La edad de muerte se considera un factor que afecta la diagénesis ósea y se relaciona con peor preservación (Lloveras, Rissech y Rosado-Méndez, 2016). Por otro lado, la muestra central presenta una coloración más leve, indicativa de una menor cantidad de colágeno, que podría relacionarse con la pérdida de colágeno en función de la edad del individuo (Wittenburg et al., 2009).

Entre todos los agentes tafonómicos, los microorganismos se han propuesto como los más determinantes en la diagénesis ósea (Turner-Walker et al., 2023) y podrían ser la principal causa de la degradación observada en Paterna. Emmons et al. (2022) identificaron un aumento de bacterias anaerobias a mayores profundidades, asociando ciertas especies con mayor degradación ósea. Esto podría explicar las diferencias de preservación observadas según la profundidad.

Los datos obtenidos de los informes genéticos indican que solo 2 de las 12 víctimas identificadas pertenecen al nivel de enterramiento superficial, mientras que el resto se distribuyen entre niveles intermedios y profundos. Resulta llamativo que los mejores resultados en el análisis genético se hayan dado en niveles inferiores, donde los restos se han mostrado más afectados histológicamente. No solo la cal podría actuar como inhibidor de la PCR, sino que también podrían estar actuando químicos pertenecientes a los tejidos sintéticos asociados a los restos óseos. Sustancias producto de la descomposición también serían potenciales inhibidores de la prueba (Kemp et al., 2020; Solla, 2002). Además, las colagenasas y ácidos orgánicos secretados por bacterias también contribuyen a la

degradación del ADN (Campos et al., 2012). Es decir, en Paterna podrían estar ocurriendo interferencias con la metodología utilizada en los análisis genéticos, provocando estas disparidades entre la preservación de la microestructura ósea y obtención del perfil genético. A la vista de los resultados aquí presentados, sería recomendable ampliar la muestra de estudio, involucrando restos procedentes de la misma y otras fosas de Paterna con y sin rendimiento de ADN, para tratar de establecer una relación más clara entre la preservación tanto del material genético como histológica.

Tras el procesamiento y análisis de las muestras de la fosa 94, se concluye en primer lugar que la muestra seleccionada permite visualizar diferentes estados de preservación microscópica en las fosas de Paterna, complementando las observaciones macroscópicas realizadas durante la exhumación. Además, los cortes histológicos muestran alteraciones tafonómicas, especialmente compatibles con la actividad bacteriana. Por otro lado, el estado de preservación ha variado con la profundidad de enterramiento y entre individuos, indicativo de diferentes historias tafonómicas en una misma fosa. Por tanto, los agentes tafonómicos característicos de Paterna, como la cal viva e inundaciones, han podido actuar de manera diferencial. Asimismo, la variabilidad en la degradación del colágeno podría estar influyendo en la obtención de perfiles de ADN. Por último, futuros estudios comparativos entre muestras con y sin rendimiento genético podrán arrojar más información sobre la relación entre la microestructura ósea, colágeno y ADN.

Agradecimientos y/o financiación

Al equipo técnico de la Asociación Científica ArqueoAntro por llevar a cabo los trabajos de exhumación y análisis antropológicos, financiados por la Diputació de València. Al Instituto Pluridisciplinar de la UCM, por enmarcarse este trabajo dentro del proyecto “Estudio de la degradación del hueso en función del medio de enterramiento” (Art. 83 L.O.U). Por último, a las familias de las víctimas, impulsoras de este trabajo.

Referencias

- Afanasieva K.S., Zazhytskaya M.O., Sivolob A.V. (2009). Mechanisms of DNA exit during neutral and alkaline comet assay. *Cytol Genet* 43(6): 367-370. <https://doi.org/10.3103/S0095452709060012>.
- Allentoft M.E., Collins M., Harker D., Haile J., Oskam C.L., Hale M.L., et al. (2012). The half-life of DNA in bone: Measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proc Biol Sci* 279(1748): 4724-4733. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1745>.
- Astolphi R.D., Alves M.T. de S., Evison M.P., Francisco R.A., Guimarães M.A., Iwamura E.S.M. (2019). The impact of burial period on compact bone microstructure: Histological analysis of matrix loss and cell integrity in human bones exhumed from tropical soil. *Forensic Sci Int* 298: 384-392. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.008>.
- Brown T.A., Brown K. (2011). *Biomolecular Archaeology: An Introduction*. John Wiley & Sons. doi: <https://doi.org/10.1002/9781444392449>.
- Campos P.F., Craig O.E., Turner-Walker G., Peacock E., Willerslev E., Gilbert M.T.P. (2012). DNA in ancient bone—Where is it located and how should we extract it? *Ann Anat* 194(1): 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.07.003>.
- Caruso V., Cummaudo M., Maderna E., Cappella A., Caudullo G., Scarpulla V., Cattaneo C. (2018). A comparative analysis of microscopic alterations in modern and ancient undecalcified and decalcified dry bones. *Am J Phys Anthropol* 165(2): 363-369. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23348>.
- Crowther J. (2002). The experimental earthwork at Wareham, Dorset after 33 years: retention and leaching of phosphate released in the decomposition of buried bone. *J Archaeol Sci* 29(4): 405-411. <https://doi.org/10.1006/jasc.2002.0728>.
- Emmons A.L., Mundorff A.Z., Keenan S.W., Davoren J., Andronowski J., Carter D.O., DeBruyn J.M. (2020). Patterns of microbial colonization of human bone from surface-decomposed remains. *PloS one* 15(7): e0218636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218636>.
- Emmons A.L., Mundorff A.Z., Hoeland K.M., Davoren J., Keenan S.W., Carter D.O., Campagna S.R., DeBruyn J.M. (2022). Postmortem Skeletal Microbial Community Composition and Function in Buried Human Remains. *mSystems* 7(2): e0004122. <https://doi.org/10.1128/msystems.00041-22>.
- Etxeberria F. (1994). Aspectos macroscópicos del hueso sometido al fuego. Revisión de las cremaciones descritas en el País Vasco desde la arqueología. Macroscopic aspects of the bone subjected to fire. Revision of cremations described in the Basque Country from Archeology. *Munibe* 46: 111-116.
- Fernández-Jalvo Y., Andrews P. (2016). *Atlas of taphonomic identifications: 1001+ images of fossil and recent mammal bone modification*. Springer.
- Florencio-Silva R., Sasso G.R. da S., Sasso-Cerri E., Simões M.J., Cerri P.S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015:421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
- Gabarda V. (2007). Evolució de la repressió franquista (1938-1956). En: *Els afusellaments al País Valencià (1938-1956)*: 43-82. Edicions Alfons El Magnànim. Valencia.
- Hedges R.E.M. (2002). Bone diagenesis: An overview of processes. *Archaeometry* 44(3): 319-328. <https://doi.org/10.1111/1475-4754.00064>.
- Hira V.V., de Jong A.L., Ferro K., Khurshed M., Molenaar R.J., Van Noorden C.J. (2019). Comparison of different methodologies and cryostat versus paraffin sections for chromogenic immunohistochemistry. *Acta Histochem* 121(2): 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.10.011>.
- Iglesias Bexiga F.J. (2017). *Estudio tafonómico en condiciones controladas de laboratorio de una muestra osteológica aplicado a la antropología forense*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Jans M.M.E., Nielsen-Marsh C.M., Smith C.I., Collins M.J., Kars H. (2004). Characterisation of microbial attack on archaeological bone. *J Archaeol Sci* 31(1): 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2003.07.007>.
- Kemp B.M., Bingham B., Frome R., Labonte M., Palmer E., Parsons E.S., Gobalet K.W., Rosenthal J. (2020). Subduing the influence of PCR inhibitors on amplifying aged, degraded, and low copy number DNA: PCR enhancer cocktail-p and rescue PCR. *PloS one* 15(6): e0234745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234745>.
- Kendall C., Eriksen A.M.H., Kontopoulos I., Collins M.J., Turner-Walker G. (2018). Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Palaeogeog, Palaeoclimatol, Palaeoecol* 491: 21-37. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.11.041>.
- Lloveras L., Rissech C., Rosado-Méndez N. (2016). *Tafonomía Forense*. (pp. 453-523). En: C. Sanabria-Medina (Ed.). *Patología y antropología forense de la muerte: la investigación científico-judicial de la muerte y la tortura, desde las fosas clandestinas, hasta la audiencia pública*: 453-523. Forensic Publisher. Bogotá D.C., Colombia.
- Miquelestrena-Standley E., Jourdan M.L., Collin C., Bouvier C., Larousserie F., Aubert S., et al. (2020).

- Effect of decalcification protocols on immunohistochemistry and molecular analyses of bone samples. *Mod Pathol* 33(8): 1505-1517. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0503-6>.
- Nielsen-Marsh C., Gernaey A., Turner-Walker G., Hedges R., Pike A.W.G., Collins M. (2000). The chemical degradation of bone. *Human Osteology in Archaeology and Forensic Science*: 439-454. Greenwich Medical Media
- Solla L.P. (2002). Estudio de polimorfismos de ADN en restos humanos antiguos y muestras forenses críticas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Sosa C., Vispe E., Núñez C., Baeta M., Casalod Y., Bolea M., Hedges R.E.M., Martínez-Jarreta B. (2013). Association between ancient bone preservation and dna yield: A multidisciplinary approach. *Am J Phys Anthropol* 151(1): 102-109. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22262>.
- Turner-Walker G. (2007). The Chemical and Microbial Degradation of Bones and Teeth. En: R. Pinhasi y S. Mays (Eds). *Advances in Human Paleopathology*: 3-29. John Wiley & Sons, Ltd.
- Turner-Walker G. (2012). Early bioerosion in skeletal tissues: Persistence through deep time. *Neues Jahrb Geol Paläontol* 265: 165-183. <https://doi.org/10.1127/0077-7749/2012/0253>.
- Turner-Walker G., Gutiérrez-Galiacho A., Armentano N., Hsu C.Q. (2023). Bacterial bioerosion of bones is a post-skeletonisation phenomenon and appears contingent on soil burial. *Quater Inter* 660: 75-83. <http://doi.org/10.1016/j.quaint.2022.12.009>.
- Wittenburg G., Volkel C., Mai R., Lauer, G (2009). Immunohistochemical comparison of differentiation markers on paraffin and plastic embedded human bone samples. *J Physiol Pharmacol* 60 (Suppl 8): 43-49.