

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE Medicina

Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio tafonómico en condiciones controladas de laboratorio de una muestra osteológica aplicado a la antropología forense**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**


**Francisco Javier Iglesias Bexiga**

Directores

**José Antonio Sánchez Sánchez  
Francisco Etxeberria Gabilondo  
Nicholas Márquez-Grant**

**Madrid, 2018**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y LEGISLACIÓN SANITARIA



**ESTUDIO TAFONÓMICO EN CONDICIONES  
CONTROLADAS DE LABORATORIO DE UNA  
MUESTRA OSTEOLÓGICA APLICADO A LA  
ANTROPOLOGÍA FORENSE**

TESIS DOCTORAL

D. Francisco Javier Iglesias Bexiga

Directores:

Dr. D. José Antonio Sánchez Sánchez

Dr. D. Francisco Etxeberria Gabilondo

Dr. D. Nicholas Márquez-Grant

**Madrid**

**Abril, 2017**









**DPTO. TOXICOLOGÍA Y  
LEGISLACIÓN SANITARIA**  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

---

Facultad de Medicina  
Pabellón VII – 3ª planta  
Pza. Ramón y Cajal, s/n  
28040 Madrid  
Tlfo.: 91 394 14 67  
Fax: 91 394 16 06  
E-mail: dp089@ucm.es

Con fecha 7 de Abril de 2017 se aprueba la admisión a trámite de la Tesis Doctoral “ESTUDIO TAFONÓMICO EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO DE UNA MUESTRA OSTEOLÓGICA APLICADO A LA ANTROPOLOGÍA FORENSE” presentada por D. FRANCISCO JAVIER IGLESIAS BEXIGA, tras su prelectura el 06/04/2017 en el Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina de la UCM.

Consideramos que la presente Tesis Doctoral cumple todos los criterios exigibles para garantizar la calidad de la misma en todos y cada uno de sus apartados:

- Originalidad del tema.
- Relevancia de la temática elegida.
- Adecuada estructura.
- Claridad en la redacción.
- Contempla y desarrolla todos los componentes de un trabajo de investigación.
- Bibliografía adecuada y significativa.
- Relevancia y aporte de los resultados obtenidos.
- Adecuada presentación formal.
- Clara exposición del trabajo (acto de prelectura del 06/04/2017).
- Brillante defensa de los argumentos a las consideraciones de los profesores doctores del Departamento presentes en el acto de la prelectura.

Para que así conste y a los efectos oportunos.

Madrid, a 7 de Abril de 2017

DRA. D<sup>a</sup>. ELENA LABAJO GONZÁLEZ  
Secretaria Académica Dpto.



**A José Luis**  
**A mi familia**  
**A Inés**

De un pare y un hijo cuentan,  
que se ganaban la vida  
por campiña y olivares  
trabajando noche y día,  
por campiña y olivares,  
trabajando noche y día.

Sin haber hecho motivo,  
a los dos los amarraron,  
a un viejo tronco de olivo,  
y a balazos los mataron.

Nadie se atrevió en el pueblo,  
a pedir explicación,  
la muerte de aquellos hombres  
sirvió pa' sembrar el terror,  
la muerte de aquellos hombres  
sirvió pa' sembrar el terror.

De aquel pare y aquel hijo,  
sólo se acuerda la tierra,  
allí donde los mataron  
crece más verde la hierba,  
crece más verde la hierba  
allí donde lo enterraron.

(*"El Pare y el hijo"*, El Cabrero)



## AGRADECIMIENTOS

No ha sido un camino fácil el haber podido terminar esta tesis doctoral sin la ayuda de muchas personas que me han apoyado y que han creído en mí. Desde luego estas líneas se quedan cortas en agradecimientos hacia todos y todas.

Primero quería agradecer a mis tutores su confianza y su saber para iniciar el trabajo, al doctor José Antonio Sánchez por abrirme el departamento y darme la oportunidad *doblemente* para doctorarme. Por no haber puesto ningún problema y por toda tu ayuda. Al doctor Francisco Etxeberria, por abrirme la mente y encauzar los conocimientos desde la Biología hacia la Antropología Forense. Al doctor Nicholas Márquez-Grant, por aceptar mi ofrecimiento para dirigirme esta tesis. A los tres estoy enormemente agradecido porque sois mis maestros y mis colegas. Porque sois un referente para mi y para muchas de las personas que os conocemos.

Aunque ya no estés entre nosotros, José Luis López Lacomba, a ti he querido dedicarte esta tesis porque el día que fuimos a pedirte ayuda José Antonio y yo para realizar los experimentos, desde el primer momento aceptaste acoger a un estudiante de doctorado que necesitaba laboratorio. Y aunque hablamos poco (siempre es poco) pude conocerte mejor a través el maravilloso equipo que tenías a tu alrededor. Dejaste un gran vacío en todos nosotros, pero muy buenos recuerdos y momentos.

Doctor Enrique Martínez Campos, amigo y compañero, sabes bien que has sido una pieza clave en todo este proceso. Gracias. Gracias por tus consejos, tu ayuda y tu apoyo. Eres muy grande en todos los sentidos.

Otra persona a la que le debo mucho y que difícilmente podré devolver como corresponde has sido tú, Inés. Gracias por estar ahí, por aguantarme en los malos momentos y por animarme a conseguirlo. Por escucharme y por estar a mi lado. Por ser como eres.

Gracias al equipo del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos de la UCM, a la Dra. Viviana Ramos, al Dra. Ana Civantos, a Ana Santos, a Isa, a David, a Laura, a la Dra.

Marian y por supuesto a Luciano (¡gran trabajo!), por ser como sois y porque sigamos viéndonos.

Porque fueron somos, porque somos, serán: Madre, padre, Manuel, Alejandro, Begoña y Alex, gracias por hacerme como soy. Por ser tan generosos y tan buena familia. Os quiero mucho.

Quiero agradecer a la Dra. Yolanda Fernández-Jalvo el haberme abierto las puertas de su laboratorio para experimentar en otros ambientes.

No puedo dejar de mencionar a los compañeros de “batallas” de la Asociación ArqueoAntro, a Miguel, Azahara, Alex, María Benito, María Fortuna y mi sobrino putativo Miguelito. Gracias por hacerme recordar lo mucho que me gusta la Antropología. Espero que sigamos dando “guerra” por muchos años.

Por último no quiero olvidarme de todas esas personas que se han cruzado en mi formación académica y en mi vida, que han confiado, me han apoyado y han dejado un huella muy grande en mi: equipo Atapuerca (Vergès, Juanin, Éthel, Miquèl, Manny, Mario y un largo etc.), profesores y compañeros de la UAM (Armando, Carlos, Cristina, Máximo), equipo Aranzadi (Itxaso, Sonia, Asier, Enrique, Helena, Paco, Igone, Lourdes, Jimi, Sebas, Tito, Virginia, Almudena, Carme, Susana, Luis, Berta), el personal del departamento de Toxicología (Elena, Enrique, Bernardo, Alexandra, Raquel, Manoli, Carmen y Conchi), a la peña de Malayerba (Hicham, Albertina, Pedro, Alberto, Juan Cachondeo, Juan Ordinas, Lupi, Paquito, Jeff, Carlos, Irene, Nuri, Antxoa, Albor, David, Isa, Isma, Julio, Raul Punkismo...), a los compañeros del inicio de carrera (María, Pablo, Patri, Juan, Virgina, Mentxu, Beti, Elena, María La Calle...), a los amigos de la sierra (Paco, Carol, David, Chelo, Claudia y Amaya) y a la cuadrilla del barrio (Óscar, Larri, Raúl, Miguel y Chuso). A todos y a todas os debo mucho. ¡Gracias!





# ÍNDICE

1. Resumen .....	1
2. Summary .....	7
3. Introducción.....	13
3.1. La Antropología Forense, orígenes y perspectiva actual .....	15
3.2. La Tafonomía Forense, orígenes e importancia para el estudio antropológico forense.....	20
3.3. Histología. Biología del tejido óseo.....	25
3.3.1. Células del tejido óseo. ....	25
3.3.2. Estructura y formación del hueso.....	27
4. Estudios histológicos con carácter forense.....	35
4.1. Efectos tafonómicos documentados sobre las estructuras óseas.....	37
4.2. Degradación de la fase orgánica del hueso.....	38
4.3. Degradación de la fase inorgánica del hueso.....	40
5. Justificación del estudio. ....	43
6. Hipótesis y objetivos del estudio.....	49
6.1. Hipótesis. ....	51
6.2. Objetivos. ....	51
7. Material y métodos aplicados. ....	53
7.1. Material de estudio. ....	55
7.1.1. Material empleado para el estudio histológico.....	55
7.2. Metodología aplicada para el estudio histológico.....	56
7.2.1. Preparación de las muestras y corte.....	57
7.2.2. Tinción de las muestras. ....	59
7.2.3. Análisis de las muestras. ....	60
7.2.4. Experimentación realizada. ....	64
8. Resultados. ....	71
8.1. Muestras control. ....	73
8.2. Ensayo preliminar en un medio de acético-acetato a pH 5.5 durante 4,5 horas. ....	74
8.3. Ensayo en un medio de acético-acetato a pH 3.8.....	83
8.4. Ensayo en un medio de acético-acetato a pH 5.5.....	92
8.5. Ensayo en un medio de NaOH 12,5M durante varias horas.....	106
8.6. Ensayo en un medio de NaOH 0,1M durante varios días.....	129
8.7. Ensayo en un medio de NaOH a diferente molaridad durante 24 horas...142	
8.8. Ensayo en un medio de NaClO durante 28 días.....	162
8.9. Ensayo en un medio de NaClO durante varios días.....	168
8.10. Ensayo en un medio de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durante 26 días.....	181
9. Discusión.....	191
10. Conclusiones.....	213
11. Bibliografía.....	217
12. Anexos.....	229



## **1. RESUMEN**



La Tafonomía Forense es una disciplina que, junto con la Genética, la Botánica, la Biología, la Arqueología, la Antropología, etc., apoya las investigaciones médico-legales principalmente para búsqueda de la identificación del sujeto. Tiene como fin la reconstrucción de las alteraciones y transformaciones postmortem que puede sufrir un individuo o unos restos durante su historia tafonómica.

Dentro de las tres fases o estadios por los que pasan los restos hasta que llegan al laboratorio, es en la fase diagenética dónde se producen las principales modificaciones o transformaciones químicas y físicas en las cuales se centra esta tesis doctoral.

Para la realización de la experimentación se han llevado a cabo una metodología actualista que parte de la premisa de que el presente es la clave del pasado, estableciendo analogías entre los procesos observables en el presente con los que han sucedido en el pasado, y considerando que las leyes físicas son constantes en el espacio-tiempo y que la tasa de cambio es uniforme.

Dentro de los agentes que contribuyen a la descomposición del cadáver, los microorganismos desempeñan el papel principal. Sin embargo, para los restos esqueléticos debemos tener en cuenta otros procesos que, de manera azarosa, intervienen en la preservación (estructura química y molecular, porosidad, tamaño, forma, edad del individuo, pH del sedimento, régimen hidrológico, temperatura, etc.).

Para comprobar los efectos que causan algunos agentes tafonómicos sobre la estructura interna del hueso se plantean los siguientes objetivos: establecer un protocolo de investigación en Antropología Forense que reproduzca estas alteraciones a partir de condiciones controladas de laboratorio; diseñar una nueva metodología para determinar los agentes ambientales que afectan a la estructura y composición de los restos óseos humanos en el contexto de la Antropología Forense; valorar el uso del material óseo utilizado como material de estudio histológico; comprobar mediante el análisis histológico, el efecto sobre la

estructura ósea que causa la exposición a un medio ácido, alcalino, de hipoclorito de sodio y de peróxido de hidrógeno.

El material utilizado proviene de los individuos excluidos de la colección de referencia de la Escuela de Medicina Legal y de una colección arqueológica del siglo XIX de Alcalá la Real. Se utilizaron indistintamente metacarpos y metatarsos de individuos adultos que no presentaran ninguna anomalía externa o interna. La elección del material contemporáneo tuvo como fin obtener una muestra que estuviera lo menos alterada por los agentes tafonómicos. Todos los huesos fueron divididos en varias submuestras de, aproximadamente, 1 cm<sup>3</sup> de volumen, desechando las epífisis para la experimentación por su escaso contenido en hueso compacto.

Una vez pasada la fase de experimentación cada una de las muestras fueron tratadas bajo un protocolo diseñado para este tipo de hueso. El proceso de descalcificación se llevó a cabo durante 5,5 horas en volúmenes de 50 ml. de una solución al 75% de descalcificante DECALC Histolab®. A continuación, se procesaron para su inclusión en parafina para proceder con el corte histológico. Todas las muestras fueron teñidas según el protocolo adaptado de la tinción tricrómica de Masson.

Para el análisis cualitativo de las muestras procesadas se procedió al estudio de varias regiones estructurales del hueso susceptibles a la degradación y fácilmente observables al microscopio óptico: El estado de conservación de la cortical y del límite con la cavidad medular, para comprobar el efecto que tiene el medio sobre la superficie más expuesta; el estado de conservación de las osteonas y sus estructuras microscópicas observando la línea cementerial, el estado de los canalículos y lagunillas osteocíticas, las lamelas osteónicas y el canal de Havers; efecto que causa el medio sobre la estructura de las hebras de colágeno dispuestas en las osteonas y en el hueso compacto; por último; se observó el efecto de la tinción sobre la muestra como indicador del estado de conservación del hueso a partir de las regiones teñidas.

Para la cuantificación de la superficie afectada de las muestras se realizó un análisis de las imágenes obtenidas con el programa Adobe Photoshop CS6®. Se seleccionaron tres imágenes al azar de cada submuestra utilizada en los ensayos. En cada imagen se delimitó un área de 53463 píxeles igual para todas las fotografías, también escogida al azar. De manera manual se marcaron los lugares donde los huesos mostraban efectos de degradación debidos a los medios en los que fueron expuestos. Esta metodología permitió cuantificar el porcentaje de degradación de cada una de las muestras en aquellas donde fue posible realizar las mediciones por su estado de conservación.

Una vez obtenidos los datos cuantitativos de las imágenes se procedió a un análisis de varianza de un factor para comprobar la influencia significativa que tiene la exposición de los huesos a los diferentes medios planteados. Para ello se utilizó el paquete estadístico incluido en el programa Microsoft Excel®.

Los experimentos realizados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes: Ensayo preliminar en un medio acético-acetato a pH 5.5 durante 4,5 horas; ensayo en un medio ácido acético-acetato a pH 3.8 y 5.5; ensayo en un medio de hidróxido de sodio (NaOH) 12,5M durante varias horas, 0,1M durante varios días y a diferente molaridad durante 24 horas; hipoclorito de sodio (NaClO) durante 28 días y durante varios días; y por último se realizó un ensayo en un medio de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 26 días.

Se ha podido comprobar que las muestras sumergidas en medios ácidos, como el tampón acético-acetato a diferentes pH, se someten a una disolución de la hidroxiapatita dando como resultado un corte histológico con todas las estructuras internas alteradas. Siendo la característica más llamativa el aspecto reticulado que adquieren las hebras de colágeno que conforman las laminillas concéntricas de las osteonas. El incremento de la porosidad es notable, alrededor de los complejos osteonales y de los espacios intersticiales.

Las muestras expuestas en un medio alcalino como el hidróxido de sodio presentan una alteración diferente que las del medio ácido. Esta alteración está

mediada por la rotura de las cadenas de aminoácidos de las fibras de colágeno. La muestra tiende a disgregarse en fragmentos de diferente tamaño como consecuencia de la alta porosidad aparecida en las líneas de cemento y espacios intersticiales.

El hipoclorito de sodio en contacto con el hueso produce su destrucción, pero de manera diferente. La penetración del medio se realiza poco a poco dependiendo de la capacidad de flujo por los canales naturales de las estructuras del hueso. Esta intrusión degrada poco a poco la fase orgánica y la inorgánica. Como resultado se obtiene un área sin teñir alrededor de los fragmentos de hueso conservados que aumenta en grosor a medida que lo hace el tiempo de exposición. El resto de las estructuras internas del hueso no sufren alteraciones llamativas.

El peróxido de hidrógeno en contacto con el hueso es muy destructivo. Su acción se centra sobre todo en la fase mineral. La disolución de la hidroxiapatita junto con la efervescencia producida en la reacción da como resultado una masa globosa, a veces reticulada de colágeno.

El protocolo propuesto para la investigación histológica, aplicado en Antropología Forense, para comprobar las alteraciones que causan los agentes intrínsecos y extrínsecos que determinan las condiciones tafonómicas, cumple con las expectativas iniciales de esta tesis

La metodología aplicada en condiciones controladas de laboratorio, para el análisis de los efectos que causan los agentes ambientales que afectan a la estructura y composición de los restos óseos humanos ha permitido obtener resultados cualitativos y cuantitativos específicos para determinadas situaciones. Es, por tanto, un buen método para el estudio histológico de muestras contemporáneas.

## **2. SUMMARY**



Forensic taphonomy is a discipline that, together with Genetics, Botany, Biology, Archeology, Anthropology, etc., supports medicolegal investigation in order to assist in the identification of the deceased. Its purpose is the reconstruction of the postmortem alterations and transformations to the body during its taphonomic history.

There are three phases or stages which the remains pass through until they arrive at the laboratory. However, this Doctoral Thesis focuses on the diagenetic phase where the main chemical or physical changes or transformations take place.

For the performance of the experimentation an actualist methodology has been carried out, starting from the premise that the present is the key to the past, establishing analogies between the processes detected in the present with those that have happened in the past, and considering that the physical laws are constant in space-time and the rate of change is uniform.

Among the agents that contribute to the decomposition of the corpse, microorganisms play the main role. However, for skeletal remains we must take into account other processes that are involved in their preservation (chemical and molecular structure, porosity, size, shape, age of the individual, sediment pH, hydrological regime, temperature, etc.).

To verify the effects caused by some taphonomic agents on the internal structure of bone, the following objectives are set: to establish a research protocol in Forensic Anthropology that reproduces these alterations from controlled laboratory conditions; to design a new methodology to determine the environmental agents that affect the structure and composition of human bone remains in the context of Forensic Anthropology; to evaluate the bone material used as histological study material; verify by histological analysis the effect on bone structure exposed to acidic, alkaline, sodium hypochlorite and hydrogen peroxide.

The samples derive from the individuals excluded from the reference collection of the School of Legal Medicine and from a 19th century archaeological collection from Alcalá la Real, Jaén. Metacarpals and metatarsals of adult individuals and without any

pathological alteration were used interchangeably. The choice of the contemporary material was intended to obtain a sample that was the least disturbed by taphonomic agents. All bones were divided into several subsamples of approximately 1 cm<sup>3</sup> volume. Only the shaft (as opposed to the epiphyses) was sampled.

Before the experimental phase, each sample was treated under a protocol designed for this bone class. The decalcification process was carried out for 5.5 hours in volumes of 50 ml of a 75% solution of DECALC Histolab®. Then, they were processed for inclusion in paraffin to proceed with the histological cut. All samples were stained according to the protocol adapted from Masson's trichrome staining.

For the qualitative analysis of the processed samples several structural regions of the bone susceptible to the degradation and easily observable under the optical microscope were analysed: the condition of the cortical bone and the internal limit in the medullary cavity in order to assess the effect of the environment on the most exposed surface; the state of preservation of the osteones and their microscopic structures observing the cementary line, the condition of osteocytic canaliculi and lagoons, the osteonic lamellae and the Haversian canal: the effect of the medium on the structure of the collagen fibers arranged in the osteons and in the compact bone was also studied; and finally, the effect of the staining on the sample as an indicator of the bone conservation status from the stained regions was observed.

For the quantification of the affected surface of the samples, an image analysis with the program Adobe Photoshop CS6 was carried out. Three random images of each subsample used in the tests were selected. In each image an area of 53463 pixels was delimited in the same way for all the photographs, also chosen randomly. Manually, marked places where the bones showed effects of degradation due to the media in which they were exposed. This methodology allowed quantifying the percentage of degradation of each sample in those where it was possible to perform the measurements by their conservation status.

Once the quantitative data from the images were obtained, an analysis of the variance (ANOVA) of one factor was carried out to verify the significant influence of the

exposure of the bones to the different media proposed. For this purpose, the statistical package included in the Microsoft Excel program was used.

The experiments carried out for the development of this Doctoral Thesis were the following: preliminary test in an acetic medium acetate at pH 5.5 for 4.5 hours; test in an acetic acid-acetate medium at pH 3.8 and 5.5; test in 12.5M sodium hydroxide (NaOH) medium for several hours, 0.1M for several days and at different molarity for 24 hours; test in a sodium hypochlorite (NaClO) medium for 28 days and for several days; and finally, a test was performed on a hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) medium for 26 days.

It has been found that samples immersed in acid media, such as acetic-acetate buffer at different pH, are subjected to dissolution of the hydroxyapatite resulting in a histological cut with altered internal structures. The most striking feature is the cross-linked appearance acquired by the collagen fibers that create the concentric lamellae of the osteons. The increase in porosity is remarkable, around the osteonal complexes and in the interstitial spaces.

The samples exposed in an alkaline medium such as sodium hydroxide have a different alteration than those of the acid medium. This alteration is mediated by the breakdown of the amino acid chains of the collagen fibers. The sample tends to disintegrate into fragments of different sizes as a consequence of the high porosity found in cement lines and interstitial spaces.

The sodium hypochlorite medium in contact with bone caused its destruction but in a different manner. The infiltration of the medium was done gently depending on the flow through the natural channels of the structures of the bone. This intrusion gradually degraded the organic and inorganic phases. As a result, an unbleached area is obtained around the preserved bone which increases in thickness as the exposure time does. The rest of the internal structures of the bone did not undergo remarkable alterations.

Hydrogen peroxide in contact with bone was very destructive. Its action focused mainly on the mineral phase. The dissolution of the hydroxyapatite together with the

effervescence produced in the reaction resulted in a globose mass, sometimes with crosslinked collagen.

The proposed protocol for histological investigation, applied in forensic anthropology, is used to verify the alterations caused by the intrinsic and extrinsic agents that determine the taphonomic conditions, and fulfilled the initial expectations of this Doctoral Thesis.

This methodology, applied under controlled laboratory conditions for the analysis of the effects caused by environmental agents that affect the structure and composition of human bone remains, has allowed specific qualitative and quantitative results to be obtained for certain scenarios. Therefore, it can be said that it is a good method for the histological study of contemporary samples.

### **3. INTRODUCCIÓN**



### **3.1. La Antropología Forense, orígenes y perspectiva actual**

El estudio del ser humano puede ser considerado tan antiguo como la Historia de la humanidad. Durante siglos, filósofos e historiadores de todas las culturas se han preguntado sobre el origen del hombre (y de la mujer) y su posición dentro de la Naturaleza.

Hablar del estudio de la diversidad biológica humana también es hablar de la anatomía y de la patología humana. Por eso, numerosos patólogos y anatomistas han estado ligados a este tipo de estudios. Pickerin y Bachman (1979) sugieren que el origen de la Antropología Forense surge de disciplinas tan diferentes como la anatomía humana, la paleontología, la odontología, la arqueología y la Antropología Física.

Para T. Dale Stewart (1979), el padre de la Antropología Forense sería Thomas Dwigth, que en 1878 publica un libro que lleva por título "*The identification of the Human Skeleton. A medico-legal study*".

Anteriores a estos estudios nos encontramos casos de identificación positiva a partir de alguna característica especial de la persona desaparecida. Casos documentados con la identificación del General Mayor de la Milicia de Massachussets, el Dr. Joseph Warren, muerto en la batalla Breed's Hill en 1775, en la Guerra de la Independencia de Estados Unidos. El cadáver del Dr. Warren pudo ser reconocido por un puente de plata con colmillo de hipopótamo que le había hecho Paul Revere un año antes de su muerte (Sánchez y Dorado, 2015).

Otro gran hito dentro de la Antropología Forense lo desarrolla George A. Dorsey al identificar los pequeños fragmentos de hueso como humanos cuando el fabricante de salchichas de Chicago, Luetger, intentó hacer desaparecer el cuerpo de su esposa a finales del siglo XIX (Sánchez y Dorado, 2015).

A comienzos del siglo XX destacan la figura de H.H. Wilder que, junto a Dorsey publican varios manuales para la identificación de individuos vivos o muertos. Otros autores como Aleš Hrdlička, fundador de la *American Association of Physical Anthropology*, y Ernest A. Hooton consolidan la escuela de antropólogos físicos en el *Smithsonian Institution* y en varias de las universidades norteamericanas (Rodríguez, 1994).

A partir de los trabajos de Thomas W. Todd, en 1920, para determinar la edad de fallecimiento de un sujeto a través del estudio de la morfología de la sínfisis púbica, y de su alumno, Wilton Marion Krogman, que en 1962 publica el libro "*The Human Skeleton in Forensic Medicine*", se establecen las bases de la Antropología Forense (Krogman, 1962).

Esta disciplina se desarrolla hasta nuestros días gracias a los trabajos llevados a cabo para identificar los soldados caídos en las diferentes guerras acaecidas a lo largo del siglo XX. Científicos como Charles Snow, Mildred Trotter, T. Dale Stewart, Thomas W. Mackern, Ellis Kerley o Charles P. Warren, publican trabajos que siguen vigentes en la actualidad (Rodríguez, 1994).

En Europa, el desarrollo de la Antropología Forense hay que buscarla dentro de la biología humana. Cirujanos como Paul Broca, patólogos como Rudolf Virchow, naturalistas como A. P. Bogdanov, y biometristas como Karl Pearson, contribuyen a establecer una disciplina centrada en la identificación individual en temas de delincuencia común (Benito, 2016).

Mientras que en Estados Unidos la Antropología Forense se desarrolló principalmente de la mano la Antropología Social, en América Latina es muy diferente. Influenciados por las corrientes norteamericanas, y el alto número de desapariciones forzadas debido a las numerosas dictaduras criminales, los antropólogos forenses latinoamericanos vinculan sus trabajos a casos de Derechos Humanos. Donde adquieren gran relevancia los aspectos históricos, sociales y jurídicos sobre los perfiles biológicos de los individuos (Rodríguez, 2004).

En España los orígenes de la Antropología Forense comienzan a establecerse a mediados del siglo XIX. Muy influenciados por el antropólogo francés Paul Broca, se publican numerosos trabajos en los diversos campos y ramas de la Antropología. Manuel Antón y Ferrándiz, Federico Olóriz Aguilera, Rafael Salillas o Pedro González de Velasco publican los primeros trabajos sobre Antropología siempre vinculada a cátedras de Medicina Legal (Reverte, 1999). No es hasta principios de los años 80 cuando se crea el primer Laboratorio de Antropología Forense y Paleopatología en España, en la Escuela de Medicina Legal de Madrid cuyo impulsor fue el profesor José Manuel Reverte Coma (Reverte, 1999). Con posterioridad aparecen otros laboratorios en Granada, Zaragoza o País Vasco, entre otros, que se ocuparan de la investigación y de la formación de profesionales de la Medicina Legal y Forense en Antropología Forense (Sánchez y Dorado, 2015).

Actualmente el desarrollo de la investigación en Antropología Forense se encuentra en manos de los Institutos de Medicina Legal, en el Instituto de Toxicología y Ciencias Forenses con sede en Madrid, en los Departamentos de universitarios de Medicina Legal y en áreas de la Policía Científica de los Cuerpos y Fuerzas de Seguridad (Mossos de Escudra, Guardia Civil, Policía Nacional, Ertzantza, etc.).

Reconocida por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO, por sus siglas en inglés), desde el año 2000 la Antropología Física se clasifica como Área de Conocimiento dentro de las Ciencias Biológicas que estudia el origen de nuestra especie y la diversidad biológica humana.

La Antropología Biológica proporciona una visión integral de los mecanismos que generan variabilidad biológica en las poblaciones humanas en sus vertientes evolutiva, ecológica, ontogenética y de género. Visión que permite además abordar las consecuencias biológicas del cambio ambiental reciente (incluido el relativo a los sistemas de valores, estilos de vida y comportamiento) sobre procesos biológicos y los patrones de salud y enfermedad en las poblaciones humanas.

Con el código 2402, la UNESCO engloba a la Antropología Física dividida en diferentes subáreas:

- Archivos antropológicos.
- Antropogenética.
- Antropometría y Antropología Forense.
- Composición del cuerpo humano.
- Constitución del cuerpo.
- Etnología.
- Antropología Médica.
- Hábitos alimentarios.
- Osteología.
- Biología de las poblaciones.
- Comportamiento de primates.
- Somatología de los primates.
- Biología racial.
- Desarrollo somático.
- Envejecimiento somático.

Estas subáreas recogen el sentido de las Antropología Física que se ocupa principalmente de reconstruir la línea evolutiva del hombre, el estudio de la Primatología y la Biología Humana (Benito, 2016).

Así pues, la Antropología es una disciplina capaz de abordar desde una perspectiva holística e integral el estudio del ser humano en sus aspectos social, cultural y biológico, relacionando tres divisiones menores de estudio del ser humano: la Antropología Socio-cultural, la Arqueología y la Antropología Biológica (Rodríguez-Cuenca, 2004). La Antropología Socio-cultural tomó como referencia al ser humano como miembro de un grupo social y como integrante de una cultura. La Arqueología estudia los restos o vestigios de las sociedades pretéritas para darle un sentido socio-cultural. Y la Antropología Biológica o Física estudia la diversidad biológica del ser humano a partir de sus propios restos dentales, óseos o momificados desde sus orígenes evolutivos hasta los contemporáneos.

Como se ha comentado antes, la Antropología Forense es una subdisciplina de la Antropología Física englobada también en la Medicina Forense. Como señalan Krogman e İşcan (1986) se trata de una “reconstrucción de la forma de vida de la víctima hasta el momento de su muerte”. Para Reverte Coma (1999), la Antropología Forense tiene como fines “el estudio de los restos óseos esqueléticos con objeto de llegar a la identificación personal, averiguar la causa de muerte, la edad, la raza, el sexo, la estatura del sujeto, las marcas profesionales, antiguas lesiones óseas, el estudio de la cavidad bucal, y todo cuanto sea posible siempre para proporcionar información a los investigadores policiales para que puedan llegar a la identificación del sujeto”. La *American Board of Forensic Anthropology* define la Antropología Forense como la aplicación de la ciencia de la Antropología Física o Antropología Biológica al proceso legal. El antropólogo forense es el encargado de aplicar normas técnicas científicas desarrolladas por la Antropología Física para la identificación de restos óseos y/o cadáveres en distintos estados de conservación (con alteraciones de índole natural, accidental o intencional), asiste a la localización y recuperación de restos humanos e identifica a los sujetos vivos (Robledo y Sánchez, 2010).

Si bien, la figura del Antropólogo forense es parte indispensable de la identificación del sujeto, hoy en día es indiscutible la presencia de otros actores en el campo de la identificación y de la investigación forense. Independientemente de la formación académica que haya tenido el antropólogo forense necesita el apoyo de otros especialistas tales como biólogos, odontólogos, arqueólogos, radiólogos, genetistas, entomólogos, botánicos, geólogos, etc., para complementar los resultados de identificación y el resto de aspectos que rodean a la causa de muerte del individuo (Márquez-Grant y Roberts, 2012).

## 3.2. La Tafonomía, orígenes e importancia para el estudio antropológico forense

La Tafonomía es la ciencia que estudia los procesos que afectan la transición de los restos de organismos vivos pasados y sus huellas en la litosfera, tal como se observa en el registro prehistórico (Fernández-Jalvo y Andrews, 2016). Para otros autores (Lloveras *et al.*, 2016) se trata de una disciplina que se ocupa de la reconstrucción de hechos o procesos del pasado que condujeron a la formación de un conjunto de restos biológicos asociados; o bien estudia las alteraciones y transformaciones postmortem que puede sufrir un individuo durante su historia tafonómica (desde que muere hasta que es recuperado) (Lyman, 1994).

Para Haglund y Sorg (1997) la Tafonomía presume de un acercamiento multidisciplinar biológico, cultural y geológico que abarca: (1) la reconstrucción de los paleo-ambientes; (2) la determinación de los factores que causan la destrucción diferencial o desgaste de los huesos; (3) comprender el transporte selectivo de restos; y (4) discriminar los agentes humanos de los no humanos de la modificación ósea. Desde el punto de vista de la Antropología Forense aclaran que los objetivos de ésta se superponen ampliamente a los de la Tafonomía, como son: (1) la estimación del tiempo y las circunstancias desde la muerte; (2) distinguir las condiciones postmortem que pueden confundir la identificación humana y la determinación de la causa y modo de muerte; y (3) la identificación de los factores relacionados con la supervivencia de restos humanos y otras pruebas.

Esta nueva ciencia, aunque presente durante décadas, comienza su desarrollo a mediados del siglo XX, cuando el paleontólogo ruso Efremov (1940) define la Tafonomía como las “leyes del enterramiento” (*taphos* → enterramiento y *nomos* → ley), es decir, la transición de los restos animales desde la biosfera a la litosfera. Posteriormente el término tafonómico es utilizado para determinar los procesos de fosilización que tiene lugar después del enterramiento.

No es hasta la década de los años 70 cuando otras disciplinas, cercanas a la paleontología, comienzan a interesarse por la ciencia de la Tafonomía. Autores como Behresmeyer (1975) aplican esta metodología en el campo de la Paleoantropología para explicar los procesos de alteración de la meteorización sobre los restos óseos antes de ser enterrados.

En aquella época la Antropología Forense era una disciplina que se dedicaba exclusivamente a proporcionar reconstrucciones precisas del perfil biológico de los esqueletos encontrados en contextos forenses. Cuando había que tratar otras cuestiones como quemaduras, huesos roídos, decoloración, etc., los antropólogos generalmente se apoyaban en otras investigaciones del campo de la Paleopatología, la Paleoantropología o de la Bioarqueología (Dirkmaat y Passalacqua, 2012).

A partir de los años 80 la Tafonomía deja de ser una disciplina de la Paleontología para pasar a manos de la Arqueología, con el fin de completar la información generada a partir del registro arqueológico. Comienzan a tratarse cuestiones relativas a los porqués, cuándo y cómo siguen los patrones de los restos óseos recuperados sin un contexto deposicional (Dirkmaat y Passalacqua, 2012). Las aplicaciones de la Tafonomía a los yacimientos arqueológicos relegan al ser humano como un agente tafonómico derivado de su actividad, para obtener información tanto de su comportamiento como de sus patrones de subsistencia (Dirkmaat *et al.*, 2008).

Es en este periodo cuando se pone en marcha el proyecto del Centro de Investigación Antropológica de la Universidad de Tennessee, conocido como *Body Farm*. El profesor William Bass plantea resolver las dudas surgidas sobre los procesos de descomposición en distintos intervalos y entornos (Jefferson y Bass, 2017). Tiempo después comienzan a parecer numerosas publicaciones sobre las modificaciones postmortem de los restos humanos, considerándose como las obras cúlmenes de la Tafonomía Forense las de Haglund y Sorg (1997, 2002). A partir de entonces surge un gran avance en el conocimiento de la descomposición cadavérica u el papel que juegan los distintos agentes.

La Tafonomía forense puede definirse como el estudio de los procesos postmortem que afectan (1) la preservación, observación o recuperación de los organismos muertos, (2) la reconstrucción de su biología o ecología, o (3) la reconstrucción de las circunstancias de su muerte (Haglund y Sorg, 1997). Es el estudio de los cambios que tienen lugar en los restos humanos hasta que son recuperados, pero también teniendo en cuenta al transporte posterior, al examen de la autopsia médico-legal y a todos los exámenes forenses realizados hasta que son depositados en el laboratorio (Dirkmaat y Passalacqua, 2012).

La mayor parte de la experimentación llevada a cabo en la Tafonomía Forense proviene de la investigación actualista, es decir, se basa en los estudios de los hechos en el presente, relacionados con la muerte y el enterramiento de los organismos, a través de la observación de los procesos que se desarrollan de forma natural o de simulaciones y experimentos controlados (Lloveras *et al*, 2016; Fernández-Jalvo y Andrews, 2016; Calmon, 2014; Andrews, 1995). Este tipo de estudio busca disminuir la ambigüedad entre las causas y los efectos, es decir, ofrecer información certera acerca de las causas y de los contextos bajo los cuales los efectos han sido observados (Gifford-González, 1991). Parten de la premisa de que el presente es la clave de pasado, estableciendo analogías entre los procesos observables en el presente con los que han sucedido en el pasado, y considerando que las leyes físicas son constantes en el espacio-tiempo y que la tasa de cambio es uniforme (Domínguez-Rodrigo, 1998).

Los estudios actualistas se aplican a la resolución de la problemática forense a partir de (Lloveras *et al*, 2016):

- Trabajos experimentales centrados principalmente en la descomposición de los tejidos. Como por ejemplo el efecto de los productos químicos domésticos corrosivos sobre la dentición (Cope *et al*, 2009). Por un lado este enfoque experimental permite al investigador controlar los factores conocidos, algunas variables, observar y medir los resultados. Sin embargo tiene otras desventajas como poder abarcar el amplio rango de variación que se da en el mundo real (Hanlund y Sorg, 1997).

- Trabajos basados en observaciones realizadas en entornos naturales, como por ejemplo los estudios de carroñeo de carnívoros sobre carcasas de vertebrados (Sala Burgos, 2012).
- Por último, se han generado importantes datos de referencia a partir del estudio de casos forense concretos, como por ejemplo la exhumación de los restos humanos no reclamados como modelos tafonómicos (Nociarová *et al.*, 2014). Estos estudios dan cuenta de la gran variabilidad que estados y cambios postmortem que se pueden encontrar en contextos forenses.

Como se ha comentado antes, la Tafonomía estudia las alteraciones o transformaciones postmortem que puede sufrir un individuo durante su historia tafonómica. Un agente tafonómico es el causante físico de la transformación (un carnívoro, una raíz, etc.) (Gifford-González, 1991). Un proceso tafonómico es la acción dinámica del agente causante (transporte, erosión, etc.). Como consecuencia de los procesos tafonómicos obtendremos unas modificaciones físicas o químicas que afectan a los restos esqueléticos. El análisis tafonómico trata de averiguar la identidad y cuantificar estos efectos tafonómicos (Lyman, 1994).

Lloveras y colaboradores (2016) hacen un buen resumen de las fases y alteraciones que se pueden dar en la historia tafonómica de un organismo. Las fases tafonómicas o estadios se contemplan como subdisciplinas de la Tafonomía:

- 1- Fase necrológica: Es la primera fase y hace referencia al proceso de muerte del individuo. Se inicia en la descomposición de las partes blandas y se relaciona con los factores asociados con la causa de muerte.
- 2- Fase bioestratinómica: Incluye las interacciones o procesos que tienen lugar después de la muerte hasta el enterramiento del individuo. Estos procesos pueden ser de tipo biótico (interacción con otros seres vivos) o abiótico (procesos físicos, mecánicos o sedimentarios).

- 3- Fase diagenética: La cual se centra en el estudio de la transformación de los materiales biológicos una vez sepultados y hasta su recuperación e incluye todas las interacciones que tienen lugar entre el organismo (o parte de él) y el sedimento que lo envuelve.

En esta última fase se centran los ensayos realizados para la redacción de esta disertación. Se entiende por diagénesis aquellos procesos de alteración tafonómica que tienen lugar después de que el organismo de estudio pasa a formar parte de la litosfera. En esta fase se estudian las modificaciones o transformaciones químicas y físicas de los elementos analizados, tanto a escala macroscópica como a escala microscópica (Cambra Moo, 2006).

Los factores que actúan en la fase diagenética se dividen en intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos son las condiciones del propio elemento de estudio (estructura química y molecular, porosidad, tamaño, forma, edad del individuo, sexo, enfermedades, causa de la muerte, peso, etc.), y los factores extrínsecos aquellos que actúan sobre el elemento de estudio relacionados con el medio donde se encuentran (microorganismos, pH del sedimento, régimen hidrológico, temperatura, carroñero, presencia de insectos, etc.) (Lloveras *et al.*, 2016; Baxter, 2004). Tradicionalmente se ha llevado a cabo su estudio en otras disciplinas como las aplicadas a la fosildiagénesis en Paleontología o en el estudio de poblaciones pretéritas (Willis y Tayles, 2009; Gutiérrez, 2000). Y son estas aplicaciones en las que se basaron la Tafonomía Forense para poder comprender los procesos que han afectado en los restos esqueléticos judiciales.

Actualmente el número de investigaciones aplicadas a la Tafonomía Forense ha experimentado un aumento según la bibliografía disponible. Aunque muchas de estas investigaciones parten de casos forenses particulares, otras se centran en la experimentación actualista con los diferentes factores extrínsecos que pueden afectar a la conservación o, mejor dicho, en la degradación de los cadáveres (Serrulla *et al.*, 2016; Hartnett *et al.*, 2011; Cope *et al.*, 2009; Dixon *et al.*, 2008; Turner-Walker, 2007; Etxeberria, 1994.).

Por otro lado, el material de estudio se ha centrado sobre todo en piezas no muy representativas y de fácil acceso como pueden ser restos óseos de animales o de humanos arqueológicos que han sufrido condiciones temporales muy alejadas del momento actual (Karr and Outram, 2012; Fernández-Jalvo *et al.*, 2002; Haslam y Tibbett, 2009; Nicholson, 1998). Estos estudios son de gran utilidad para comprender las consecuencias de los procesos tafonómicos acaecidos en el pasado.

### **3.3. Histología. Biología del tejido óseo**

El tejido óseo es un tipo de tejido conjuntivo especializado que se caracteriza por su rigidez, debido a que la sustancia fundamental extracelular se encuentra calcificada. Junto al cartílago forman los tejidos de apoyo del cuerpo, incluyendo otras funciones como protección de órganos vitales, depósito y almacenamiento y hematopoyesis (Gartner y Hiatt, 2009).

#### **3.3.1. Células del tejido óseo**

El tejido óseo está compuesto por células osteogénicas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

Las células osteogénicas u osteoprogenitoras provienen de las células mesenquimatosas primitivas. Dan lugar a los osteoblastos. Tienen forma fusiforme y se encuentran en la parte más profunda del periostio formando una capa que rodea al hueso y del endostio, delimitando las cavidades medulares del hueso. También se encuentra en las paredes de los conductos de Havers (Tresguerres *et al.*, 2005).

Los osteoblastos son los responsables de la síntesis de la matriz ósea. Se encuentran sobre todo en los huesos en crecimiento. Son células dispuestas en empalizada sobre la matriz orgánica que sintetizan y segregan de forma coordinada. Aunque los osteoblastos están polarizados hacia el hueso, las proteínas de la matriz que liberan no solo se limitan a su zona basal, sino que

muchos de ellos van quedando envueltos en la matriz, convirtiéndose en osteocitos incluidos en las lagunas que se forman junto a ellos (Tresguerres *et al.*, 2005) (Figura 1).

Los osteocitos se forman a partir de los osteoblastos cuando éstos han perdido su capacidad de síntesis. Las células quedan atrapadas por la matriz ósea y encerradas en unas oquedades llamadas osteoplastos o lagunas óseas. Al microscopio se observan como células alargadas (estrelladas) con un núcleo ovoide central, citoplasma basófilo y prolongaciones citoplasmáticas con las cuales se relacionan entre sí por una red de canaliculos, o conductos calcóforos, bañada por el denominado fluido óseo, a través de uniones comunicantes (Bernabé Salazar *et al.*, 2013). El papel principal de los osteocitos es la detección de estímulos mecánicos y variaciones de tensión y morfología del hueso producidas por las cargas que soporta en su superficie, así como su traducción en el remodelado (Tresguerres *et al.*, 2005).

Los osteoclastos tienen la función de remodelación ósea que tiene lugar durante los procesos ontogénicos y de reparación del hueso, así como las de la eliminación de las porciones de la matriz ósea alteradas o debilitadas. Son células gigantes, muy activas y móviles que se mueven alrededor de las superficies de reabsorción del hueso. Frecuentemente forman grupos de células que son visibles al microscopio formando depresiones erosionadas en la superficie conocidas como lagunillas de Howship (Ortner y Turner-Walker, 2003).

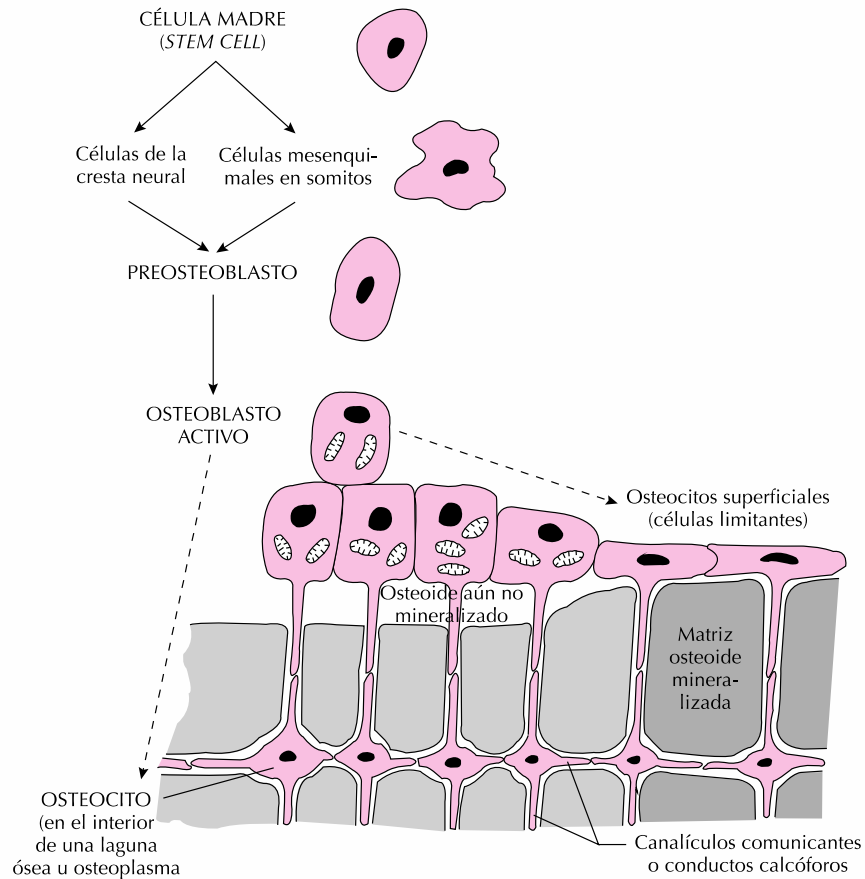


Figura 1. Familia del osteoblasto. Modificado de Tresguerres *et al.*, 2005.

### 3.3.2. Estructura y Formación del hueso:

Existen dos tipos de tejido óseo según sus características macroscópicas: el tejido óseo cortical o compacto y el tejido óseo trabecular o esponjoso.

El tejido óseo cortical o compacto está compuesto por una masa ósea densa sin espacios o espacios muy reducidos en tamaño y su organización laminar es mucho más precisa y más gruesa (como por ejemplo la parte más externa de la diáfisis de los huesos largos).

La unidad funcional del tejido óseo es la osteona o sistema de Havers. Constituido por un conducto central o de Havers fueron descritos por Compton Havers en el siglo XVII. Tienen un diámetro de entre 10 a 350  $\mu\text{m}$  por donde discurren un capilar y una vénula en el caso de los más finos, y varios vasos sanguíneos,

linfáticos y fibras nerviosas en aquellos con un diámetro mayor. Los conductos de Havers se encuentran comunicados entre sí y con la cavidad medular a través de un sistema de conductos transversales (de Volkmann) (Tresguerres *et al.*, 2005). Alrededor del conducto central se disponen una serie de laminillas óseas concéntricas (de 4 a 20), de las cuales la más externa se denomina laminilla limitante, laminilla intersticial o de Ebner. Cada laminilla está constituida por una hilera de osteocitos que se disponen en el interior de las lagunillas osteocíticas u osteoplastos. Entre cada laminilla hay un espacio ocupado por la matriz ósea constituida fundamentalmente por las fibras de colágeno (Bernabé Salazar *et al.*, 2013). Desde las lagunillas se originan finas extensiones citoplasmáticas filiformes de los osteoblastos que se extienden para comunicarse con los osteocitos vecinos, las células de revestimiento óseo y osteoblastos, formando una red (Ortner y Turner-Walker, 2003). Estas extensiones citoplasmáticas pasan por pequeños canales llamados canalículos que permiten el transporte de nutrientes, productos de desecho y señales químicas entre los vasos sanguíneos y las células óseas (Figura 2).

Cada osteona constituye un cilindro longitudinal apilados entre sí dejando un espacio entre ellos denominado sistemas o espacios intersticiales, de forma y tamaño irregular, y limitados por las líneas de cemento que separan estas estructuras de las osteonas adyacentes (Bernabé Salazar *et al.*, 2013). Las líneas de cemento son capas muy finas de matriz orgánica que unen o cementan la matriz de las laminillas contiguas.

Tanto debajo del periostio como del endostio aparece una capa de láminas óseas denominadas lámina limitante externa e interna respectivamente. El periostio queda fijado al tejido óseo mediante una serie de haces gruesos de fibras de colágeno denominadas fibras de Sharp (Bernabé Salazar *et al.*, 2013).

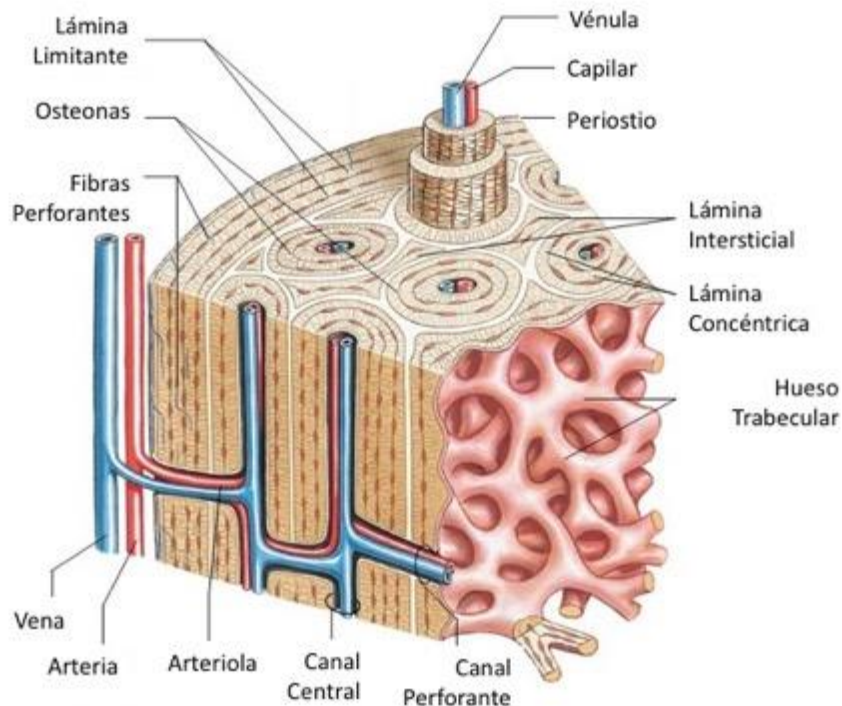


Figura 2. Estructura del tejido óseo compacto. Adaptado de Frederick, 2015.

El tejido óseo trabecular o esponjoso lo constituyen una red de finas trabéculas que se entrecruzan anárquicamente dando lugar a un entramado cuyos espacios están intercomunicados albergando a la médula ósea (se localiza en la parte central de los huesos cortos, las epífisis y metáfisis de los huesos largos y en el diploe de los huesos planos). Carece de conductos de Havers, aunque se constituye de laminillas óseas con osteoplastos, canalículos, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos, ya que se trata de una región en continuo proceso de remodelación. (Tresguerres *et al.*, 2005; Bernabé Salazar *et al.*, 2013) (Figura 3).

Todos los huesos están recubiertos tanto en su cara interna como en la externa por el endostio y el periostio. Ambos son esenciales para la nutrición, el crecimiento y la reparación de los huesos, gracias a los diferentes tipos celulares que albergan.

El periostio cubre la totalidad del hueso a excepción de las superficies articulares. La parte más externa está constituida por una gruesa capa de tejido conectivo, muy vascularizado, que se denomina capa fibrosa. La capa interna, más delgada y

denominada capa osteogénica, está constituida principalmente por células osteogénicas.

El endostio, está formado por una capa de células osteogénicas que, junto con las de la capa interna del periostio, participan en la remodelación ósea (Bernabé Salazar *et al.*, 2013).

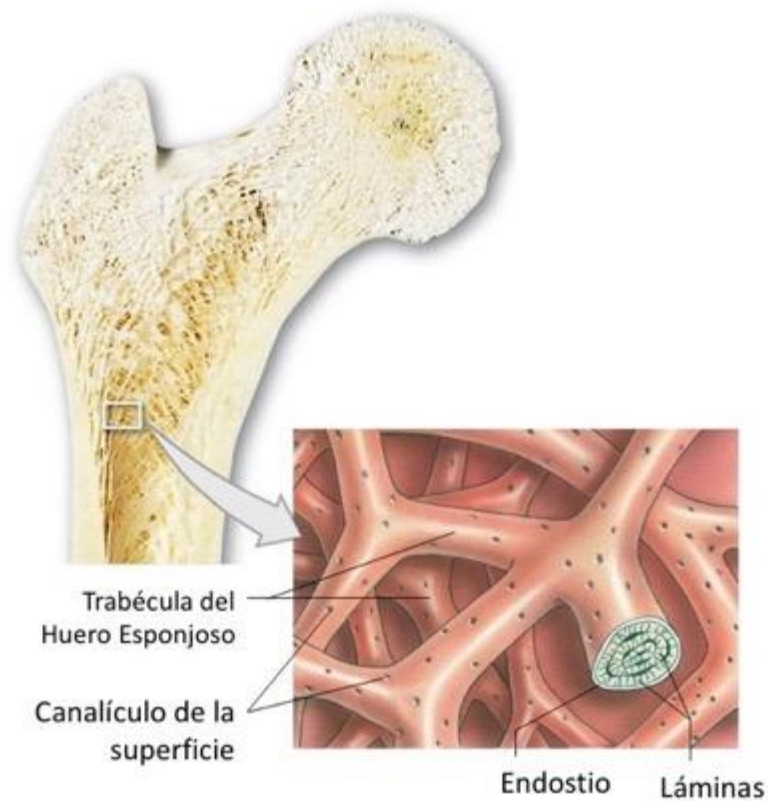


Figura 3. Estructura del tejido óseo trabecular. Adaptado de Frederick, 2015.

Para entender correctamente la estructura ósea es importante comprender los procesos de formación del hueso. Aunque se trate de un tejido ampliamente estudiado por las implicaciones médicas que tiene todavía existen muchos aspectos generales que son desconocidos.

La matriz ósea se constituye de dos componentes: orgánicos e inorgánicos. El componente orgánico, representado principalmente en un 90% por fibras de colágeno, principalmente tipo I. El colágeno tipo I es una proteína fibrilar no soluble que se compone de tres cadenas polipeptídicas (dos del tipo  $\alpha 1$  y una  $\alpha 2$ ), de unos 1000 aminoácidos cada una, enrolladas formando una hélice de tres

hebras de unos 300 nm de longitud y unos 1,5 nm de diámetro. Las tres cadenas están estabilizadas por puentes hidrógeno entre grupos  $-C=O\dots HN-$  de enlaces peptídicos en cadenas adyacentes. Estas moléculas se unen entre sí formando empaquetamientos de múltiples unidades que forman fibrillas que agrupadas en haces constituyen las fibras de colágeno de la sustancia orgánica del hueso (Tresguerres *et al.*, 2005; Bernabé Salazar *et al.*, 2013) (Figura 4).

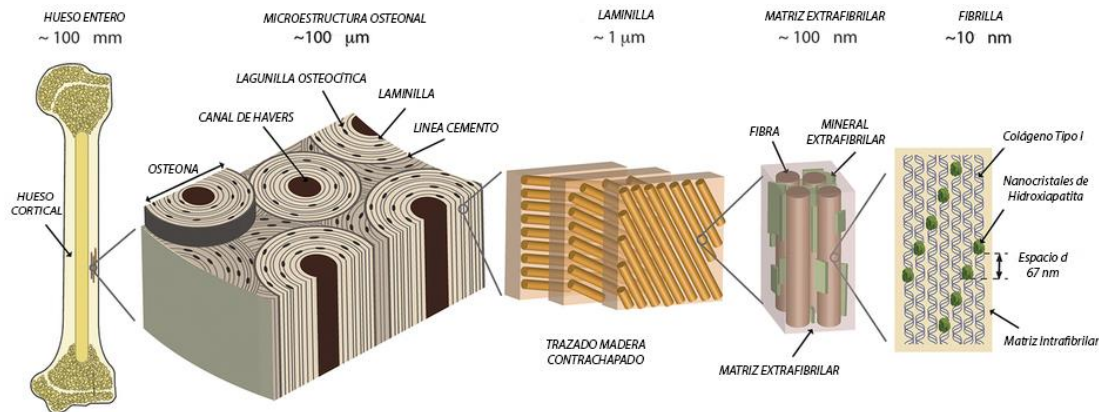


Figura 4. Estructura jerárquica del hueso humano. Adaptado de Zimmermann *et al.*, 2015)

El resto de proteínas no colágenas de la matriz, que representa el resto del componente orgánico un 10%, además de contribuir a la estructura poseen un papel clave en la fisiología del tejido (Tabla 1). Lo constituyen proteoglicanos, glucosaminoglicanos, glucoproteínas, osteonectina (mantiene unidas las fibras de colágeno con la porción mineral del hueso) y osteocalcina (fija el calcio de la matriz ósea) (Tresguerres *et al.*, 2005; Bernabé Salazar *et al.*, 2013).

Papel Fisiológico de las proteínas no colágenas de la matriz ósteoide	
I.	En la mineralización: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Favorecer o inhibir el depósito de mineral en la matriz osteoide.</li> <li>b. Favorecer o inhibir la maduración y crecimiento del mineral.</li> <li>c. Acción enzimática.</li> </ul>
II.	En la reabsorción ósea: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Regulación de la actividad de los osteoclastos.</li> <li>b. Acción quimiotáctica.</li> <li>c. Función de reconocimiento.</li> </ul>
III.	En la estructura de la matriz osteoide:

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Favorecer el anclaje de las células óseas en la matriz.</li> <li>b. Contribuir a la estructura de la matriz osteoide.</li> </ul> <p>IV. Otras:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Transporte de iones, hormonas y metabolitos.</li> <li>b. Estimulación o inhibición de enzimas.</li> </ul> |
|--|

Tabla 1. Papel Fisiológico de las proteínas no colágenas de la matriz ósteoide. Adaptado de Tresguerres *et al.*, 2005.

El componente inorgánico principal de la matriz osteoide está constituido principalmente por depósitos de fosfato cálcico cristalino (hidroxiapatita). El cristal de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$  se caracteriza por su pequeño tamaño (200-400 nm de largo, 20-40 nm de ancho y 10-20 nm de grosor) y su gran asimetría física y electrostática. Este tamaño y asimetría favorece el depósito de agua e iones en su superficie, de tal manera que, además de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , en el cristal de hidroxiapatita se adsorben iones hidroxilo, carbonatos y citrato, junto con cationes menos abundantes como  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  (Tresguerres *et al.*, 2005; Bernabé Salazar *et al.*, 2013).

Los cristales de hidroxiapatita se encuentran incrustados dentro de las fibras de colágeno alineados paralelos al eje largo de la fibra. Estas fibras son, a su vez, como se ha comentado enrolladas en paralelo formando láminas sucesivas que, según su orientación, forma una “estructura de contrachapado torcida o girada” (Nielsen-Marsh *et al.*, 2000).

El proceso de formación del hueso u osificación u osteogénesis se produce de forma diferente dependiendo del hueso que se considere. Así pues, hay dos tipos de osificación: intramembranosa u osificación primaria y endocondral u osificación secundaria.

En la osificación primaria el tejido conjuntivo embrionario es transformado directamente en hueso (por ejemplo, en el neurocráneo y tercio medio de la clavícula).

Comienza a partir del primer mes tras la concepción. Las células mesenquimales del blastema se condriifican formando el primordio del futuro esqueleto. Este tejido es invadido por numerosos capilares que permiten que las células mesenquimales que se localizan en la superficie de la matriz cartilaginosa se transformen en células osteogénicas que originan los osteoblastos. En este momento comienzan a producir la matriz osteoide, que se deposita en capas. Los osteoblastos que quedan encerrados en la matriz se transforman en osteocitos. La matriz ósea se calcifica gracias al aporte de nutrientes a través de los canalículos o canales calcóforos. La llegada de nuevas células mesenquimatosas y su posterior transformación en osteoblastos hace que estos centros de osificación crezcan expansivamente. La unión de varios centros de osificación da lugar al tejido óseo primario. La acción de los osteoclastos a la vez hace que el tejido óseo primario se remodele dando lugar al secundario (Tresguerres *et al.*, 2005; Bernabé Salazar *et al.* 2013).

En la osificación secundaria el hueso se forma a partir de una base cartilaginosa (huesos largos, costillas, columna, etc.). El tejido óseo hialino no se transforma directamente en hueso, sino que a partir de los núcleos de osificación es sustituido progresivamente. Las células mesenquimatosas se diferencian en condroblastos que constituirán la matriz cartilaginosa que conformará el molde óseo primario. Este molde crece en longitud y grosor gracias al crecimiento del tejido cartilaginoso controlado por el aumento de la matriz cartilaginosa mediado por los condrocitos y condroblastos.

A continuación, en una región media del molde óseo se produce la calcificación de los condrocitos debido a un depósito de hidroxihapatita. En esta región se produce una rápida vascularización a partir del pericondrio. Los condrocitos se diferencian a células osteogénicas y éstas, posteriormente, a osteoblastos, que producirán la matriz ósea sobre los restos de cartílago osificado. El tejido conectivo que lo rodea se transformará en el periostio. A todo este conjunto se conoce como centro de osificación primario o diafisiario. A nivel de las epífisis también aparecen otros centros de osificación llamados secundarios o metafisiarios. Estos centros siguen el mismo patrón de osificación que los primarios.

El cartílago persiste en la superficie articular del hueso, transformándose en cartílago articular, y en la región metafisiaria entre los centros de osificación primarios y secundarios. Éste último permite el crecimiento de los huesos hasta alcanzar su longitud máxima que será sustituido completamente por tejido óseo. (Bernabé Salazar *et al.*, 2013).

## **4. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS CON CARÁCTER FORENSE**



La Histología es una herramienta indispensable para lectura de los efectos que producen los diferentes factores que alteran la estructura de los tejidos. Completamente formalizada en los análisis médico-legales es utilizada en otras investigaciones judiciales para observar los efectos que ocurren sobre los tejidos como por ejemplo muertes súbitas, traumatismos, intoxicaciones, congelaciones, incendios, etc. (Crowder y Stout, 2012).

El estudio histológico tafonómico forense, además, se debe acompañar de un enfoque multidisciplinario que recoja toda la información posible del lugar de enterramiento (análisis químico de las estructuras orgánicas y minerales, espectrometría, etc.) para poder reconstruir la Historia tafonómica de los restos hallados.

#### **4.1. Efectos tafonómicos documentados sobre las estructuras óseas**

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos ensayos en el campo de la Tafonomía aplicada a la Arqueología para comprobar las consecuencias que tienen el conjunto de factores que intervienen en la diagénesis de los huesos de diferentes yacimientos (Nielsen-Marsh y Hedges; 2000a, 2000b). La investigación en Paleohistología, actualmente con gran proyección, se ha centrado principalmente en la estimación de la edad, el estudio de la enfermedad, diferencias entre vertebrados y la evaluación de la diagénesis (Turner-Walker y Mays, 2007).

Muchos autores destacan la importancia de los factores biológicos (raíces, insectos, roedores, etc.) cuyos efectos pueden ser visibles macroscópicamente (Márquez-Grant y Roberts, 2012; Forbes, 2008; Haglund y Sorg, 2002, 1997). Pero en la degradación del hueso también está influida microscópicamente, principalmente por la degradación química y microscópica. A su vez, la presencia de los microorganismos está definida por la accesibilidad del agua en el entorno funerario, la disponibilidad al oxígeno, el pH y la temperatura (Turner-Walker, 2007; Collins *et al.*, 2002; Nicholson, 1988). En las primeras etapas de la

descomposición de un cadáver la presencia de estos microorganismos y el resto de actores que colaboran en este proceso desempeñan el papel principal. Sin embargo, para los restos esqueléticos debemos tener en cuenta otros procesos que, de manera azarosa, intervienen en la preservación (estructura química y molecular, porosidad, tamaño, forma, edad del individuo, pH del sedimento, régimen hidrológico, temperatura, etc.) (Lloveras *et al.*, 2016).

Este deterioro microscópico no solo influye en la preservación del hueso, también puede tener un gran impacto en los análisis químicos o radiológicos y en la datación por carbono de los esqueletos (Turner-Walker, 2007; Nielsen-Marsh y Hedge, 2000; Grupe, 1995).

Comprender la composición y estructura del hueso, así como la interacción de la matriz orgánica (colágeno) con la matriz inorgánica (hidroxiapatita) es esencial para entender los procesos que conllevan la degradación de los huesos, tanto a nivel macroscópico como a nivel tisular.

## **4.2. Degradación de la fase orgánica del hueso**

Tradicionalmente se pensaba que la degradación ósea estaba relacionada principalmente con la pérdida de la fase mineral, pero parece ser que también interviene la pérdida de la fase orgánica (Nielsen-Marsh y Hedge, 2000; Nielsen-Marsh *et al.*, 2000).

La fase orgánica del hueso seco está representada aproximadamente por un 22-23% en peso y un 40% en volumen (Nielsen-Marsh *et al.*, 2000). Alrededor del 90% está compuesto por fibras de colágeno I que da a los huesos vivos la resistencia y un cierto grado de flexibilidad.

Como se comentó anteriormente una de las características más importantes del colágeno tipo I es que, por su estructura tridimensional bien ordenada de las fibras, las interacciones iónicas e hidrofóbicas con las cadenas de aminoácidos

adyacentes y el grado de reticulación, en condiciones fisiológicas, es insoluble (Turner-Walker, 2007; Tresguerre *et al.*, 2005).

En el hueso, el colágeno tiene enlaces cruzados covalentes mediados enzimáticamente (lisil o hidroxilo) entre cadenas de aminoácidos adyacentes. Estos enlaces, junto con la unión a la hidroxiapatita, restringen físicamente la capacidad de la cadena a expandirse. La red de colágeno no mineralizada o matriz orgánica también contiene proteínas no colágenas (como la osteocalcina) y mucopolisacáridos que constituyen el 10% restante en peso. La osteocalcina se une tanto a la hidroxiapatita como al colágeno jugando un papel clave en la mineralización primaria (Turner-Walker, 2007).

Esta estabilidad hace que el colágeno altamente mineralizado sea resistente al ataque microbiano. A su vez, esta resistencia del colágeno está influida físicamente por la ausencia de nanoporos de tamaño  $>8$  nm en el hueso que impiden el acceso de las colagenasas y otras enzimas exógenas bacterianas y fúngicas (Hedges y Millard, 1995). Por tanto, para que se produzca la degradación ósea por parte de las enzimas requerirá que sea eliminada la parte mineral. Las alteraciones diagenéticas, como la acción de un medio de enterramiento ácido, eliminarán la fase mineral ósea permitiendo a las colagenasas alterar la integridad del colágeno (Nielsen-Marsh *et al.*, 2000).

La disponibilidad del agua en el ambiente de enterramiento y alrededor y dentro del hueso tiene una gran influencia en la supervivencia de los restos óseos. El agua es el medio en el que se producen las reacciones químicas que tienen lugar en el suelo y a la vez favorece en el metabolismo microbiano.

La ausencia de agua, en condiciones especiales, permite la conservación de los tejidos blandos, produciendo la momificación de los mismos. Pero, sin embargo, en la mayoría de los sitios de enterramiento el agua, además de acelerar la presencia microbiana, puede acelerar la pérdida de proteínas a través de la hidrólisis.

Cuando la hidrólisis no se produce por el efecto de las colagenasas producidas por las bacterias y hongos, el agua residual retenida en la microporosidad de los huesos (incluso en los huesos secos) hace que el colágeno experimente una lenta hidrólisis química influida por un aumento o reducción del pH local y por el aumento de la temperatura (Turner-Walker, 2007; Nielsen *et al.*, 2000).

El colágeno es más estable frente a la hidrólisis cuando el pH está en el rango 3-7.5. A pH 1, la velocidad de la hidrólisis es 10 veces más rápida que a pH neutro. A pH 12 la velocidad es 100 veces más rápida. Curiosamente, aunque la hidrólisis de la cadena de aminoácidos la secciona en fragmentos más pequeños la presencia de microporos en el hueso hace que no puedan ser lixiviados y se conserven dentro del hueso, reduciendo drásticamente la resistencia mecánica (Collins *et al.*, 1995).

### **4.3. Degradación de la fase inorgánica del hueso**

Como se ha comentado antes la acción de las aguas subterráneas en el ambiente de entierro es determinante a la hora de alterar la composición mineral del hueso y, por consiguiente, de la disolución y lixiviado de la hidroxiapatita (Smith *et al.*, 2007; Baxter, 2004; Nielsen *et al.*, 2000; Hedges y Millar, 1995).

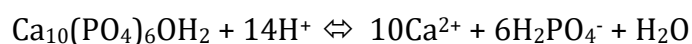
Para que esto ocurra Nielsen y colaboradores (2000) describen tres alteraciones en la hidroxiapatita que pueden utilizarse como indicadores de los cambios diagenéticos: el aumento de la porosidad, el aumento de la cristalinidad y la inclusión de iones exógenos.

La porosidad aumenta a medida que se produce la degradación del hueso acelerando la destrucción de los diferentes componentes estructurales, y las otras dos alteraciones diagenéticas mencionadas. El aumento de la cristalinidad se sugiere a través de dos mecanismos: la disolución de los cristales más pequeños y la disolución y posterior recristalización a cristales más grandes por incorporación de iones diagenéticos. Estos cambios en la cristalización aumentan la disolución de los cristales más pequeños menos estables y la formación de poblaciones componentes más estables por la incorporación de iones exógenos. Las propias

características químicas de la hidroxiapatita hacen que sea un buen absorbente de muchas especies iónicas, como flúor, carbonato o uranio. El intercambio de iones  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  entre el hueso y el ambiente también conduce a la alteración de la estructura ósea.

Si se atienden a los parámetros ambientales que actúan modificando la fase mineral, Nielsen y colaboradores (2000) proponen tres parámetros ambientales clave: el pH, la saturación del agua circundante con respecto a los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  y la tasa de movimiento de las aguas subterráneas.

La solubilidad de las apatitas en las aguas subterráneas depende en gran medida del pH del agua y de la presencia de iones disueltos. En general todos los fosfatos de calcio, como la hidroxiapatita, se vuelven más solubles cuando se produce una disminución del pH (Turner-Walker, 2007).



Según la ecuación un aumento en la concentración de iones de hidrógeno (disminución del pH o aumento de su acidez) fuerza la reacción hacia la derecha y la hidroxiapatita se disuelve.

En el caso de disoluciones alcalinas ocurrirá lo contrario y la hidroxiapatita será más estable, pero en presencia de  $\text{CO}_2$ , el calcio en disolución ( $\text{Ca}^{2+}$ ) precipitará en forma de bicarbonato cálcico. El sentido de la reacción estará limitado por la concentración de  $\text{CO}_2$ . La eliminación de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo tanto, también impulsará la reacción hacia la derecha permitiendo de nuevo la disolución de la hidroxiapatita. En el caso de suelos o ambientes con escaso contenido de fosfato también pueden conducir a la desmineralización de la matriz. Cuando la hidroxiapatita se disuelve consume iones  $\text{H}^+$  y empuja la reacción hacia la izquierda reduciendo la acidez. En este sentido la hidroxiapatita actúa como un amortiguador del pH local (Turner-Walker, 2007).

La hidroxiapatita es más estable alrededor de un pH 7,8 y tiene baja solubilidad en medios alcalinos ( $> 7,5$ ), mientras que en medios ácidos ( $\text{pH} \leq 6,0$ ) su solubilidad es alta. Por consiguiente, el hueso tiende a conservarse mejor en entornos alcalinos. El pH de las aguas subterráneas tiene un papel fundamental ya que determina la presencia de los iones para el intercambio iónico.

### **Importancia de $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{PO}_4^{3-}$ en la disolución de la hidroxiapatita ósea**

El modelo de disolución simple para la hidroxiapatita ósea, previsto por Hedges y Millard (1995), supone que la pérdida de mineral se produce por difusión, donde se cree que el movimiento de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  de la superficie de la hidroxiapatita ósea es el paso limitante de la velocidad de degradación.

Varios autores sugieren que la difusión como responsable del transporte de la materia lejos de las superficies de la hidroxiapatita bajo condiciones de laboratorio controladas. Parece ser que el movimiento de las aguas circundantes al hueso controla la alta saturación de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  en esta área. Las pérdidas sucesivas de calcio y de fósforo de la matriz ósea causan aumentos de la porosidad, los cuales pueden quedar encerrados en un circuito de retroalimentación positiva.

La velocidad y el volumen del flujo de agua a través de un hueso depende de las conductividades hidráulicas relativas del medio (suelo) y del hueso (porosidades relativas), y el volumen total de agua circundante (Turner-Walker, 2007).

En medios muy saturados se retrasará e incluso pueden detener el proceso de disolución. Sin embargo, debido a la introducción de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  por parte del agua subterránea circundante la disolución será extremadamente limitada en ambientes donde la solubilidad de la apatita es baja (Turner Walker, 2007; Hedges y Millard, 1995).

## **5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



Para obtener una identificación positiva de los restos humanos hallados en contextos distintos se utilizan diferentes técnicas forenses. Los intentos para ocultar la identidad de una víctima y evitar su identificación son muy frecuentes e inverosímiles, desde la destrucción de la dentición, la amputación de los dedos y las manos, la desfiguración de la cara, la quema del cadáver e incluso la disolución con productos químicos (Hartnett *et al.*, 2011).

La mayoría de los estudios histológicos que se realizan para estudios forenses están dirigidos, sobre todo, hacia el análisis de los tejidos blandos (Cummings *et al.*, 2011). Aquellos que se realizan sobre tejido óseo se aplican principalmente para la determinación de la edad de muerte del individuo, en el estudio de patologías óseas o para la determinación de la especie. Rara vez, como raros son los casos que surgen, se analizan para esclarecer aspectos concretos, como la disolución de restos humanos en medio ácidos o alcalinos (Vermeij *et al.*, 2015; Trujillo-Mederos *et al.*, 2012; Bosch *et al.*, 2011; Hartnett *et al.*, 2011; Cope y Dupras, 2009; Ubelaker y Sperber, 1988).

Por otro lado, los estudios tafonómicos tradicionales aplicados a la especie humana se han llevado a cabo tradicionalmente sobre huesos frescos de animales o bien sobre restos óseos humanos de origen arqueológico desde una perspectiva arqueológica y paleontológica, posiblemente debido a las dificultades para conseguir muestras de hueso contemporáneas (Jaggers y Rogers, 2009; Setúbal *et al.*, 2008).

Al realizar estos estudios sobre poblaciones pasadas que han sufrido el efecto tafonómico durante un tiempo determinado, y por consiguiente han sufrido alteraciones físicas y químicas en la composición del tejido óseo, los resultados deberían aplicarse sobre muestras judiciales con cierta cautela ya que la historia tafonómica de los restos comparados difieren considerablemente. Pero como se ha comentado antes, desde la experimentación actualista se establecen analogías entre los procesos observados en el presente con los que han sucedido en el pasado (Domínguez-Rodrigo, 1998).

Desde nuestro punto de vista es necesario ampliar los objetivos de la Tafonomía tradicional al campo de la Antropología Forense para aumentar el conocimiento de los efectos que tienen los agentes intrínsecos y extrínsecos sobre la estructura y composición de los restos humanos dentro del ámbito de la Medicina Legal.

Así pues, es necesario extrapolar los resultados observados en la experimentación con material arqueológico o animal a los resultados obtenidos en el laboratorio en los ensayos bajo condiciones controladas. Éstos deben ser analizados tanto a nivel macroscópico y microscópico.

La aplicación de la Histología es una gran herramienta para el análisis de los cambios tafonómicos que se producen en la estructura ósea. La observación al microscopio de una muestra ósea nos permite comprender los efectos que tienen los agentes tafonómicos sobre las estructuras internas y los componentes orgánicos y minerales del hueso.

Ante la falta de bibliografía específica centrada en el análisis histológico forense para determinar los efectos de los agentes intrínsecos y extrínsecos que alteran las estructuras óseas, planteamos iniciar la investigación con una serie de ensayos que muestren estas alteraciones con una aplicación útil en el análisis médico-legal. Es decir, pretendemos establecer una herramienta de utilidad para el estudio de los restos forenses que ayude a identificar los efectos y las causas de las alteraciones observadas en el hueso a partir del análisis histológico.

En este estudio se ha querido comprobar si los efectos estructurales y químicos que se producen en diferentes medios hipotéticos, a los que se puede enfrentar un hueso en un caso judicial, son reconocibles y cuantificables en un análisis histológico.

Como se ha visto existen multitud de factores que intervienen en las alteraciones tafonómicas que actúan en la descomposición de un ser vivo. Dadas las dificultades obvias para el análisis completo, el desarrollo de la experimentación se centró en el análisis de los efectos producidos sobre una muestra de hueso seco en diferentes

medios en condiciones controladas de laboratorio. El método actualista aplicado, permite centrarnos en los efectos de los procesos químicos y en los resultados histológicos obtenidos, descartando el resto de factores que se producen habitualmente en los diferentes ambientes de enterramiento.

Para la creación de un atlas o manual histológico forense centrado en los efectos ya comentados, sería necesaria la realización de numerosos ensayos en diferentes ambientes controlados y no controlados con varias réplicas en distintos tipos de huesos. En esta Tesis Doctoral se pretende establecer un protocolo aplicable a este tipo de análisis aprovechando las muestras disponibles. De este modo, se exponen los resultados y conclusiones obtenidos tras la puesta a punto de esta herramienta.



## **6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO**



## **6.1. Hipótesis**

Las hipótesis planteadas para presente estudio son las siguientes:

1. Es posible establecer un marco comparativo entre la experimentación realista o actualista frente a los casos contemporáneos estudiados desde la perspectiva médico-legal.
2. Se pueden establecer unos patrones histológicos cuantitativos y cualitativos que ayuden a entender la Historia tafonómica de unos restos óseos a partir del análisis histológico.

## **6.2. Objetivos**

Para comprobar las hipótesis propuestas nos planteamos los siguientes objetivos:

1. El presente estudio intentará establecer un protocolo de investigación en Antropología Forense que, aplicado al hueso humano, reproduzca las alteraciones que causan los agentes intrínsecos y extrínsecos que determinan las condiciones tafonómicas a partir de la experimentación en condiciones controladas de laboratorio.
2. Iniciar una nueva metodología desde la perspectiva de la Tafonomía Forense para la determinación de los agentes ambientales que afectan a la estructura y composición de los restos óseos humanos en el contexto de la Antropología Forense.
3. Valorar el uso de metacarpos y metatarsos de una muestra contemporánea y de otra origen arqueológico como material de estudio histológico.
4. Comprobar mediante el análisis histológico, el efecto sobre la estructura ósea que causa la exposición a un medio ácido, de un tampón de acético-

acetato, sobre una muestra de hueso humano durante diferentes tiempos y pH, en condiciones controladas de laboratorio.

5. Comprobar mediante el análisis histológico, el efecto sobre la estructura ósea que causa la exposición a un medio alcalino, de hidróxido de sodio (NaOH), sobre una muestra de hueso humano durante diferentes tiempos y molaridad, en condiciones controladas de laboratorio.
6. Comprobar mediante el análisis histológico, el efecto sobre la estructura ósea que causa la exposición a un medio de hipoclorito de sodio (NaClO) sobre una muestra de hueso humano durante diferentes tiempos, en condiciones controladas de laboratorio.
7. Comprobar mediante el análisis histológico, el efecto sobre la estructura ósea que causa la exposición a un medio de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre una muestra de hueso humano durante diferentes tiempos, en condiciones controladas de laboratorio.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS APLICADOS**



## **7.1 Material de estudio**

A continuación, se describen los materiales y la metodología aplicada para la realización de la investigación.

### **7.1.1. Material empleado para el estudio histológico**

El hueso utilizado para la realización de todos los experimentos tenía que tener una serie de características macroscópicas como son una cortical consistente, así como un volumen limitado para su introducción en los casetes utilizados para su procesamiento histológico. Para ello los huesos elegidos fueron tanto metacarpos como metatarsos indistintamente. Éstos, antes de su experimentación fueron seleccionados por sus características y buen estado de conservación macroscópico. Debían cumplir una serie de requisitos necesarios para la experimentación, tales como:

- Antigüedad menor a 20 años, con el fin de reducir, en la medida de lo posible, el factor temporal y, por tanto, obtener una muestra que no hubiera sufrido el paso del tiempo y los efectos descomponedores habituales.
- Huesos de individuos adultos, ya que la estructura ósea de los huesos de los individuos jóvenes en proceso de maduración alteraría los resultados finales.
- Completos, sin fracturas o roturas ante-mortem y post-mortem, es decir, en buen estado de conservación para obtener una muestra lo menos degradada en su estructura interna.

La muestra escogida proviene de las donaciones de la colección de referencia de la Escuela de Medicina Legal de Madrid de la Universidad Complutense de Madrid. Se utilizaron aquellos restos de los individuos de los cuales faltaban algún dato que los excluía de la colección de referencia.

Con el fin de comenzar un estudio comparativo se decidió incluir en la muestra seleccionada los huesos de una colección arqueológica recuperados de un

enterramiento colectivo de 1834 en la fortaleza de la Mota (Alcalá la Real) (Sánchez, 1999).

Los huesos fueron documentados como establece el protocolo de recepción de muestras del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid. A cada muestra se le asignó un código que fue apuntado en las hojas de registro para mantener un control seguro. Este código recoge la información como sigue:

Ejemplo: PH - 05B - 6 / 1. 2

Donde P indica que fue procesado en Parafina; H (Human) que es humano; 05 el mes de mayo; B el código del año, en este caso 2014; /1 el número de muestra; .2 el número de submuestra.

Finalizados los trabajos experimentales, los restos óseos no utilizados y aquellas fracciones de hueso sobrantes fueron depositados de nuevo en las respectivas colecciones de origen. Los cortes histológicos se guardarán custodiados en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, donde se realizaron los ensayos.

## **7.2. Metodología aplicada para el estudio histológico**

Aunque como comentan otros autores (De Boer y Maat, 2013), el hueso seco no tiene la calidad del hueso fresco, y por consiguiente no debe ser descalcificado y cortado con micrótopo. Estos procedimientos se pueden causar ciertos artefactos, como micro-fracturas, y diagnósticos falsos. La metodología utilizada habitualmente utiliza la inmersión en resinas de metilmetacrilato que conllevan un gasto económico alto y ocupan mucho tiempo. Además, este tipo de tratamientos limita en el número de cortes histológicos que se pueden llevar a cabo sobre una muestra. Por este motivo la metodología aplicada para los estudios realizados fue ampliamente discutida decidiéndose finalmente por un método más barato y rápido con el fin de obtener resultados más amplios sobre los objetivos a cumplir.

Se decidió tratar todas las muestras con inclusión de parafina después de su descalcificación para obtener un muestrario más amplio de cortes histológicos en el menor tiempo posible.

### **7.2.1. Preparación de las muestras para el corte**

Una vez seleccionada la muestra se procedió al corte de los huesos por medio de un minitaladro marca Dremel® y un disco de corte de 24 mm. El proceso de corte se realizó bajo medidas de seguridad y dentro de una campana de extracción de gases.

Los metacarpos y metatarsos se dividieron en segmentos de, aproximadamente, 1 centímetro cúbico. Las epífisis de todos los huesos fueron desechadas ya que la cortical de estas regiones es muy fina, quebradiza y contiene más cantidad de hueso esponjoso que dificulta el corte histológico. Las muestras de los huesos obtenidos fueron de nuevo seleccionadas según el estado macroscópico que presentaba cada uno de los segmentos, desechándose aquellos más afectados por el corte y otras características como patologías asociadas a la edad del individuo.

Para la realización de la experimentación se han utilizado un total de 99 submuestras de un total de 61 huesos disponibles. Además, hay que añadir en el cómputo total de unas 20 submuestras utilizadas como muestra control para cada uno de los ensayos.

Antes de comenzar con los diferentes ensayos objeto del estudio, hubo que realizar una fase previa de ensayo para determinar qué tipo de descalcificante utilizar, el más idóneo para que no se afectara la estructura de las muestras. Después de varios ensayos con diferentes muestras se decidió que el proceso no se veía afectado a una concentración del 75% del descalcificante DECALC Histolab® durante 5,5 horas (Figura 5).

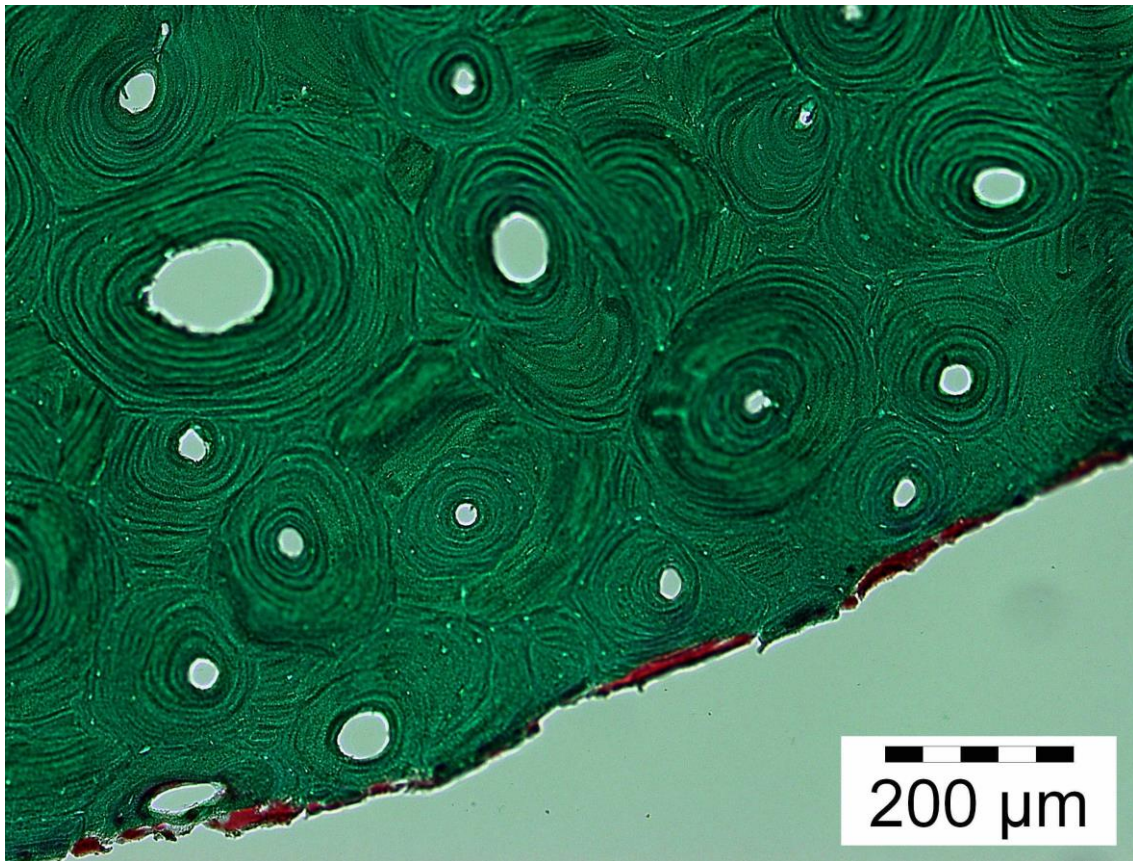


Figura 5. Ejemplo de corte histológico generado sobre una muestra control de uno de los ensayos.

Cuando las muestras terminaron la fase de inmersión en el medio con el que se experimenta fueron lavadas con agua destilada para eliminar cualquier rastro que quedase que pudiera afectar a la acción del descalcificante.

Una vez descalcificadas las muestras se depositaron en un casete e introducidas en el procesador tisular automático Shandon Citadel 2000® para su inclusión en parafina. Los tiempos empleados fueron:

1. Inclusión en etanol al 70 % durante 1 hora.
2. Inclusión en etanol al 80 % durante 1 hora.
3. Inclusión en etanol al 90 % durante 1 hora.
4. Inclusión en etanol absoluto durante 2 horas.
5. Inclusión en etanol absoluto durante 3 horas.
6. Inclusión en xilol durante 2,5 horas.
7. Inclusión en xilol durante 3,5 horas.
8. Inclusión en parafina durante 3,5 horas.

## 9. Inclusión en parafina durante 4,5 horas.

A la hora de colocar la muestra en el molde de parafina ésta debe de ser cuidadosamente depositada para orientar el corte de manera transversal en el micrótopo. Cuando la parafina ha solidificado correctamente continúa el proceso de corte con un micrótopo de la marca Leica® modelo RM2155. Todos los cortes tienen un grosor de 8 micras. Para el montaje se utilizaron portaobjetos de la marca Superfrost® Plus con tratamiento electrostático con cargas positivas.

### **7.2.2. Tinción de las muestras**

Antes de comenzar con la experimentación se experimentó con varios tipos de tinciones aplicadas a la coloración del hueso. Finalmente se decidió que todas las muestras serían teñidas mediante el protocolo de tinción tricrómica de Masson, adaptando los tiempos para muestras en hueso seco.

La tinción tricrómica de Masson utiliza tres tipos de colorantes, hematoxilina, fucsina y verde luz. Este tipo de tinción permite visualizar fibras de colágeno tipo I, el núcleo celular y el citoplasma. El fundamento principal de esta técnica recae en la capacidad del ácido fosfomolibdico en unirse a los grupos básicos de las fibras de tejido conectivo para permitir la unión del colorante básico (verde luz). Es decir, actúa de puente entre los grupos básicos del sustrato y los grupos básicos del colorante (Gartner y Hialt, 2009) permitiendo observar las fibras de colágeno de color verde.

El protocolo a seguir es el siguiente:

1. Desparafinado de las muestras.
  - a. Estufa a 60°C: 10-20 minutos.
  - b. Xilol: 10 minutos.
2. Hidratación:
  - a. Etanol absoluto: 5 minutos.
  - b. Etanol al 96%: 5 minutos.

- c. Etanol al 80%: 5 minutos.
  - d. Etanol al 70%: 5 minutos.
  - e. Agua destilada: 5 minutos.
3. Hematoxilina de Weigert: 5 minutos.
  4. Lavado con agua destilada: 10 min.
  5. Fucsina + Panceau BS: 5 minutos.
  6. Lavado con agua destilada: 2 minutos.
  7. Ácido fosfomolibdico I: 10 minutos.
  8. Ácido fosfomolibdico II: 10 minutos.
  9. Verde luz: 7 minutos.
  10. Lavado con agua destilada: 20 pases.
  11. Ácido acético al 1%: 4 minutos.
  12. Deshidratación:
    - a. Etanol al 70%: 2 minutos.
    - b. Etanol al 80%: 2 minutos.
    - c. Etanol al 96%: 2 minutos.
    - d. Etanol absoluto: 2 minutos.
  13. Xilol: 5 minutos.
  14. Montaje.

Para el montaje final el cubreobjetos se selló con el adhesivo Eukitt® al protaobjetos.

### **7.2.3. Análisis de las muestras**

Para el análisis histológico de las muestras se utilizó un microscopio óptico de la marca Olympus, modelo BX51 y el software informático CellD. Cada muestra fue fotografiada y almacenada con la siguiente nomenclatura, tal y como sigue el protocolo del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos para su correcta identificación:

Ejemplo: PH-03C-32.2 8MIC TCM P6 C1 X2 2

Donde PH-03C-32.2 es la submuestra 2 de la muestra 32, 8MIC es el tamaño de corte de la muestra (8 micrómetros), TCM indica la tinción realizada (Tricrómico de Masson), P6 indica el número de porta (6), C1 el número de corte del portaobjetos (primero), X2 indica el número de aumentos utilizado y 2 es el número de fotografía realizado para esa submuestra.

Para el análisis cualitativo se procedió al estudio de varias regiones estructurales del hueso susceptibles a la degradación. Estas regiones están presentes en los huesos compactos y son fácilmente observables al microscopio óptico (Figura 5).

Se analizó:

- El estado de conservación de la cortical del hueso y del límite óseo interno inmediato a la cavidad medular, para comprobar el efecto que tiene el medio sobre la superficie más expuesta.
- El estado de conservación de las osteonas y sus estructuras microscópicas observando la línea de cemento y los espacios intersticiales, el estado de los canalículos y lagunillas osteocíticas, las laminillas concéntricas y el canal de Havers.
- También se estudió la morfología y la reacción de la estructura de las fibras de colágeno dispuestas en las laminillas de las osteonas y en el hueso compacto frente a los diferentes medios.
- Por último, se observó el efecto de la tinción sobre la muestra como indicador del estado de conservación del hueso a partir de las regiones teñidas y de su intensidad (Figura 6).



Figura 6. Estructuras óseas observadas en los cortes histológicos (C → Cortical del Hueso; CV → Canal de Volkmann; EI → Espacio Intersticial; O → Osteona, área rodeada en azul; Línea azul → Lámina de cemento; Flechas blancas → Lagunillas Osteocíticas; Flechas amarillas → Laminillas).

Para la cuantificación de la superficie afectada de las muestras se realizó un análisis de las imágenes obtenidas con el programa Adobe Photoshop CS6®. Se seleccionaron tres imágenes al azar de cada submuestra utilizada en los ensayos. En cada imagen se delimitó un área de 53463 píxeles igual para todas las fotografías, también escogida al azar. De manera manual se marcaron los lugares donde los huesos mostraban efectos de degradación debidos a los medios en los que fueron expuestos.

Esta metodología permitió cuantificar el porcentaje de degradación de cada una de las muestras en aquellas donde fue posible realizar las mediciones por su estado de conservación (Figura 7).

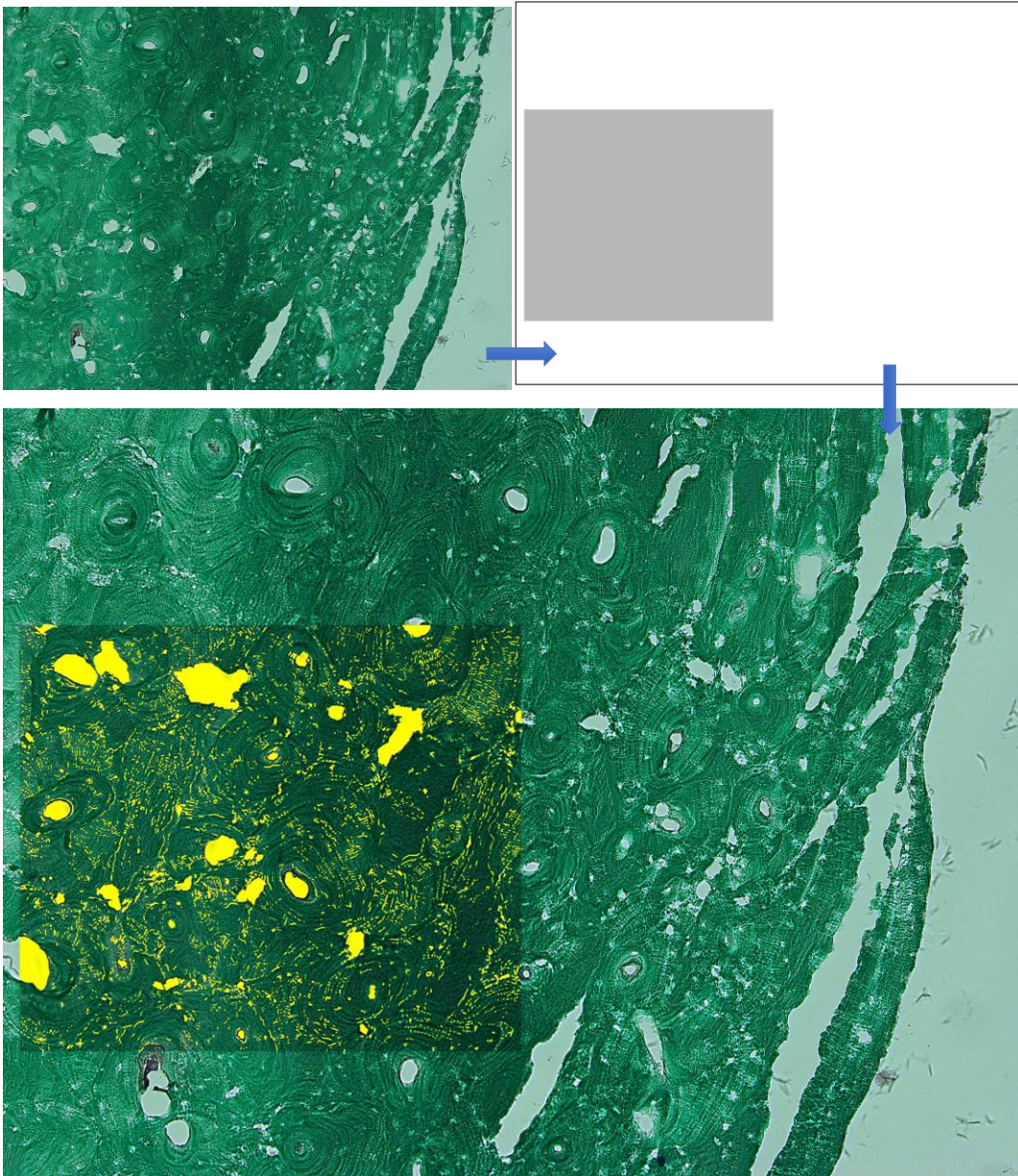


Figura 7. Secuencia del proceso de cuantificación del porcentaje del área degradada sobre un corte histológico.

Una vez obtenidos los datos cuantitativos de las imágenes se procedió a un análisis estadístico a partir de un análisis de varianza de un factor para comprobar influencia significativa que tiene la exposición de los huesos a los diferentes medios planteados (De La Horra, 2003). Para ello se utilizó el paquete estadístico incluido en el programa Microsoft Excel®.

#### **7.2.4. Experimentación realizada**

A continuación, se describen los materiales y los métodos empleados para cada ensayo.

Para el diseño de los experimentos se discutió a qué ambientes se deberían exponer las muestras de hueso seleccionadas. Se tomó la decisión que sería conveniente experimentar con medios ácidos y alcalinos, así como con otros elementos de fácil acceso con el fin de comprobar el efecto sobre el tejido óseo. Para ello se desarrollaron los siguientes ensayos:

- Ensayo preliminar en un medio tampón acético-acetato a pH 5.5 durante 4,5 horas.
- Ensayo en un medio ácido tampón acético-acetato a pH 3.8 y 5.5
- Ensayo en un medio de hidróxido de sodio (NaOH) 12,5M durante varias horas.
- Ensayo en un medio de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1M durante varios días.
- Ensayo en un medio de hidróxido de sodio (NaOH) durante 24 horas a diferente molaridad.
- Ensayo en un medio de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 28 días.
- Ensayo en un medio de hipoclorito de sodio (NaClO) durante varios días.
- Ensayo en un medio de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 26 días.

En todos los ensayos se estableció una muestra control que se procesó junto con el resto de las submuestras.

#### **Ensayo preliminar en un medio ácido (tampón acético-acetato) a pH 5.5 durante 4,5 horas**

Para comprobar el efecto que puede tener la exposición de unos restos óseos en un medio con pH ácido se sumergió una muestra de hueso en un buffer de ácido acético y acetato de sodio con pH 5.5. Se eligió este pH por ser algo inferior a la

media de los suelos más ácidos de la Península Ibérica (Guerra Delgado *et al.*, 1968).

Un buffer o tampón químico es una disolución de un ácido y una base cuya concentración de protones apenas varía al añadir ácidos o bases fuertes (Morcillo, 1989). Se decidió este tipo de tampón por su capacidad reguladora y por la accesibilidad a los materiales. Además, es un medio utilizado comúnmente como “agente de limpieza” para eliminar el carbonato exógeno del hueso cuando se realizan análisis químicos para el estudio dietético y de datación del carbono 14.

Para ello se disolvió 160 ml de acetato de sodio 0,1M de la marca Sigma<sup>®</sup> en 32 ml de acético glacial 0,1M de la marca Panreac<sup>®</sup>. Para obtener el pH exacto deseado se desplazó la ecuación añadiendo hidróxido de sodio. El pH fue controlado con un pH-metro de la Crison GLP21<sup>®</sup> y tiras indicadoras de pH de la marca Labbox<sup>®</sup>.

Se seleccionaron al azar una muestra de origen arqueológico y otra de origen contemporáneo, cada una de ellas fueron divididas en cuatro submuestras para experimentar con cada una en medios ácidos y básicos controlados.

En un inicio, para planteamiento del ensayo se valoró la inclusión de las muestras durante unas 4,5 horas. Cada 30 minutos las muestras fueron analizadas bajo lupa binocular anotando los cambios macroscópicos que se pudieran ocasionar. A partir del minuto 150 se observó que las muestras comenzaban a tener una consistencia blanda sin cambios macroscópicos evidentes, y se decidió extraer una submuestra de cada muestra para su procesamiento y corte histológico. La extracción de las submuestras se realizó a los 150, 210, 270 minutos y por último a las 10,5 horas.

Se tomó la decisión de dejar las últimas muestras durante más tiempo debido a que no se observaron cambios macroscópicos bajo la lupa binocular más allá de la consistencia blanda de las mismas.

A la hora de procesar y cortar las muestras solamente fue posible obtener cortes histológicos de tres submuestras. El resto fueron altamente degradadas durante el proceso de descalcificación para su preparación para los cortes histológicos.

### **Ensayo en un medio ácido (tampón acético-acetato) a pH 3.8 y 5.5**

Ante los resultados obtenidos en el ensayo preliminar con una solución reguladora acético acetato con pH 5.5, se decidió llevar a cabo la realización de un nuevo ensayo que recogiera cómo afecta un medio ácido a una muestra de hueso a diferente pH. Posteriormente los resultados obtenidos se compararán con los de las muestras expuestas a pH alcalinos para comprobar la reacción del hueso seco en los diferentes medios.

Para ello se disolvieron 160 ml de acetato de sodio 0,1M de la marca Sigma<sup>®</sup> en 32 ml de acético glacial 0,1M de la marca Panreac<sup>®</sup> para obtener el pH 5.5 y, 21,8 ml de acetato de sodio 0,1M en 178,2 ml de acético glacial 0,1M para obtener el pH 3.8, ambos en volúmenes de 200ml. Para obtener el pH exacto deseado se desplazó la ecuación añadiendo hidróxido de sodio. Los pH fueron controlados con un pH-metro de la CRISON GLP21<sup>®</sup> y tiras indicadoras de pH de la marca Labbox<sup>®</sup>.

Se seleccionaron al azar varias submuestras de origen contemporáneo. En esta ocasión las submuestras fueron escogidas de diferentes huesos para comprobar que el efecto producido del medio ácido sobre el hueso es parecido.

Para el ensayo a pH 3.8 se utilizaron 6 submuestras más una como control. Para el ensayo a pH 5.5 se utilizaron 8 submuestras más una como control.

Se valoró el efecto observado sobre el hueso en el anterior ensayo y se decidió que los tiempos debían ser diferentes para un pH 3.8 que para un pH 5.5. Por ello las muestras a pH 3.8 se expusieron durante 1, 6 y 8 horas. Las muestras a pH 5.5 se expusieron durante 8, 24, 32, 48 y 56 horas.

Cada 30 minutos las muestras a pH 3.8 se analizaron bajo lupa binocular anotando los cambios macroscópicos que se pudieran ocasionar.

En ambos ensayos fue posible obtener cortes histológicos de todas las submuestras.

### **Ensayo en un medio de hidróxido de sodio (NaOH) 12,5M durante varias horas**

Una vez analizada la reacción del hueso seco en un medio ácido se decidió continuar la investigación para comprobar el efecto que tiene un medio alcalino. Para ello se diseñaron varios ensayos en un medio de hidróxido de sodio (NaOH) teniendo en cuenta la concentración molar. Se decidió este medio ya que el hidróxido de sodio es un producto de fácil acceso y común en muchos hogares.

Este primer ensayo en un medio alcalino se realizó con dos muestras de huesos seco, una de origen contemporáneo y la otra de origen arqueológico, cada una fue dividida en cuatro submuestras.

Para ello se sumergieron en un medio alcalino consistente en una disolución de hidróxido de sodio 12,5M de la marca Riedel-de Haën<sup>®</sup> en volúmenes de 50 ml y con un pH entorno a 13. El ensayo se produjo durante 1, 2, 3 y 4 horas para cada una de las dos muestras. Una vez pasado el tiempo las muestras fueron descalcificadas y procesadas para su análisis histológico.

### **Ensayo en un medio de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1M durante varios días.**

A la vista de los resultados obtenidos en el ensayo en un medio de hidróxido de sodio 12,5M, se decidió incidir en el efecto que produce este medio alcalino sobre una muestra de hueso contemporánea, pero con una concentración molar menor. Para ello preparó una disolución 0,1M disolviendo 0,4 g de hidróxido de sodio de la marca Riedel-de Haën<sup>®</sup> en volúmenes de 100 ml.

Para la realización de este ensayo se utilizaron 8 submuestras de hueso contemporáneo la cual se sumergió durante 5, 7, 11 y 13 días. Pasado este tiempo las muestras fueron procesada según los protocolos antes descritos.

### **Ensayo en un medio de hidróxido de sodio (NaOH) durante 24 horas a diferente molaridad**

Ante los resultados obtenidos de los ensayos anteriores, tanto en un medio ácido como en un medio alcalino se diseñó una serie de experimentos que recogieran otras medidas de concentración de hidróxido sódico, como por ejemplo 0'1M, 0'05M y 1M. En este caso se ha considerado tratar el medio respecto a su concentración molar ya que el rango de variación del pH de las disoluciones es altamente alcalino, entorno a 12-13.

Para la realización del ensayo en medio alcalino a diferente molaridad se diluyó hidróxido de sodio de la marca Riedel-de Haën<sup>®</sup> en tres disoluciones: para obtener una molaridad de 0,05 se necesitaron 0,2 gramos; para una molaridad de 0,1 se necesitaron 0,4 gramos; y para una molaridad de 1 se requirieron 4 gramos, todos ellos en volúmenes de 100 ml.

Se decidió que las submuestras utilizadas para cada uno de los medios pertenecieran al mismo individuo. Para ello se seleccionaron al azar unas muestras de hueso contemporáneo y dos de origen arqueológico divididas en 4 submuestras. Todas las muestras estuvieron expuestas al medio alcalino durante 24 horas. Pasado este tiempo las muestras fueron procesadas según los protocolos antes descritos.

### **Ensayo en un medio de hipoclorito de sodio (NaClO) durante 28 días**

El hipoclorito de sodio (NaClO), comúnmente llamado lejía, es un desinfectante muy habitual en los hogares debido a su precio económico. Es utilizado en los laboratorios como blanqueante por su capacidad destructiva de los colorantes. También tiene grandes aplicaciones en la industria química, agroalimentaria, etc.

Se decidió realizar una experimentación preliminar ya que su uso para blanquear y desinfectar los huesos es una práctica habitual que realizan numerosos estudiantes de medicina y Antropología Física para su material de estudio. También se valoró la ausencia de bibliografía para un tratamiento tan habitual sobre las muestras de hueso.

Para la realización de la experimentación con NaClO primero se realizó un ensayo preliminar con una muestra ósea contemporánea y otra arqueológica durante 28 días. De cada una de ellas se utilizaron dos submuestras del mismo hueso. Para ello se introdujo cada submuestra en un volumen de 50 ml de lejía comercial de la marca Aliada<sup>®</sup>. Pasado este tiempo las muestras fueron procesada según los protocolos antes descritos.

### **Ensayo en un medio de hipoclorito de sodio (NaClO) durante varios días**

Debido a los resultados obtenidos en la experimentación preliminar se procedió a realizar un segundo ensayo con las mismas características, pero en diferentes tiempos de exposición para comprobar los efectos de la lejía sobre el tejido óseo, concretamente se dejaron durante 2, 3, 4, 9 y 11 días.

Solo se utilizaron muestras de diferentes huesos contemporáneos ya que en el experimento anterior solo sobrevivieron las muestras de origen arqueológico a la exposición durante 28 días. En total se utilizaron 8 submuestras de diferentes muestras de hueso. Pasado este tiempo las muestras fueron procesada según los protocolos antes descritos.

### **Ensayo en un medio de peróxido de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, agua oxigenada) durante 26 días**

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es otro elemento comúnmente utilizado en la industria química y farmacéutica por su propiedades blanqueantes y corrosivas. Es

un potente oxidante, aunque habitual en los hogares en bajas concentraciones, es utilizado como antiséptico general.

En odontología su uso es común como blanqueante a unas concentraciones determinadas (Soares, 2008; Tanizawa, 2005). En los departamentos de Antropología de muchas universidades es habitual el uso del peróxido de hidrógeno para blanquear los huesos de las colecciones para su uso docente (Alemán y Botella, 2013; Rodríguez y Ramírez, 2009).

Para la realización del experimento con peróxido de hidrógeno de la marca Panreac<sup>®</sup> se sumergieron cuatro submuestras de diferentes huesos, dos contemporáneas y dos arqueológica, durante 26 días.

## **8. RESULTADOS**



## 8.1. Muestras control

A continuación, se describen los resultados obtenidos de las muestras control que se llevaron a cabo en cada uno de los ensayos. El procesamiento de las muestras control para cada una de los ensayos no mostró ningún cambio estructural óseo destacable (Figuras 8 y 9).

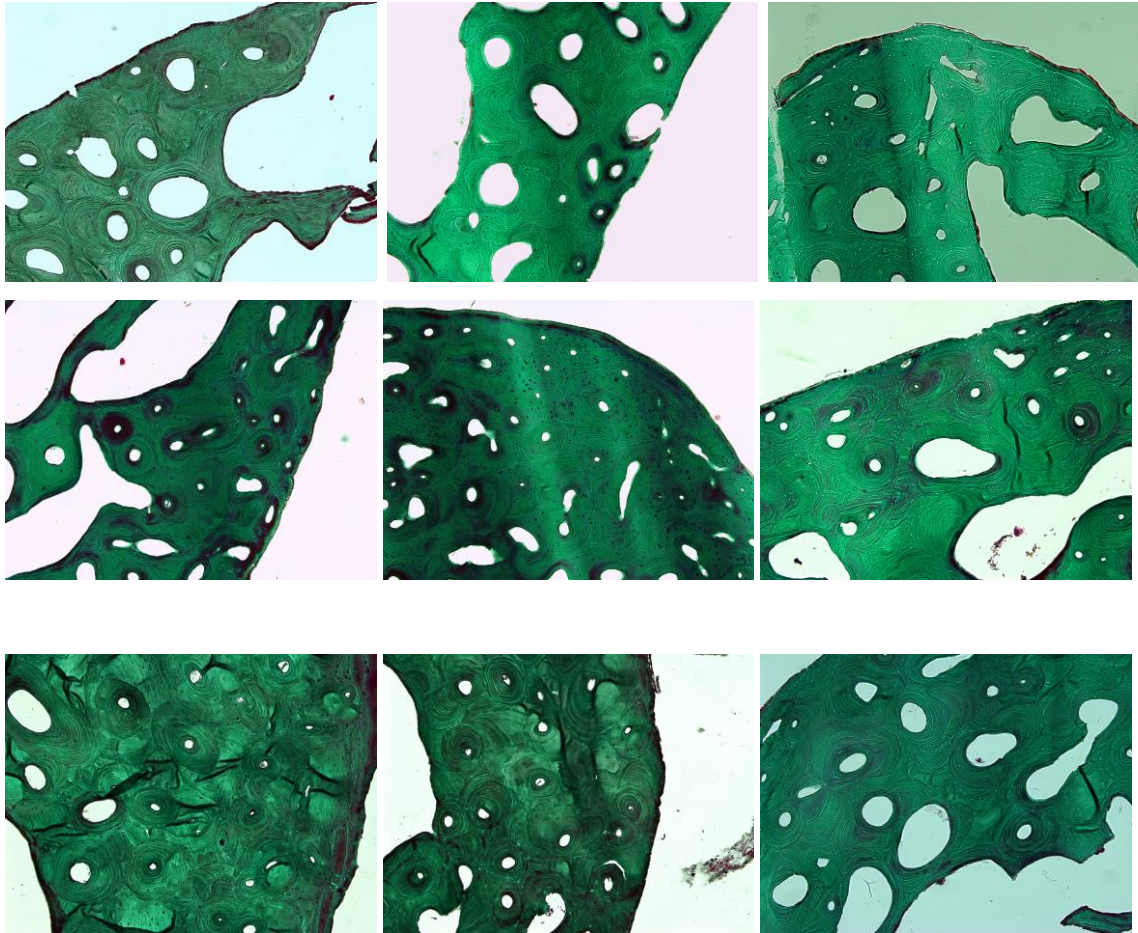


Figura 8. Imágenes de los cortes histológicos de las muestras control de hueso contemporáneo, a 10 aumentos, obtenidas de cada uno de los ensayos en el orden de presentación de esta tesis.

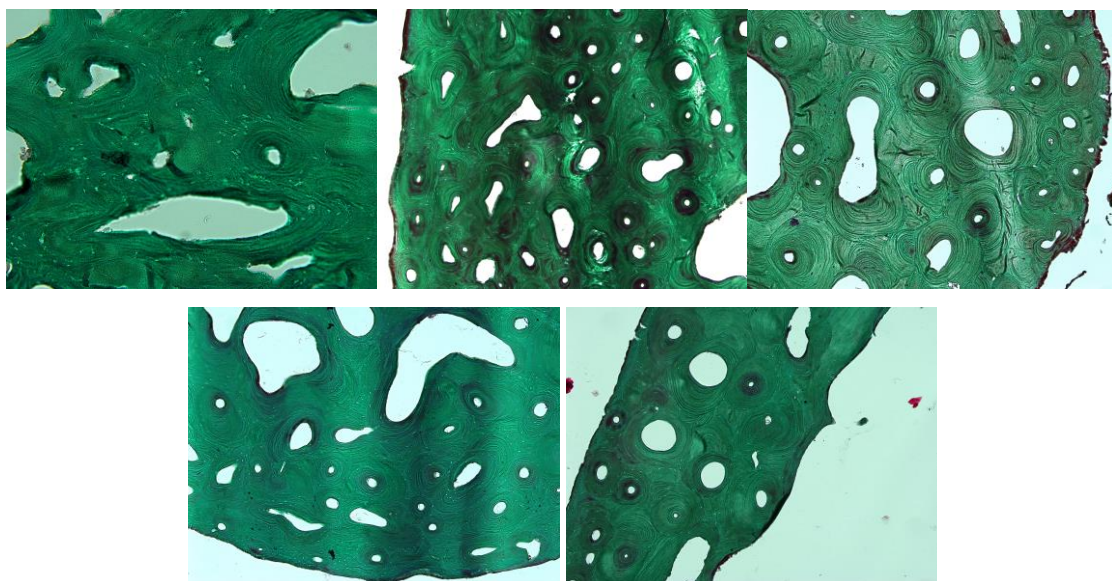


Figura 9. Imágenes de los cortes histológicos de las muestras control de hueso arqueológico, a 10 aumentos, obtenidas de cada uno de los ensayos en el orden de presentación de esta tesis.

## **8.2. Ensayo preliminar en un medio de acético-acetato a pH 5.5 durante 4,5 horas**

En este apartado se expondrán los resultados obtenidos en la experimentación con hueso seco en un medio ácido (tampón acético-acetato) de las tres submuestras de origen arqueológico y contemporáneo que completaron el proceso de descalcificación. Solamente se pudo analizar las muestras que estuvieron sumergidas durante 150 y 270 minutos.

En la muestra contemporánea sumergida durante 150 minutos se observa degradación generalizada en toda la muestra. Comenzando con la destrucción de la cortical de la muestra, donde en algunas regiones está ausente completamente y en otras está rota en fragmentos. La muestra presenta una degradación general desde el exterior hacia el interior. Aproximadamente hacia la mitad de la muestra se puede observar la separación de las osteonas (Figura 10).

Alrededor de las osteonas, en la línea de cemento y en el espacio intersticial entre los complejos osteonales, se pueden observar oquedades de diferentes tamaños. El

límite de estos huecos presenta una morfología discontinua y sinuosa como consecuencia de la degradación química. En algunas osteonas se puede observar los canalículos que comunican las lagunillas que albergan a los osteocitos como consecuencia del comienzo de degradación de los mismos. A mayor aumento se puede comprobar que, en aquellos lugares donde la alteración es mayor, la porosidad ha aumentado. Los canales de Havers no presentan alteraciones en el interior.

La tinción de todo el corte se presenta homogénea.

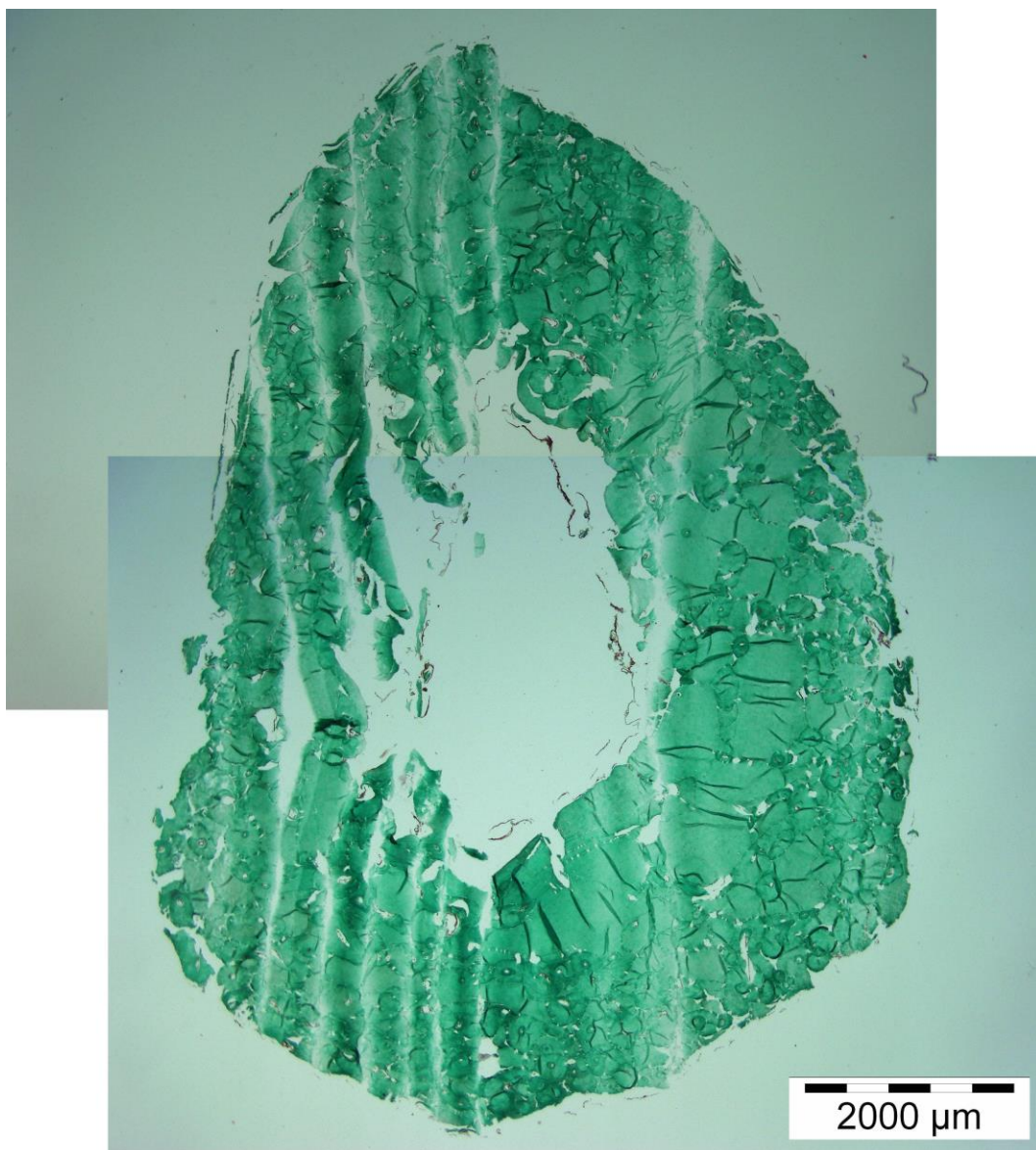


Figura 10. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 150 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.

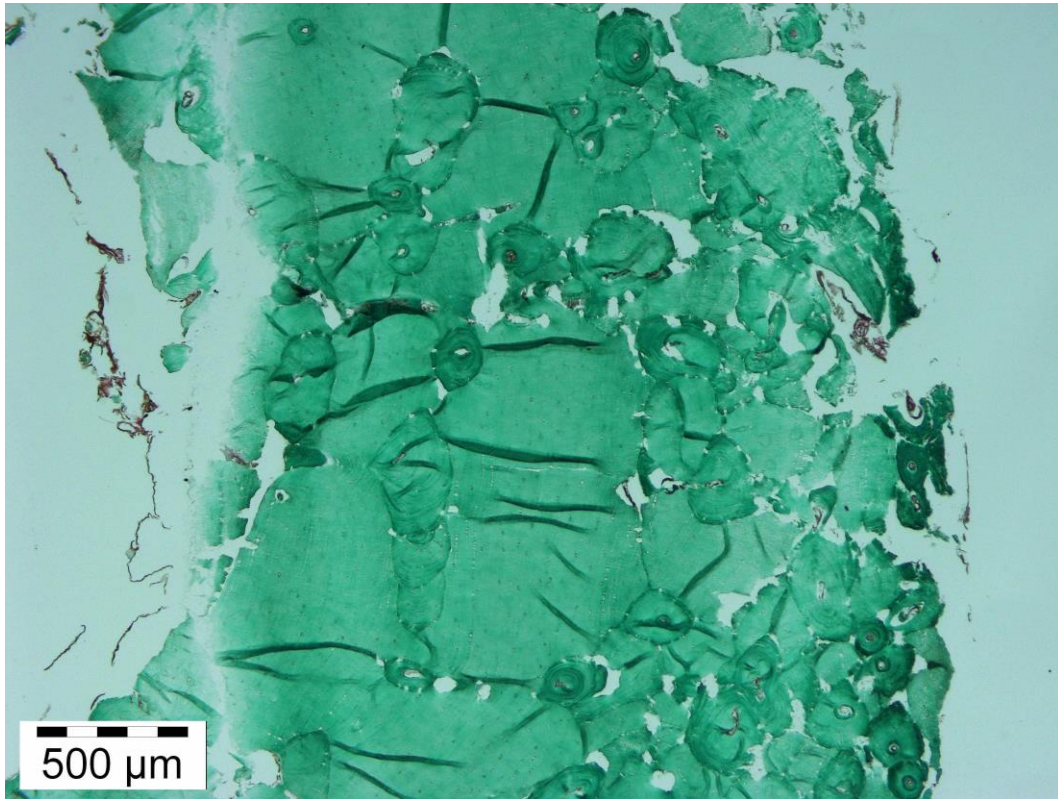


Figura 11. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 150 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 5 aumentos.

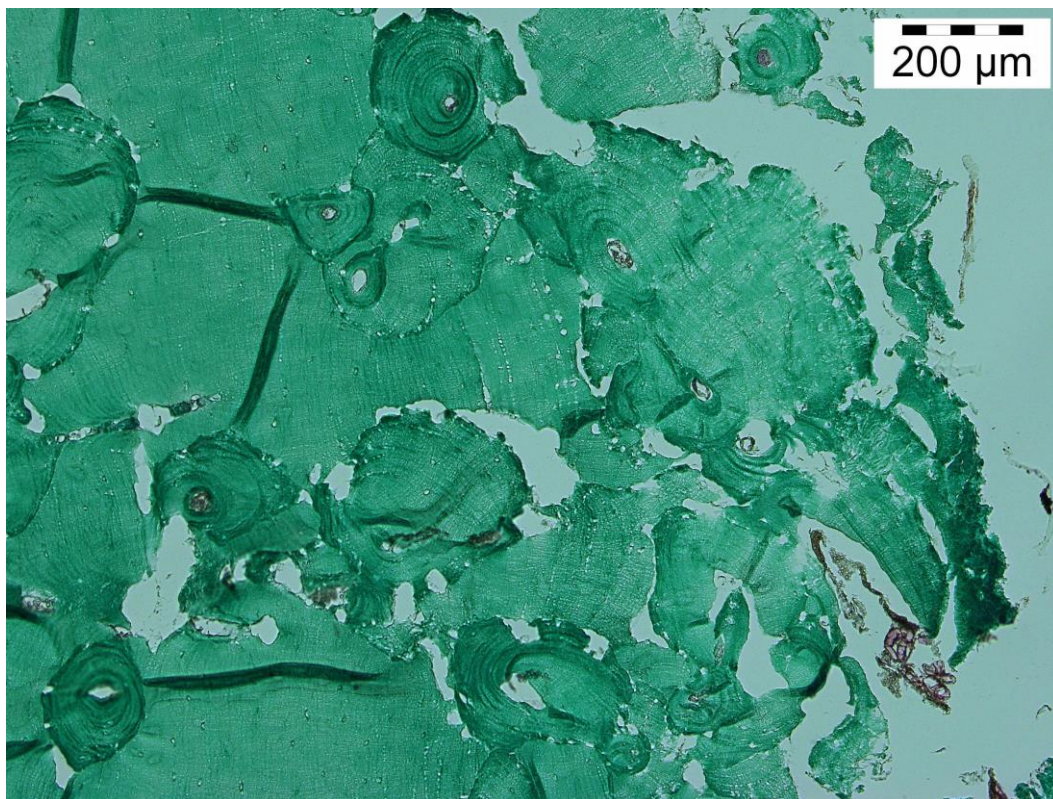


Figura 12. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 150 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

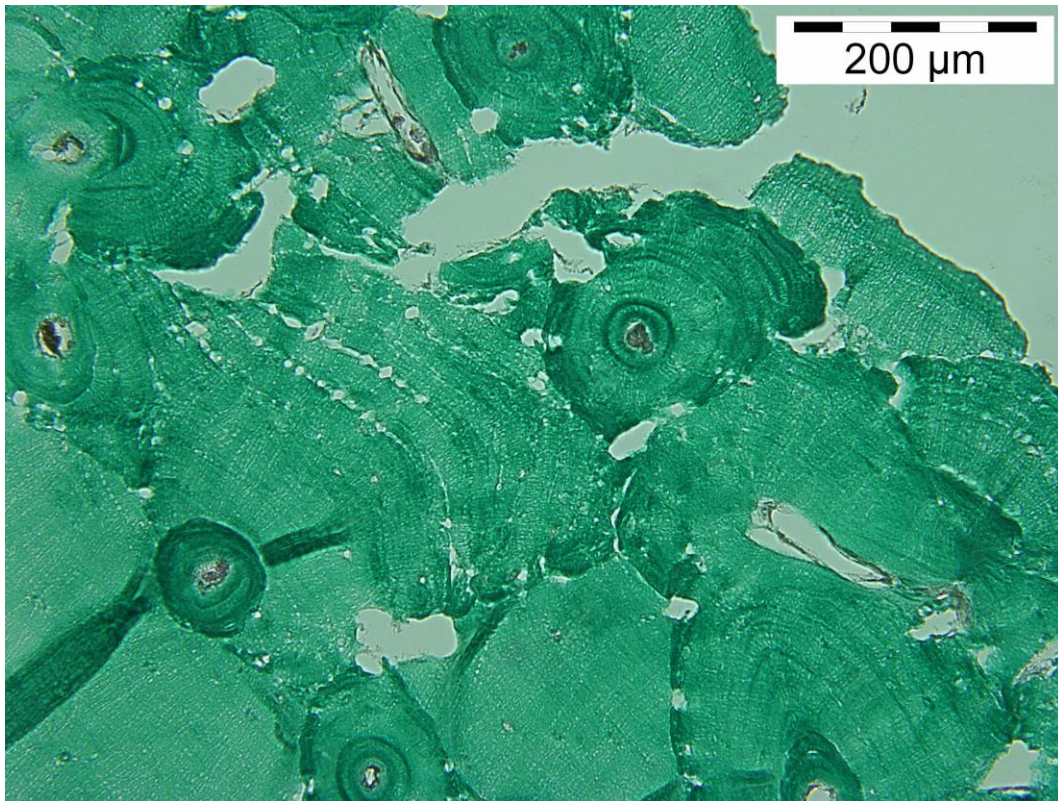


Figura 13. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 150 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.

Los efectos encontrados en la muestra arqueológica sumergida durante 270 minutos son semejantes a los ocurridos en la muestra contemporánea anterior. Por la naturaleza de la muestra se observa que el hueso cortical ha sufrido menor destrucción que su muestra contemporánea. También se observan alteraciones que alteran la capa interna de la muestra.

En el resto de la muestra la degradación ocurre principalmente en la línea cementicial de las osteonas y los espacios intersticiales, lugar por donde puede penetrar mejor el medio. Sin embargo, la porosidad generada por el medio se distribuye uniforme por todo el corte histológico, sin diferenciarse dos regiones. Se observa al microscopio óptico los canalículos que comienzan a alterarse. No se ha observado que el medio influya en el interior de los canales de Havers.

La coloración homogénea de la muestra nos indica que la consistencia del colágeno es firme no apreciándose alteraciones.

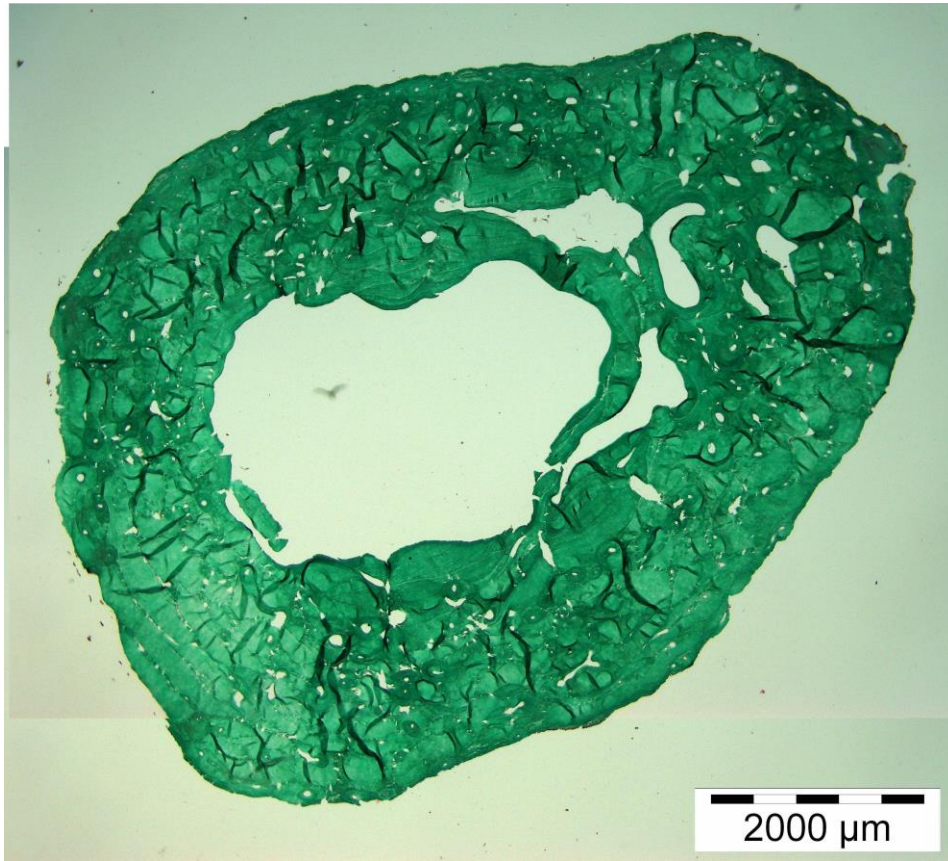


Figura 14. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.

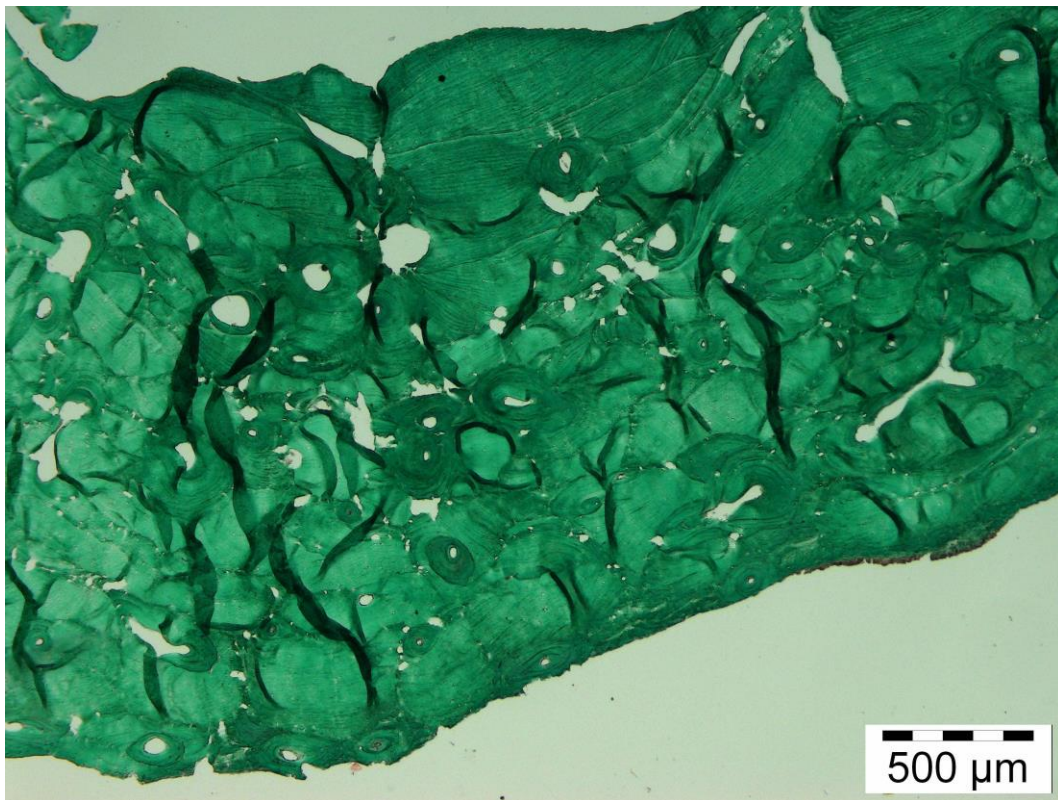


Figura 15. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 5 aumentos.



Figura 16. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

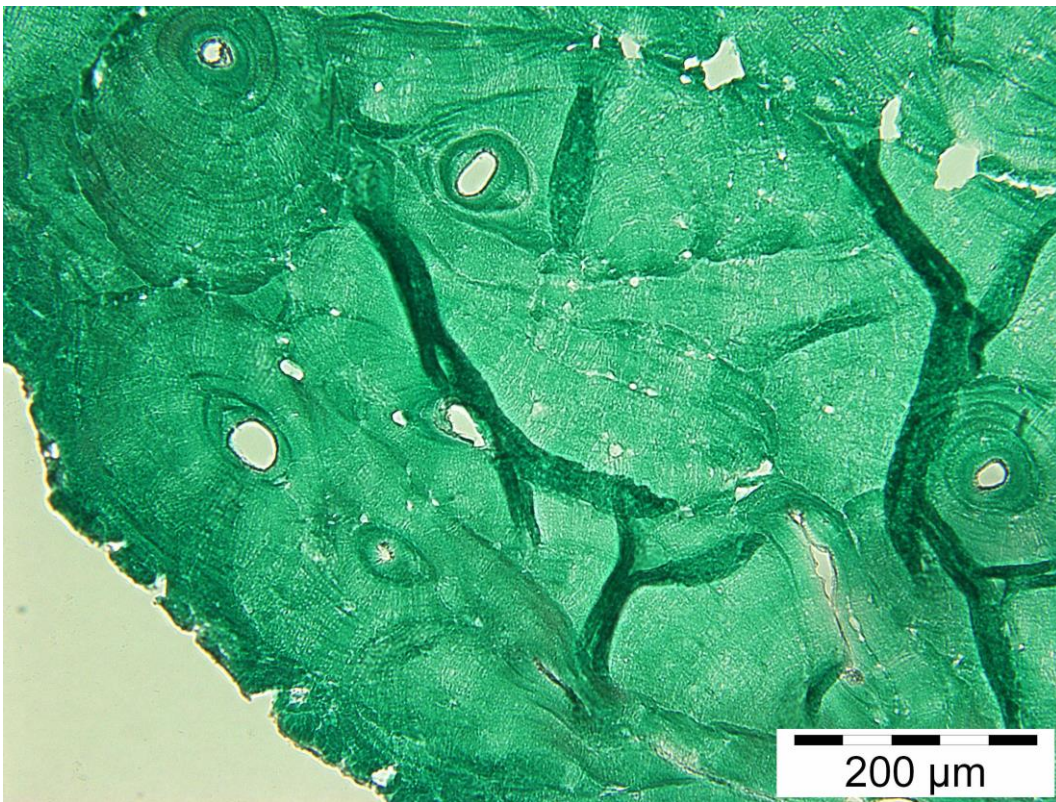


Figura 17. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.

Igual que la muestra anterior, la muestra contemporánea expuesta durante 270 minutos, presenta una degradación general desde el exterior hacia el interior de la muestra. En algunas regiones de la muestra el hueso cortical ha desaparecido o se encuentra en los primeros estados de su alteración. Aparecen nuevamente los huecos en la línea cementicial de las osteonas de diferentes tamaños. En algunas regiones donde el hueso compacto es más evidente se observa que las lagunillas osteocíticas están siendo alteradas químicamente. Se observa los canalículos que comunican con las lagunillas con mayor grosor. Algunos de los canales de Havers han aumentado en tamaño.

La tinción aplicada a la muestra se presenta homogénea en todo el hueso.

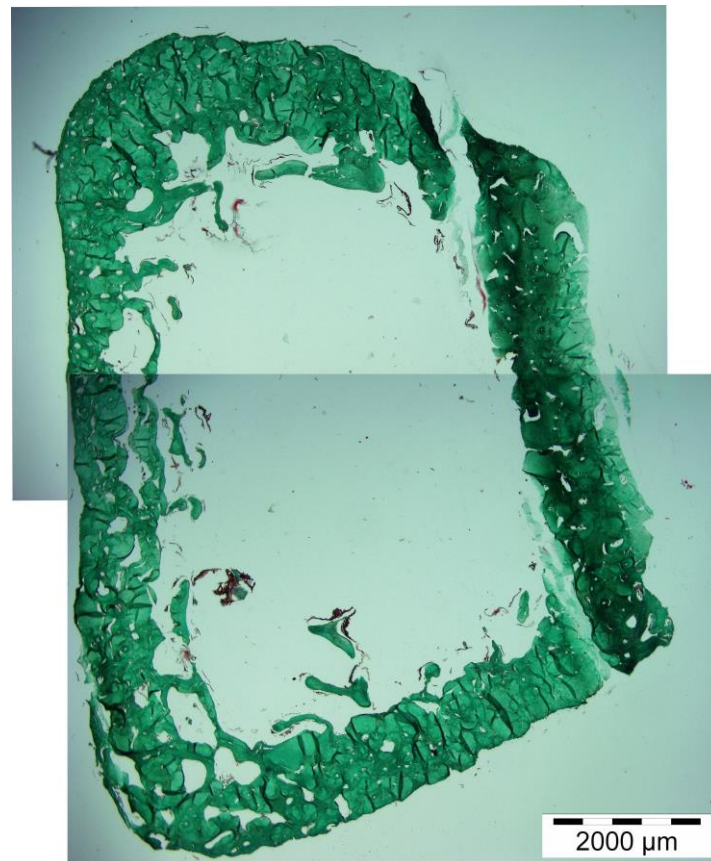


Figura 18. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.

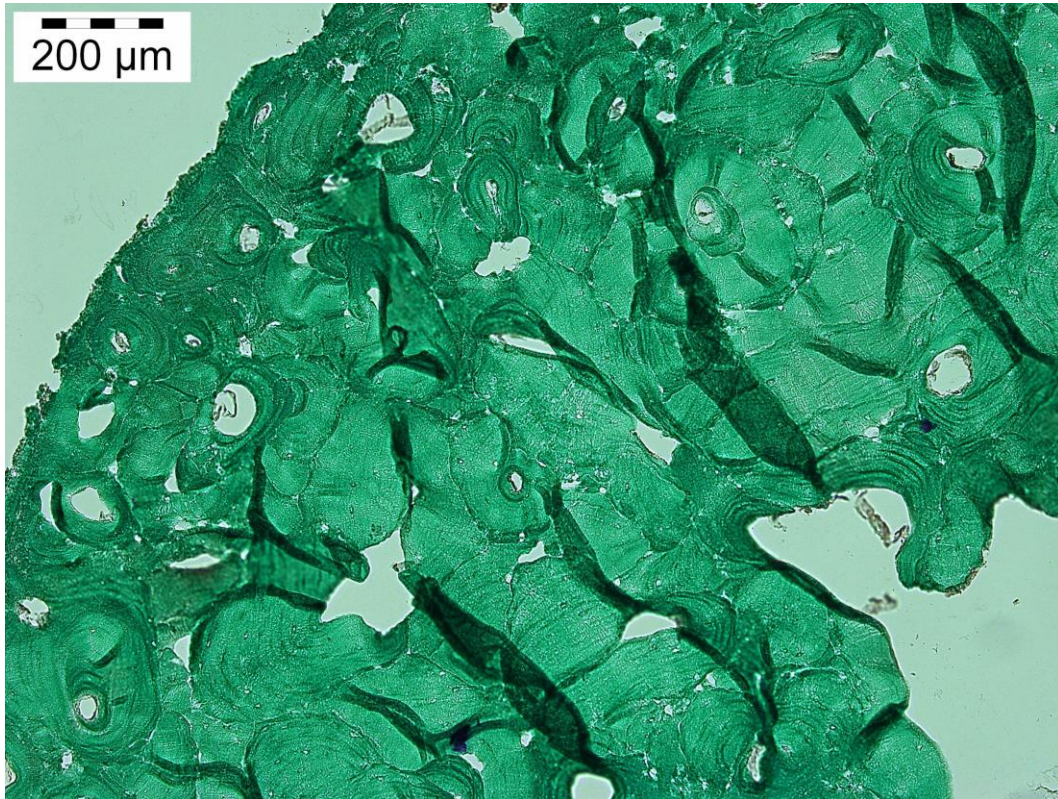


Figura 19. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

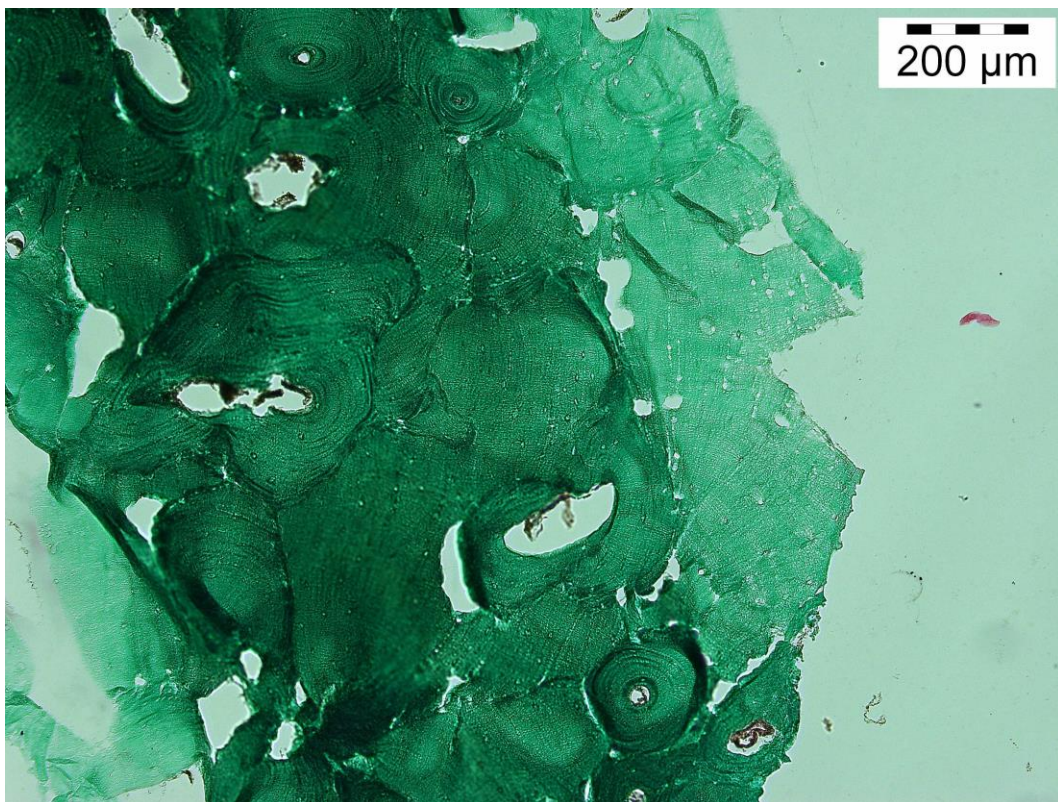


Figura 20. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

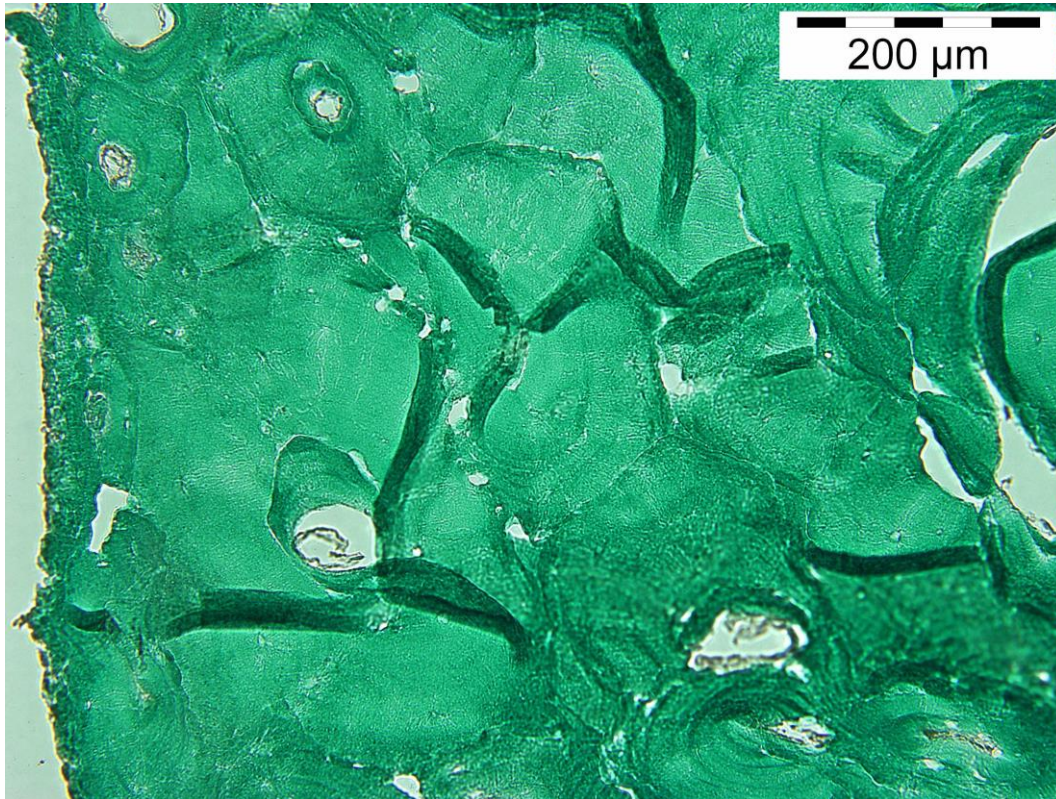


Figura 21. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.

### **Análisis de imagen:**

El análisis de las imágenes para cuantificar el porcentaje de hueso degradado da como resultado que la muestra que estuvo 150 minutos en el buffer tuvo una pérdida de un 10,23% de la muestra. La muestra arqueológica a 270 minutos un 8,83% y la muestra contemporánea a 270 minutos un 19,68%.

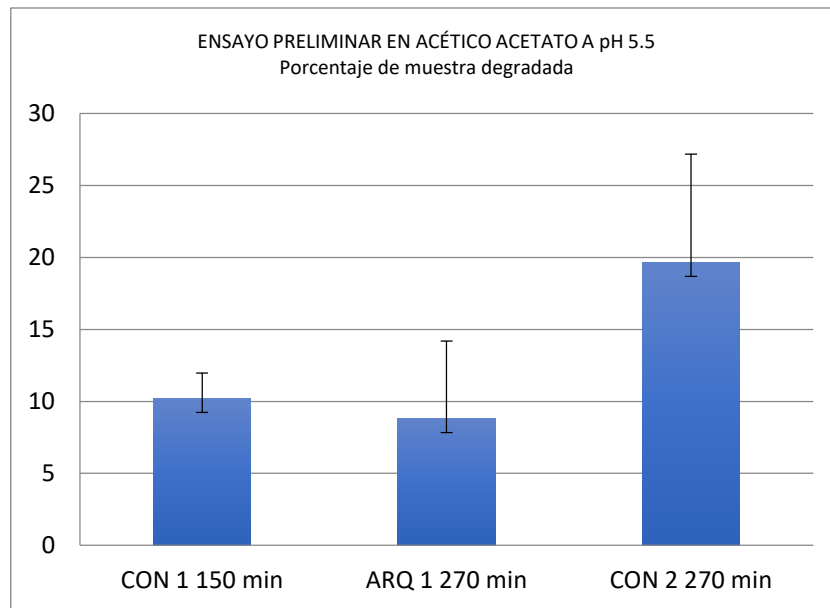


Figura 22. Gráfico del porcentaje de degradación analizado en las muestras del ensayo preliminar en un medio de acético acetato a pH 5.5.

El análisis estadístico mediante el análisis de la varianza muestra que no existen diferencias significativas entre la degradación de las tres muestras (ver Anexo, Tabla 1).

El análisis de varianza entre la muestra arqueológica y la contemporánea a 270 minutos para comprobar si el origen de las muestras afecta a la degradación nos muestra que tampoco existen diferencias significativas entre ellas (ver Anexo, Tabla 2).

### 8.3 Ensayo en un medio de acético-acetato a pH 3.8

En este apartado se expondrán los resultados obtenidos en la experimentación con hueso seco contemporáneo en medio ácido (tampón acético-acetato) de las submuestras sumergidas a diferentes tiempos a pH 3.8

La muestra sumergida durante 1 hora mantiene su estructura original, aunque la degradación es generalizada en todo el corte histológico. Sin embargo, la cortical del hueso se conserva casi completo observándose algo alterado de manera

intermitente alrededor del hueso. Las osteonas comienzan a degradarse en su línea cementicial creándose una porosidad de diferente tamaño como se observa en la figura 24. Los canales de Havers no han sufrido apenas alteraciones en su interior. La estructura de las osteonas, en concreto las laminillas de las osteonas se encuentran alteradas comenzando su separación en las uniones más lábiles dando un aspecto de bandeado (Figuras 25 y 26). Los canalículos que comunican los espacios osteoclasticos se muestran degradados.

La tinción es homogénea en casi toda la muestra, aunque algo más marcada en el límite externo de la cortical y en los límites de los complejos osteonales.

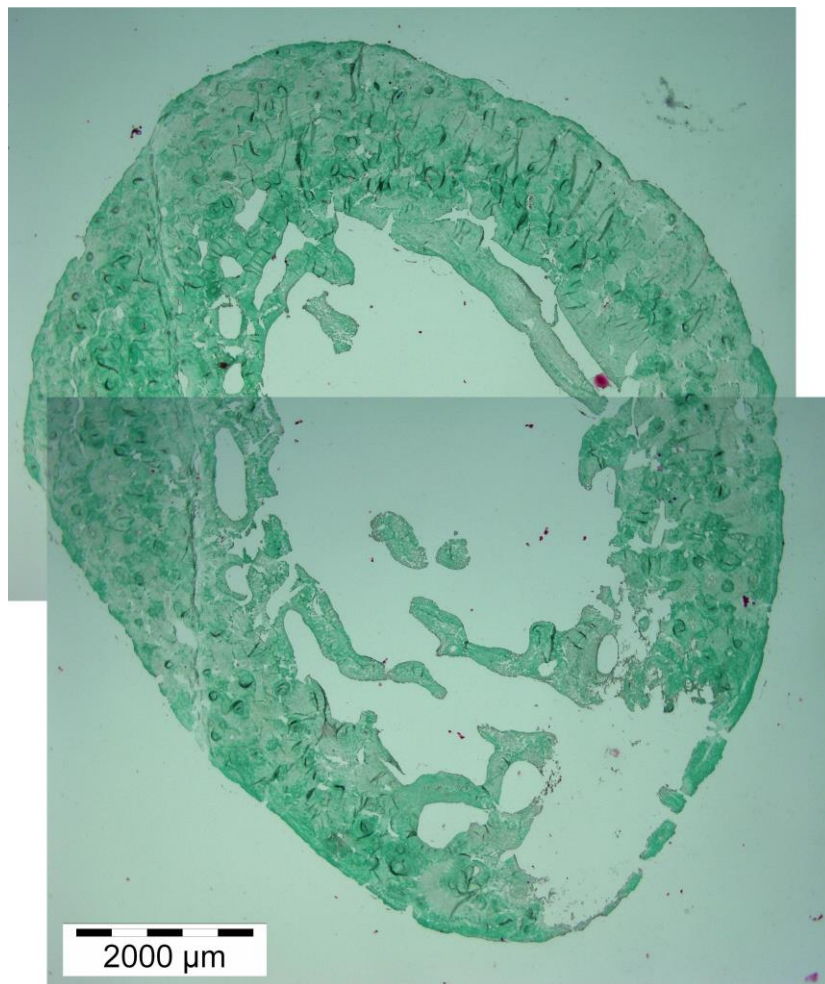


Figura 23. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 2 aumentos.

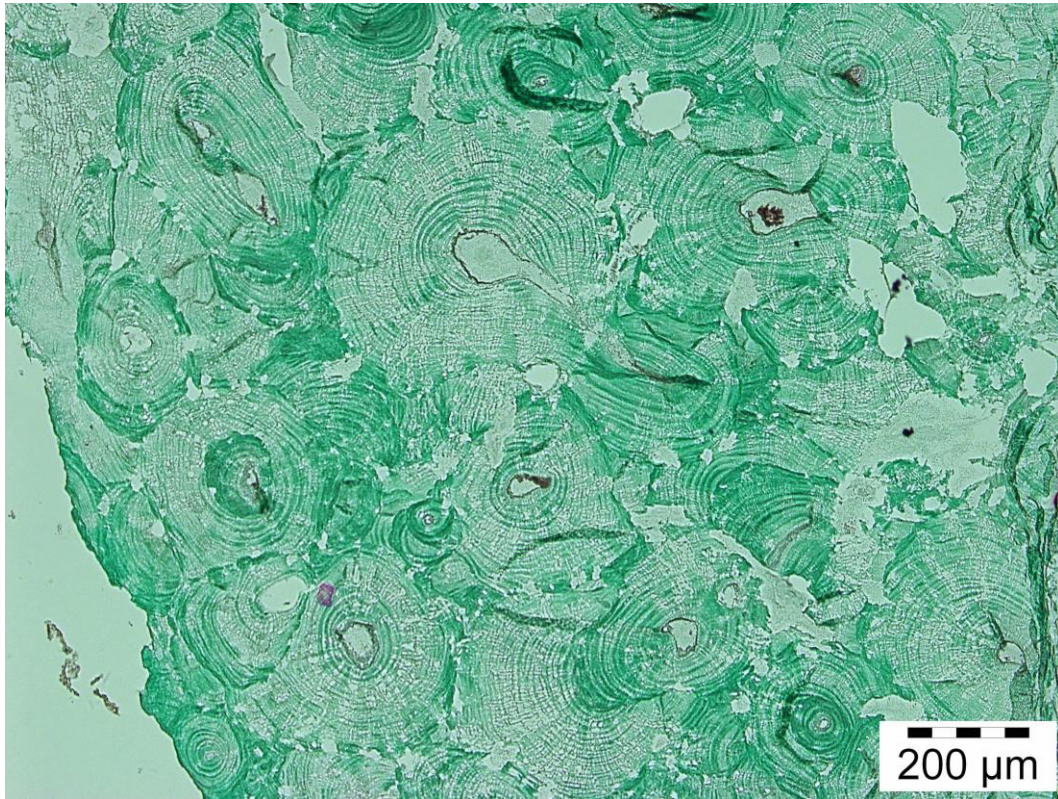


Figura 24. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.

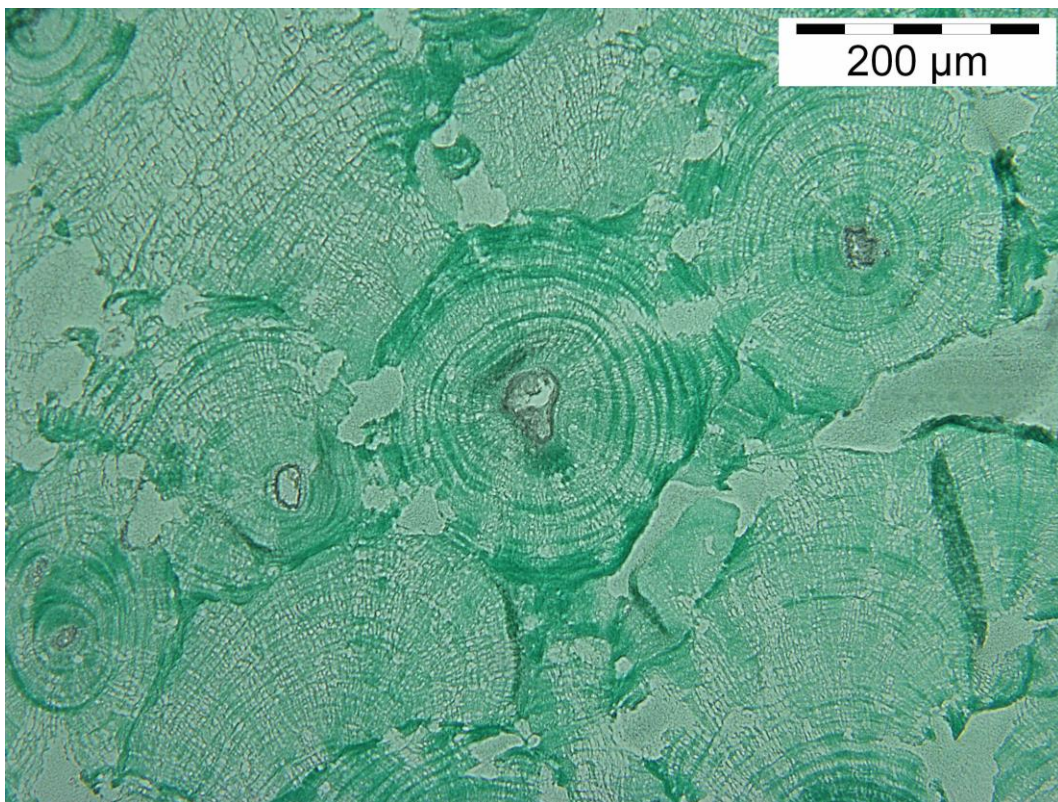


Figura 25. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 20 aumentos.

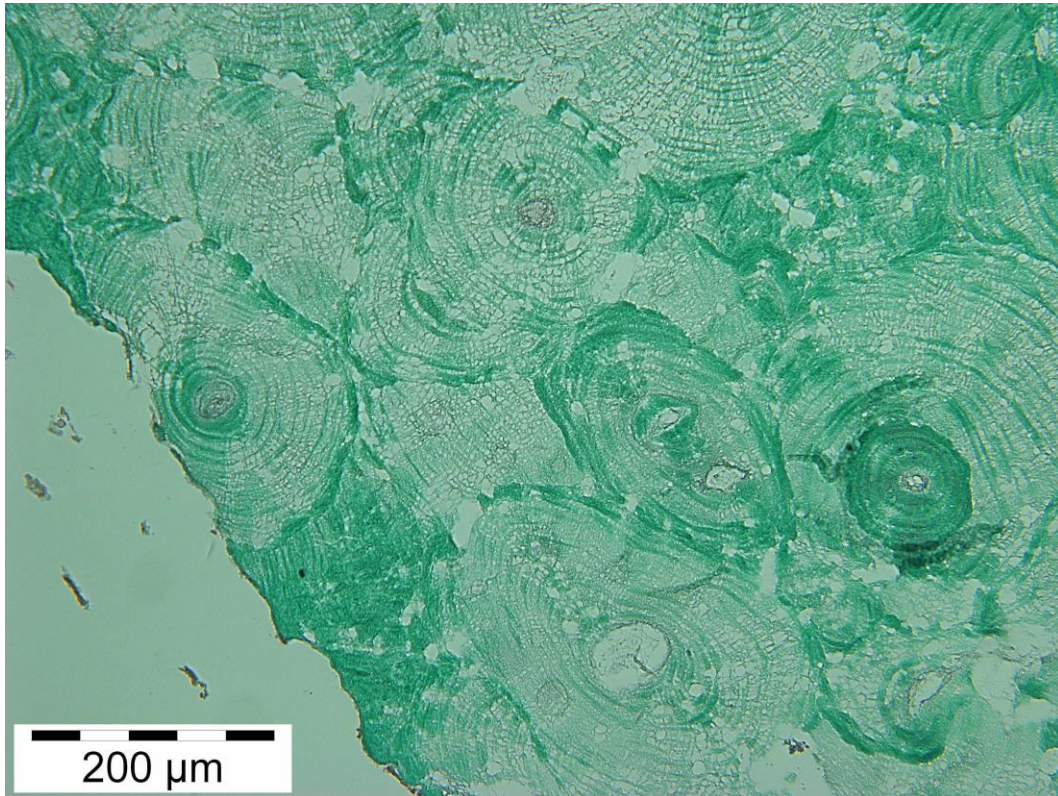


Figura 26. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 20 aumentos.

La muestra sumergida durante 6 horas mantiene la estructura completa del hueso. La cortical del hueso está alterada separándose del interior del hueso en capas en algunas zonas del corte histológico (Figura 27). Aumenta porosidad producida por el medio alrededor de las osteonas. En algunas regiones la degradación es mayor afectando a dos o más osteonas. Los canaliculos se observan alterados igual que algunas lagunillas osteocíticas que han comenzado a degradarse (figura 30). Se inicia la separación de las fibras de colágeno en algunas partes centrales de las osteonas como consecuencia de la disolución de la matriz mineral a las que se adhieren las fibras.

La tinción, aunque homogénea en todo el corte histológico, colorea con mayor intensidad los bordes externos de la mayor parte de las osteonas.



Figura 27. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 6 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 2 aumentos.

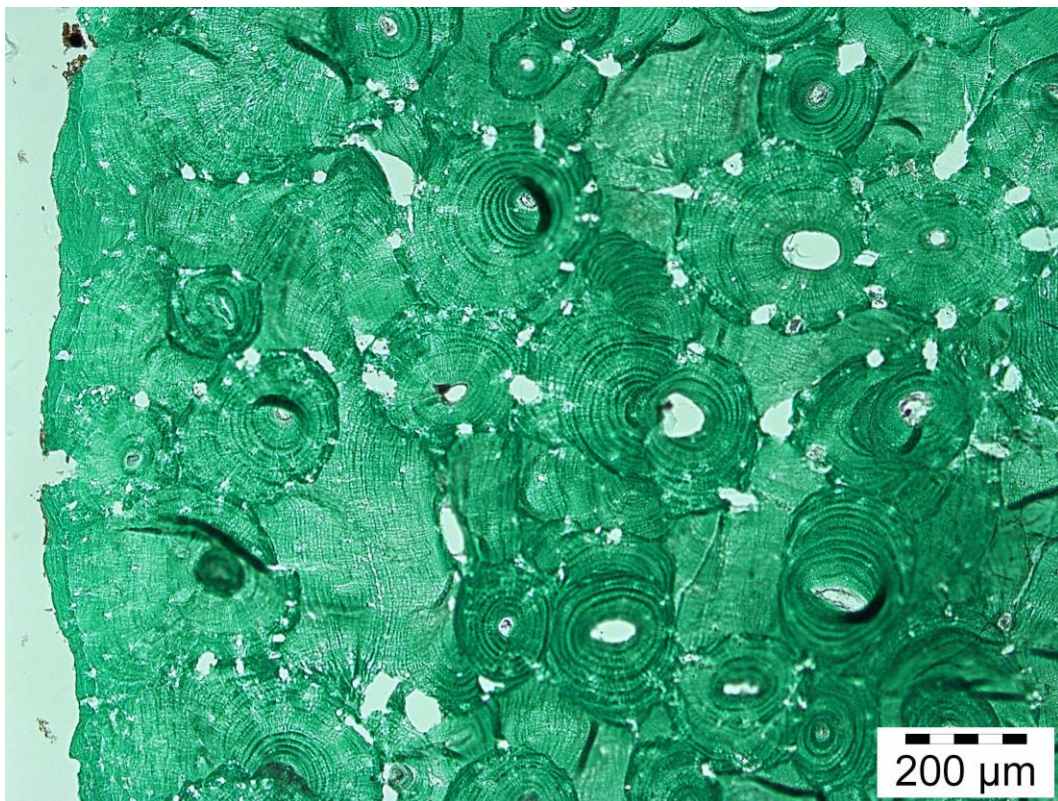


Figura 28. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 6 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.

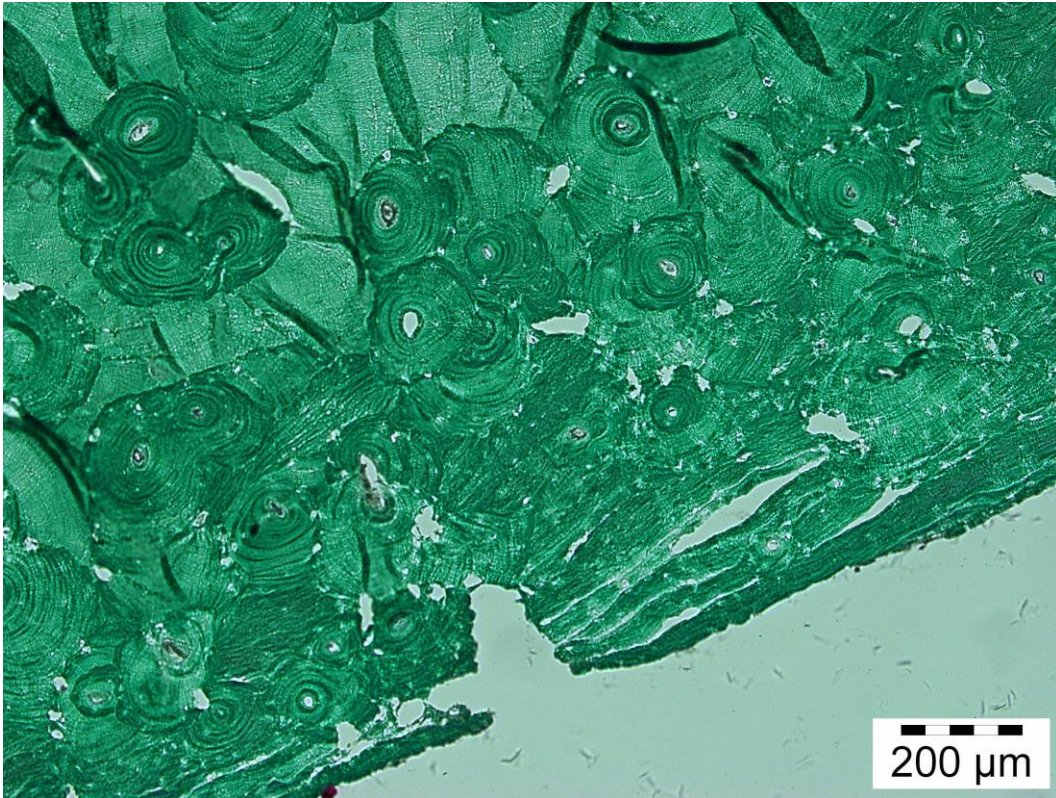


Figura 29. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 6 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.

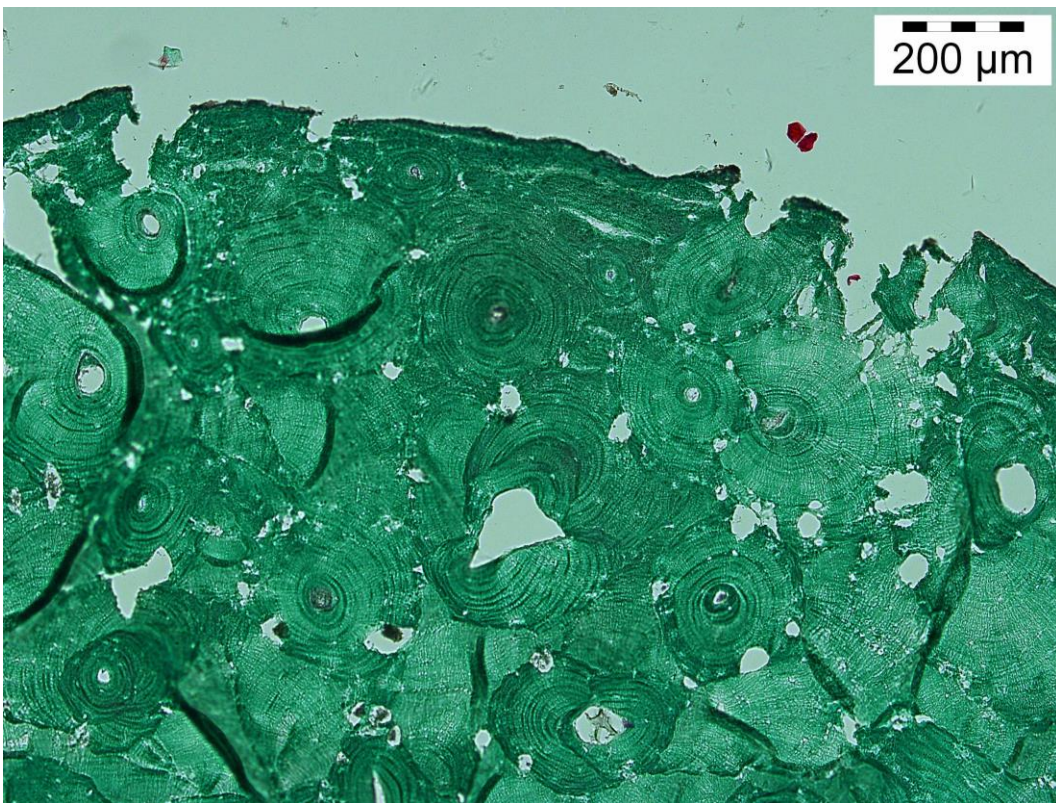


Figura 30. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 6 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.

La muestra sumergida durante 8 horas ha sufrido alteración de su estructura original. Gran parte de la cortical del hueso se encuentra degradada, estando ausente en más de la mitad del corte. Se altera separándose en algunas partes del corte (Figura 31). La mayor parte de las osteonas se observan destruidas en su totalidad, aunque si mantienen su estructura primaria, es decir, las fibras de colágeno que las componen se han separado de tal manera que adquieren aspecto reticulado (Figura 33). La porosidad aumenta a lo largo de la línea de cemento y aparecen otros espacios o huecos de degradación que afectan a más de una osteona a la vez (Figura 34).

La tinción deja de ser homogénea ya que, al perder la consistencia el colágeno en algunas regiones, la coloración se concentra en aquellos lugares del hueso que aún mantiene una estructura compacta (Figura 31).

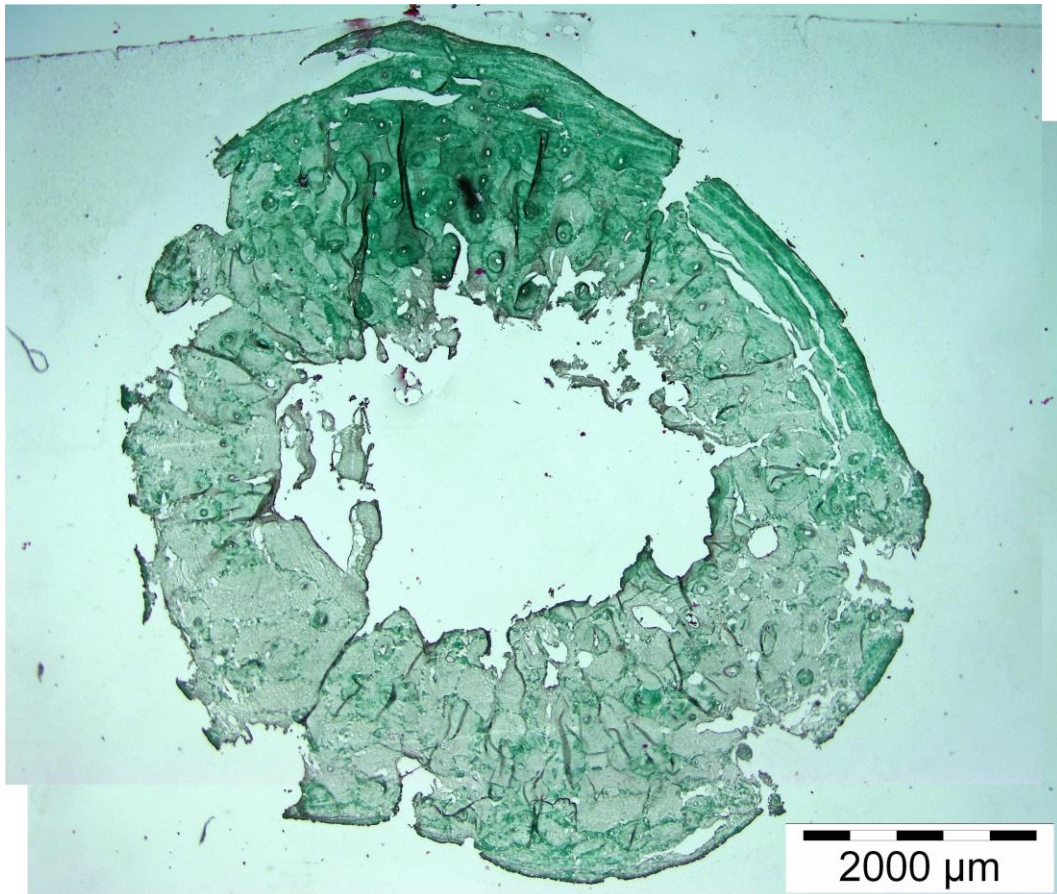


Figura 31. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 2 aumentos.

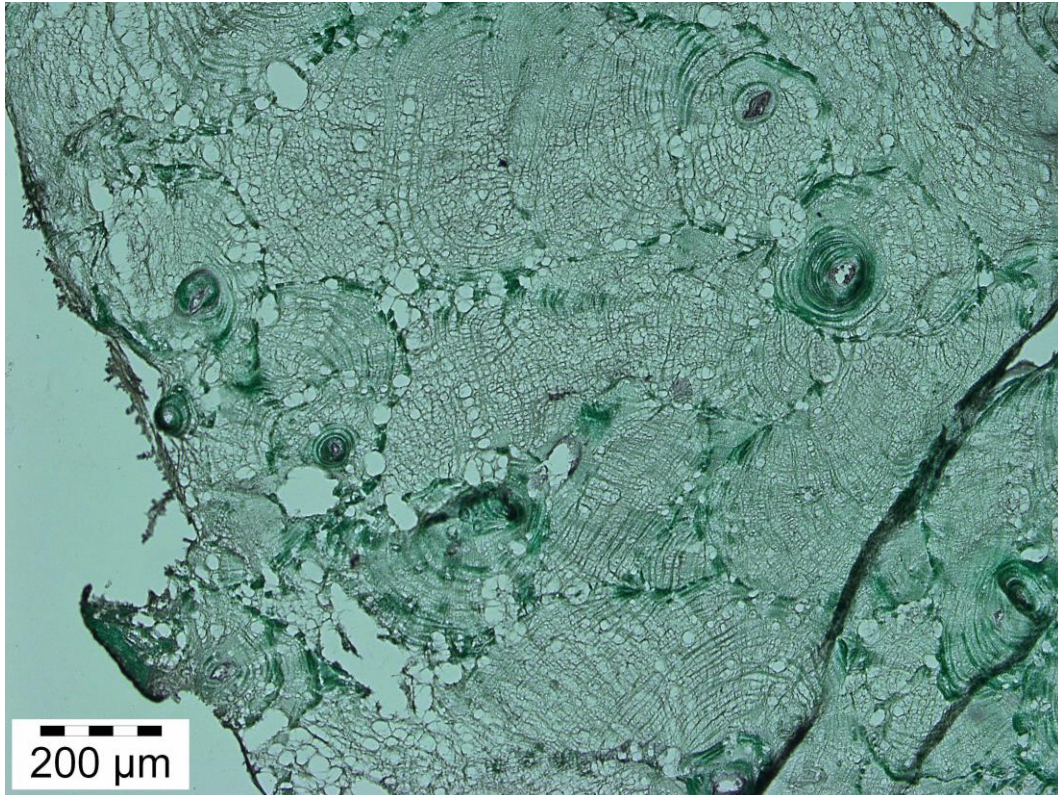


Figura 32. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.

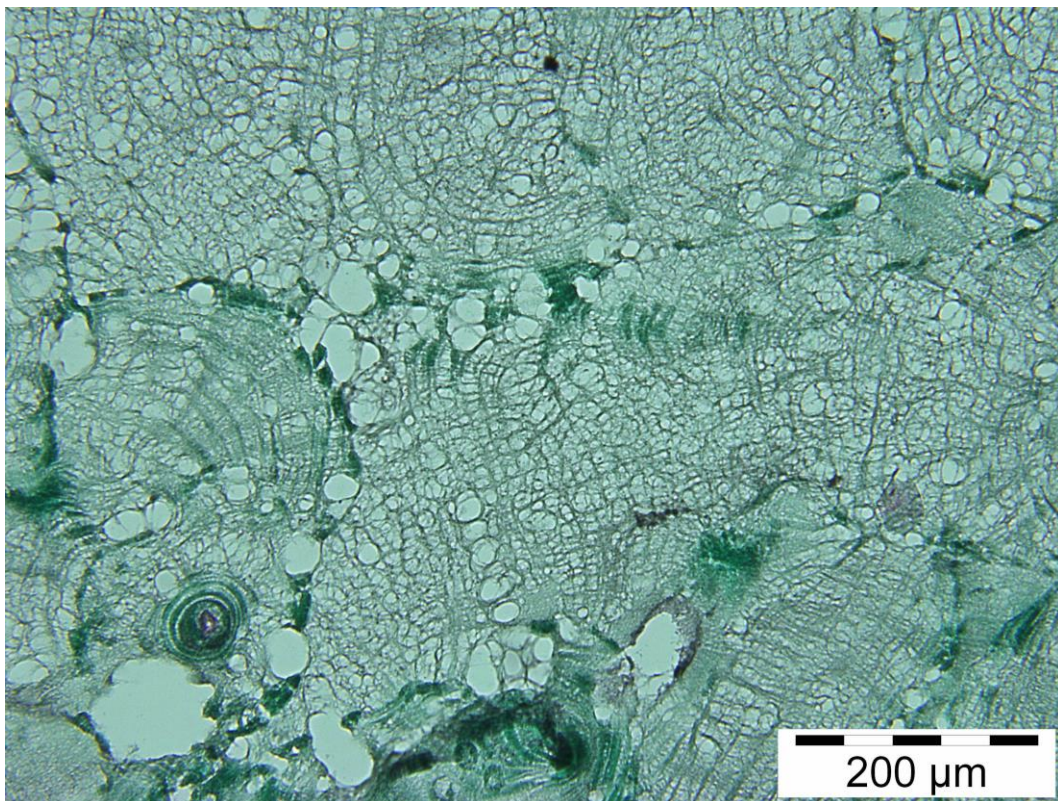


Figura 33. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 20 aumentos.



Figura 34. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 20 aumentos.

#### **Análisis de imagen:**

El análisis de las imágenes para cuantificar el porcentaje de hueso degradado da como resultado que las muestra que estuvieron durante una hora tuvieron una pérdida del 18,43% de materia. La muestra expuesta durante 6 horas de un 46,92% de pérdida. Y, por último, la muestra expuesta durante 8 horas de un 53,93%.

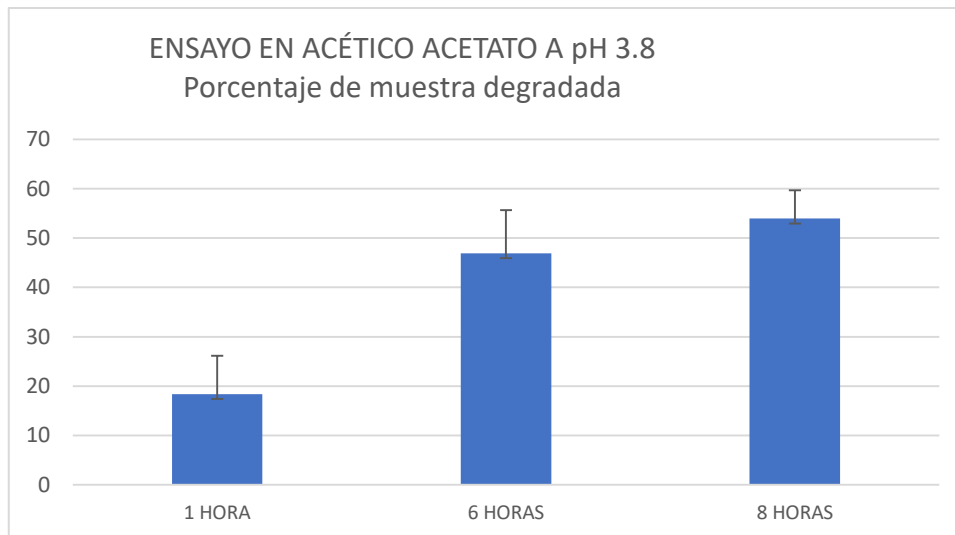


Figura 35. Gráfico del porcentaje de degradación analizado en las muestras del ensayo en un medio de acético acetato a pH 3.8.

El análisis de varianza (ANOVA) de los datos obtenidos del porcentaje de degradación indica que existen diferencias significativas según el tiempo que pasa una muestra de hueso en un medio ácido (ver Anexo. Tabla 3).

#### 8.4. Ensayo en un medio de acético-acetato a pH 5.5

En este apartado se describirán los resultados obtenidos en el ensayo realizado sobre una muestra de material óseo contemporáneo expuesto en un medio ácido (tampón acético-acetato) a pH 5.5. Las muestras fueron embebidas en este medio durante 8, 24, 32 y 56 horas.

En la muestra sumergida durante 8 horas no se observaron cambios aparentes en la estructura ósea. La cortical está casi completa y presente en toda la muestra, exceptuando en algunos lugares donde se ha desprendido (Figura 36). Las osteonas se mantuvieron unidas entre sí, manteniendo su forma sin presentar alteraciones en los límites, ni en la línea cementerial.

El colágeno de toda la muestra se presenta consistente y bien estructurado. La tinción de toda la muestra es homogénea.

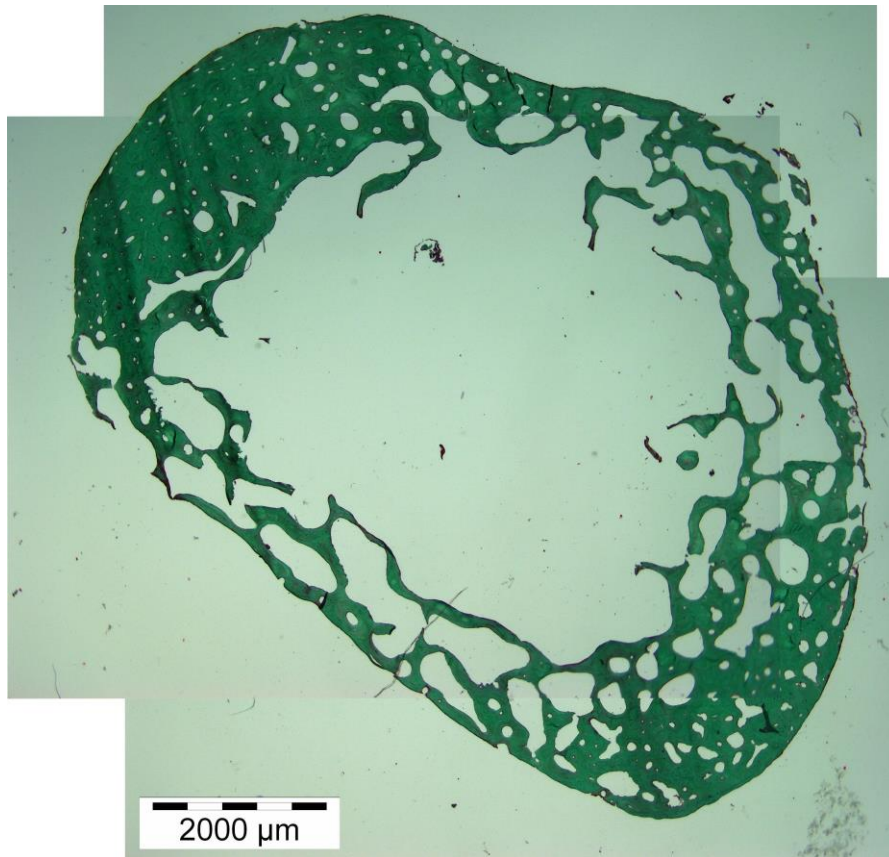


Figura 36. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.

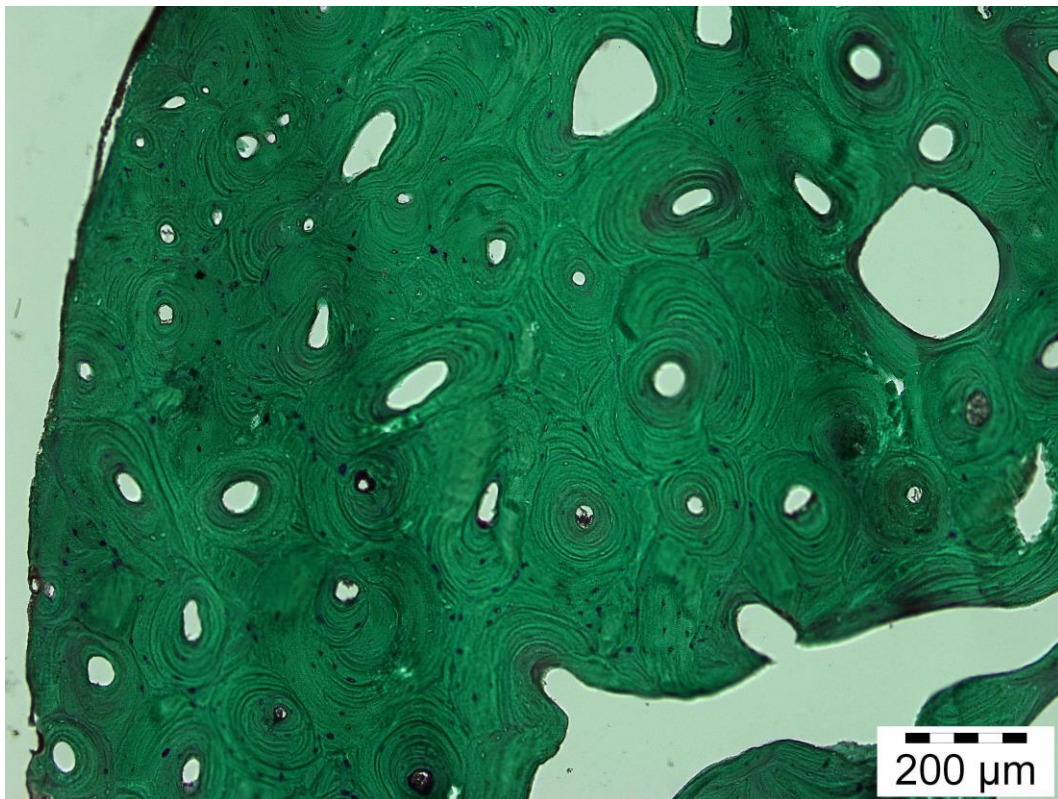


Figura 37. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

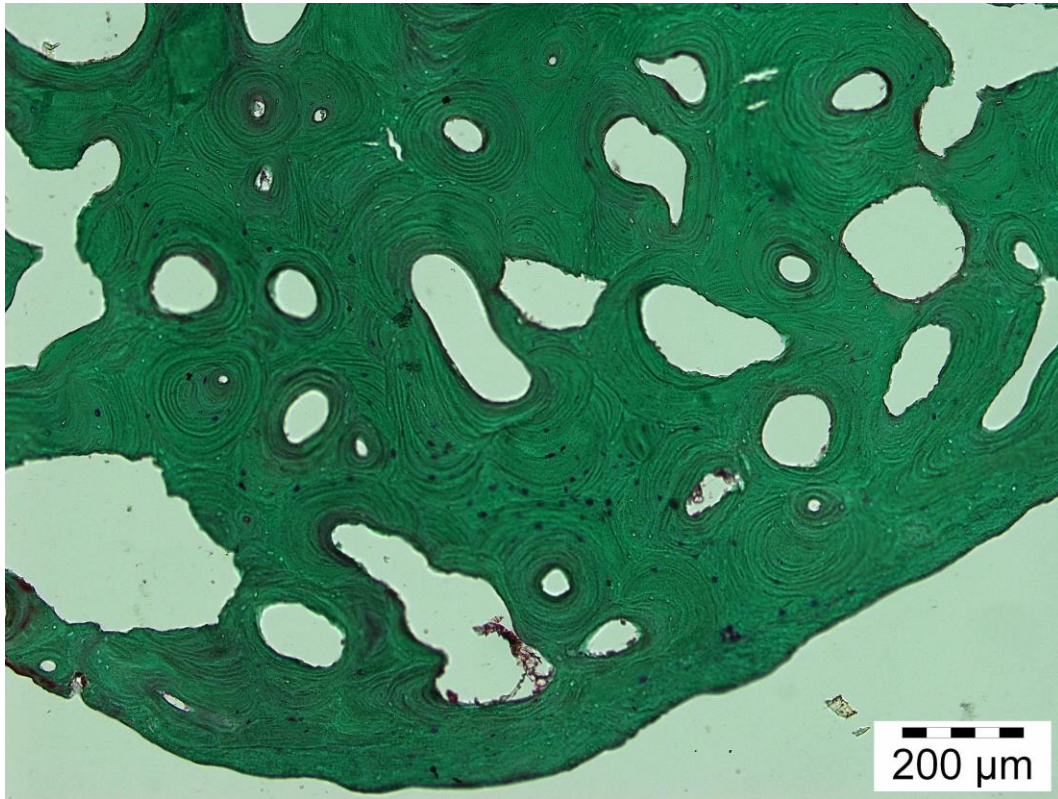


Figura 38. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

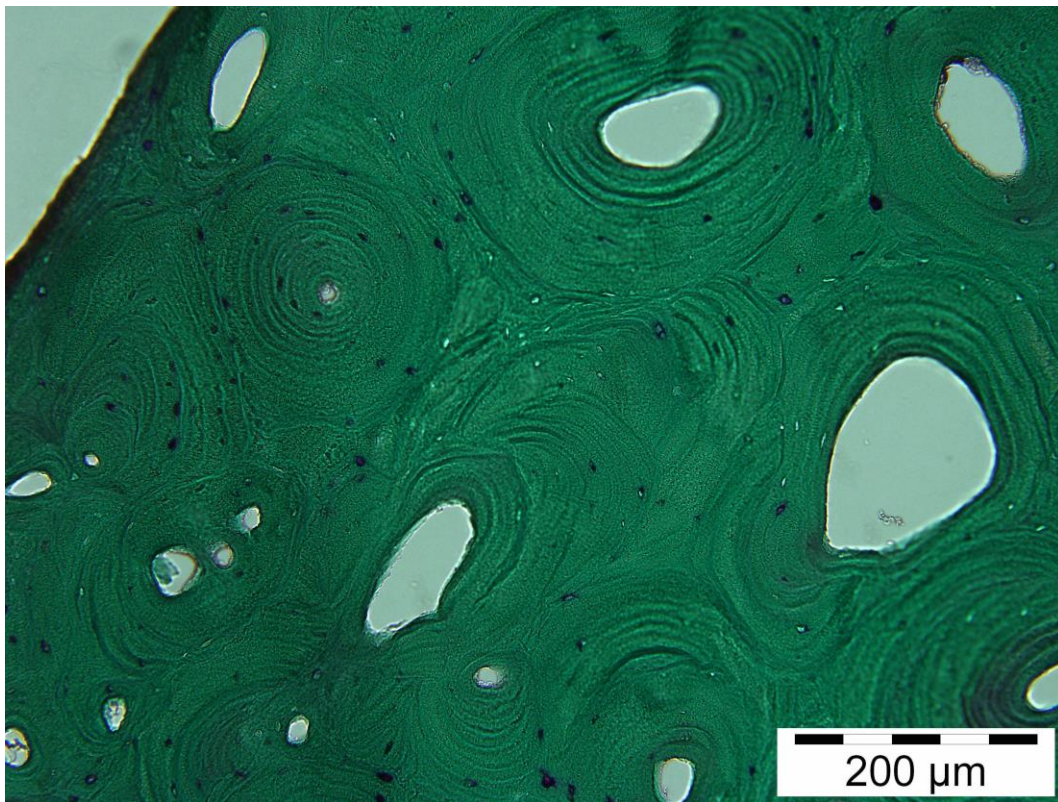


Figura 39. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.

La muestra sumergida durante 24 horas comienza a presentar síntomas de degradación. La cortical del hueso y el límite con el canal medular se rompen en algunas regiones. Se observan efectos leves en el canal medular.

Las osteonas no presentan cambios en su estructura a excepción de algunas lagunillas osteoclásticas que comienzan a aumentar de tamaño, a la vista del microscopio óptico. El colágeno no está afectado y se mantiene denso y compacto.

La tinción es homogénea en toda la muestra.

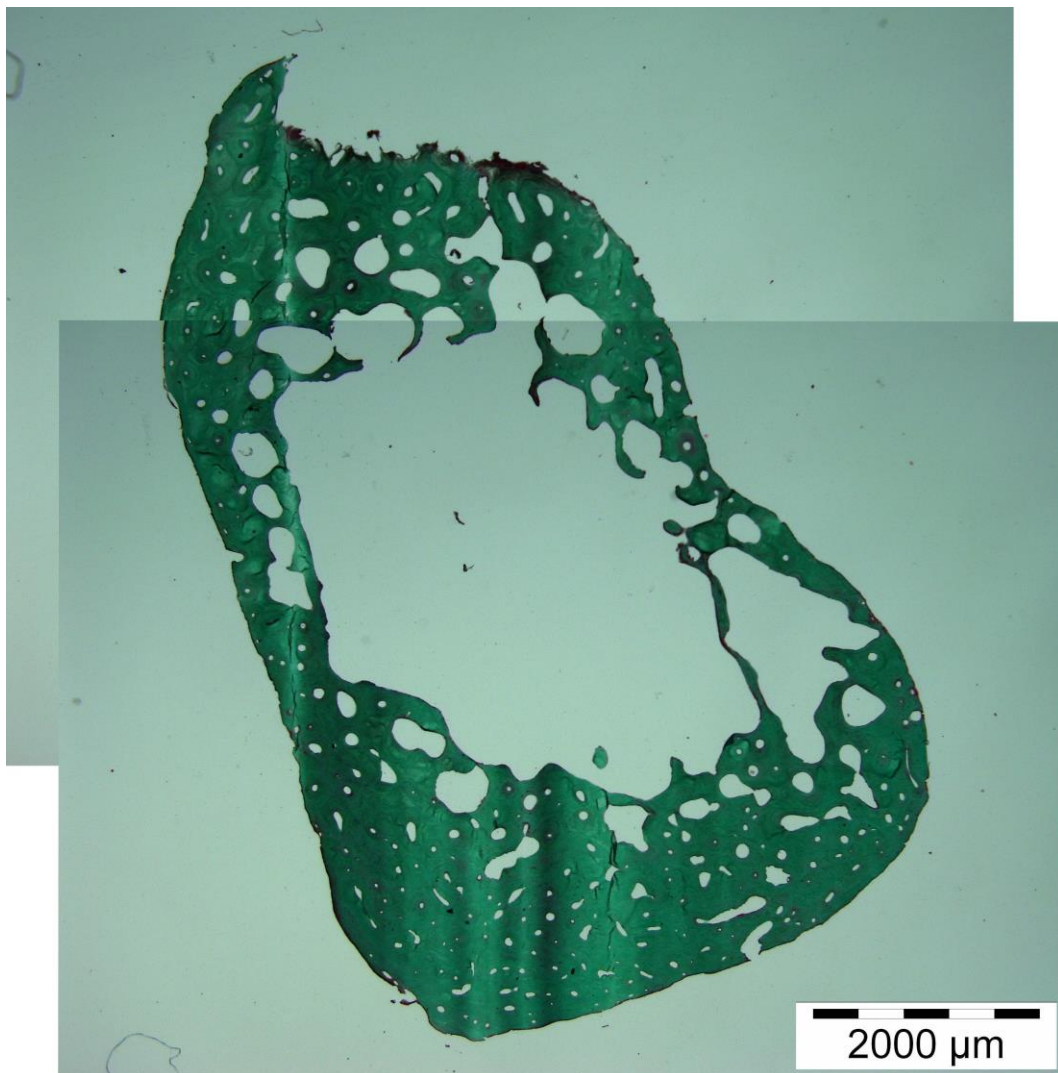


Figura 40. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.

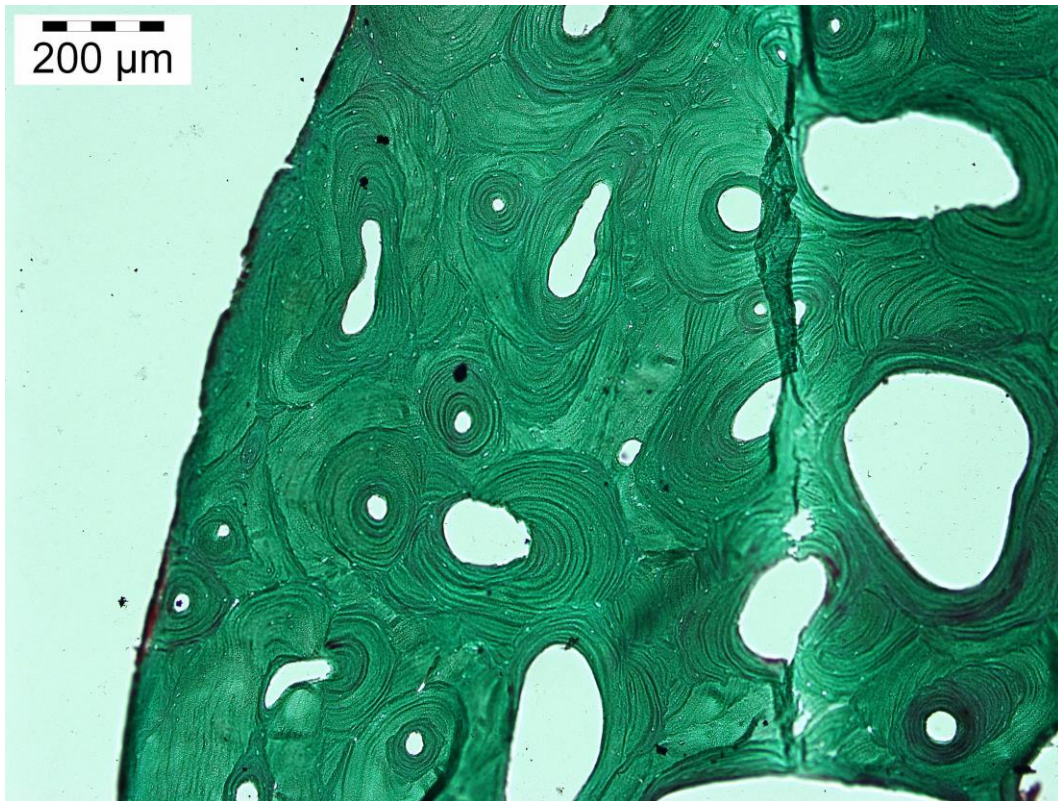


Figura 41. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

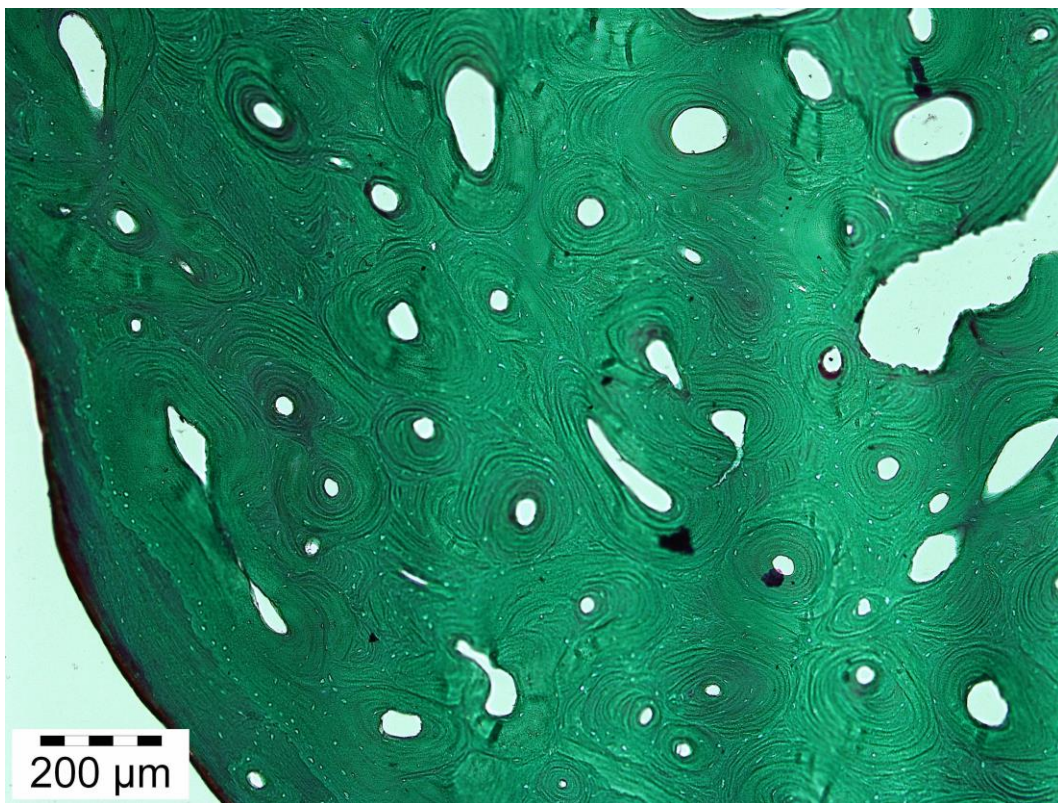


Figura 42. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

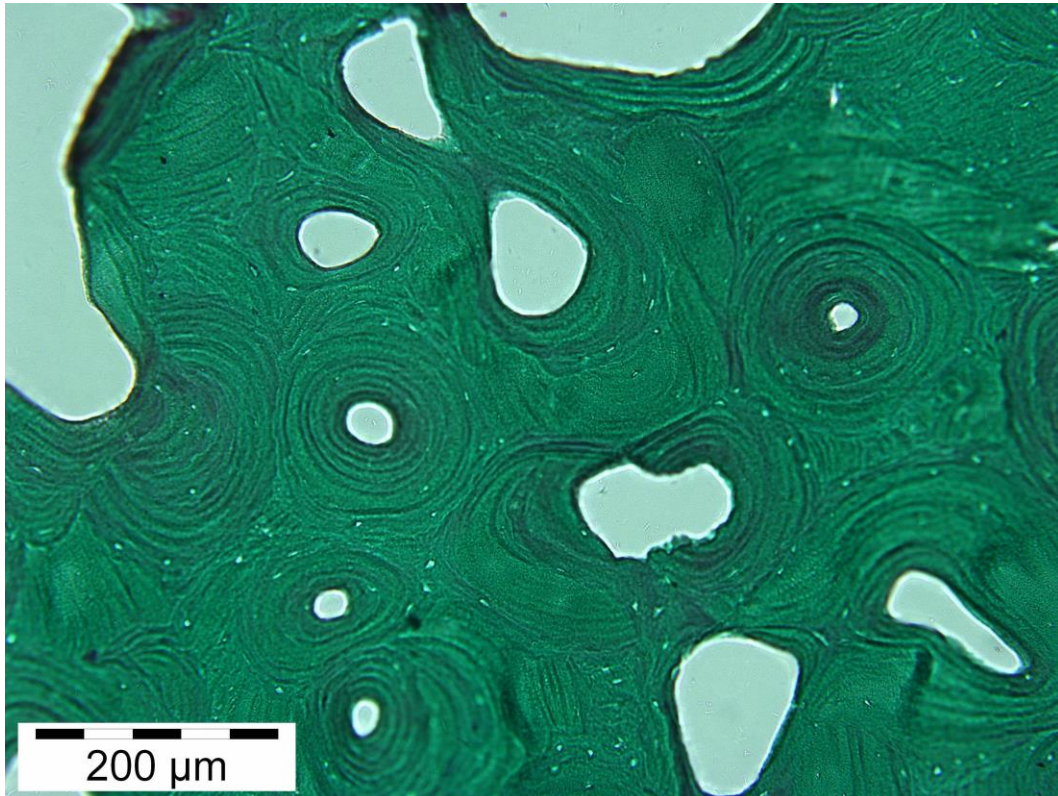


Figura 43. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.

La siguiente muestra analizada estuvo 32 horas sumergida. Aunque mantiene la estructura original comienza a hacerse notorios los efectos del medio ácido.

La cortical del hueso comienza a degradarse alrededor de toda la muestra, presentando pequeñas fisuras tanto en el exterior como en el interior del canal medular. Las osteonas mantienen su estructura, pero comienza a aparecer porosidad en la línea cementaria. La penetración del medio ácido afecta también a los canalículos que comunican los espacios osteocíticos que, a su vez, aumentan de tamaño.

Las fibras de colágeno se hacen más presentes en el corte histológico dando lugar a un bandeo claro-oscuro más marcado. La tinción, aunque homogénea es más oscura alrededor de las osteonas y del límite subperóstico de la muestra.

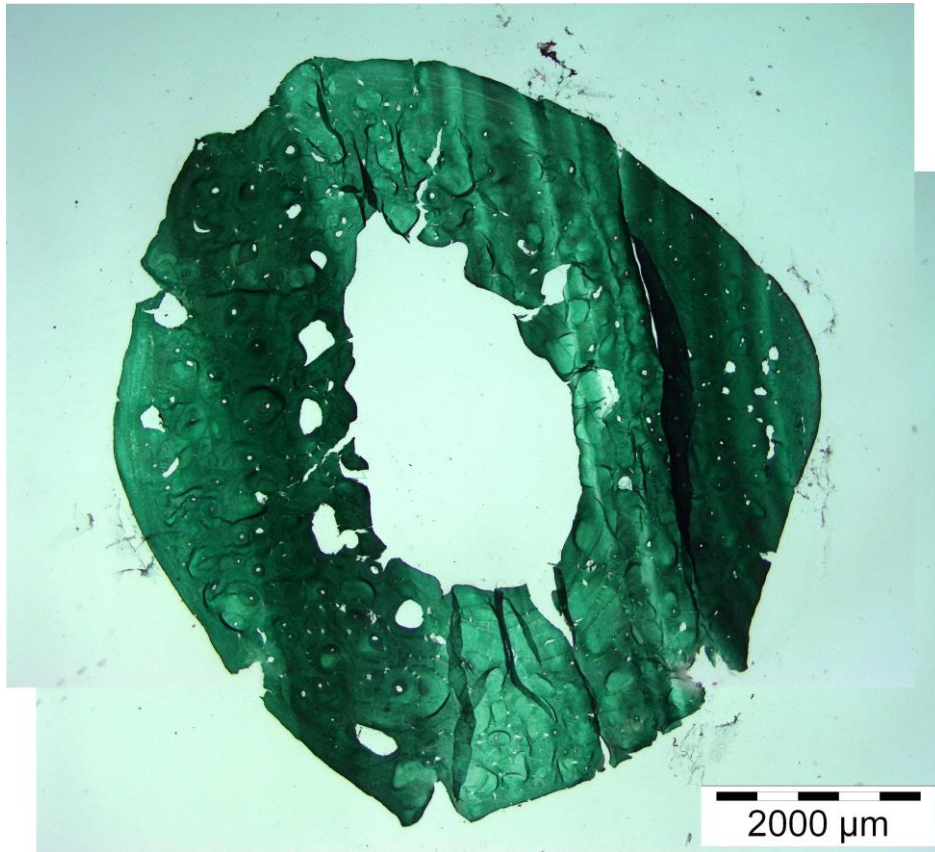


Figura 44. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 32 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.

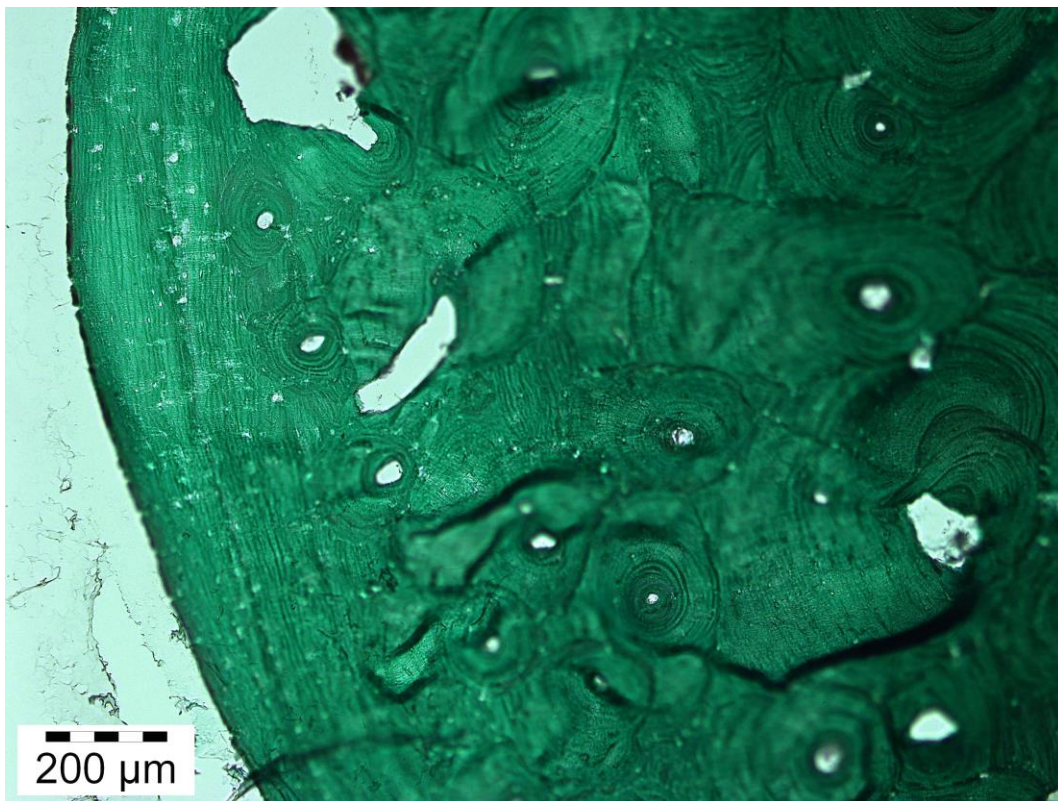


Figura 45. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 32 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

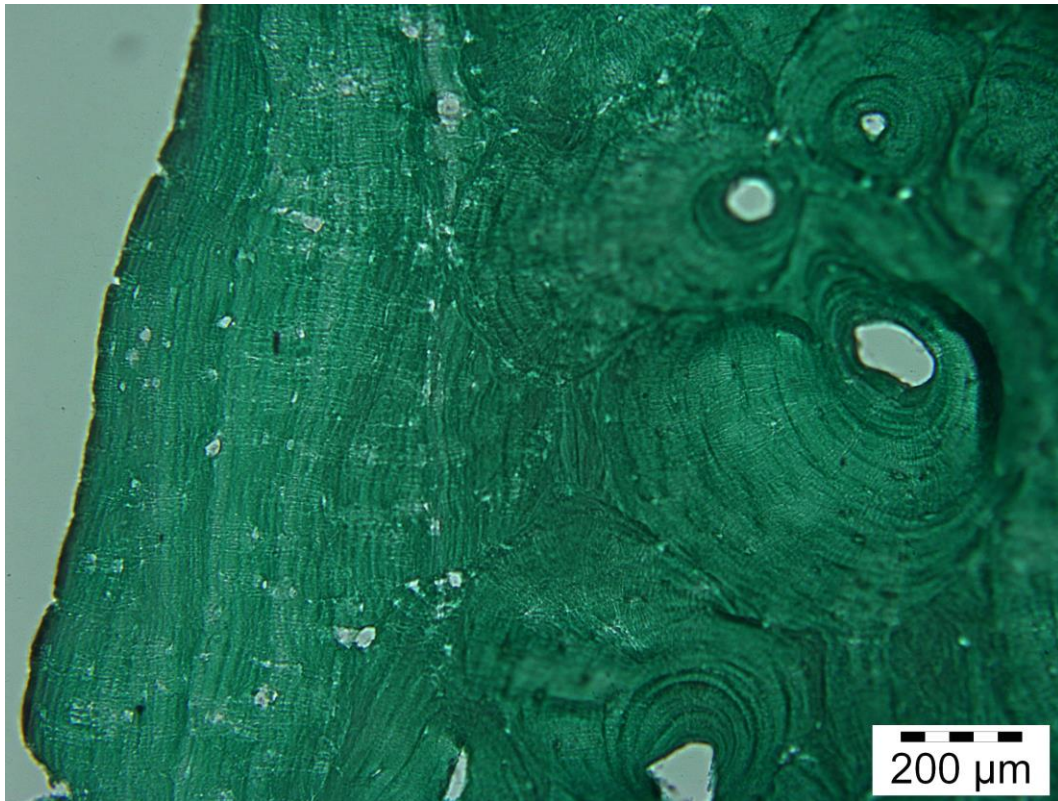


Figura 46. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 32 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

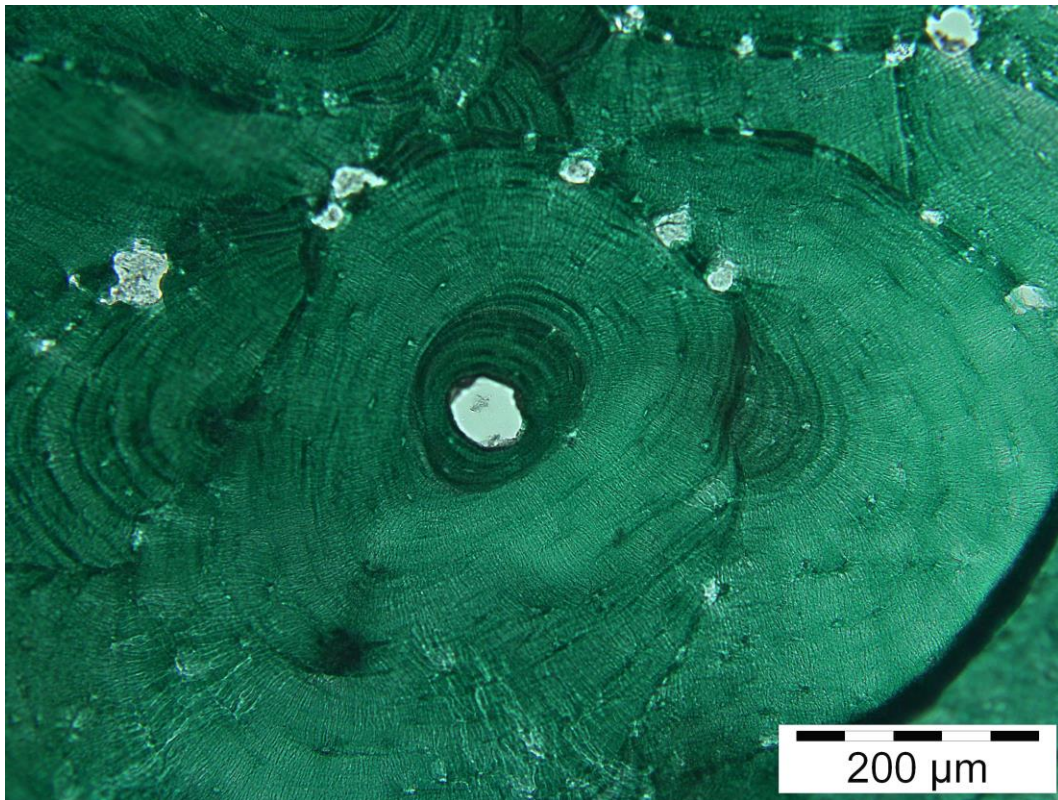


Figura 47. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 32 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.

La submuestra sumergida durante 48 horas presenta un mayor grado de alteración. Mantiene la estructura original, aunque la cortical del hueso está afectada en la totalidad de la muestra presentando discontinuidades y separación en capas de la zona más externa. También se observa una alta degradación del interior del canal medular del hueso. Las osteonas están afectadas en su límite cementicial debido al aumento de la porosidad con respecto a la muestra que estuvo 32 horas. Los canalículos de las osteonas se hacen más evidentes ocupando el interior de los complejos osteonales. Lo mismo ocurre en las lagunillas osteocíticas. El efecto producido en la degradación de los canalículos y en las lagunillas hace que las fibras de colágeno comiencen a alterar su estructura molecular.

La tinción pierde su homogeneidad en toda la muestra estando más marcada alrededor de las osteonas, a la altura del límite externo y en aquellos lugares donde el hueso es más compacto.

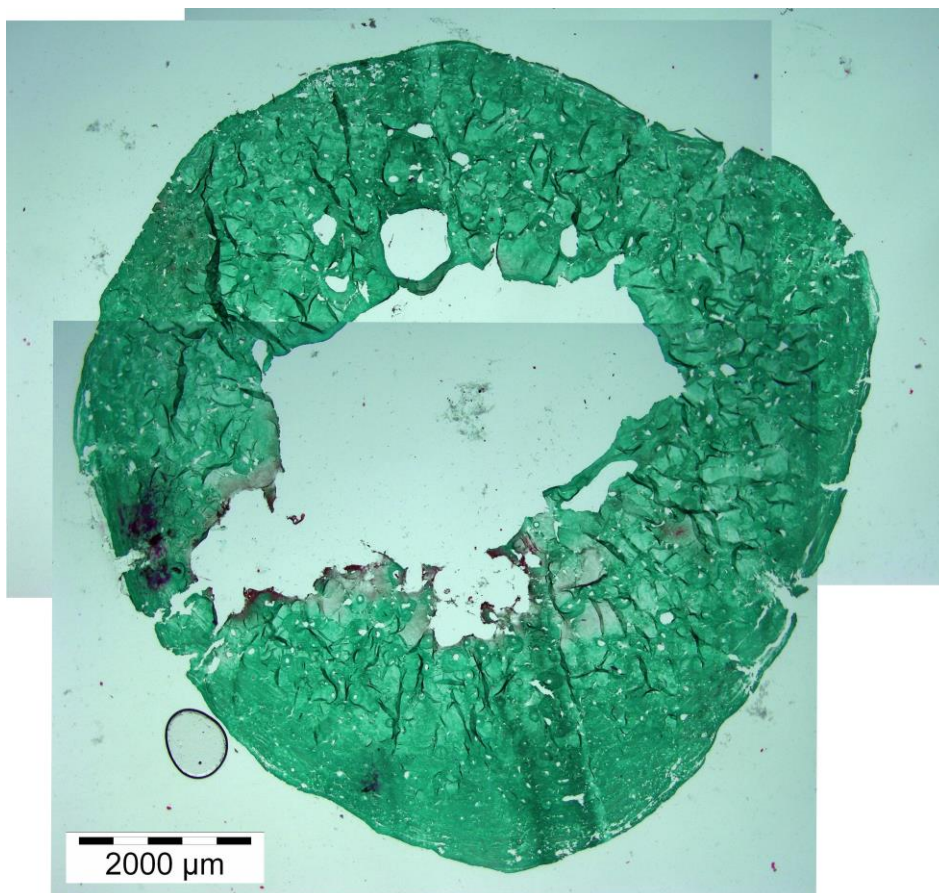


Figura 48. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 48 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.

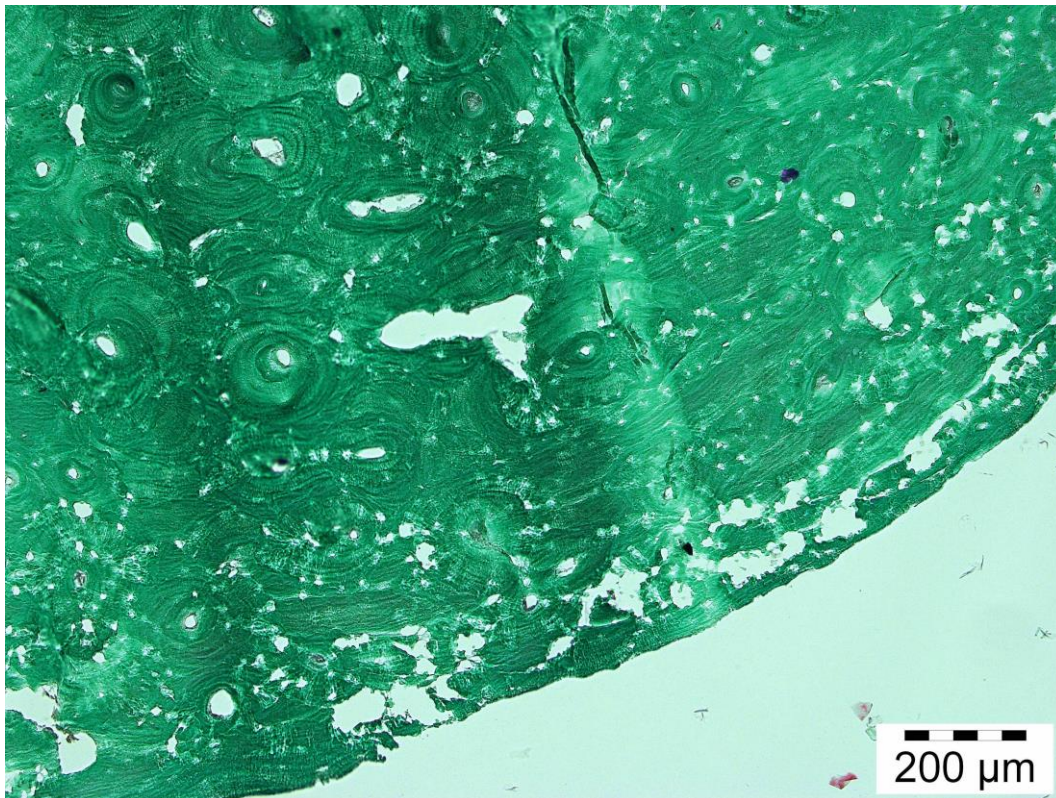


Figura 49. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 48 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

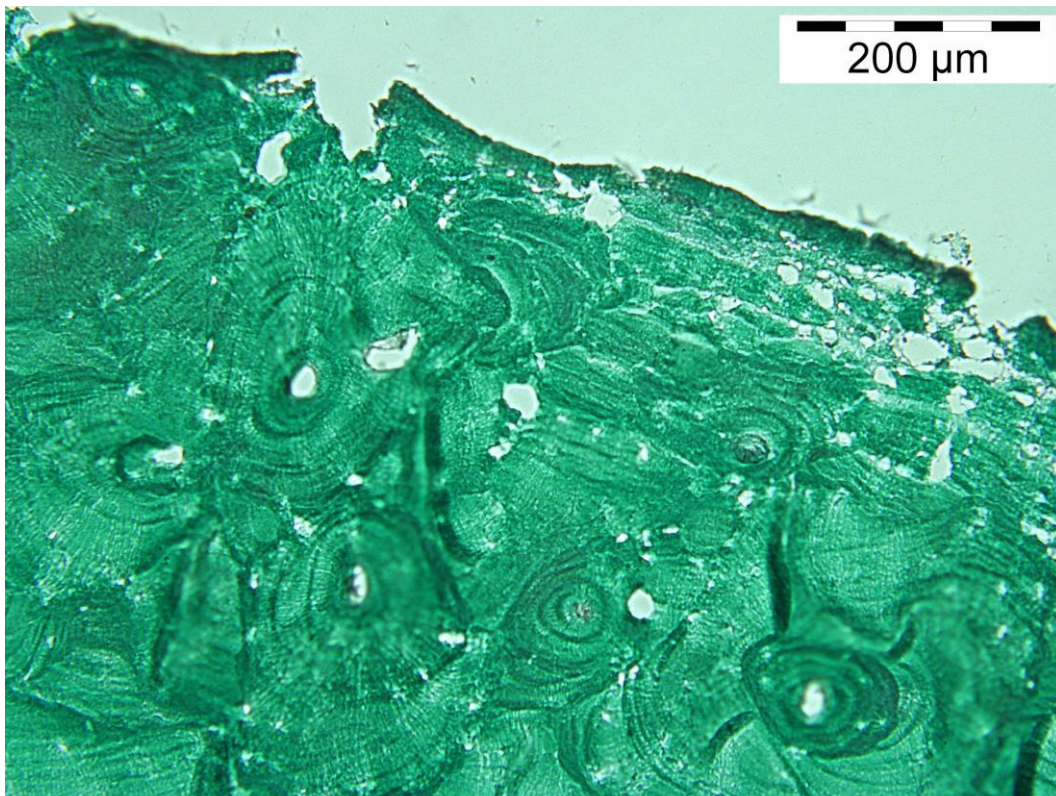


Figura 50. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 48 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.

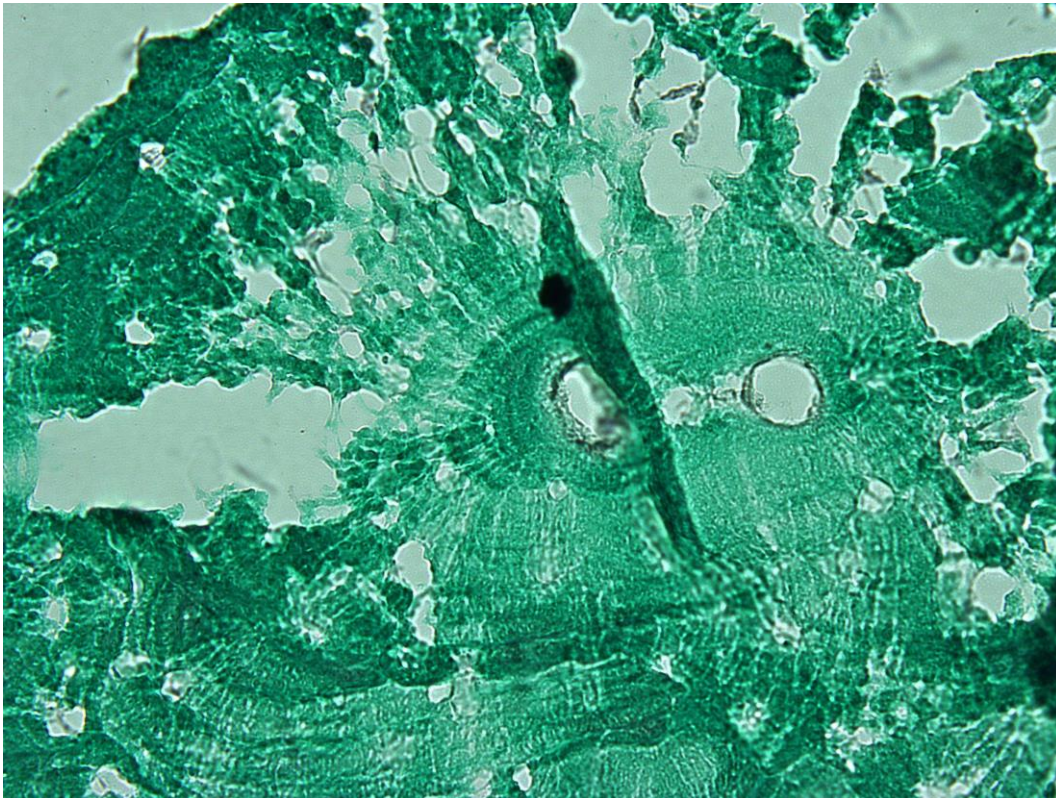


Figura 51. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 48 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 40 aumentos.

A partir de las 56 horas la muestra mantiene su estructura macroscópica, pero el grado de degradación con respecto a la anterior es mucho mayor. La cortical del hueso prácticamente ha desaparecido conservándose en algunas regiones del corte histológico.

La estructura de las osteonas está muy afectada ya que la matriz mineral que las forma prácticamente ha desaparecido presentando un aspecto reticulado. La línea de cemento se encuentra muy alterada por la cantidad de poros creados, alguno de los cuales afectan a varios complejos osteonales.

La tinción deja de ser homogénea quedando presente de manera residual en aquellas zonas donde el colágeno aún mantiene su estructura y la matriz mineral no se ha disuelto completamente.

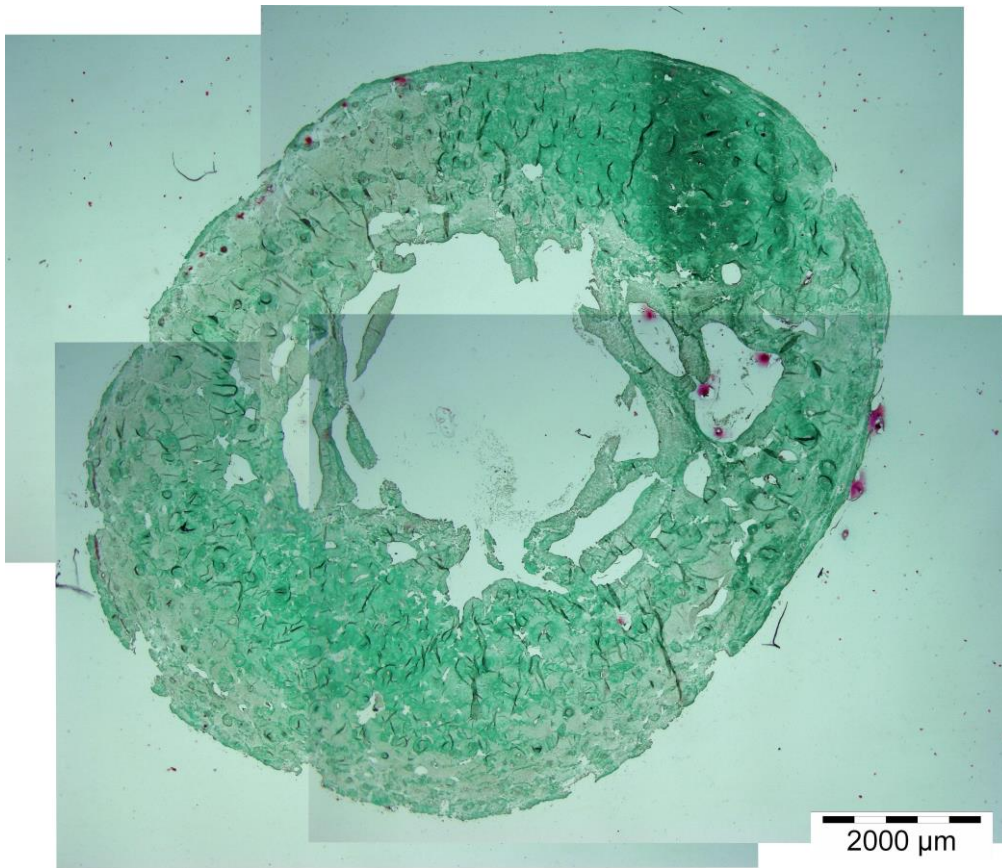


Figura 52. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 56 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.

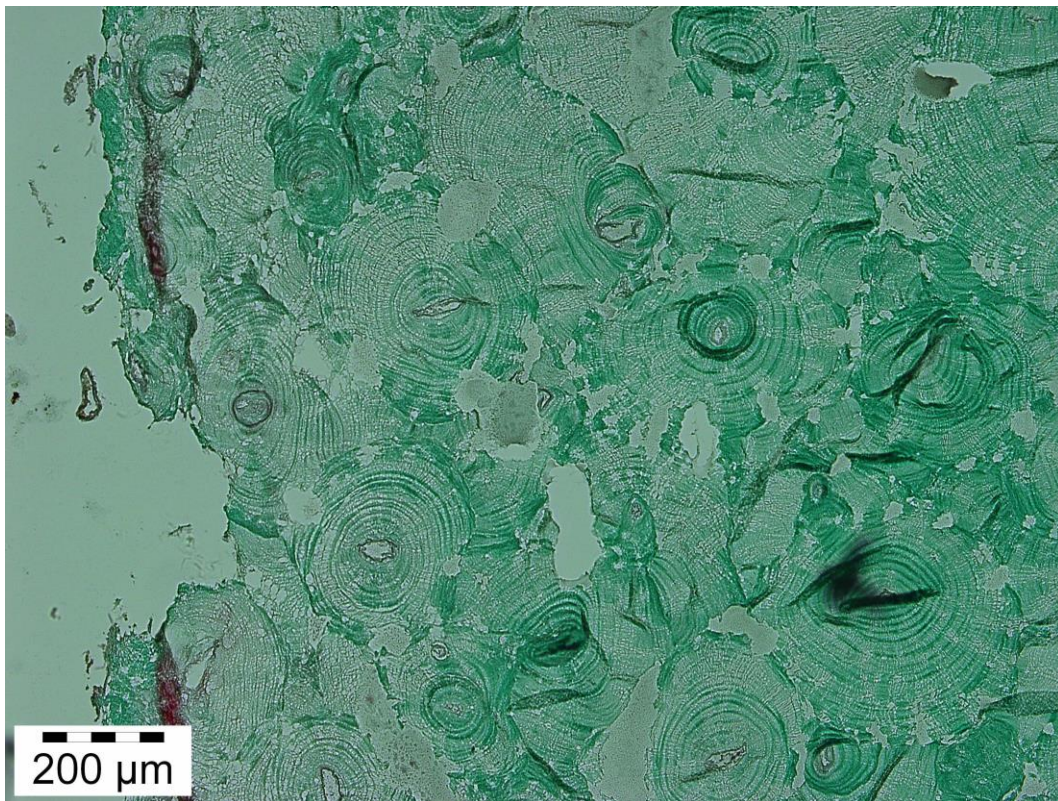


Figura 53. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 56 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

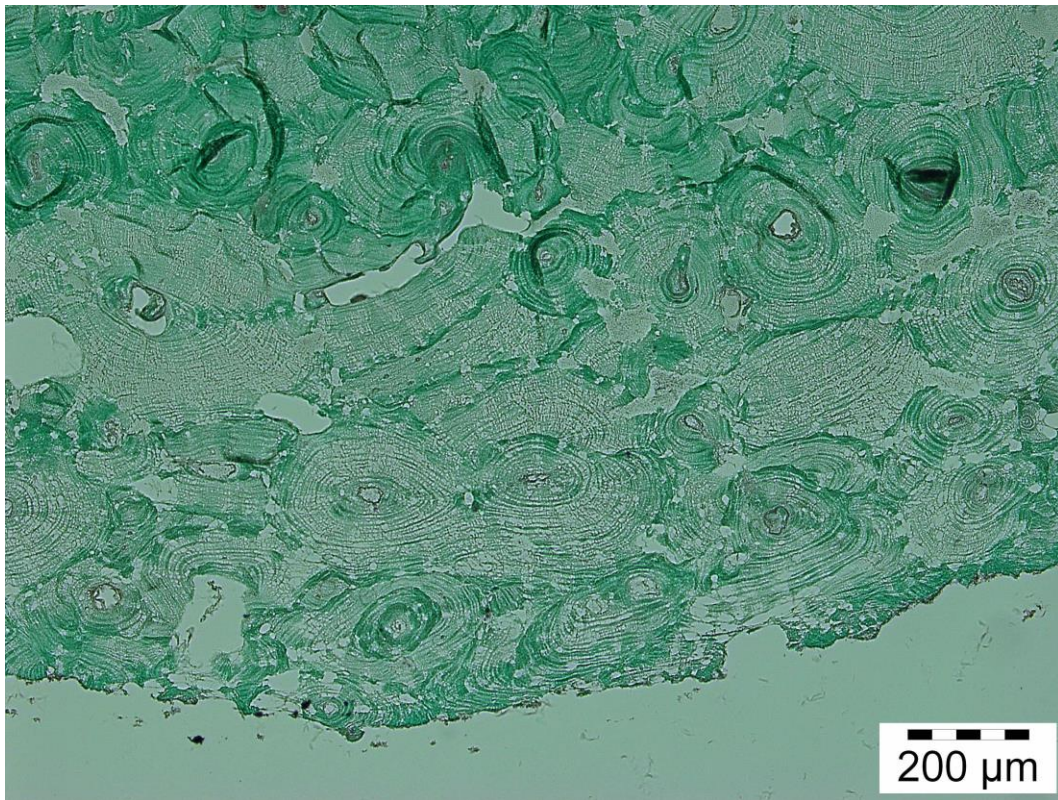


Figura 54. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 56 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

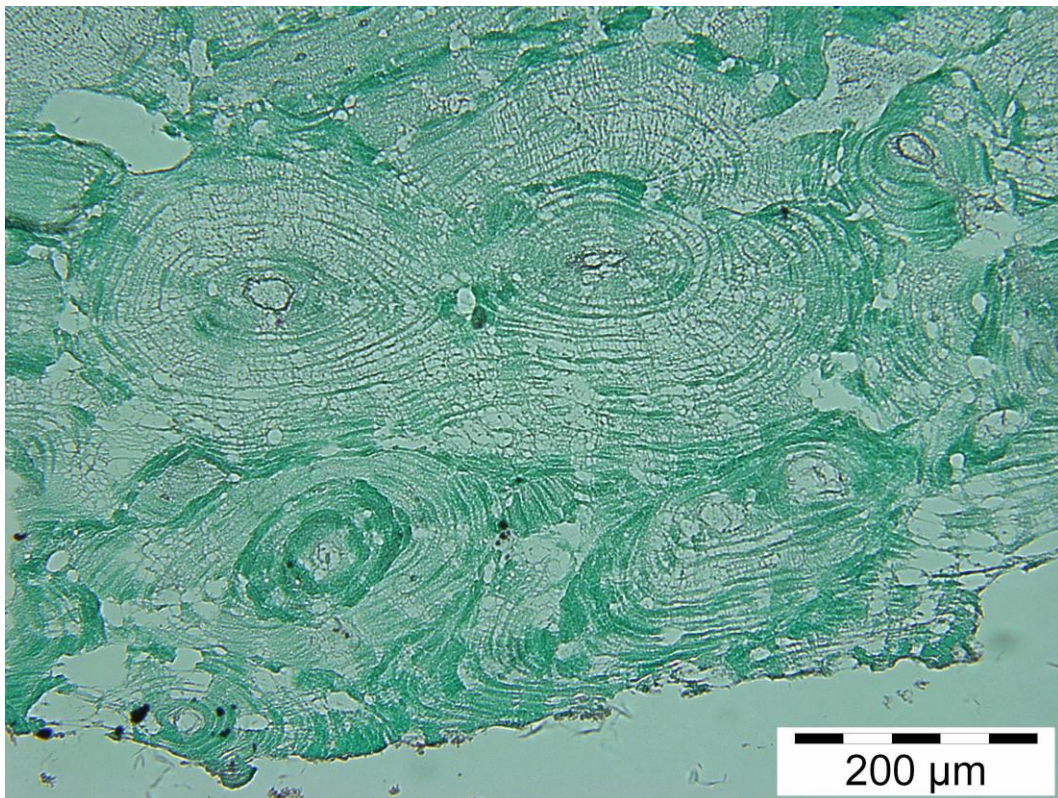


Figura 55. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 56 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.

## Análisis de la imagen

El tratamiento de las imágenes para la cuantificación del área desaparecida de cada uno de los cortes histológicos muestra que existe una degradación exponencial a medida que pasa el tiempo de exposición. Durante las primeras 24 horas apenas hay diferencia en cuanto al área destruida, en torno a un 3 - 4% de la muestra. A partir de las 32 horas de exposición comienzan a aumentar pasando de un 15,22% a un 35% a las 48 horas de exposición y a un 51,76% a las 56 horas (Figura 56).

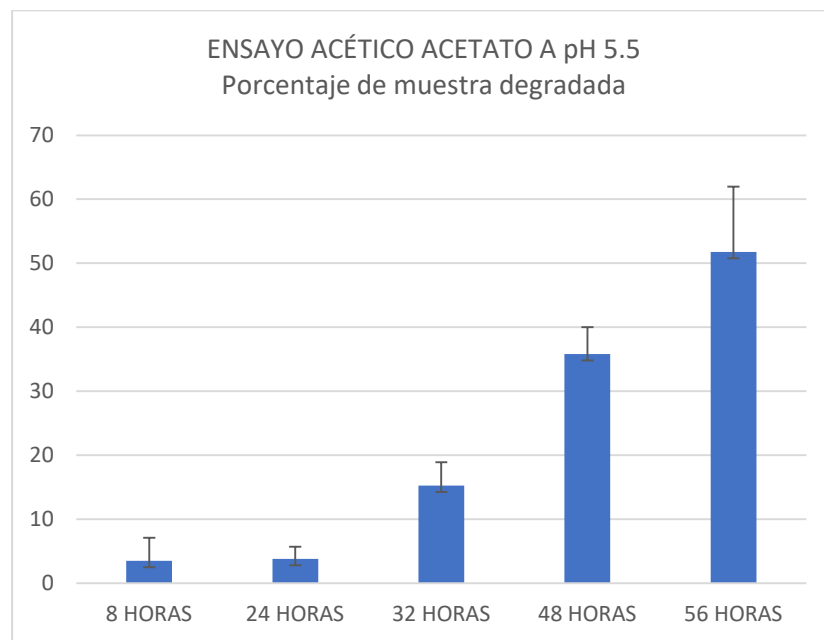


Figura 56. Gráfico del porcentaje de degradación analizado en las muestras del ensayo en un medio acético acetato a pH 5.5.

El análisis de la varianza (ANOVA) de los datos obtenidos determina que existen diferencias significativas según los tiempos en los que se encuentren las muestras sometidas a un medio ácido de pH 5.5 (ver Anexo, Tabla 4).

## **8.5 Ensayo en un medio de NaOH 12,5M durante varias horas.**

A continuación, se describen los resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos en el ensayo en un medio de NaOH 12,5M durante 1, 2, 3 y 4 horas para una muestra contemporánea y otra arqueológica.

Todas las muestras superaron su proceso de exposición al medio altamente alcalino y su descalcificación. A nivel macroscópico todas mantenían su estructura diafisiaria original.

La muestra de hueso contemporáneo que estuvo expuesta durante una hora presenta una afección importante en su conjunto a nivel subperióstico. A menor aumento se observa que el medio alcalino altera la capa más externa del hueso desde fuera hacia adentro hasta alcanzar aproximadamente la mitad del radio del hueso compacto (Figura 57). A mayor aumento se puede ver que la degradación ocurre en lugares concretos de manera irregular.

En el interior del corte histológico la afección sobre las osteonas comienza a lo largo de la línea cementicial de las mismas y en los espacios intersticiales, aproximadamente toda la porosidad es del mismo tamaño. A mayor aumento se observa que el medio alcalino comienza a penetrar en el interior de la estructura de las osteonas y actúa principalmente en las lagunillas osteocíticas. También se observa alteración en el límite de las laminillas de las osteonas, en aquellas de mayor grosor principalmente (Figura 59).

La tinción se muestra homogénea en casi toda la muestra siendo más intensa en las capas externas de la cortical.

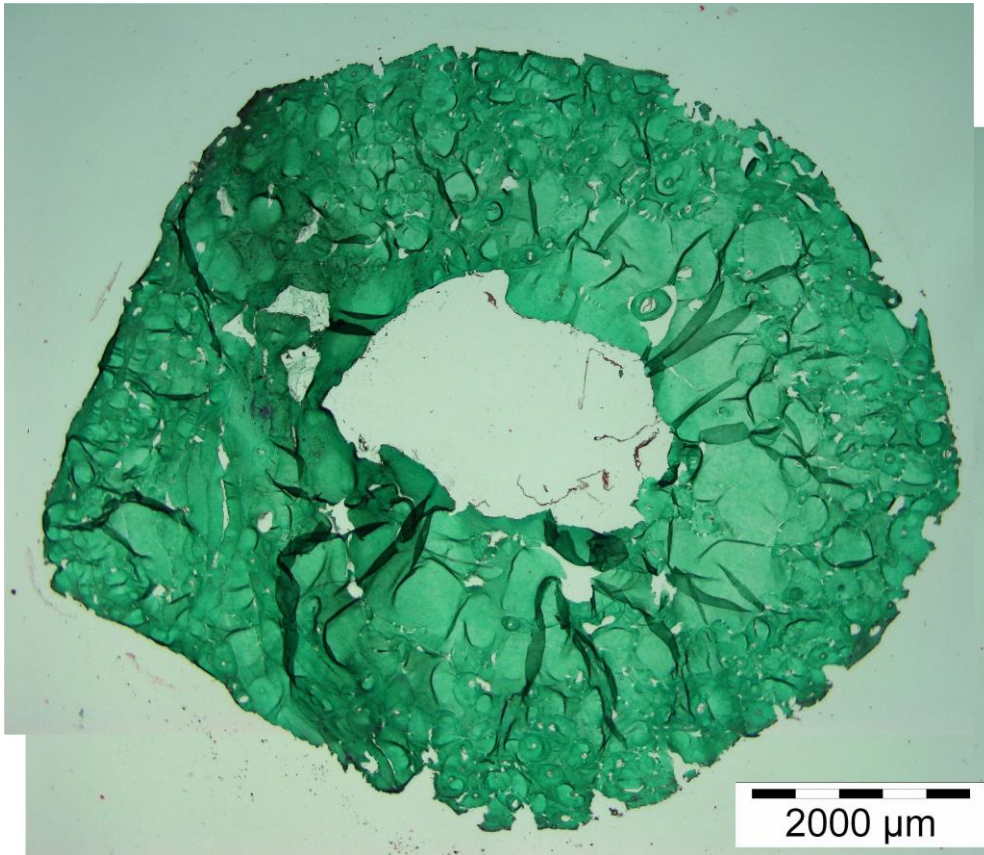


Figura 57. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.

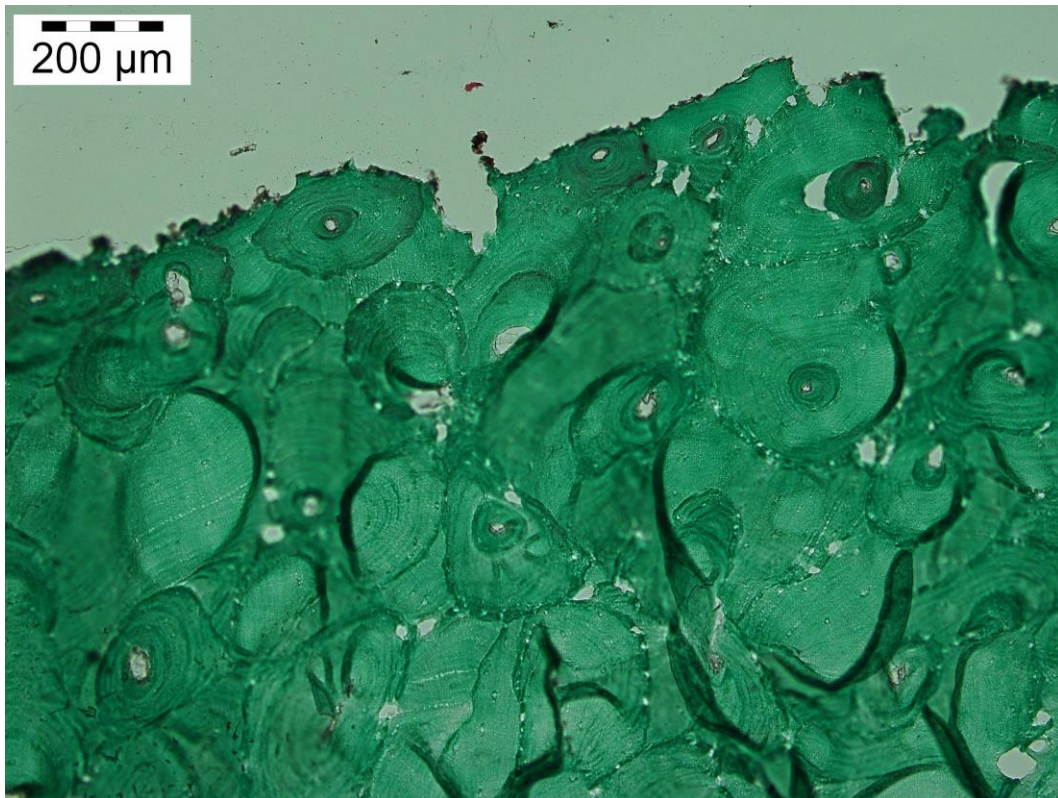


Figura 58. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.

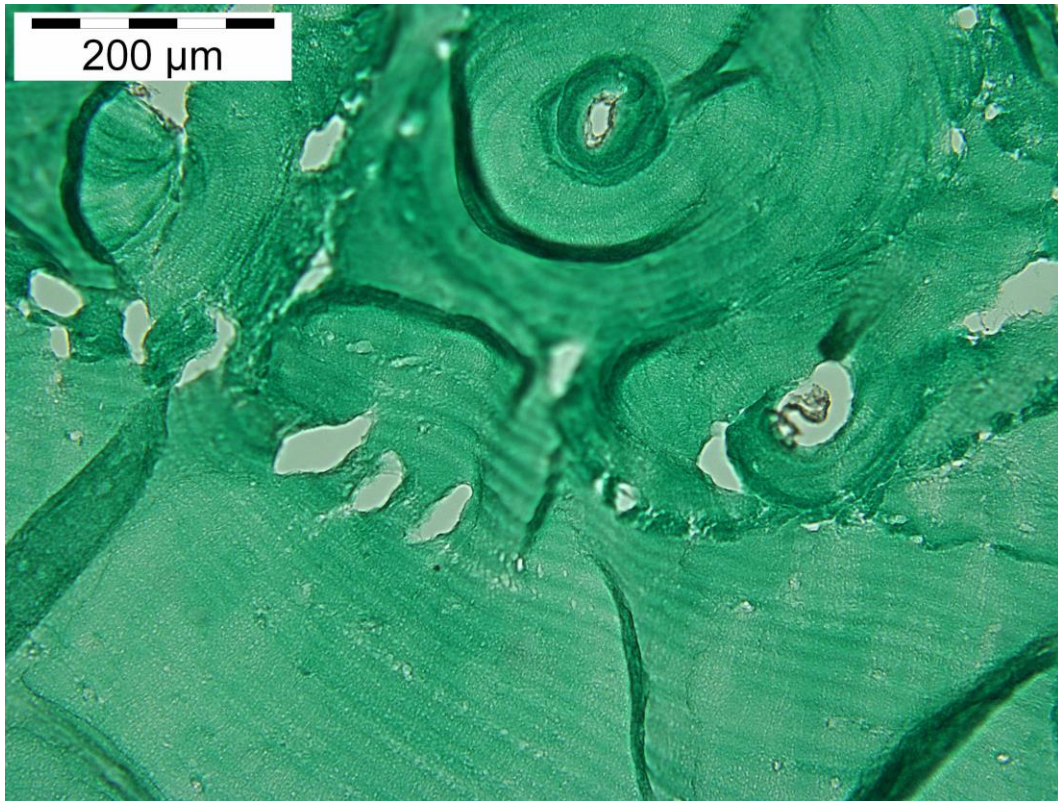


Figura 59. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

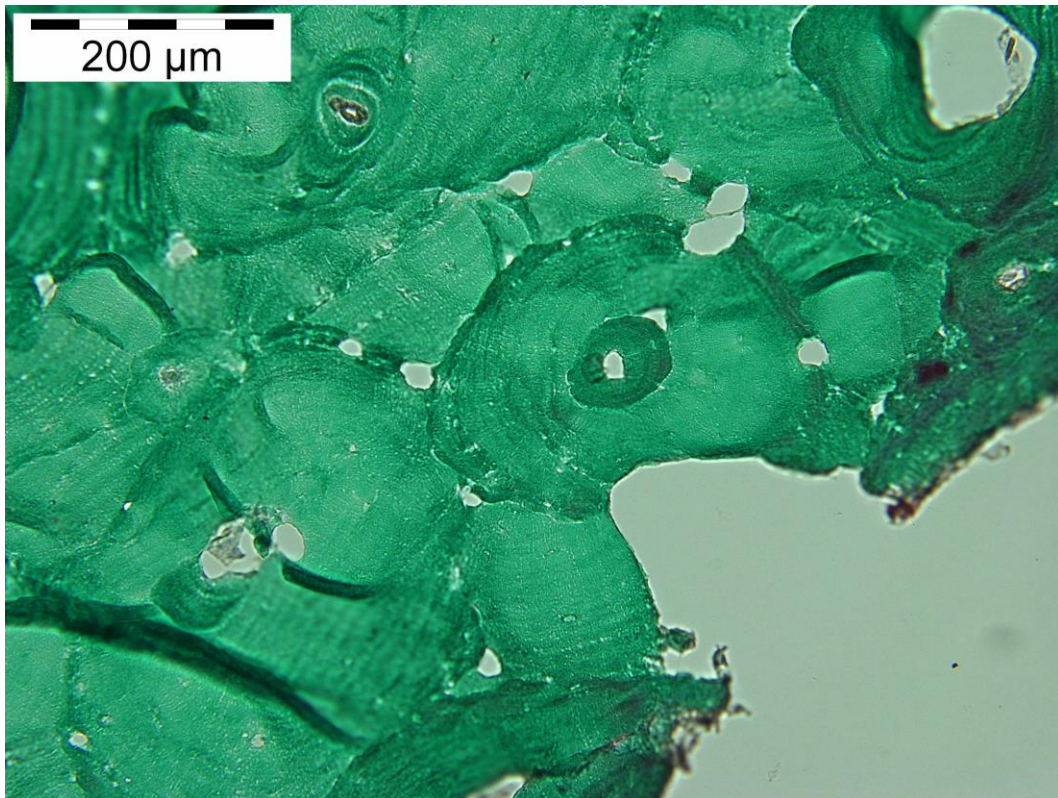


Figura 60. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

A las dos horas de inmersión la muestra contemporánea sigue conservando su estructura original a nivel macroscópico. La cortical del hueso continúa destruyéndose desapareciendo totalmente en algunas regiones del corte. La capacidad de penetración del medio es mayor.

Las osteonas están más afectadas en la línea de cemento y espacios intersticiales. La porosidad aumenta en número alrededor de las osteonas y comienzan a aparecer huecos más grandes como consecuencia de la degradación del hueso.

No se observan efectos degradantes a nivel del colágeno. La tinción es homogénea, aunque tiene más intensidad en los límites de la muestra que se conservan y alrededor de algunas osteonas en su línea cementerial que está siendo alterada.

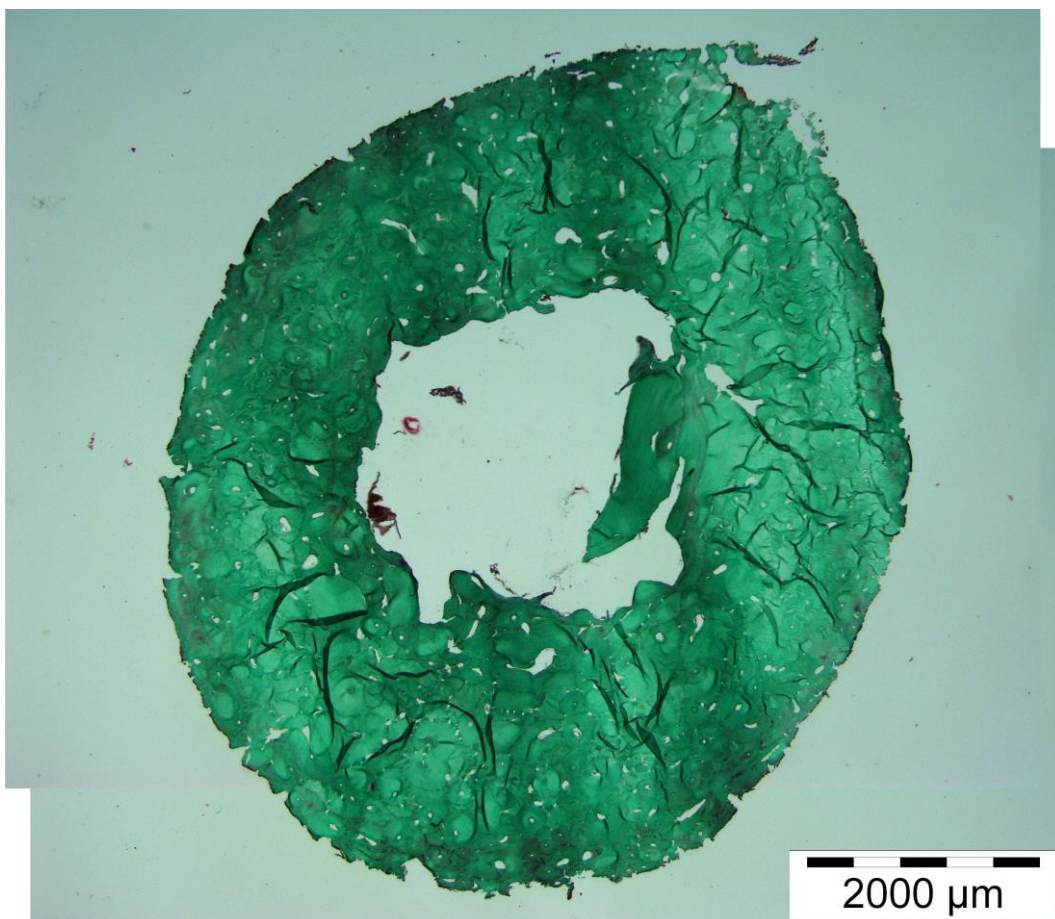


Figura 61. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.

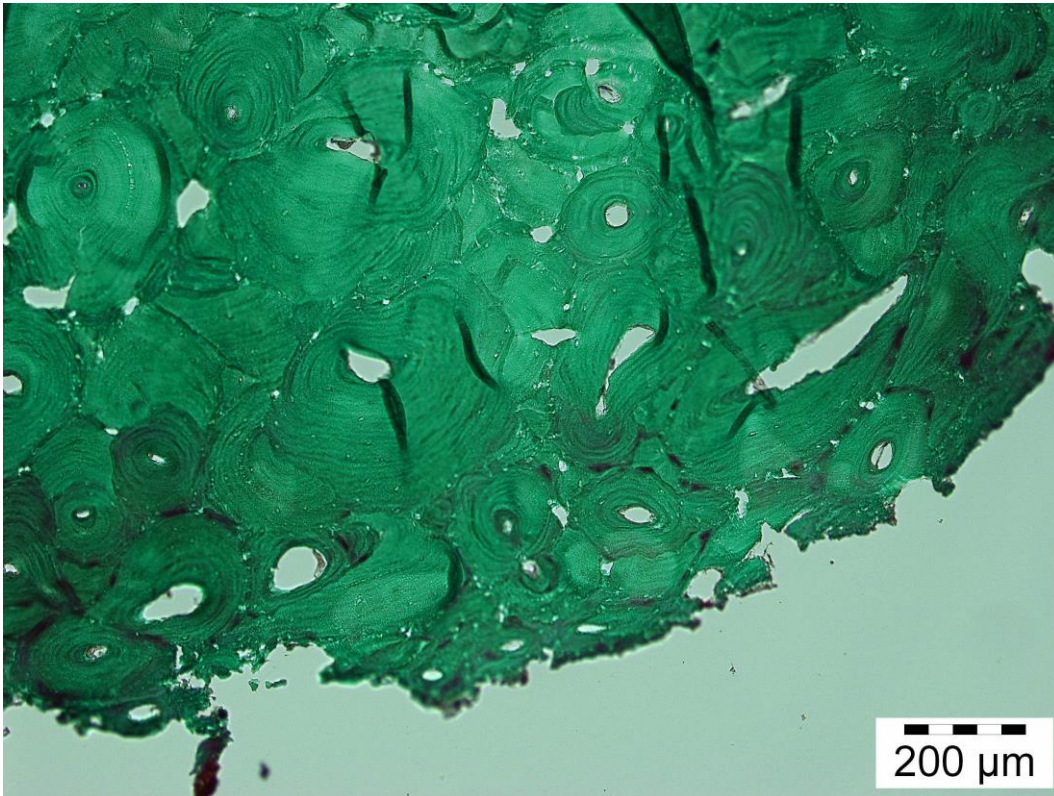


Figura 62. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.

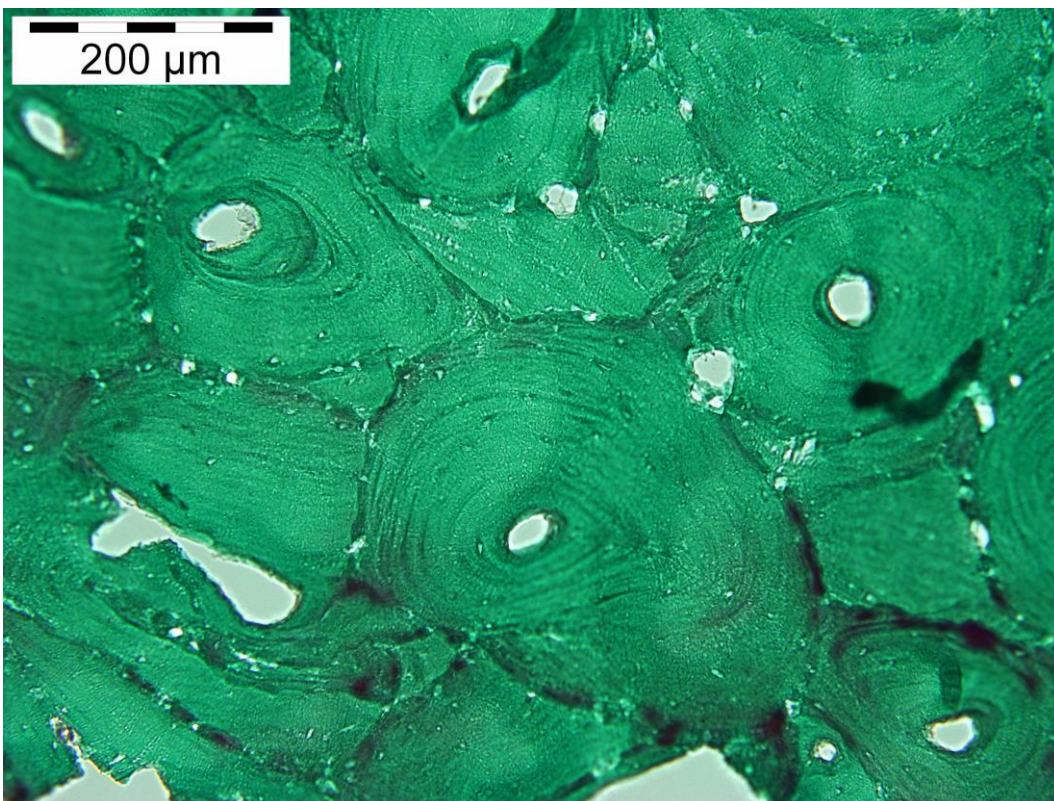


Figura 63. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

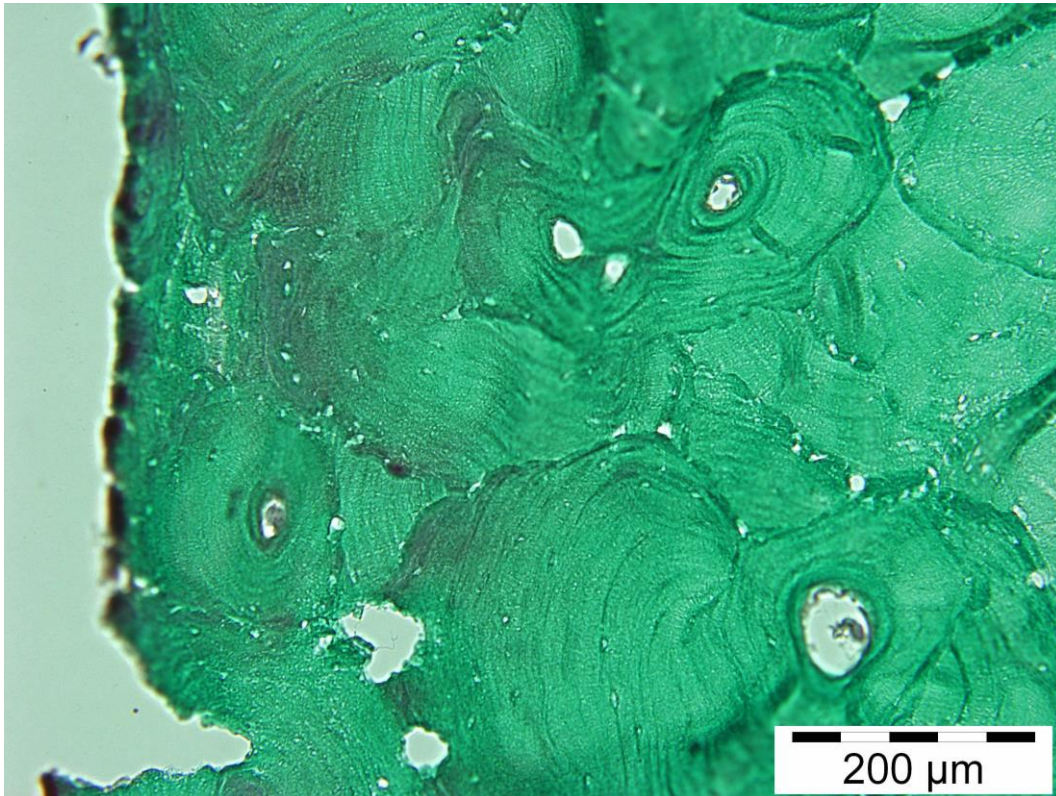


Figura 64. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

A las tres horas de inmersión no se observan grandes cambios. La estructura macroscópica se observa en buenas condiciones. A mayor aumento con el microscopio óptico la alteración producida por el medio alcalino es semejante que la muestra contemporánea sumergida durante dos horas. La porosidad continúa dándose sobre la línea externa de cemento de las osteonas y sobre los espacios ocupados por las osteonas primarias.

Llama la atención que la tinción ha dejado de ser homogénea, actuando con más intensidad sobre las laminillas externas de las osteonas delimitando cada uno de los complejos osteonales (Figura 68).



Figura 65. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.

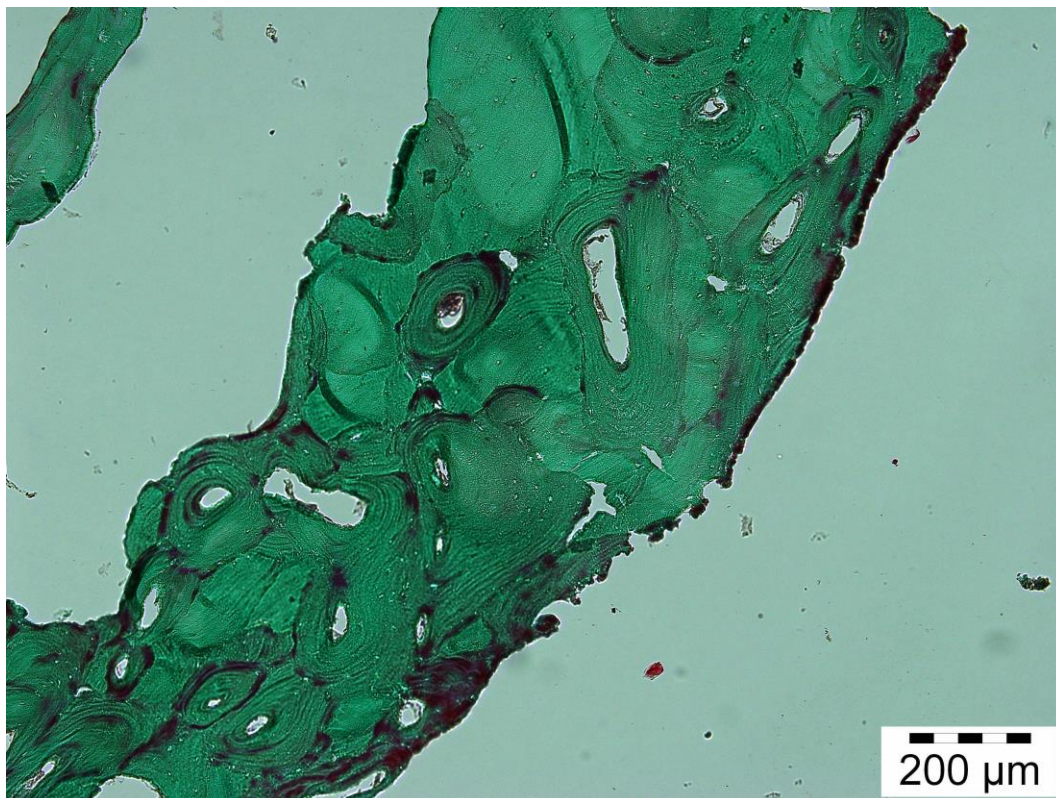


Figura 66. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.



Figura 67. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

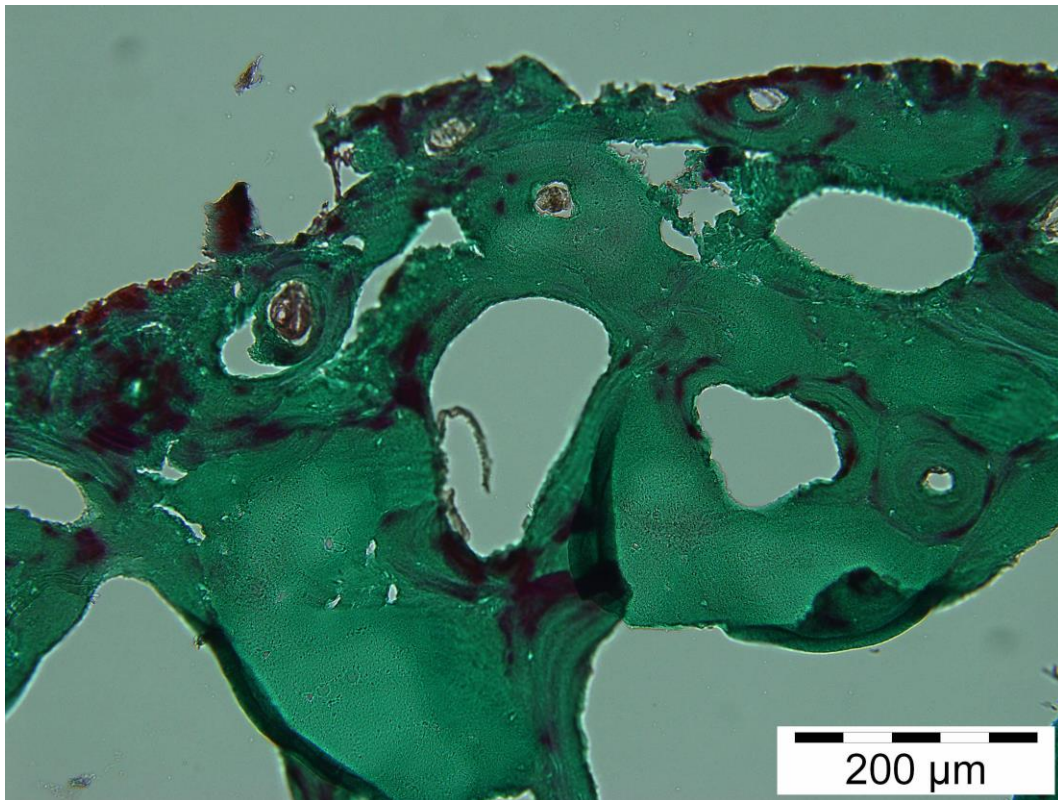


Figura 68. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

La muestra contemporánea sumergida durante cuatro horas en el medio alcalino presenta un nivel de afectación mucho mayor. Prácticamente ha desaparecido la cortical del hueso y se observa muy afectado el límite que recubre la cavidad medular. Aunque mantiene su estructura ósea, a mayor aumento observamos que la porosidad aparecida en la línea cementerial de las osteonas ha aumentado considerablemente de tamaño y en número llegando incluso, en algunos casos, a separar algunas osteonas de sus vecinas contiguas. En algunas osteonas el canal de Havers desaparece debido a que se ha destruido por acción del medio. También se observa en algunas lagunillas osteocíticas y en los canalículos que comunican estas lagunillas una fuerte alteración. En algunas ocasiones se produce la separación de las laminillas concéntricas de los complejos osteonales (Figura 72).

La tinción del corte histológico se muestra homogéneo, pero continúa con más intensidad en la región externa de las osteonas (Figura 71).



Figura 69. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.

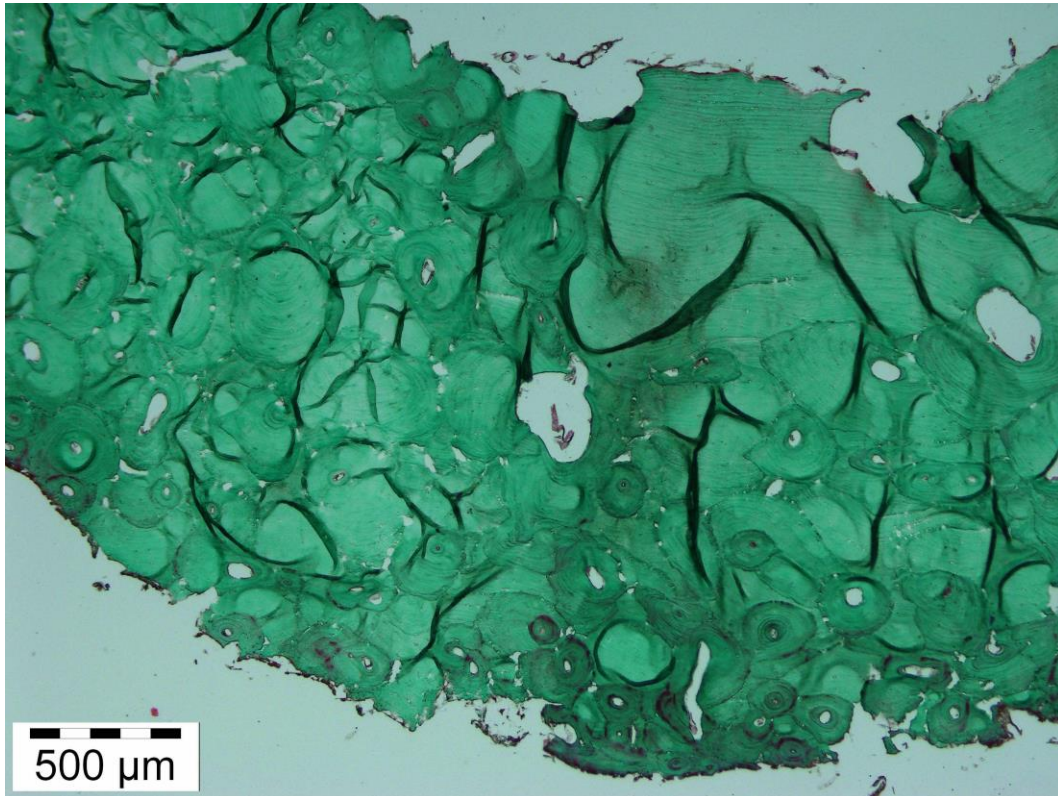


Figura 70. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 5 aumentos.

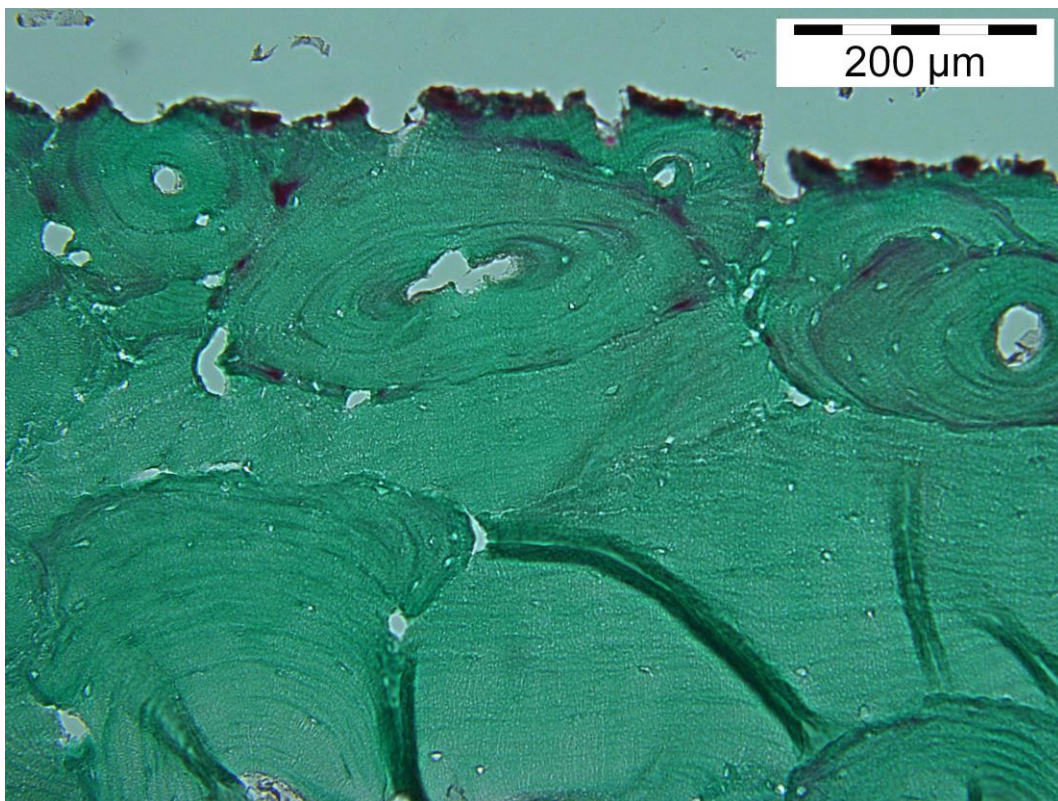


Figura 71. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

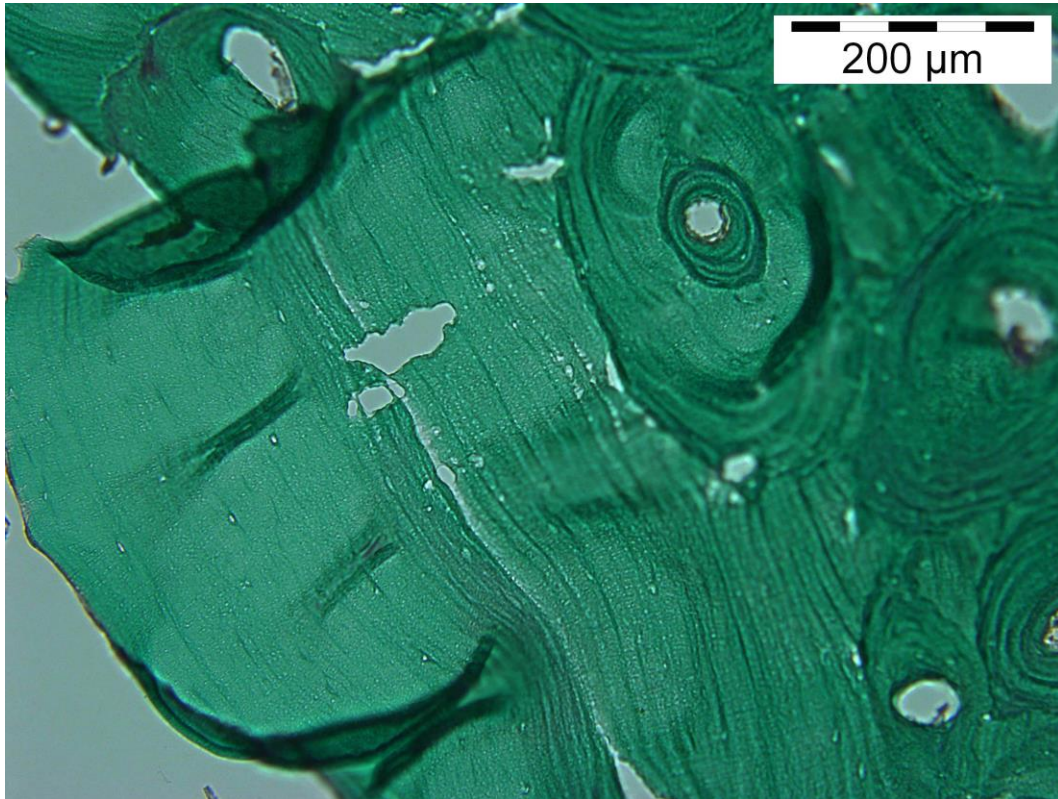


Figura 72. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

En el caso de las muestras arqueológicas sumergidas durante los mismos tiempos que las contemporáneas se observan cambios más intensos, pero con un patrón semejante.

La muestra arqueológica sumergida durante una hora ha perdido parte de la estructura original quedándose algunos fragmentos separados de la muestra (Figura 73) pero manteniendo la forma. En algunas secciones del hueso la cortical del hueso se ve más degradada que en otras donde se conserva completamente.

Existen regiones del corte que la muestra está desapareciendo creando grandes espacios vacíos (Figura 74) cuyo límite son dentados y sin orden alguno. El interior de algunos canales de Havers se ha degradado igual que los límites de las osteonas que presentan porosidad de distinto tamaño en su línea cementicial (Figura 75). En algunas de las osteonas se observa que comienza a afectarse algunas líneas lamelares empezando en las lagunillas osteocíticas y continuando por el límite

entre las laminillas, o mejor dicho, por los canalículos que comunican las lagunillas (Figura 76).

En general la tinción es homogénea, aunque hay zonas más teñidas intensamente como son los límites osteonales (Figura 74).

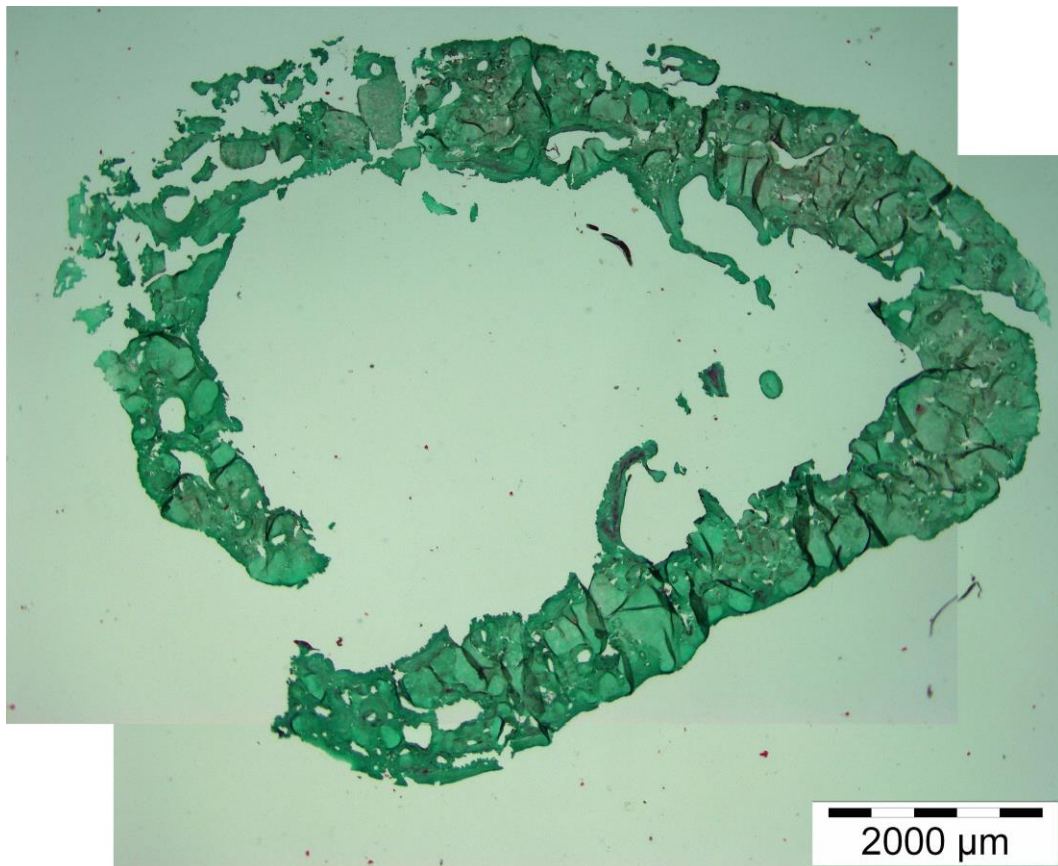


Figura 73. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.

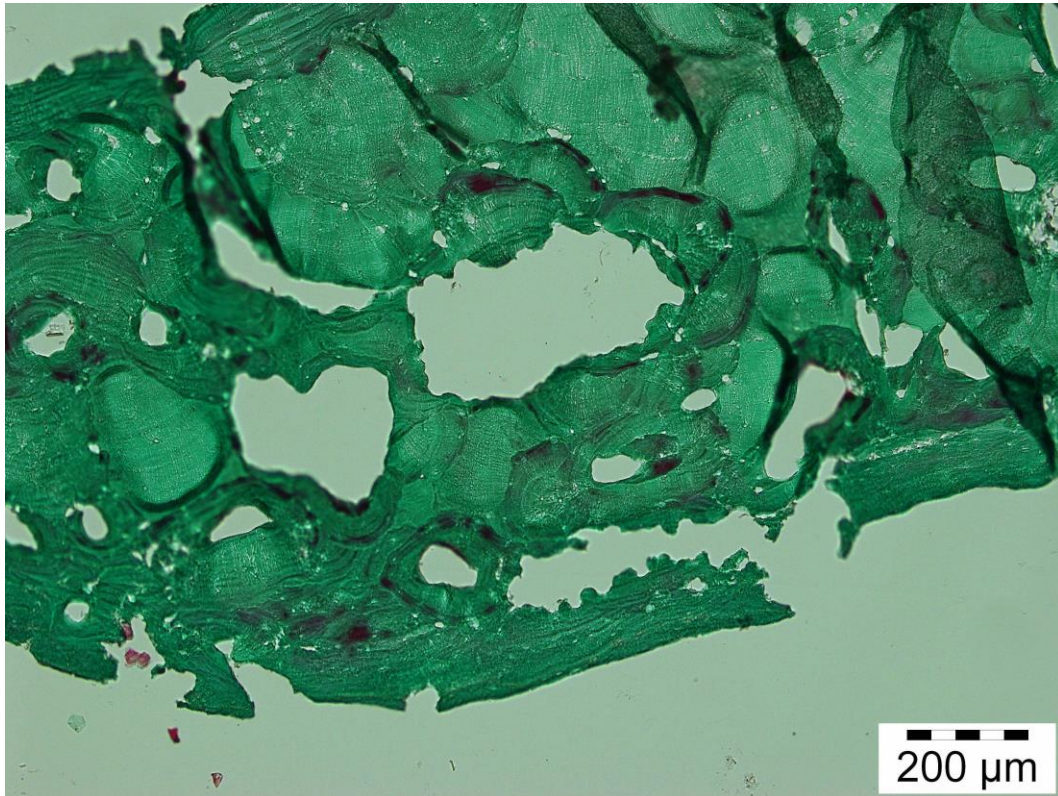


Figura 74. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.



Figura 75. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.

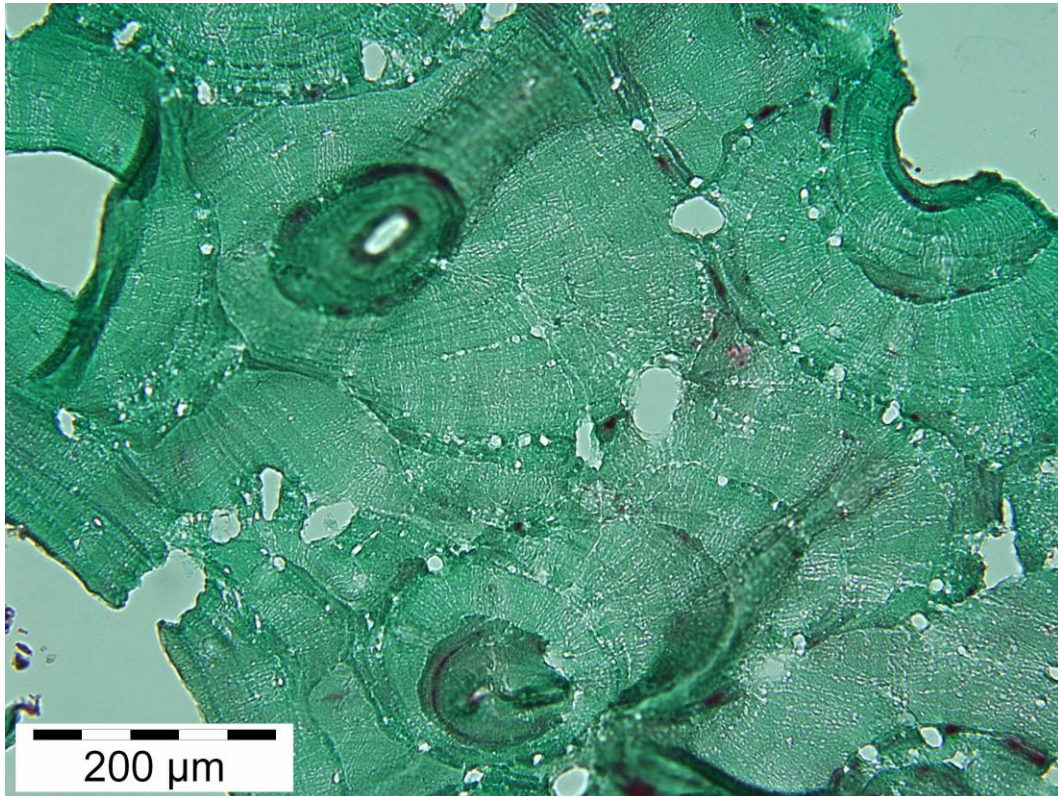


Figura 76. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

La muestra arqueológica sometida durante dos horas revela un mayor efecto de degradación que la anterior. Aunque conserva su estructura original gran parte de la muestra se ha perdido (Figura 77).

La acción del medio alcalino produce grandes oquedades cuyo origen se centra en los canales de Havers y en los límites osteonales. A su vez estos espacios no tienen un frente liso, sino todo lo contrario dando un aspecto sinuoso y quebradizo (Figura 80). A partir de las dos horas se hacen visibles los canalículos que parten de las lagunillas osteocíticas aumentando de tamaño.

La tinción sigue siendo más intensa en la línea cementicial de las osteonas.



Figura 77. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.

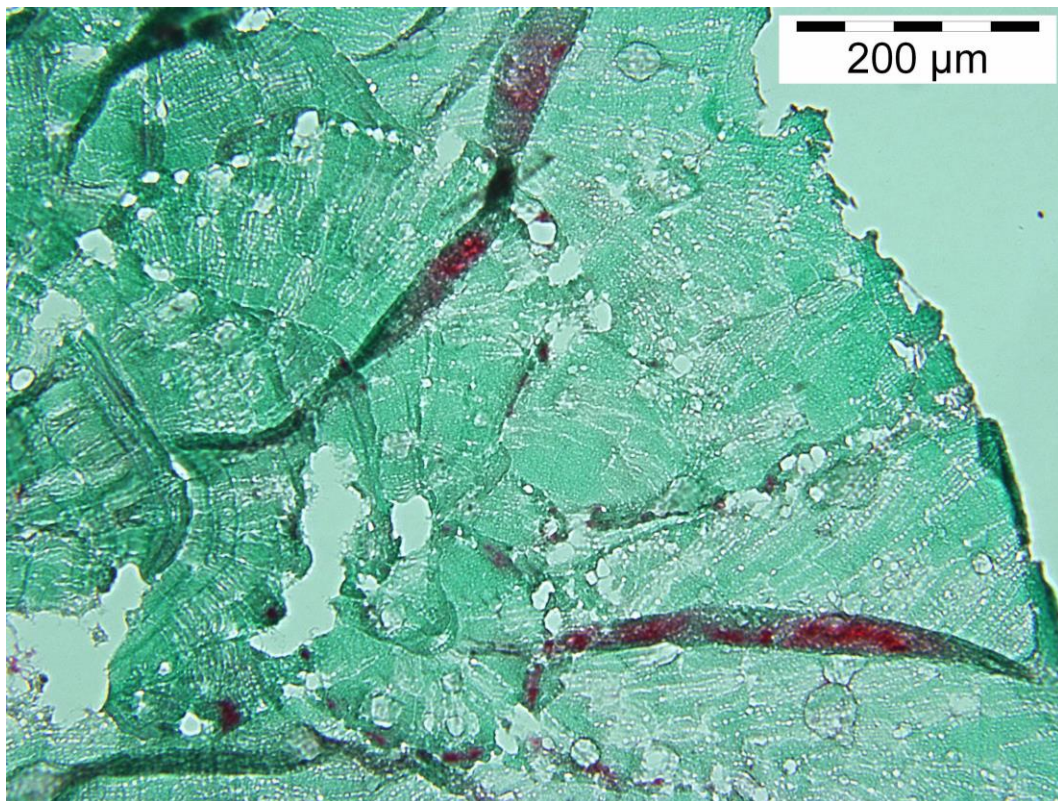


Figura 78. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.

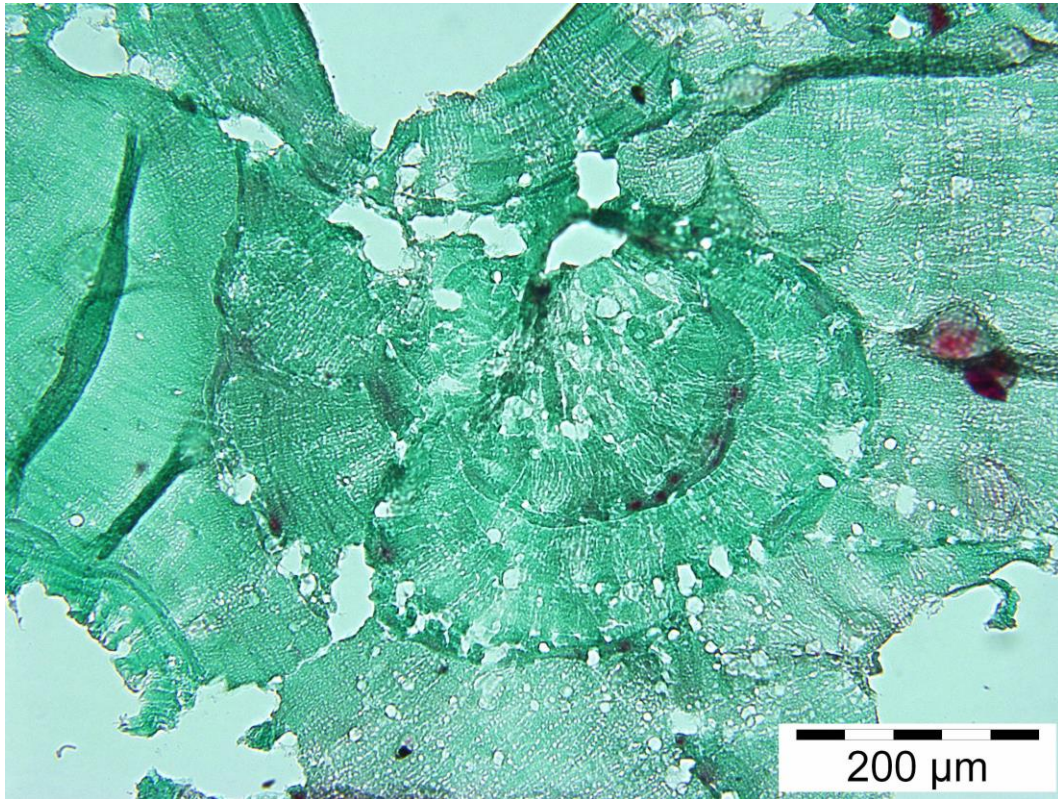


Figura 79. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

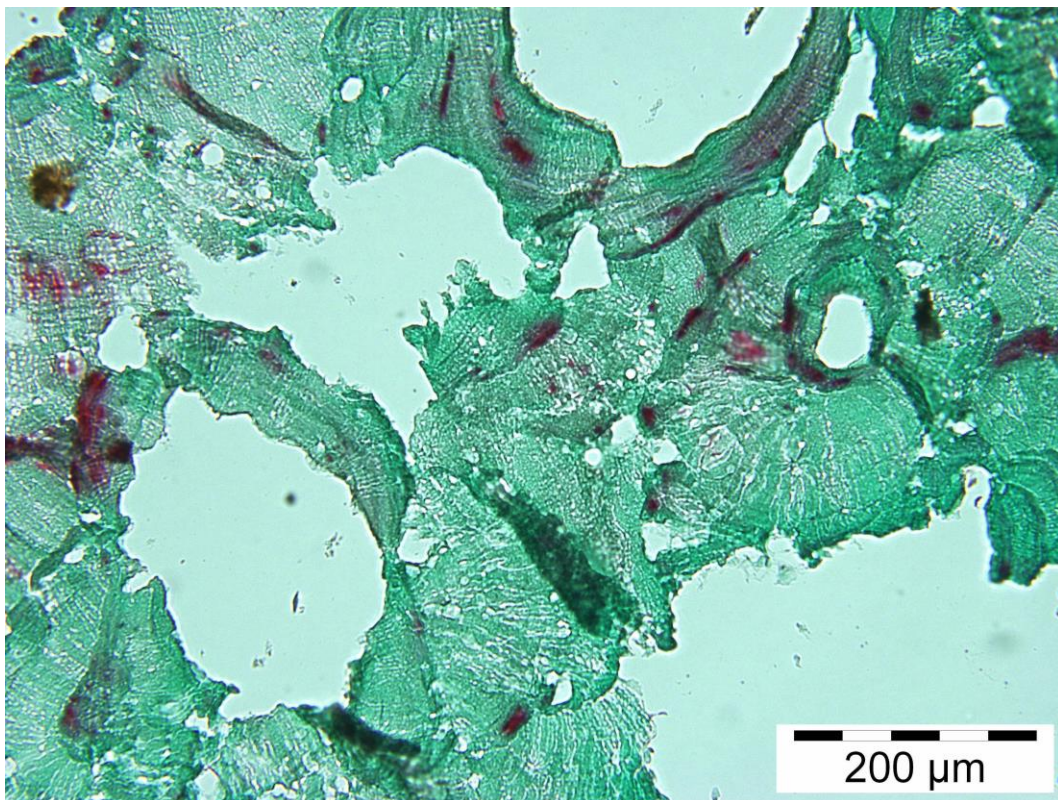


Figura 80. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

A partir de las tres horas de inmersión en un medio alcalino con un pH extremo se hace más evidente la degradación de la muestra. El medio destruye parte de la estructura original, sin destacar grandes cambios de la original del hueso. La cortical del hueso apenas se conserva en toda la muestra arqueológica.

El medio afecta de manera generalizada a la organización de las osteonas y del colágeno que las forma. El efecto degradante altera a las laminillas de las osteonas que las separa unas de otras combinándose con la destrucción de los canalículos y de las lagunillas osteocíticas (Figura 84).

La tinción es más intensa en aquellas zonas donde se conserva mejor el colágeno que aún no ha sido afectado por el medio.

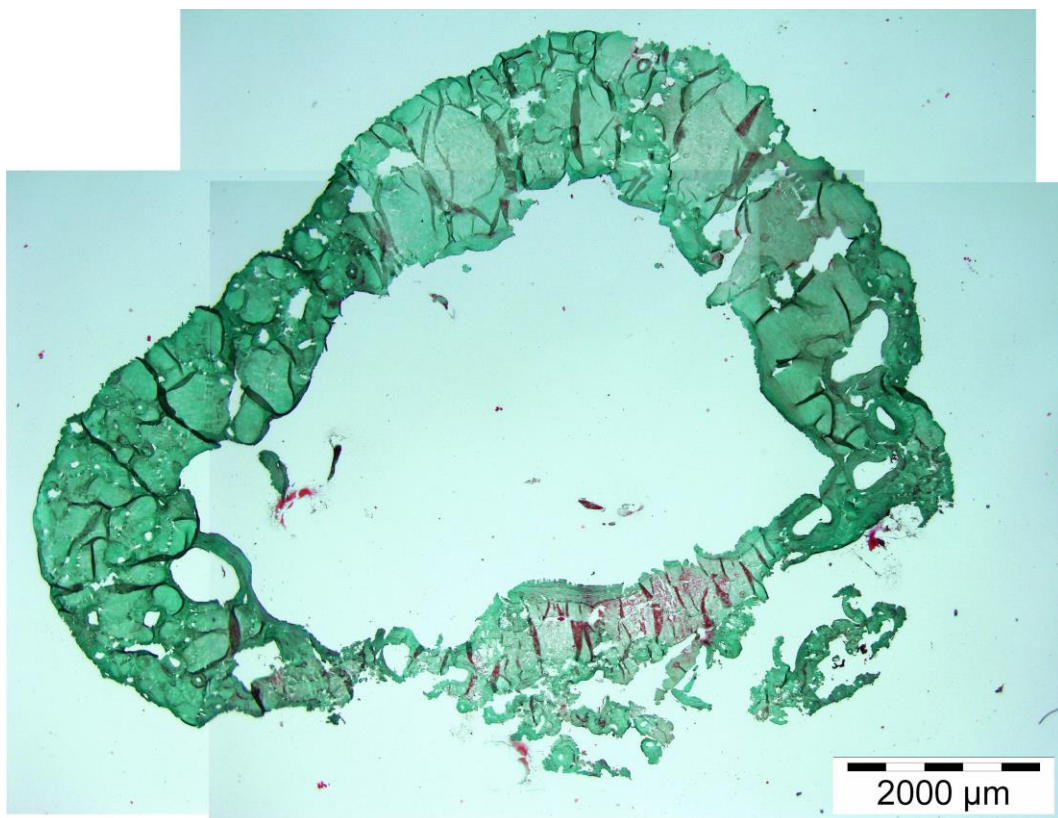


Figura 81. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.

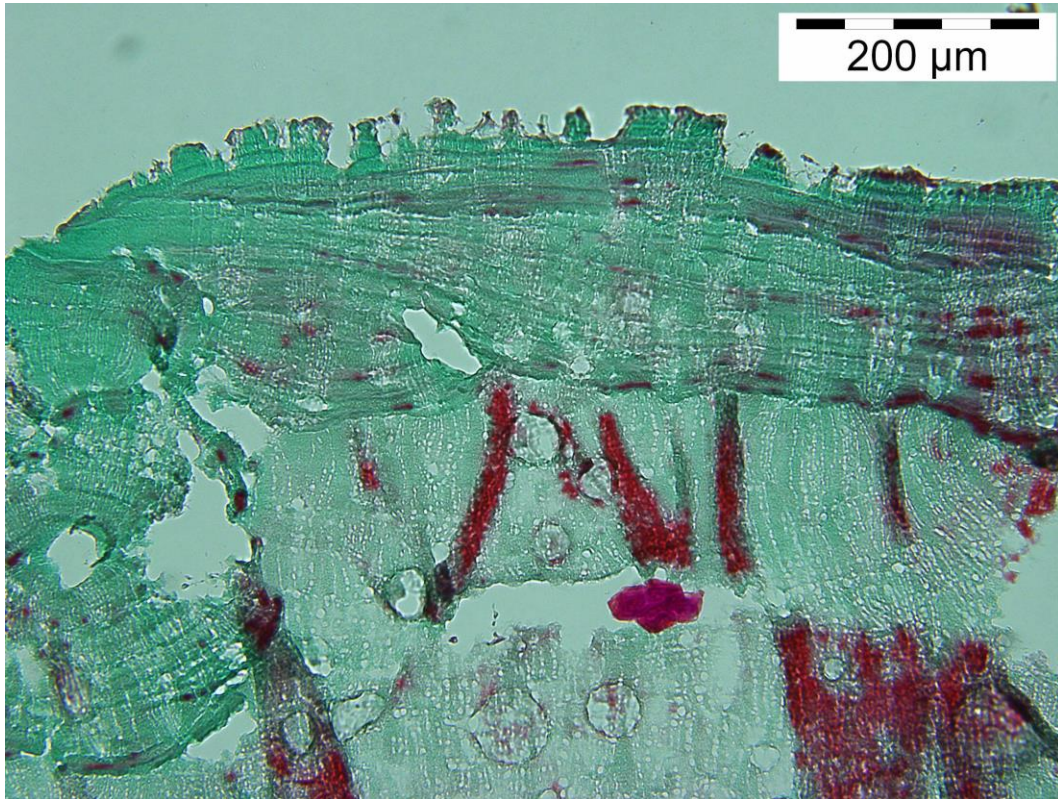


Figura 82. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

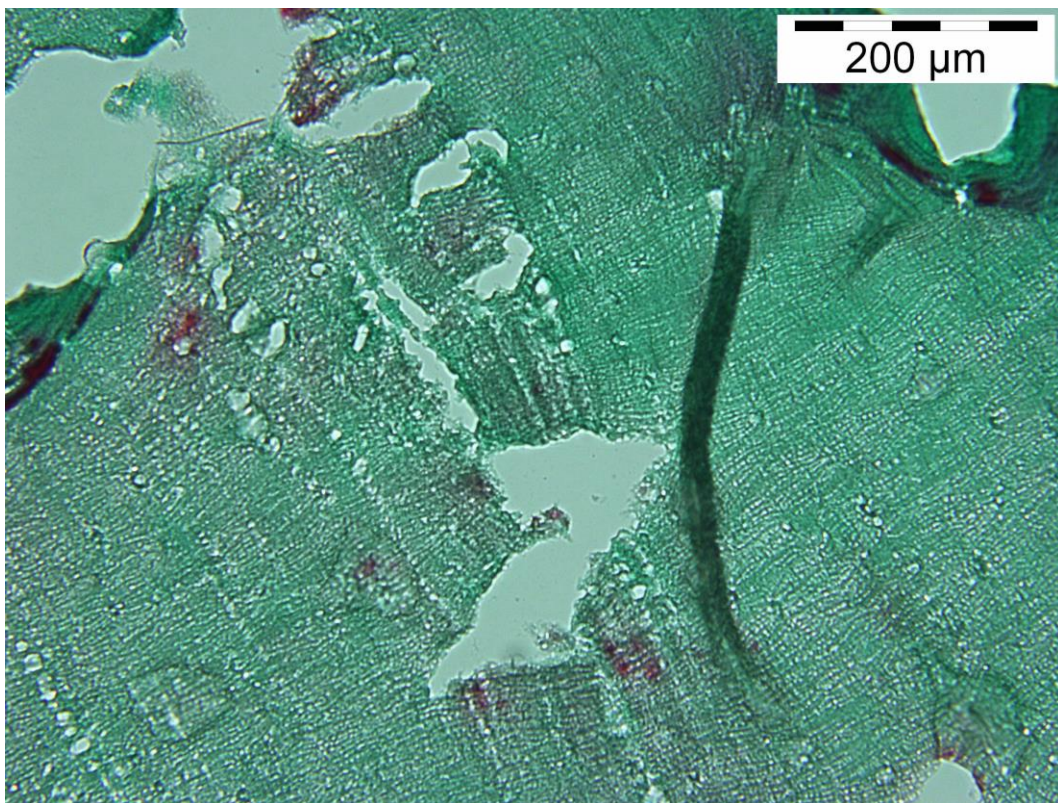


Figura 83. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.



Figura 84. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

A las cuatro horas de inmersión en el medio alcalino se puede observar que los efectos degradantes en el hueso son muy parecidos a los destacados en la muestra arqueológica sumergida durante tres horas. Es decir, se encuentran alteradas todas las estructuras óseas antes descritas. La cortical del hueso prácticamente ha desaparecido. Las osteonas se encuentran más afectada a nivel de las laminillas concéntricas, sobre todo por la alteración de los canalículos y de las lagunillas osteocíticas (Figuras 86 y 87). Se observan grandes huecos que afectan a dos o más osteonas.

La tinción sigue siendo homogénea, aunque más intensa en los límites externos de los complejos osteonales (Figura 87).

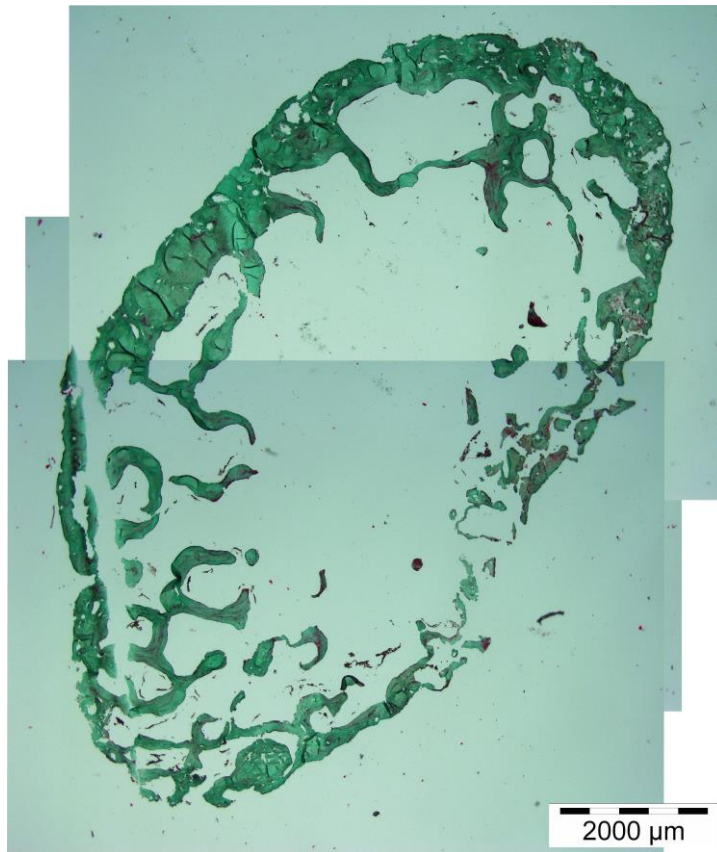


Figura 85. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.

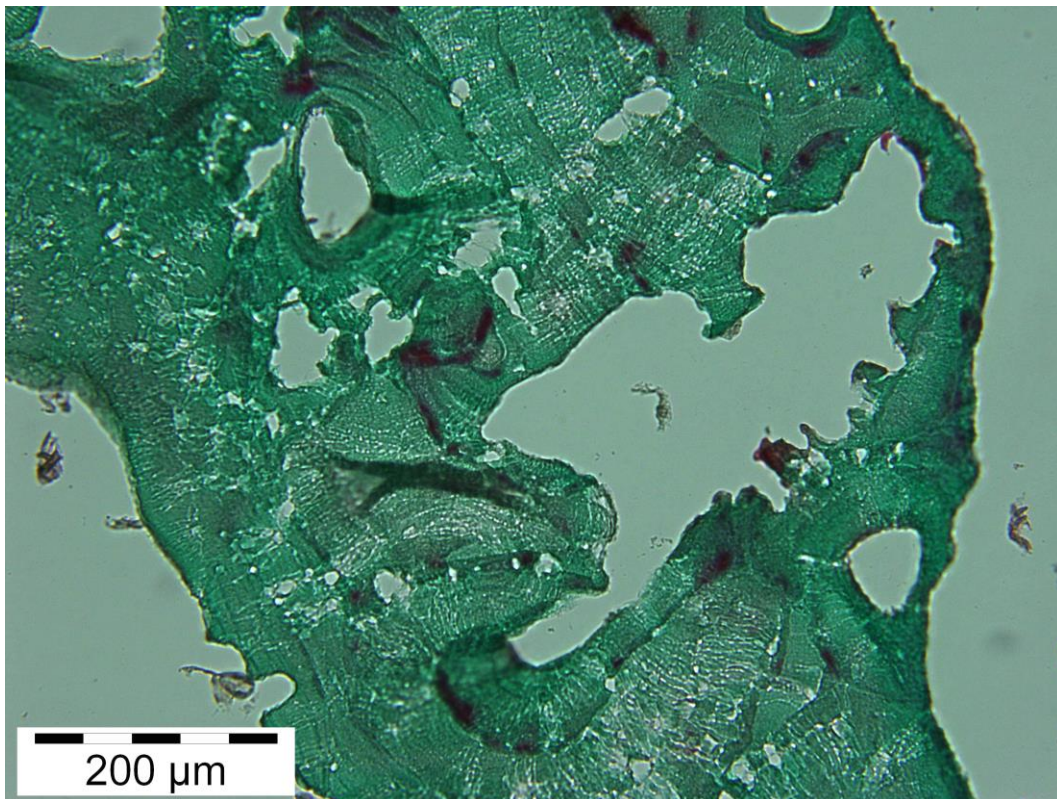


Figura 86. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.

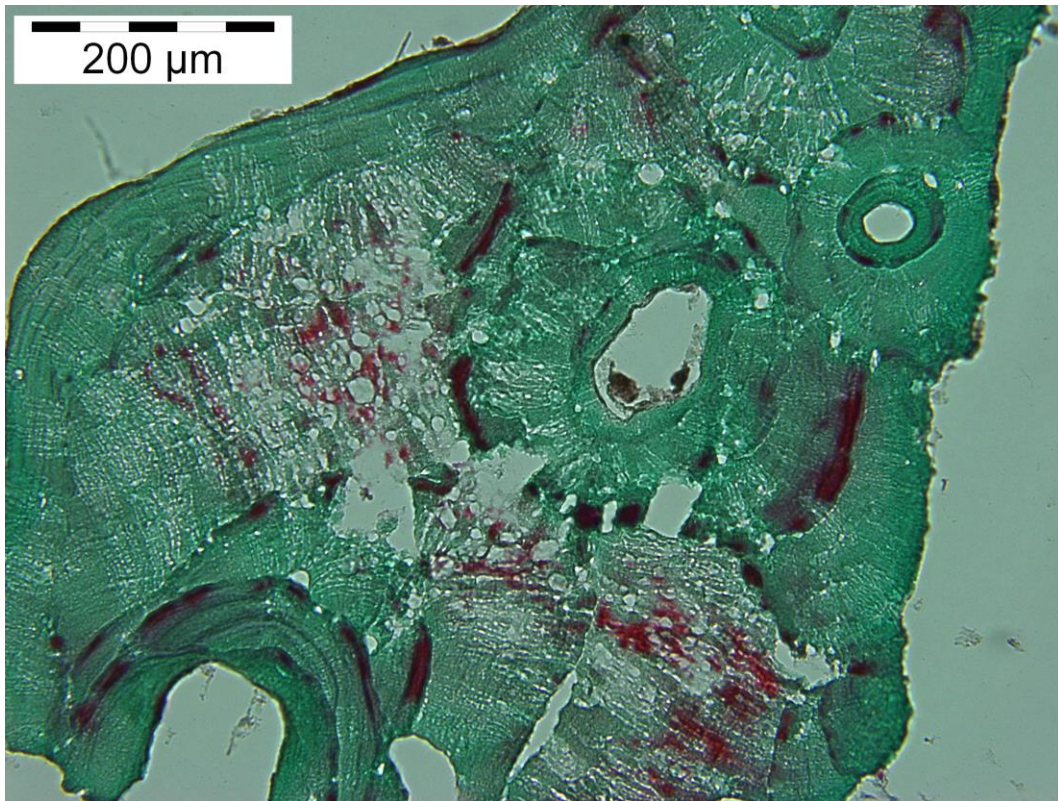


Figura 87. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

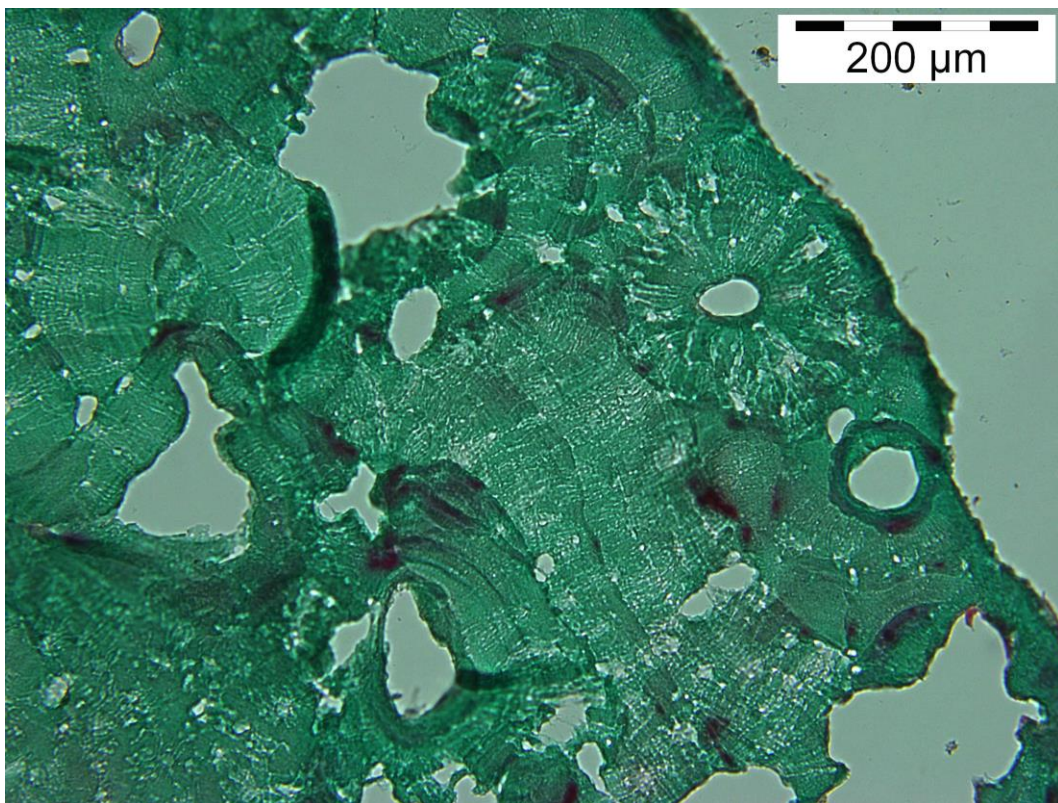


Figura 88. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

## Análisis de imagen

El análisis de imagen de las muestras contemporáneas sumergidas en un medio alcalino (hidróxido de sodio 12,5M) con un pH entorno a 13 nos muestra que durante las dos primeras horas la muestra ha perdido entre un 7 - 8 % de la composición. A partir de las 3 horas este porcentaje aumenta hasta un 18,20% y un 13,77% en la muestra a las cuatro horas (Figura 89).

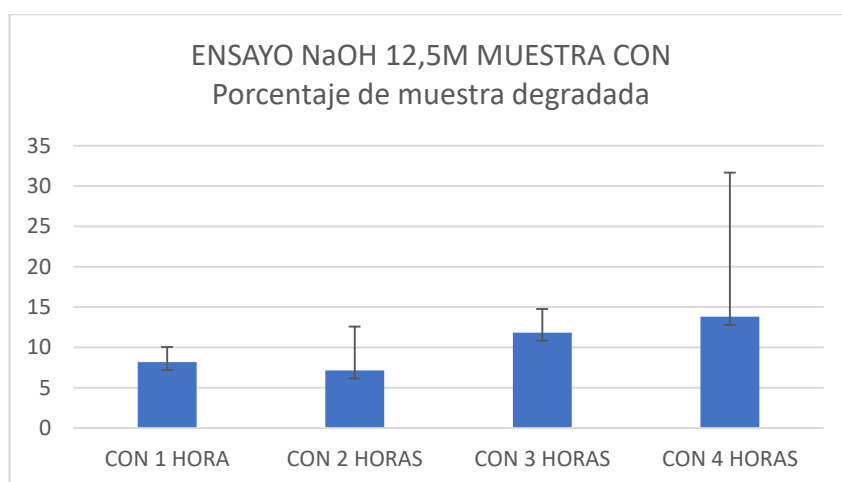


Figura 89. Gráfico con los porcentajes de degradación de la muestra contemporánea expuesta a un medio de NaOH 12,5M durante 1, 2, 3 y 4 horas.

Los resultados obtenidos con la muestra arqueológica indican que, en la primera hora de exposición la muestra pierde un 34,46% de media. A partir de las dos horas se incrementa a un 51,91%. A las tres horas un 59,16%. Y a las cuatro horas un 37,23% (Figura 90).

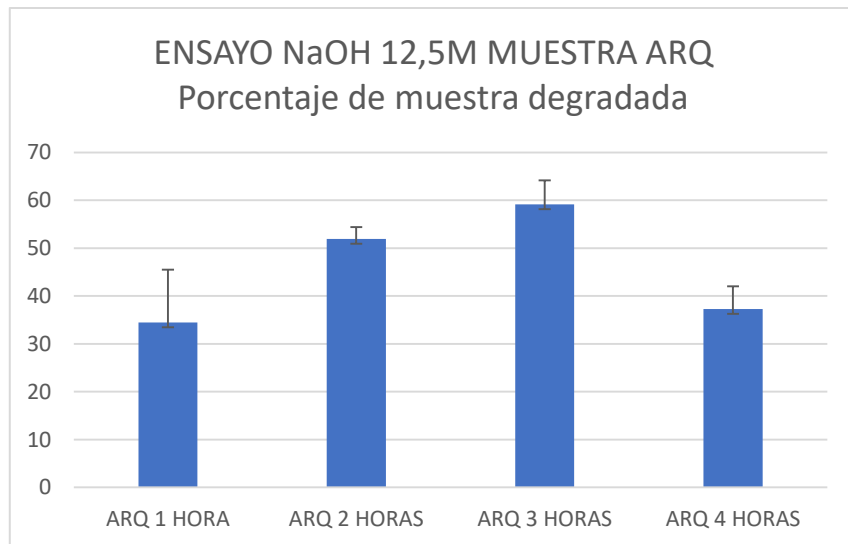


Figura 90. Gráfico con los porcentajes de degradación de la muestra arqueológica expuesta a un medio de NaOH 12,5M durante 1, 2, 3 y 4 horas.

El análisis de varianza (ANOVA) de los datos obtenidos en la cuantificación del área degradada determina que sí existen diferencias significativas entre las muestras contemporáneas y el tiempo de exposición a un medio alcalino (Anexo, Tabla 5).

El análisis de varianza (ANOVA) para la muestra arqueológica determina que sí existen diferencias significativas según el tiempo en el que han estado expuestas en un medio alcalino (Anexo, Tabla 6).

## **8.6. Ensayo en un medio de NaOH 0,1M durante varios días**

A continuación, se describen los resultados obtenidos a partir de los cortes histológicos realizados sobre una muestra de hueso contemporánea sumergida durante 5, 7, 11 y 13 días en un medio alcalino de hidróxido de sodio 0,1M.

La muestra sumergida durante 5 días presenta efectos muy similares a los encontrados en los últimos estadios observados en el experimento con molaridad 12,5.

Los límites externos e internos de la muestra se encuentran alterados en la mayor parte de la muestra llegando incluso a separarse en algunas regiones (Figura 92). La mayor parte de las osteonas tienen afectadas la línea de cemento. En muchos espacios intersticiales ha desaparecido el colágeno creándose grandes oquedades. Sin embargo, el interior de las osteonas mantiene su estructura original mostrándose inalterada en la mayoría de ellas. En algunas regiones, donde la concentración de hueso compacto es mayor, se inicia el comienzo de separación de las láminas de colágeno (Figura 94).

La tinción es homogénea en toda la muestra, siendo algo más intensa en aquellas regiones donde está menos afectada la muestra.

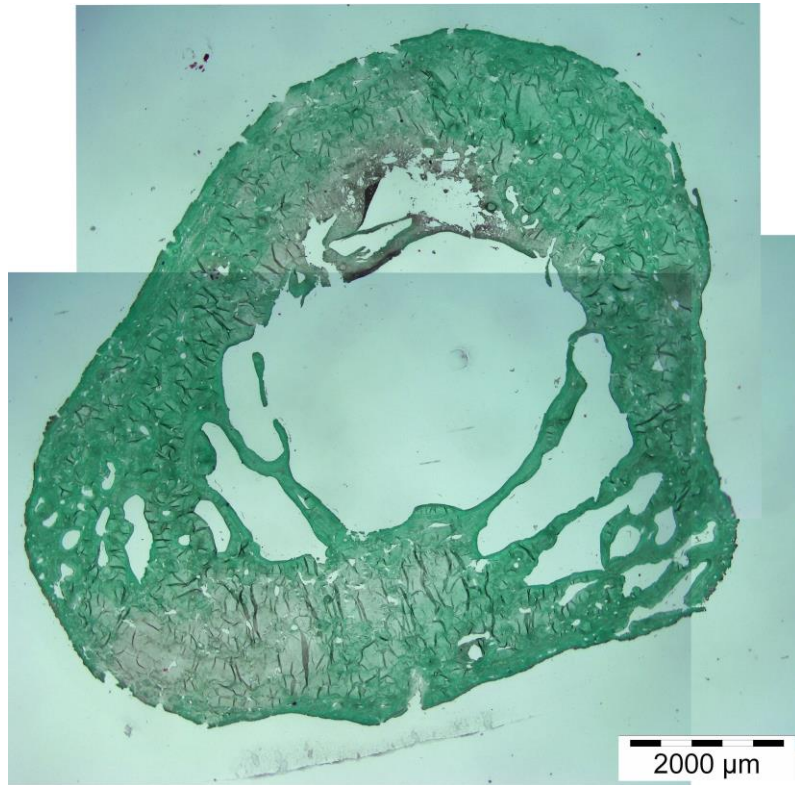


Figura 91. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 5 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.

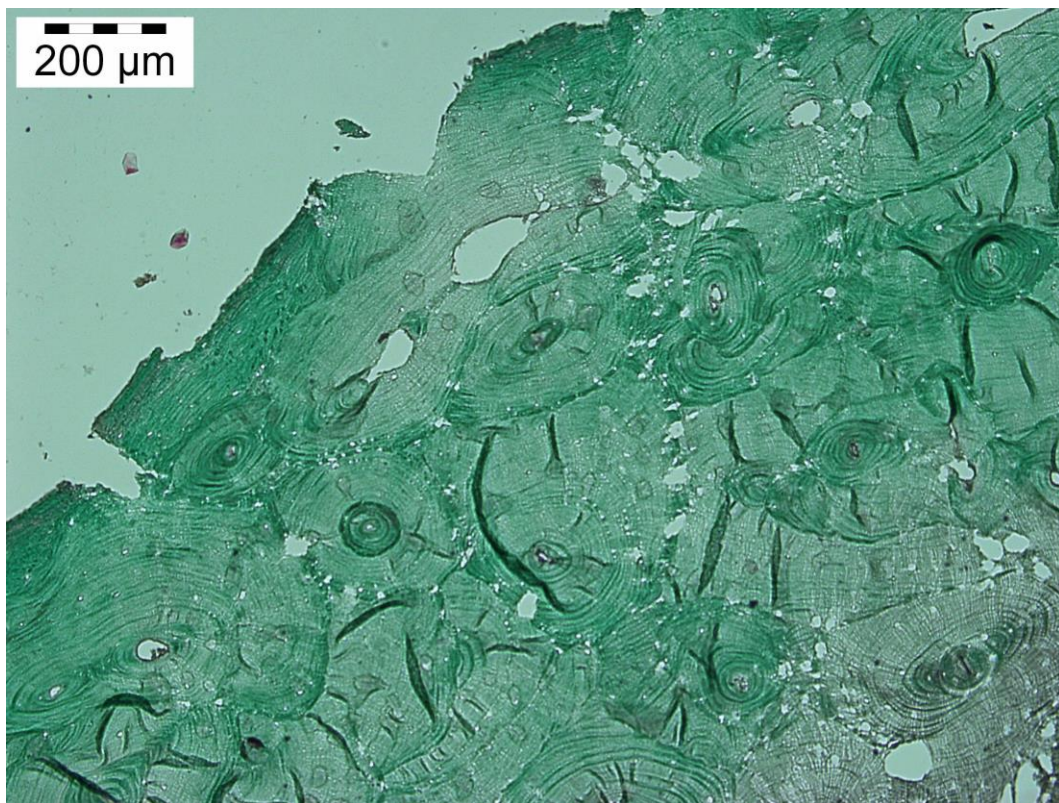


Figura 92. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 5 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.

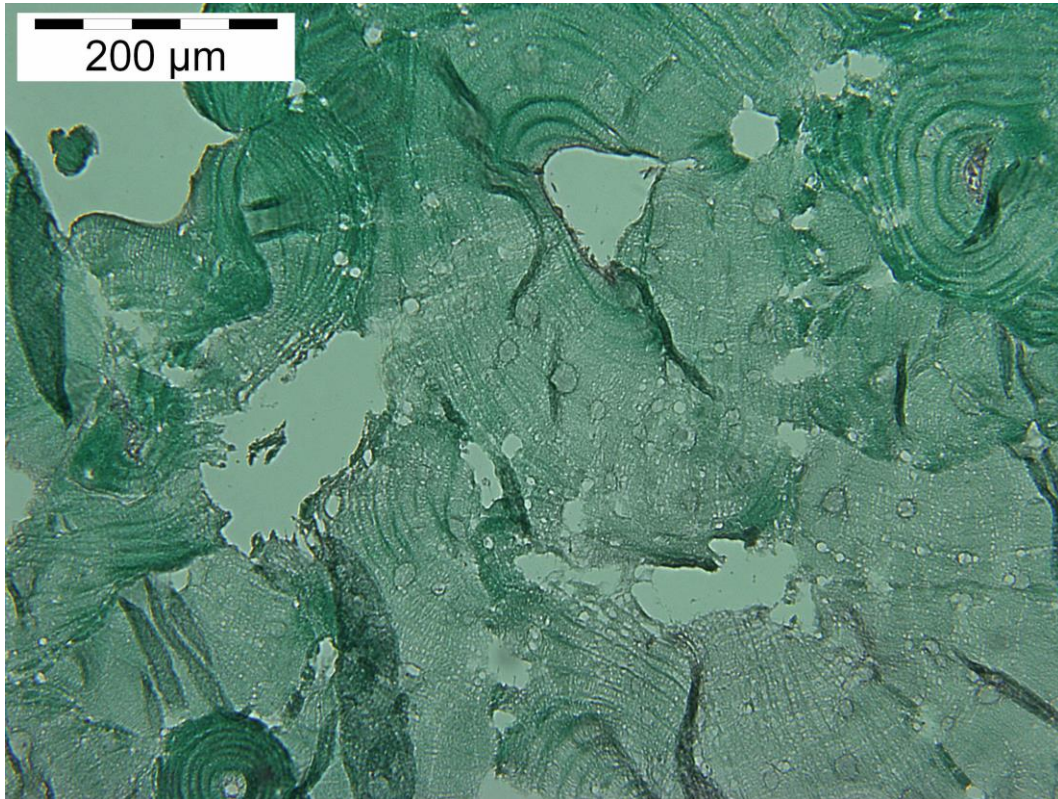


Figura 93. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 5 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

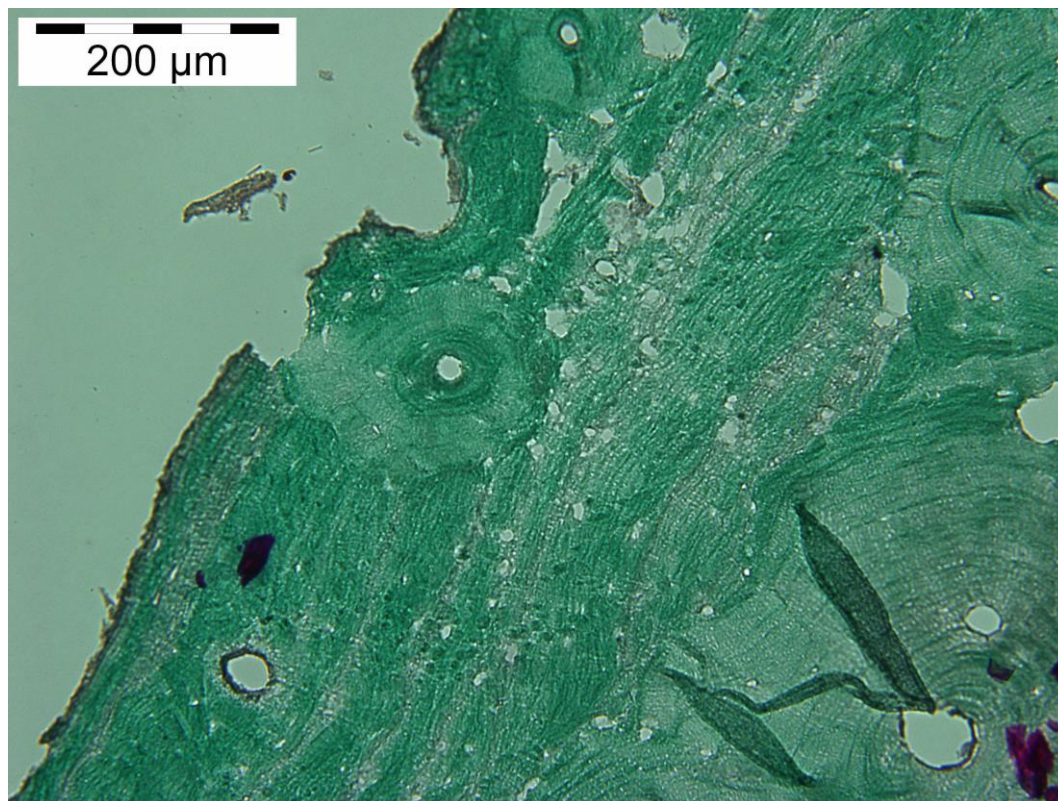


Figura 94. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 5 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

Los resultados para la muestra contemporánea sumergida durante 7 días son similares a los de la muestra expuesta durante 5 días, pero se observa mayor degradación los límites externos e internos del hueso. Aunque la muestra conserva su estructura original, tanto los límites externos como los internos del hueso presentan grandes espacios de degradación (Figura 95). Igual que en la anterior el espacio intersticial y la línea de cemento se ven afectadas aumentando la porosidad en ellos. En general el interior de las osteonas se conserva intacto, pero en aquellas regiones donde es más marcado el efecto degradante del hidróxido de sodio, presenta un colágeno alterado. Continúa la separación las fibras de colágeno y se produce una alteración de los canalículos y los espacios osteocíticos (Figuras 96 y 97).

La tinción sigue siendo homogénea, pero permite distinguir aquellas regiones de la muestra que tienen mejor estado de conservación, o lo que es lo mismo, que no están siendo alteradas por el medio.

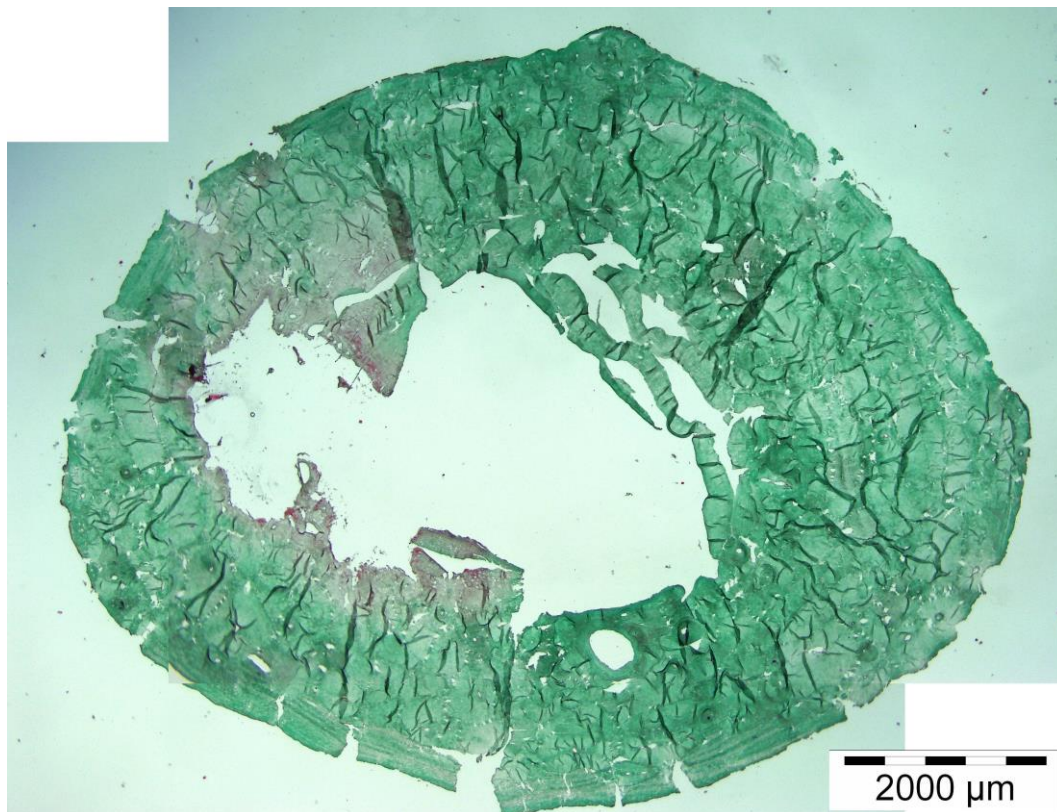


Figura 95. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 7 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.

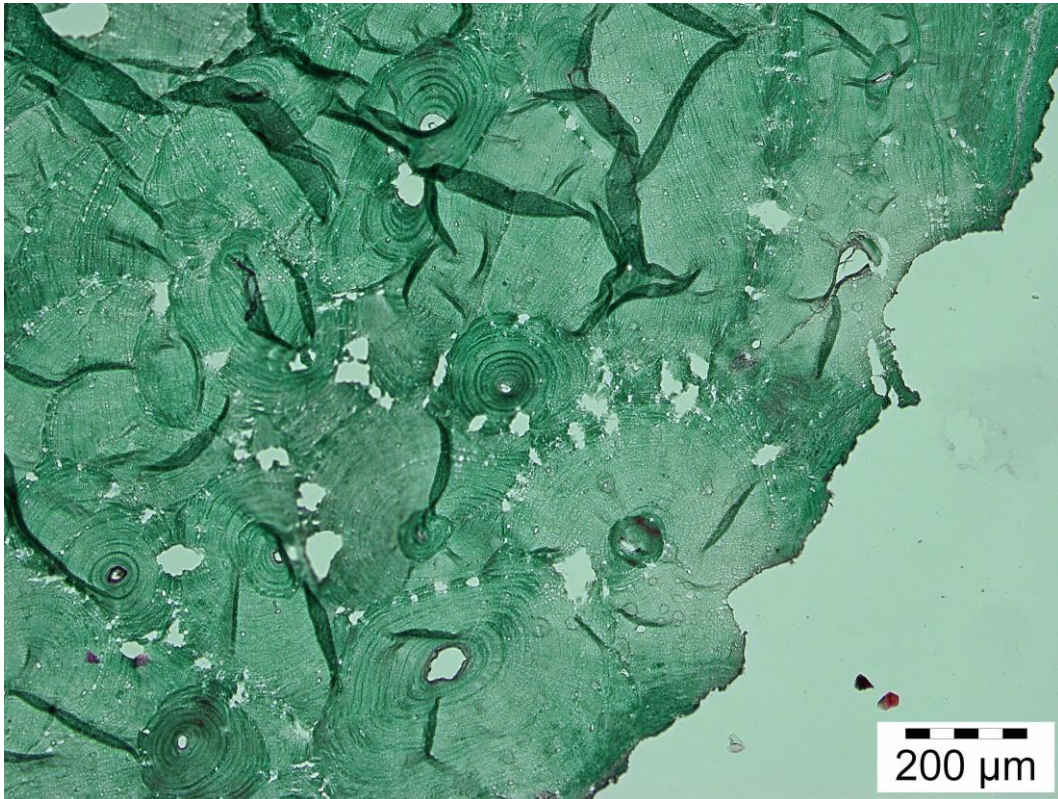


Figura 96. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 7 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.

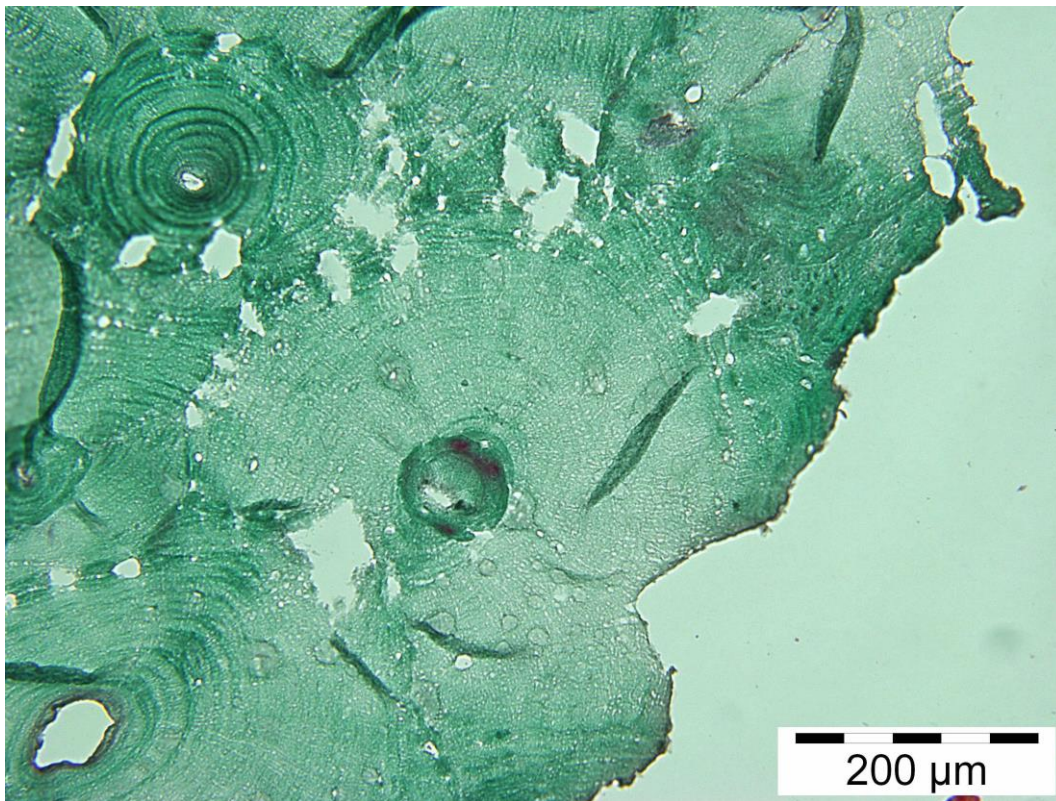


Figura 97. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 7 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

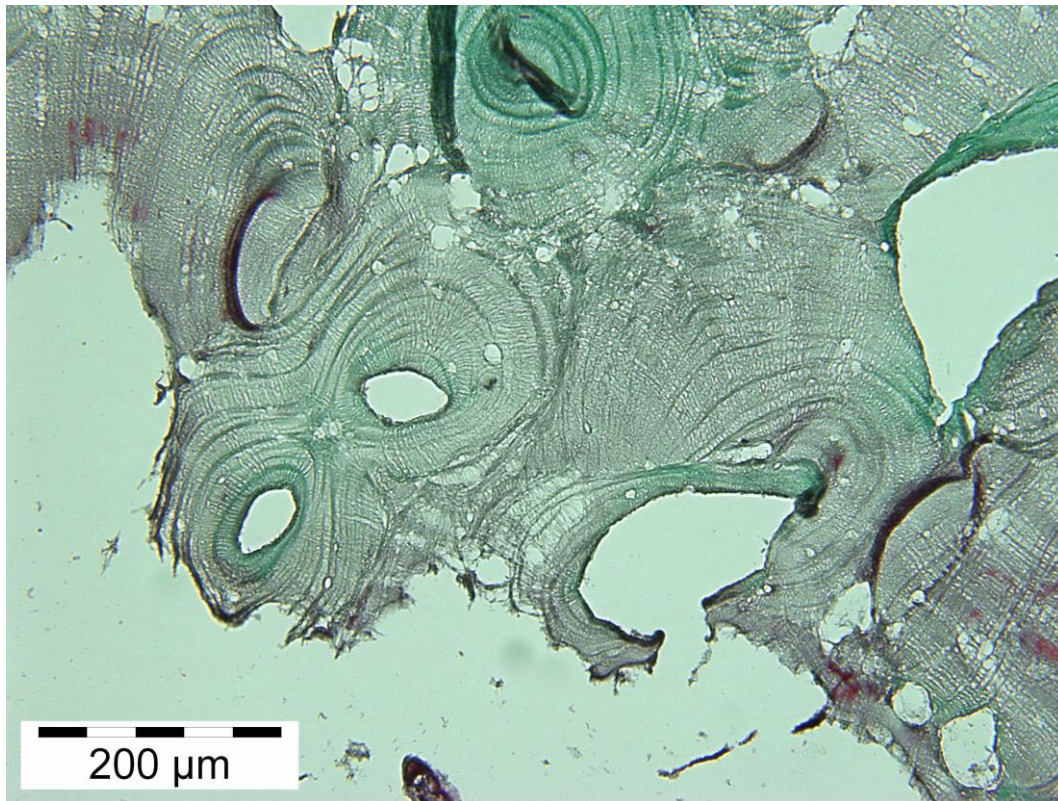


Figura 98. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 7 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

La muestra contemporánea expuesta durante 11 días mantiene su estructura natural (Figura 99). Los límites externos e internos del hueso están siendo afectados por el medio alcalino. Se observan alteraciones sobre la superficie de ambos en forma de invaginaciones que penetran toda la zona subperióstica. Aunque las osteonas conservan su estructura y están claramente diferenciadas, las laminillas externas están siendo muy modificadas por el medio (Figura 101).

El colágeno continúa degradándose permitiendo la separación de las laminillas en aquellas osteonas más afectadas. En todo el corte histológico las lagunillas osteocíticas y los canaliculos que las comunican están siendo degradados haciéndolos muy visibles al microscopio óptico. Aumenta la porosidad sobre los espacios intersticiales. El interior de algunos canales de Havers también han aumentado de tamaño (Figura 99).

Como en la muestra anterior, la tinción es homogénea en toda la muestra, pero más intensa en aquellas regiones de la muestra que no se han alterado de igual manera.



Figura 99. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.

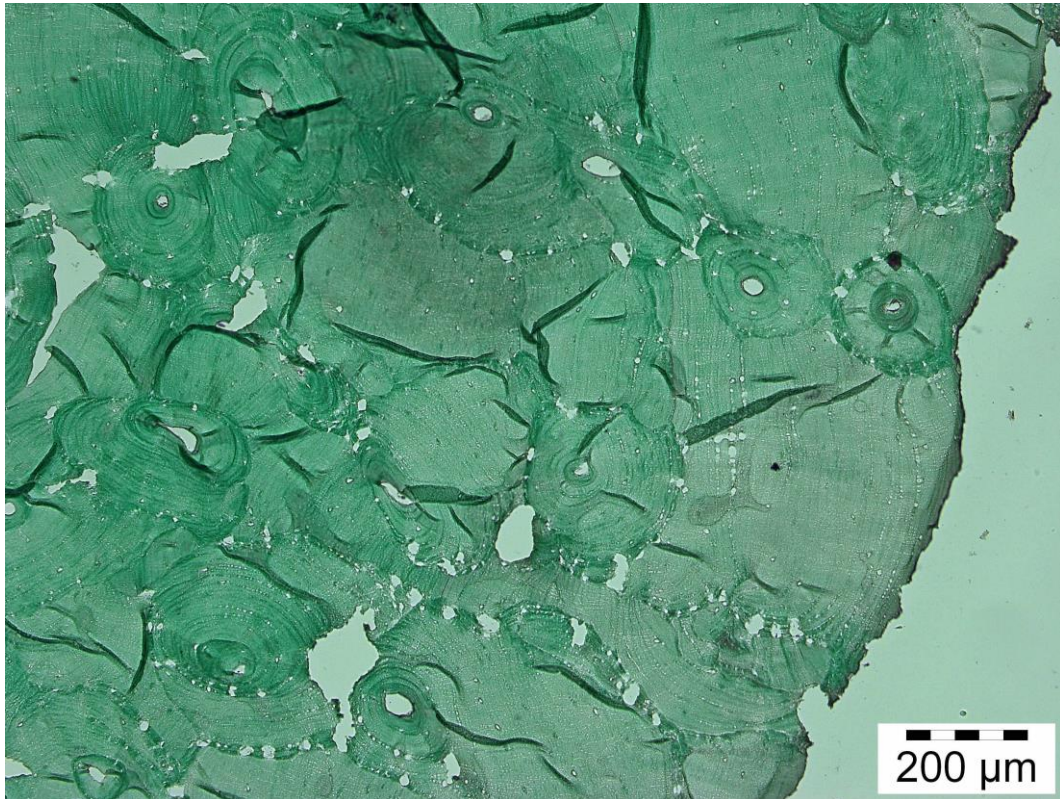


Figura 100. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.

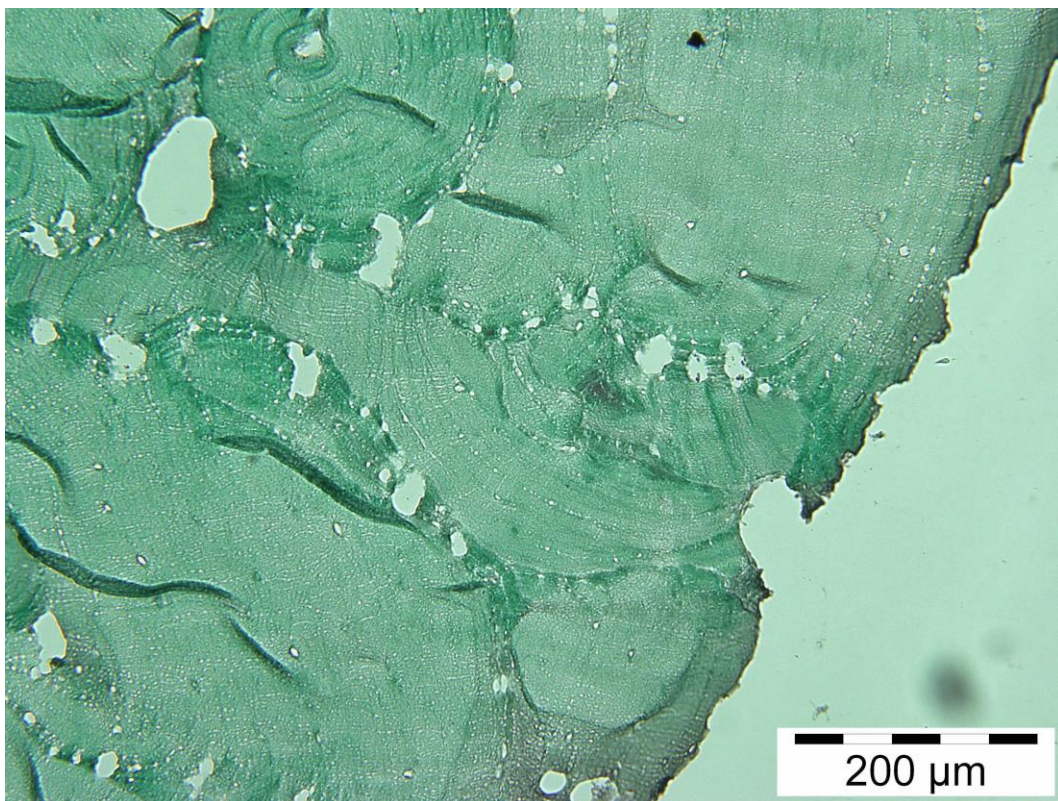


Figura 101. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

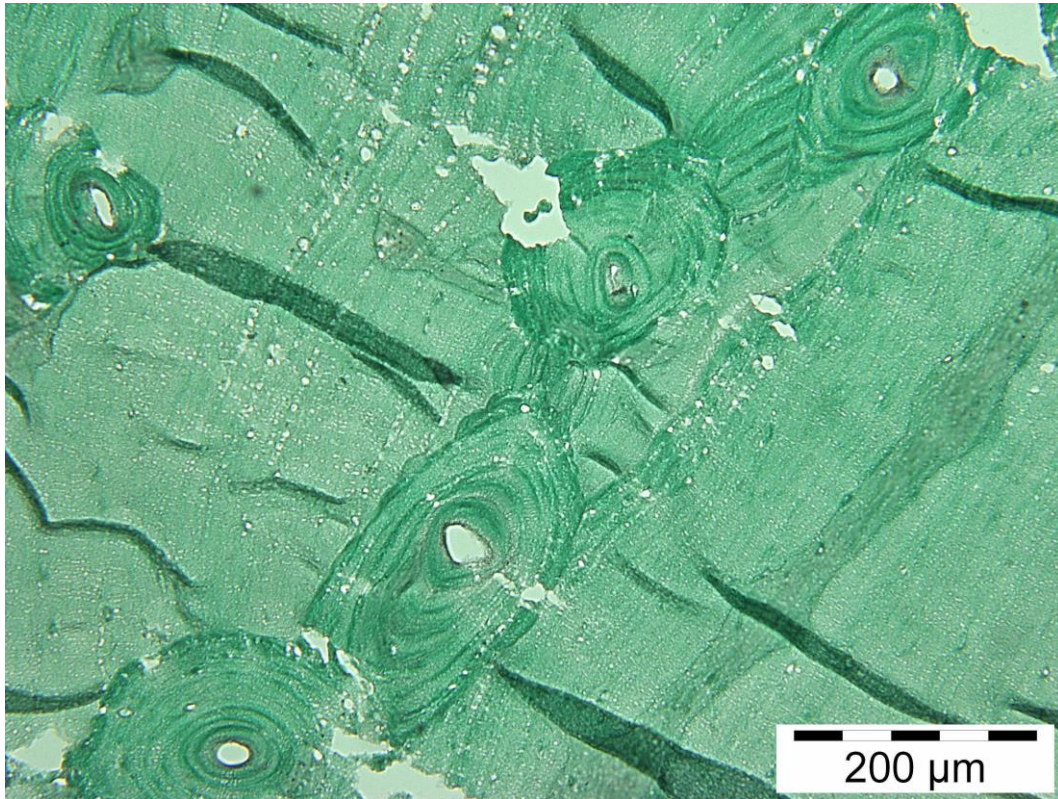


Figura 102. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

El nivel máximo de degradación se observa en la muestra contemporánea que más tiempo ha estado sumergida en el medio, 13 días.

Conserva su estructura ósea macroscópica, aunque tanto la cortical como el límite medular de la muestra están altamente afectadas como consecuencia de la degradación del colágeno principalmente. Se observa claramente la separación de las laminillas de colágeno próximas a la cortical (Figura 106). En general toda la muestra presenta una alta degradación a nivel de las laminillas de colágeno que conforman la estructura de las osteonas. La porosidad es muy alta y las oquedades han aumentado de tamaño (Figura 106). La presencia de canalículos y lagunillas osteocíticas degradados está presente en todo el corte histológico. La tinción es homogénea, pero cambia a tonalidad rojiza debido a la ausencia de colágeno en la estructura de la muestra.

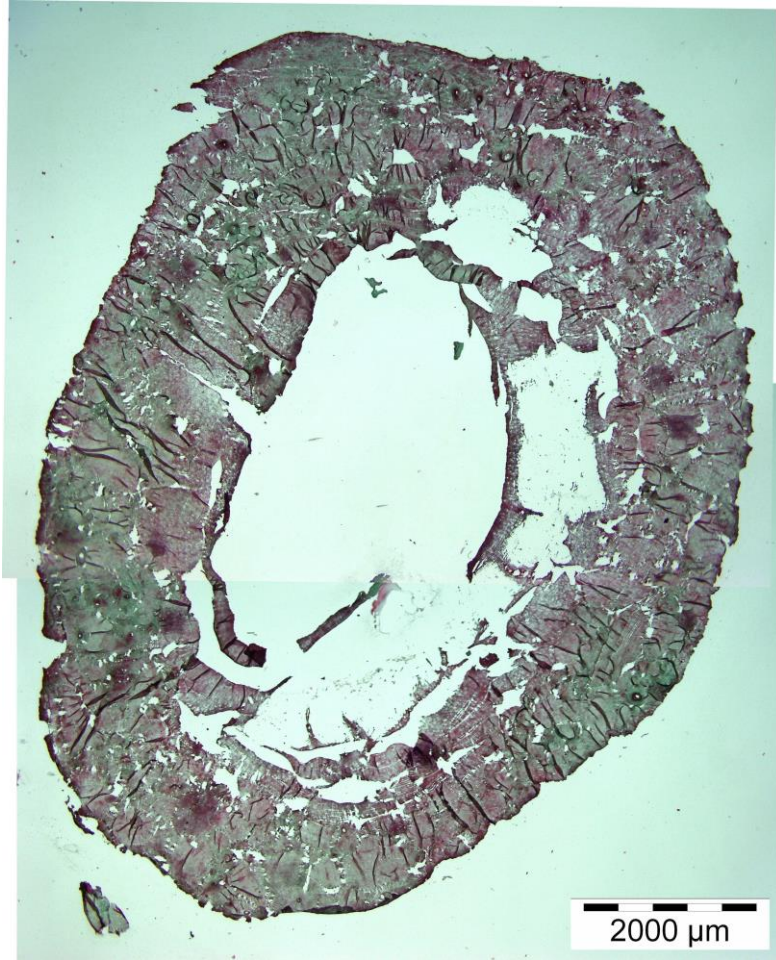


Figura 103. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 13 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.

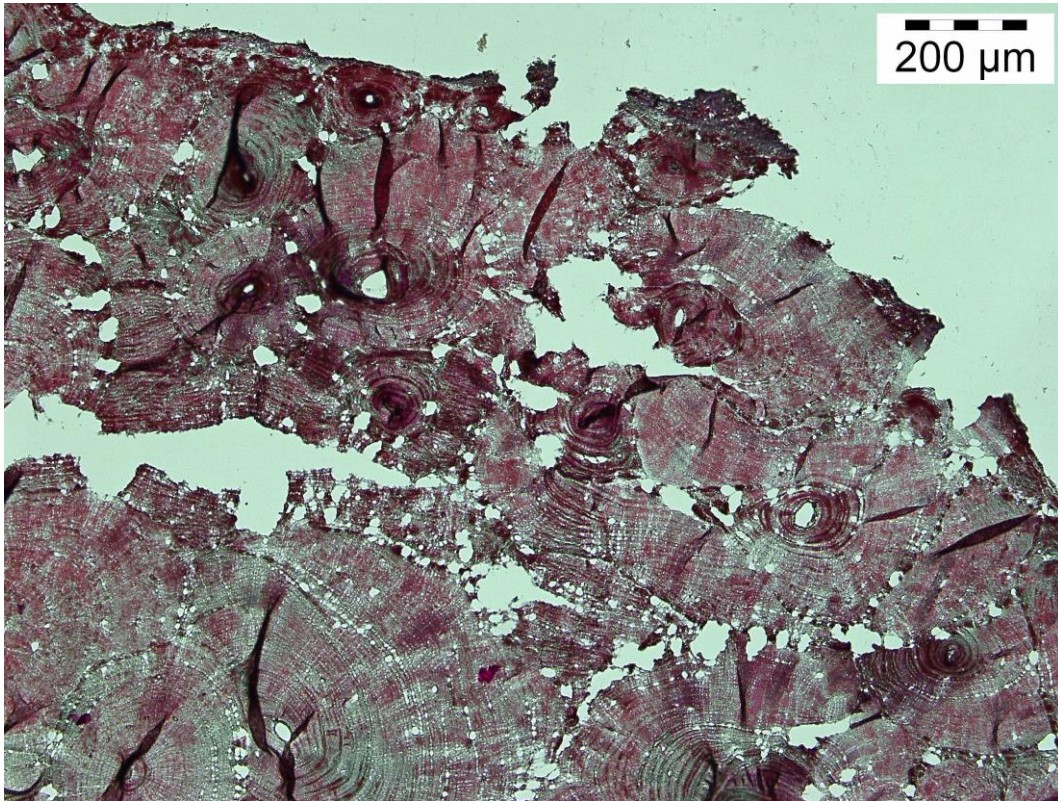


Figura 104. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 13 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.

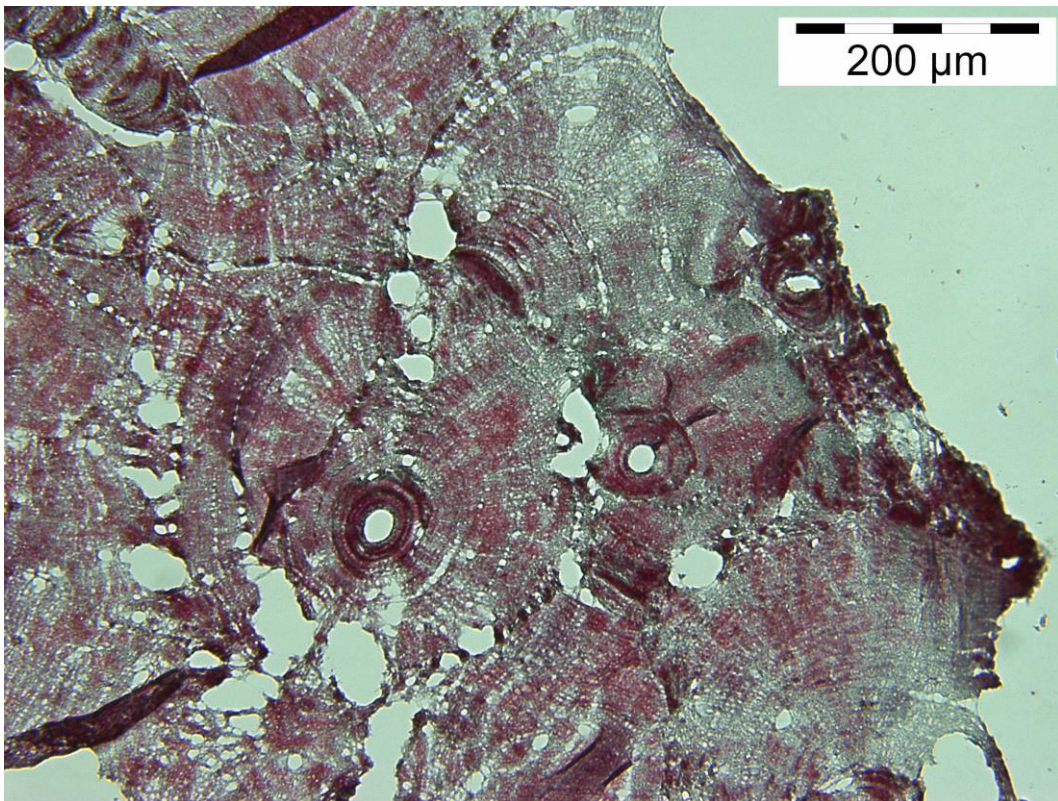


Figura 105. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 13 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

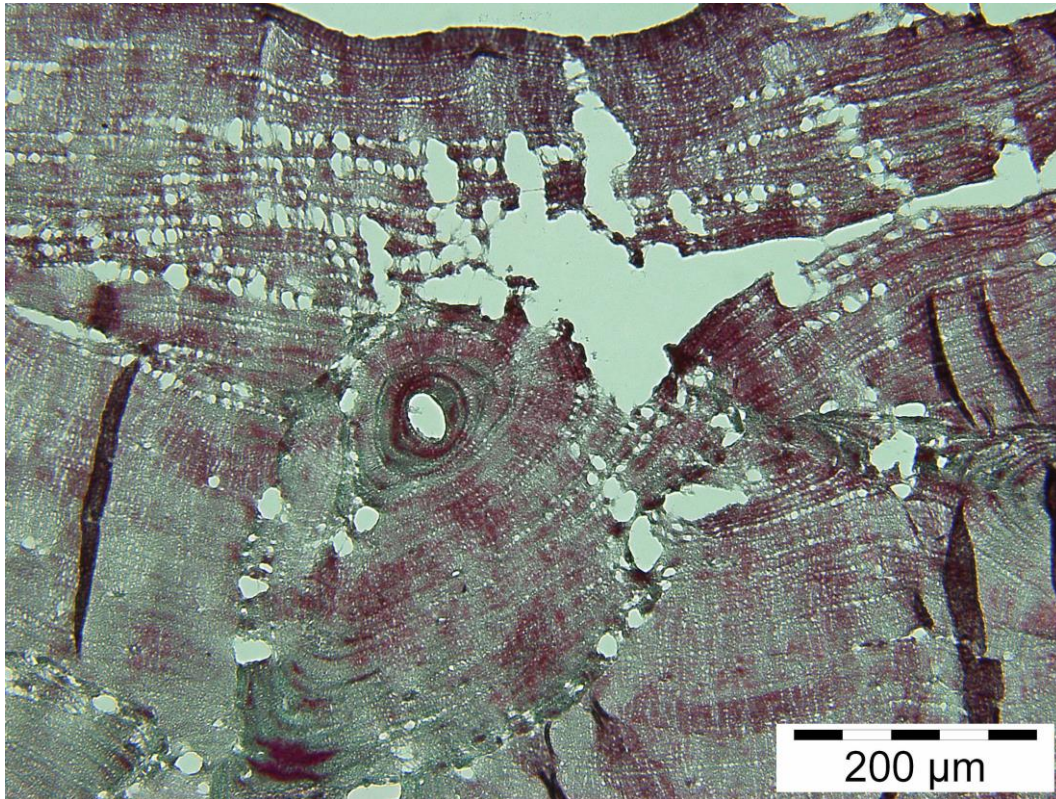


Figura 106. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 13 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

### **Análisis de imagen**

El análisis de imagen de las fotografías obtenidas de los cortes histológicos de las muestras contemporáneas, expuestas en un medio alcalino de hidróxido de sodio 0,1M durante varios días, indica un aumento progresivo de degradación de la muestra. Durante los primeros cinco días la muestra sufre una alteración del 20,9% de la superficie analizada. A los 7 días el porcentaje aumenta hasta un 25,49%. A los 11 días un 30,08% hasta alcanzar un 38,8% a los 13 días de exposición (Figura 107).

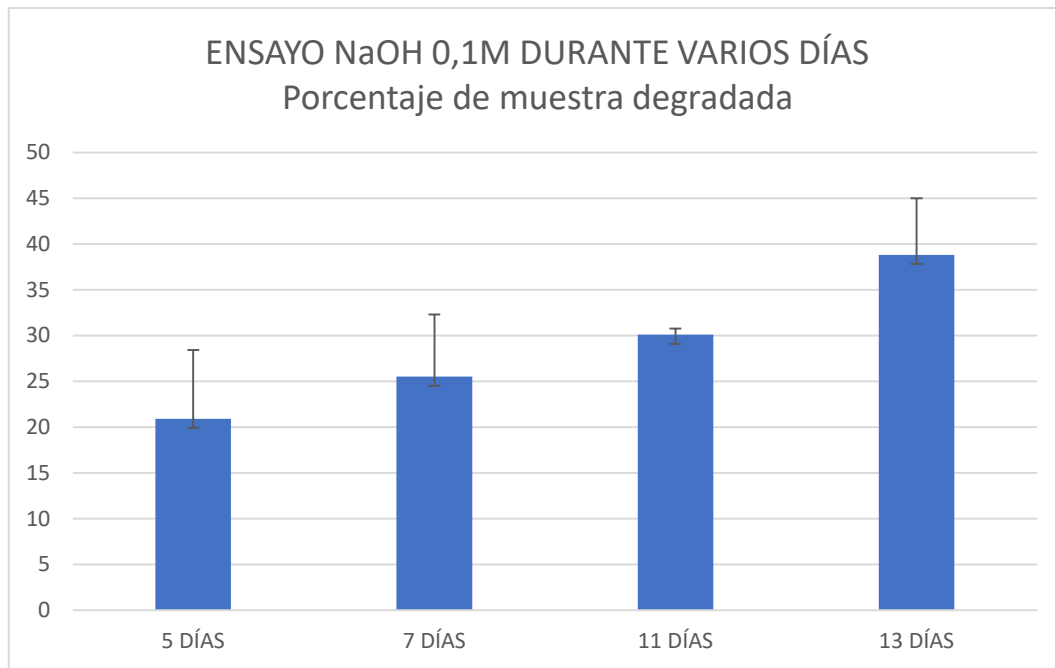


Figura 107. Gráfico del porcentaje de degradación de una muestra en un medio de NaOH 0,1M durante 5, 7, 11 y 13 días.

El análisis de la varianza (ANOVA) concluye que existen diferencias significativas según el tiempo al que están expuestas las muestras al medio de NaOH 0,1M (Anexo, Tabla 7)

## **8.7. Ensayo en un medio de NaOH a diferente molaridad durante 24 horas**

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de las muestras contemporáneas y arqueológicas que se expusieron en un medio de hidróxido de sodio durante 24 horas y en molaridades diferentes (0,05M, 0,1M y 1M).

### **Medio de hidróxido de sodio 0,05M**

En el medio con molaridad 0,05 se observó que la muestra contemporánea apenas mostró alteración en su estructura interna. Los límites externos e internos del hueso se conservaron en buenas condiciones en casi toda la muestra a excepción de algunas regiones donde comienzan a alterarse desprendiéndose de la muestra. Tanto las osteonas, como los canales de Harvers y los extremos cementeriales de las osteonas no sufrieron ningún tipo de cambio llamativo, a excepción de algunos lugares intersticiales que si mostraron degradación (Figura 110).

La tinción es homogénea en toda la muestra.

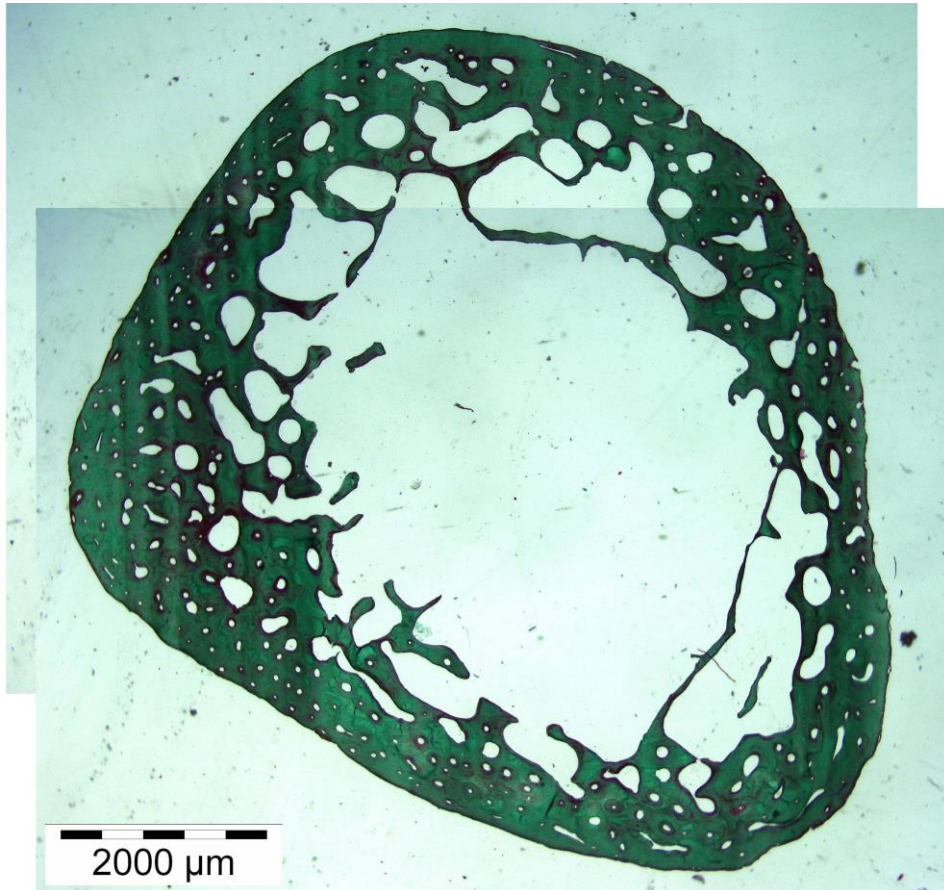


Figura 108. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 2 aumentos.

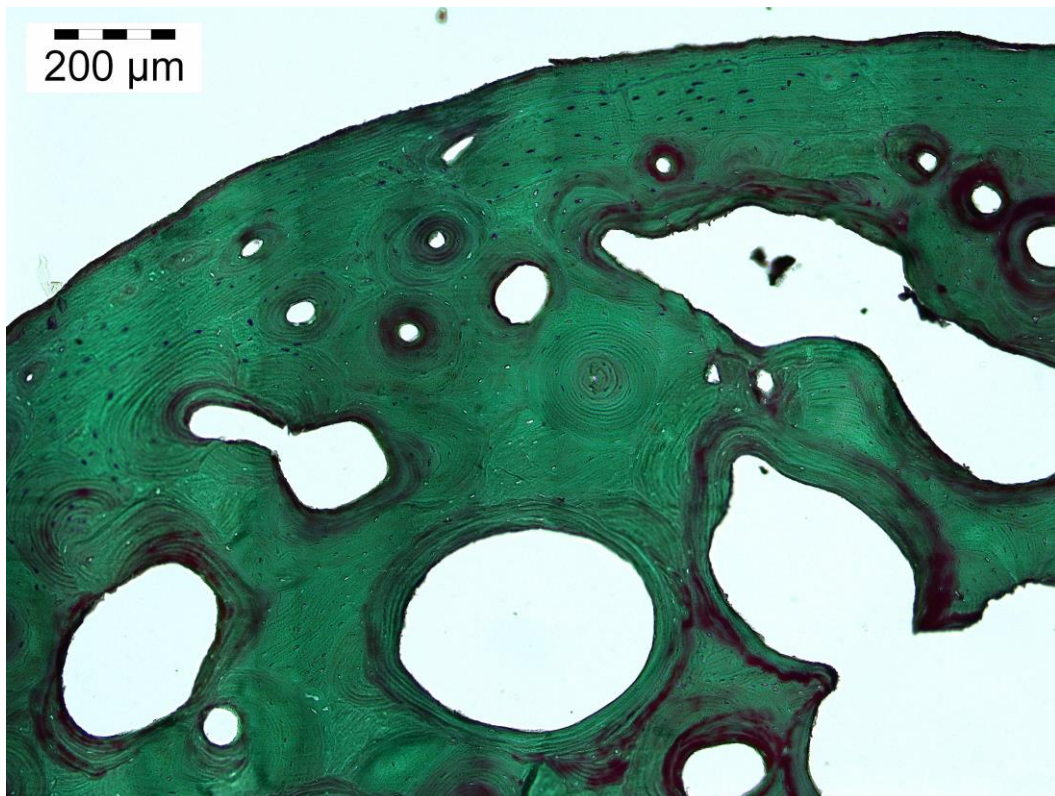


Figura 109. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 10 aumentos.

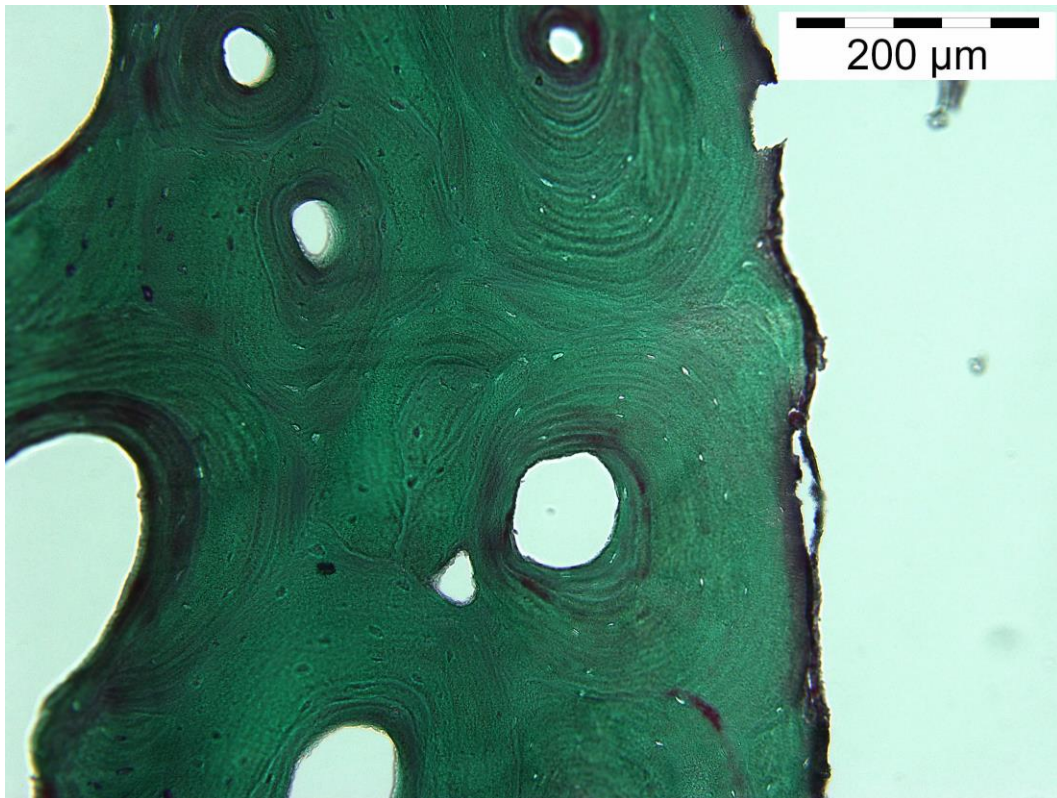


Figura 110. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 20 aumentos.

Para las dos muestras de origen arqueológico la situación es diferente. Ambos cortes histológicos presentaron alteración en la estructura original del hueso. Tanto la cortical externa como el límite interno medular fueron afectados por el medio. La cortical se conserva entero de manera discontinua (Figura 2 111 y 114). El contorno de la línea de cemento de las osteonas presenta gran porosidad y destrucción de las laminillas más externas y de los espacios intersticiales. En ambas muestras arqueológicas se puede observar al microscopio óptico la degradación de los canaliculos y de las lagunillas osteocíticas que comunican.

La tinción general es homogénea y dependiente de la cantidad de colágeno disponible que no ha sido alterado (Figura 112).

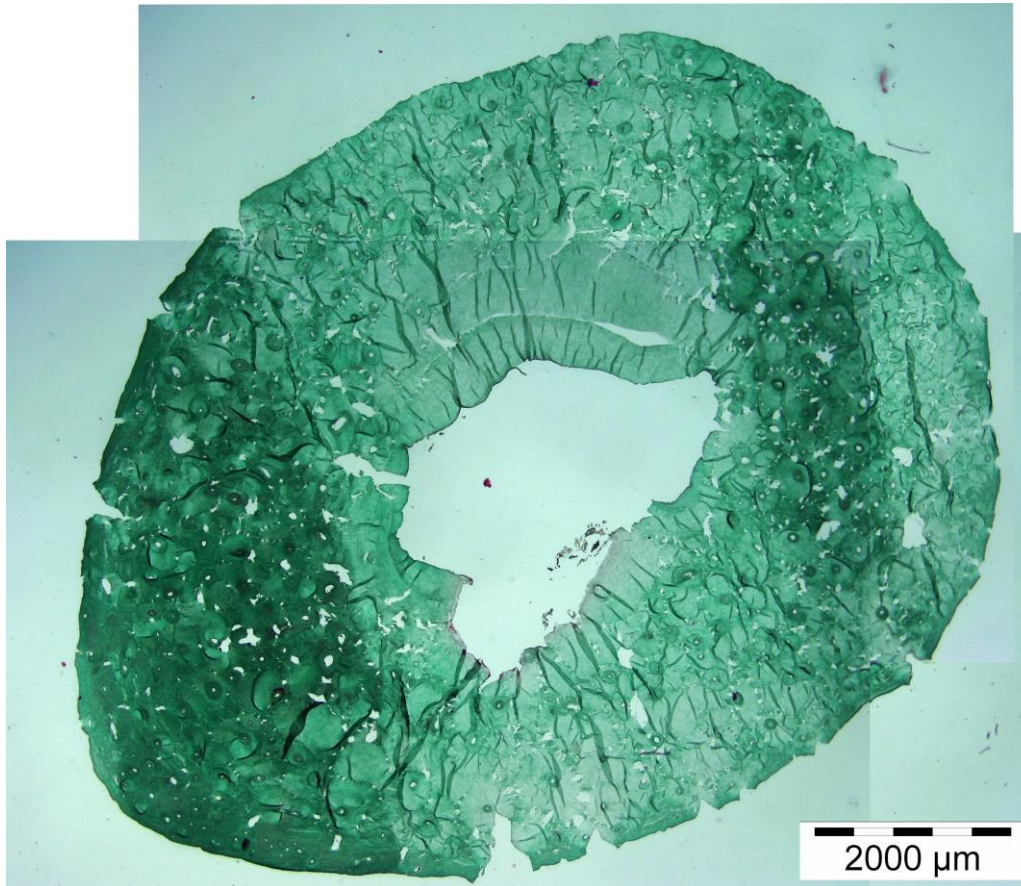


Figura 111. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 2 aumentos.

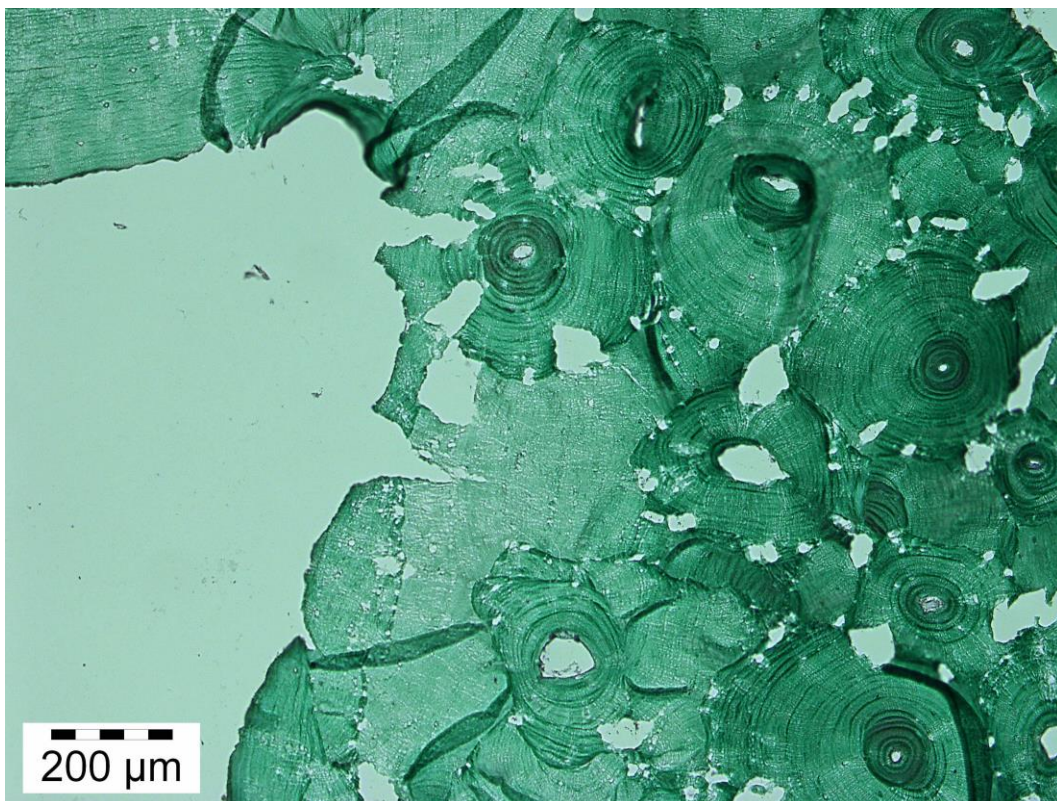


Figura 112. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 10 aumentos.

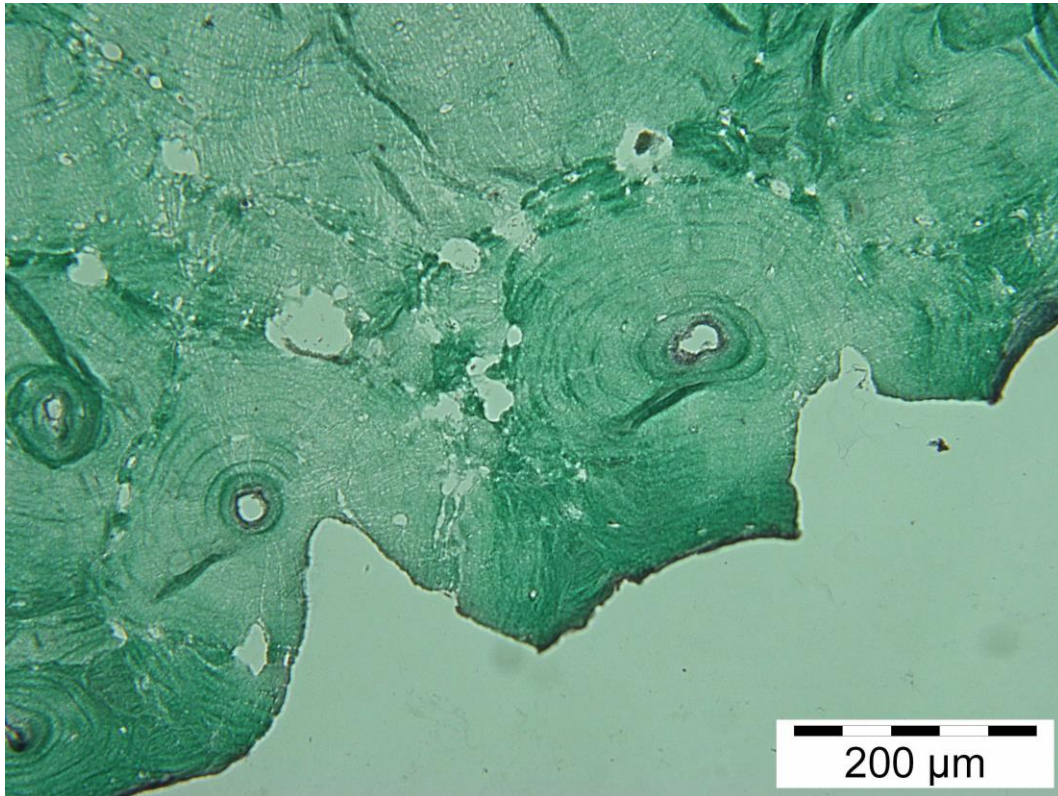


Figura 113. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 2 aumentos.

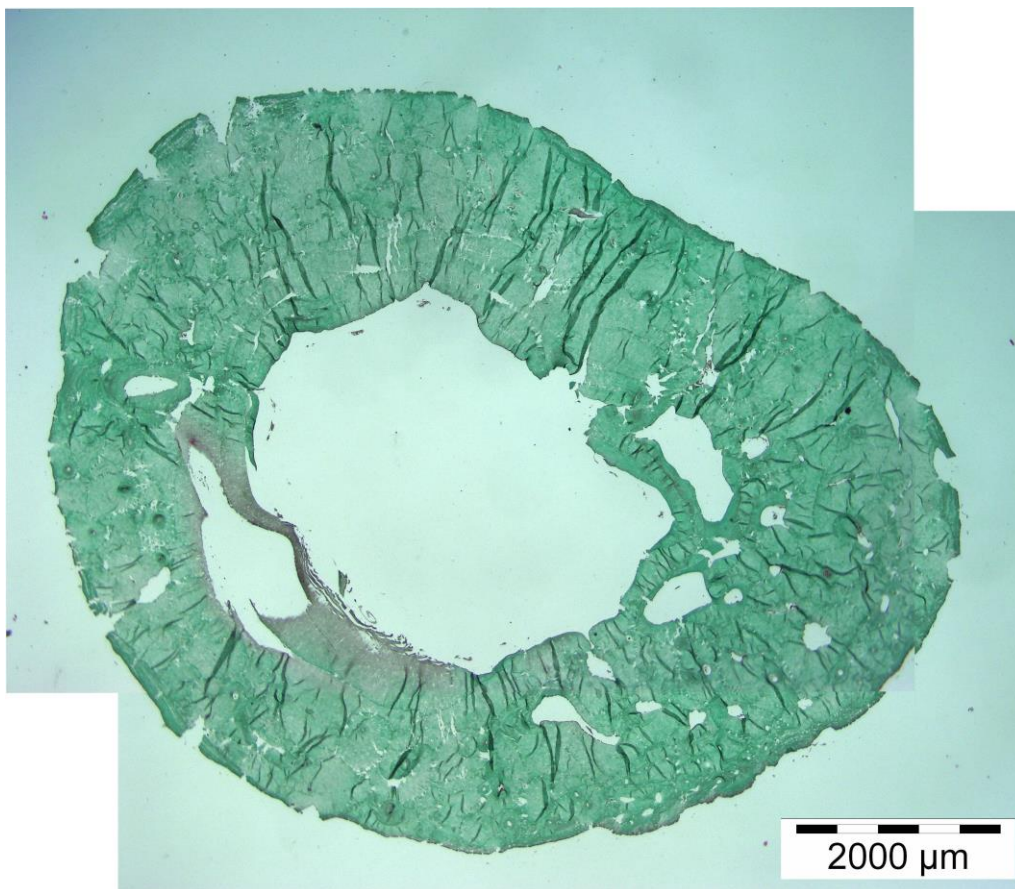


Figura 114. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 2 aumentos.

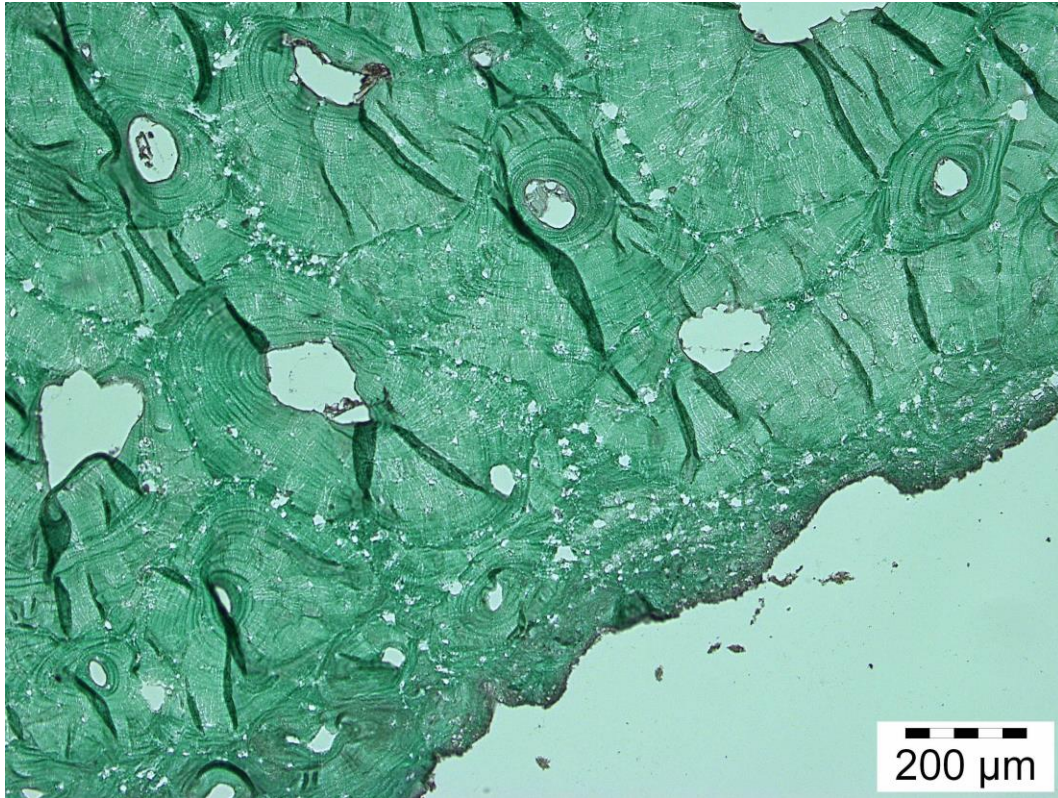


Figura 115. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 10 aumentos.

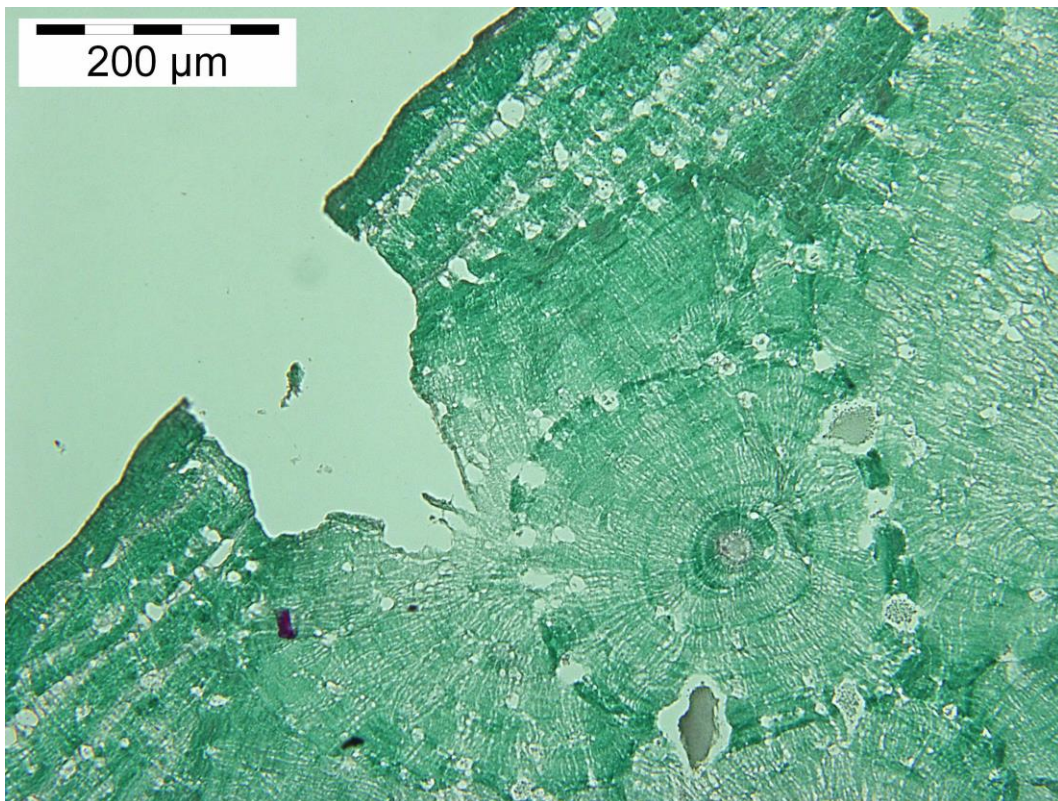


Figura 116. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 20 aumentos.

### Medio de hidróxido de sodio 0,1M

Los huesos sumergidos en un medio alcalino 0,1M presentan un grado de alteración de la estructura ósea mayor que los que han estado el mismo tiempo en un medio 0,05 molar.

La muestra contemporánea se mantiene en buen estado de conservación sin apenas cambios reseñables. Es posible observar que la tinción con Tricrómico de Masson presenta mayor intensidad en algunas regiones subperiósticas y en áreas alrededor de las osteonas. A mayor aumento, en las imágenes se aprecia cierta alteración en el interior de los canales de Havers definiendo un borde irregular (Figuras 118 y 119).

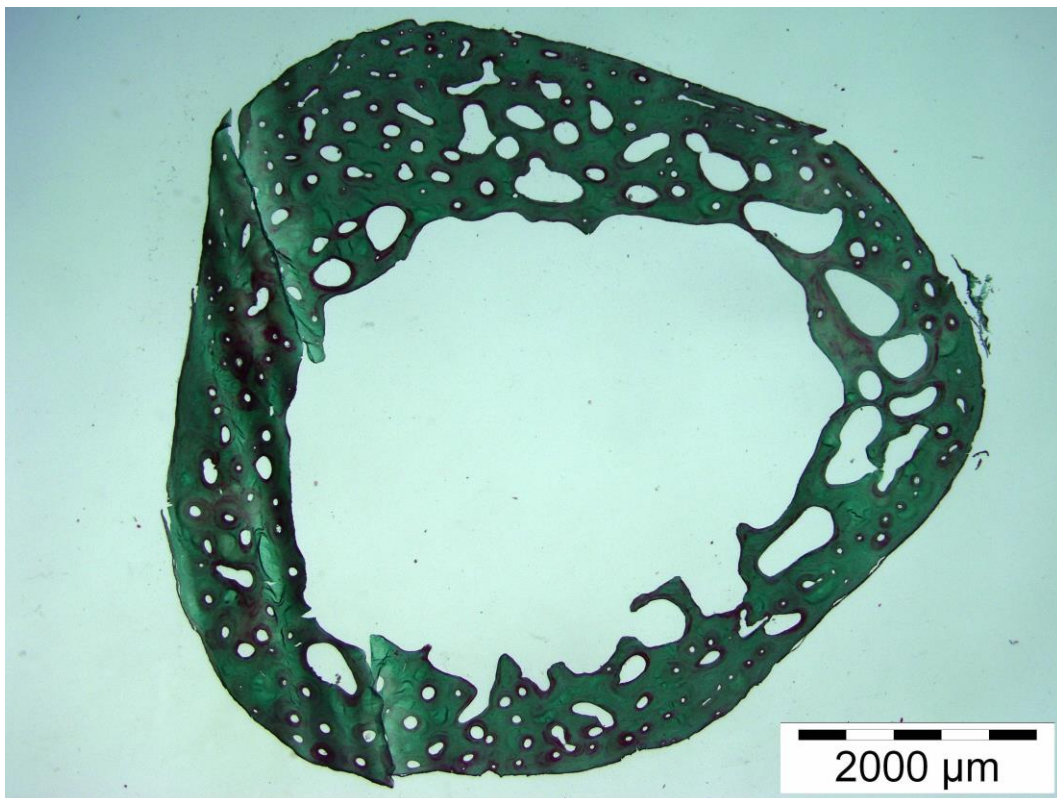


Figura 117. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.

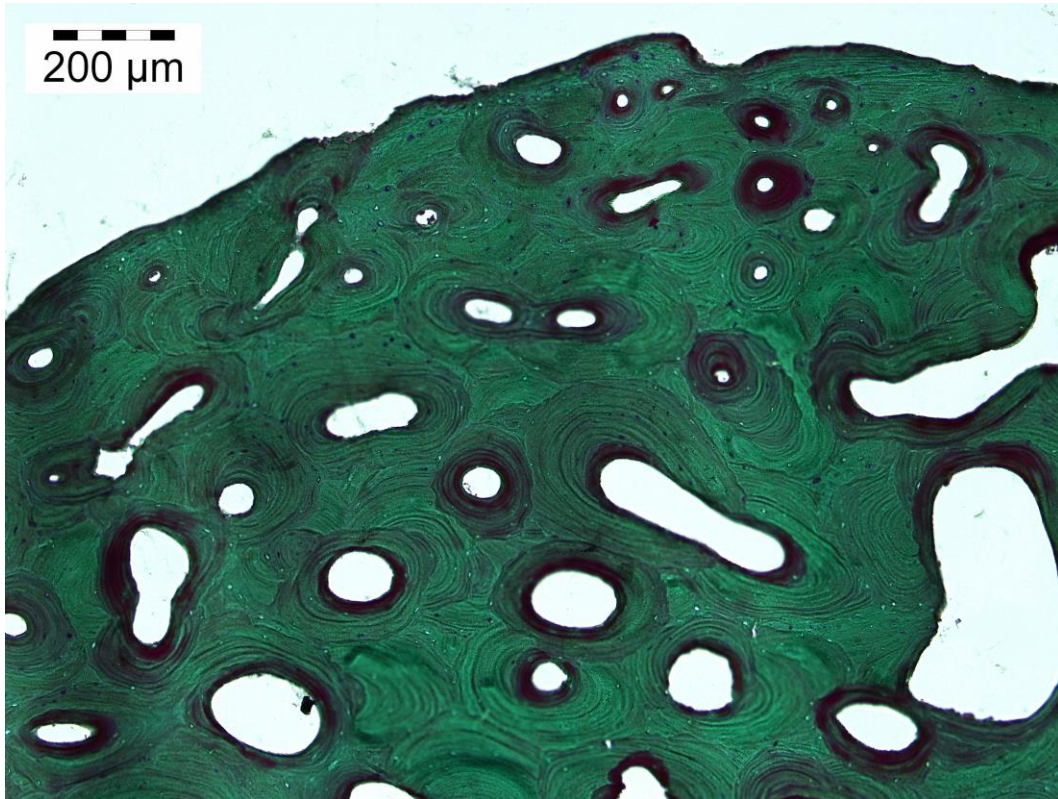


Figura 118. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.



Figura 119. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

Las muestras arqueológicas presentaron un mayor grado de degradación que la contemporánea. En ambas la alteración los límites externos e internos del hueso es notable afectando en algunas regiones con gran intensidad (Figuras 120 y 123). También presentan un aumento de la porosidad localizado sobre todo en los límites osteonales y en los espacios intersticiales. En éstos últimos se producen grandes oquedades que llegan a alterar la estructura de las osteonas colindantes (Figuras 121, 122 y 125). Los canalículos internos son visibles al microscopio óptico igual que la alteración de las laminillas que componen las osteonas, que comienzan a separarse unas de otras (Figuras 122 y 125).

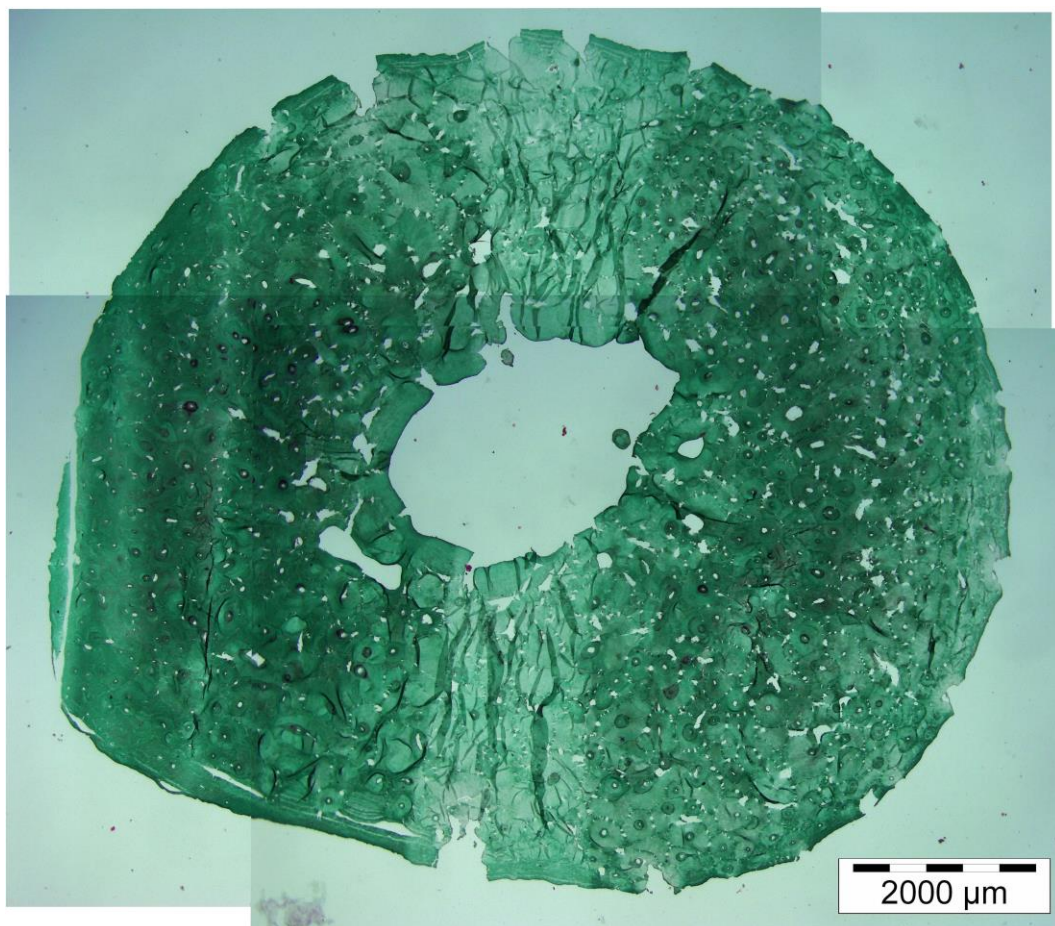


Figura 120. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.

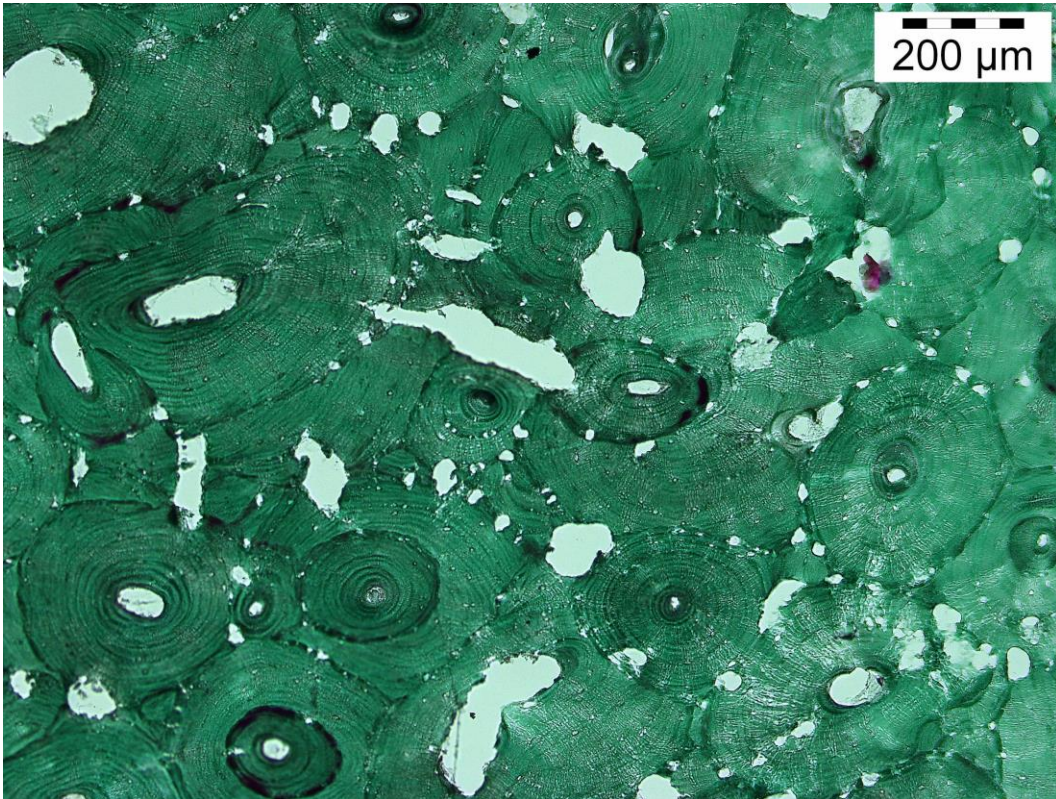


Figura 121. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.

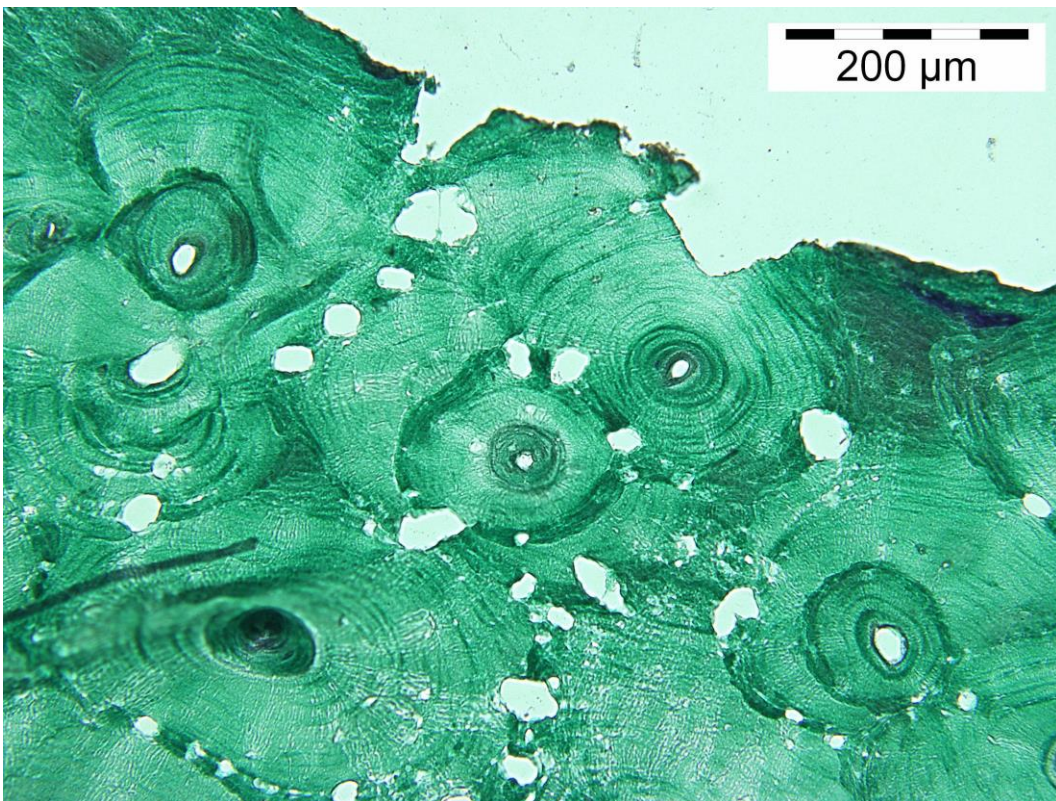


Figura 122. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

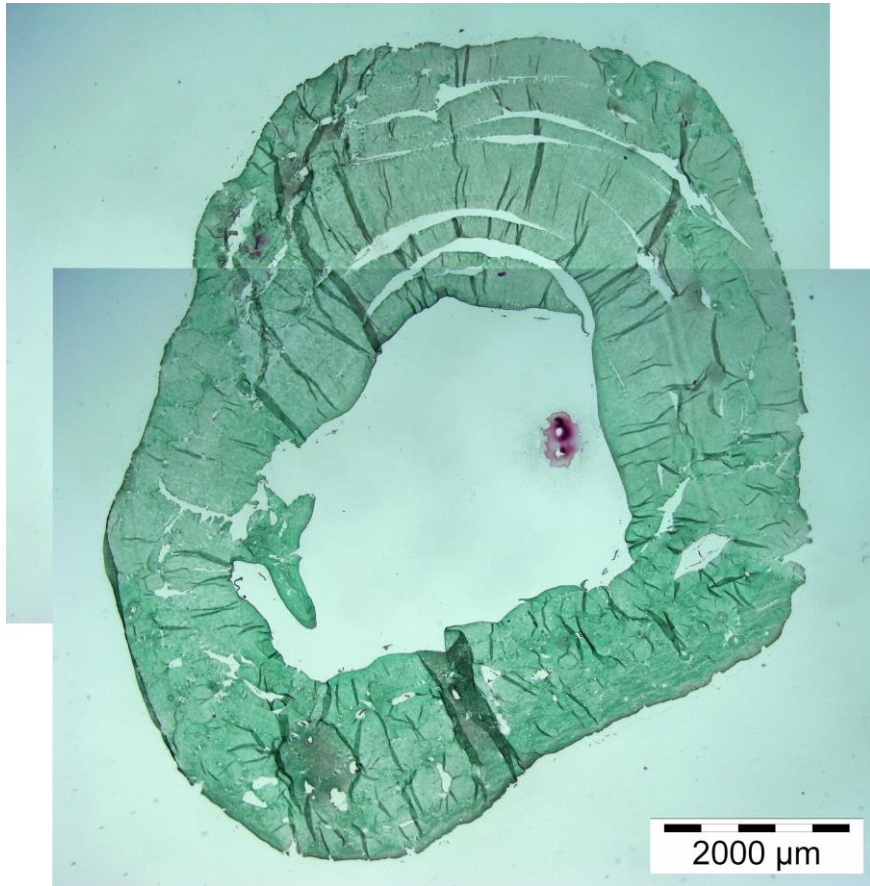


Figura 123. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.

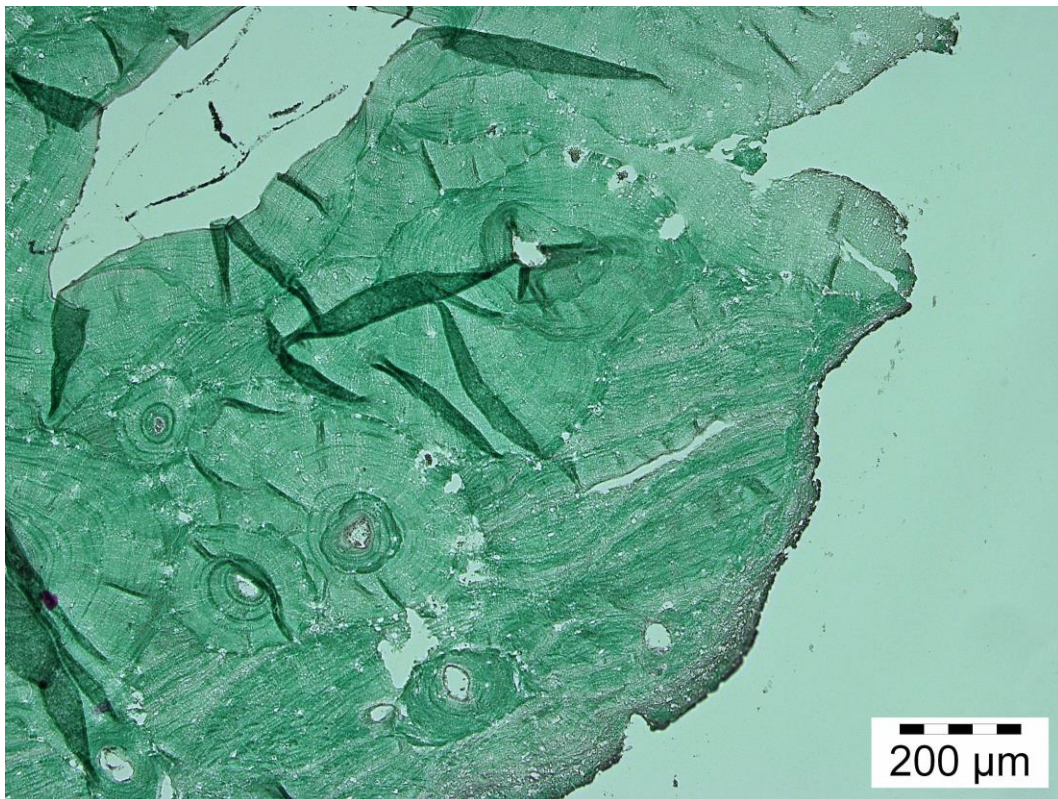


Figura 124. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.

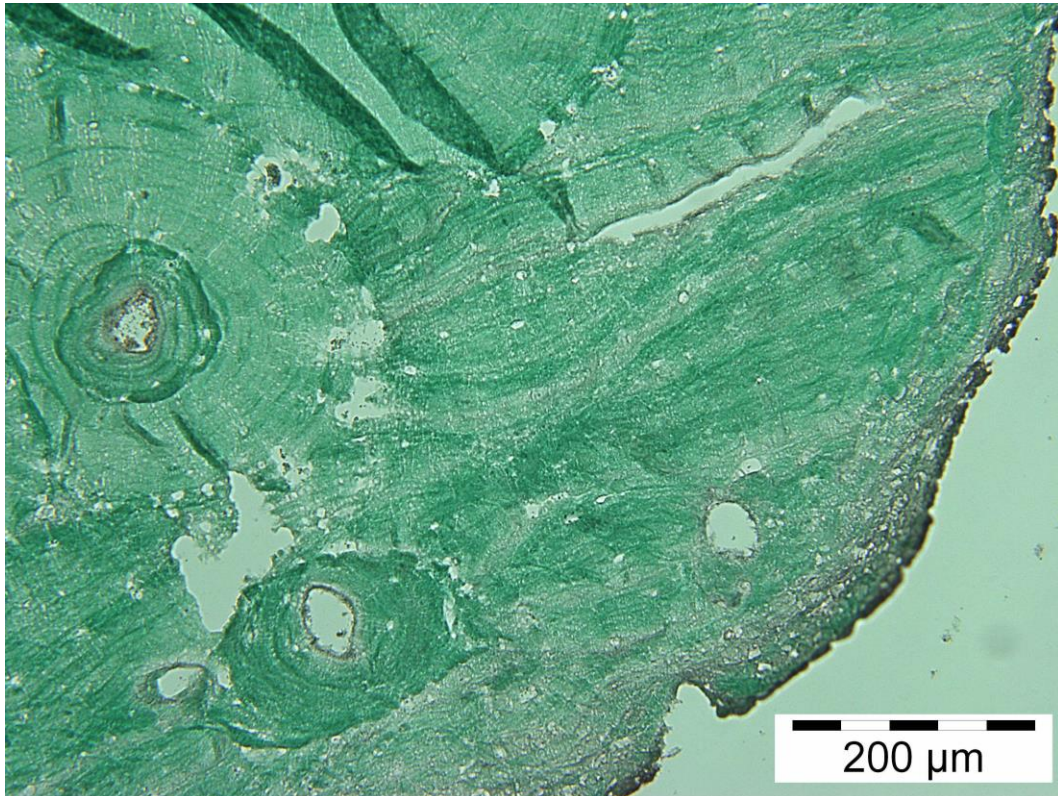


Figura 125. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

### **Medio de hidróxido de sodio 1M**

El efecto producido en una muestra contemporánea expuesta a un medio alcalino de hidróxido de sodio 1M durante 24 horas altera toda la estructura de la muestra. Pese a que ligeramente conserva su estructura ósea original, es apreciable a menor aumento una alteración generalizada sobre toda la muestra. Se observa que el corte histológico presenta una tinción desigual en dos mitades. Una más intensa que la otra (Figura 126).

La cortical y el límite de la cavidad medular del hueso han sido degradados completamente en toda la muestra permitiendo una mayor interacción del medio alcalino en el interior del hueso. El núcleo central de los complejos osteonales se conserva casi intacto, pero sin embargo, en la mayoría de las osteonas se ha degradado la línea de cemento separando unas de otras. En la región de la muestra más teñida (más intensa) la estructura de las laminillas osteonales se conserva en buen estado no apreciándose alteración a mayor aumento. En el caso con tinción

más leve las laminillas comienzan a separarse y se expone con mayor claridad la alteración de los canalículos y las lagunillas osteocíticas (Figura 127).

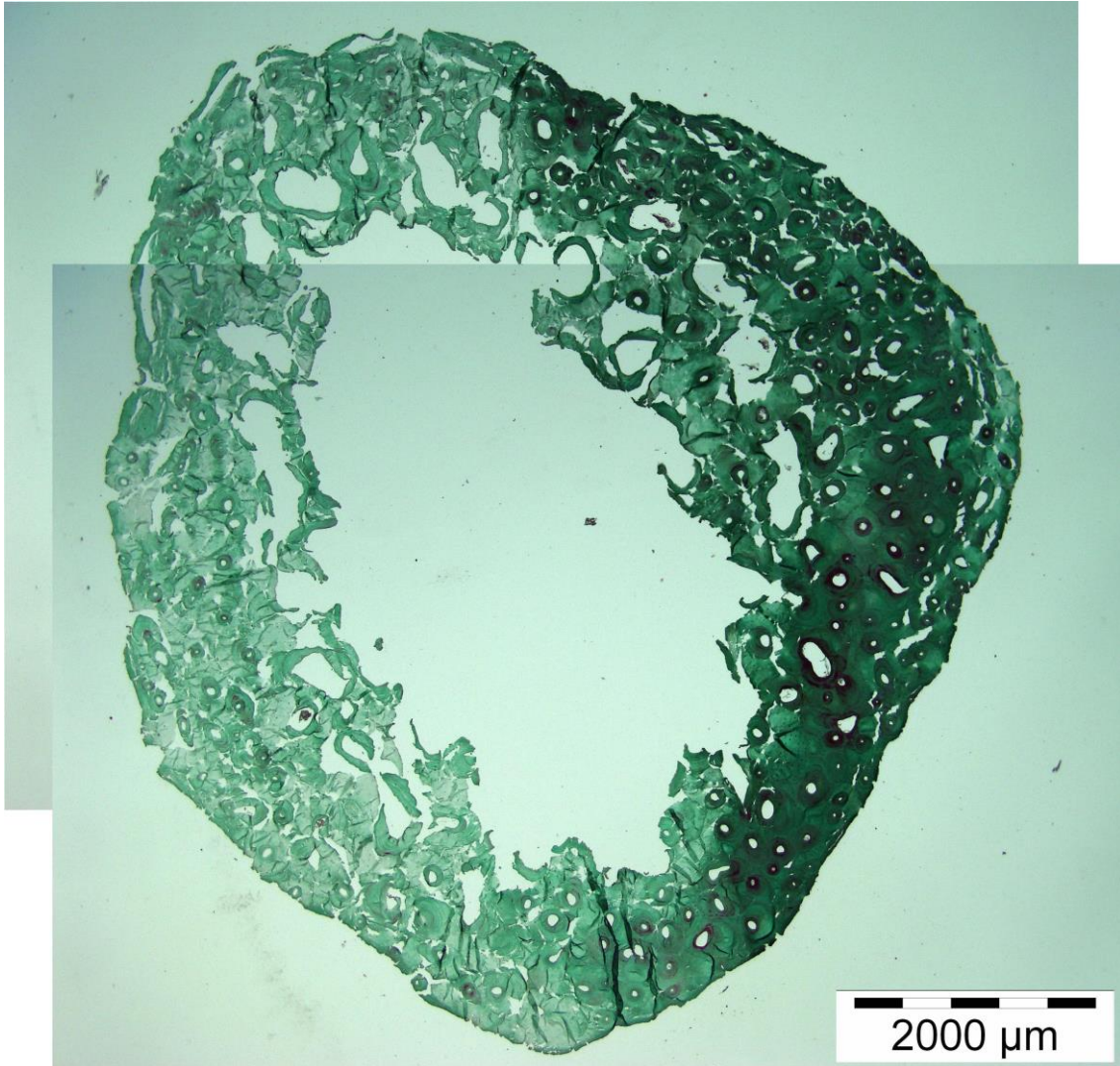


Figura 126. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 2 aumentos.

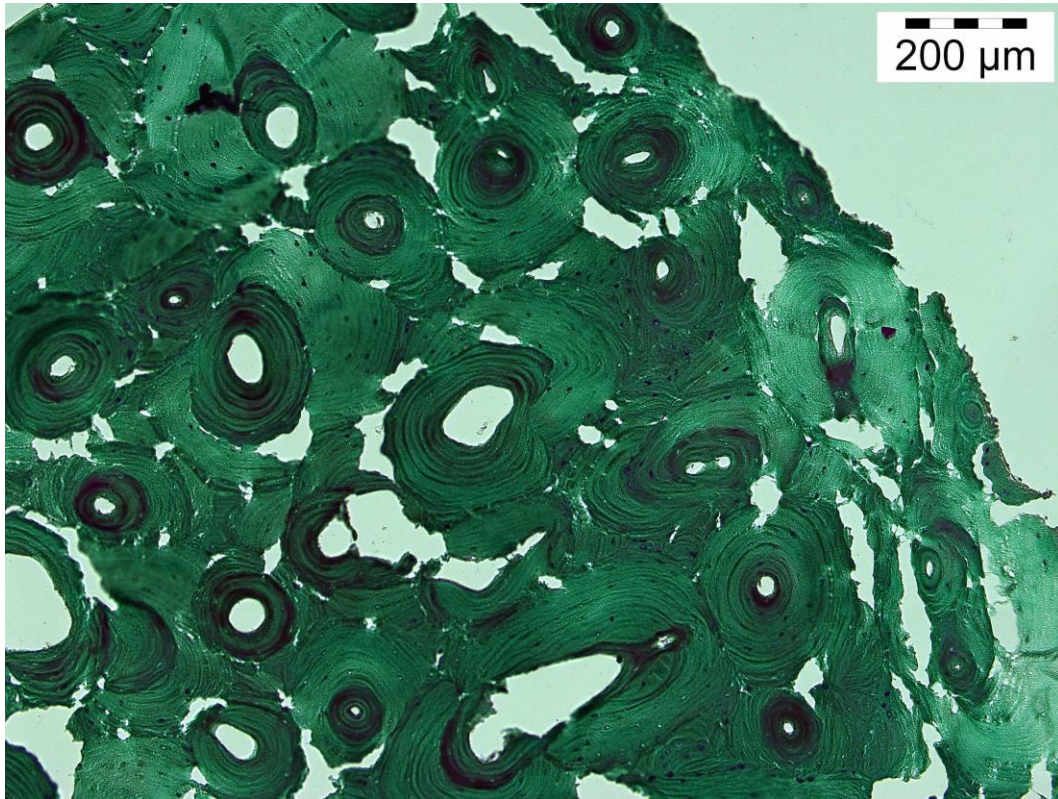


Figura 127. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 10 aumentos.

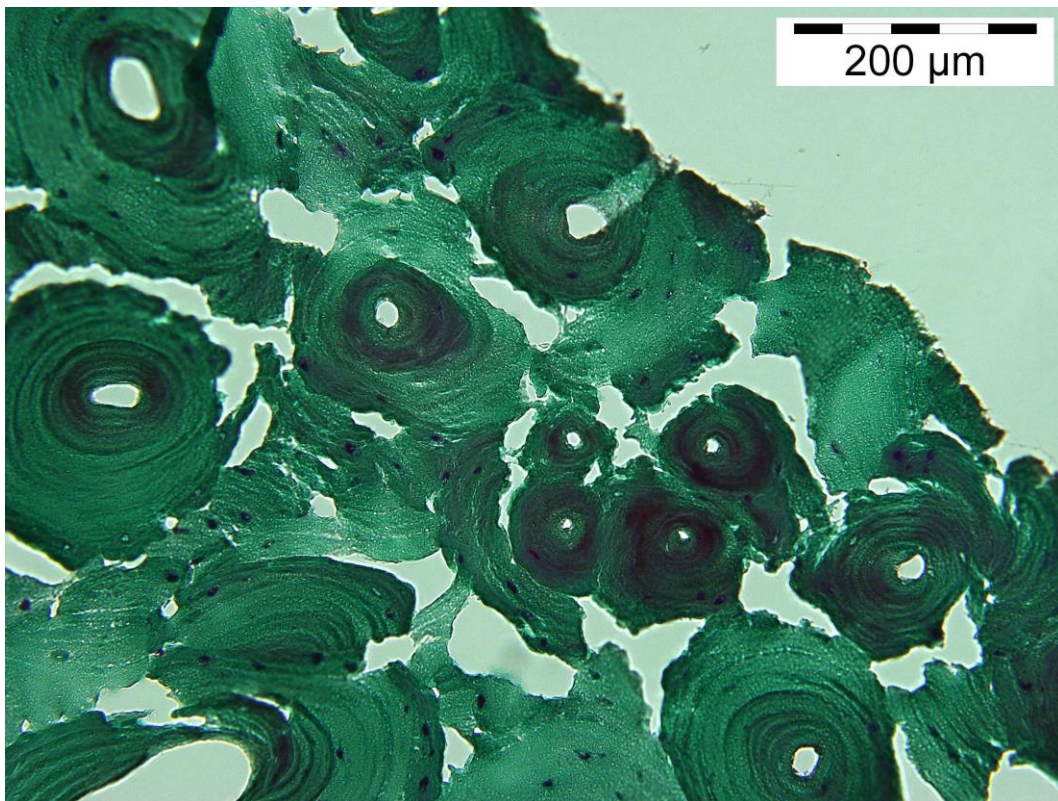


Figura 128. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 20 aumentos.

Para las muestras arqueológicas sometidas a un medio 1M se observan dos situaciones muy diferentes. Una de las muestras (ARQ1), aunque conserva la estructura natural del hueso, ha sido afectada con los patrones observados en los demás experimentos. Se produce una rotura y degradación completa de la cortical y del interno de la cavidad medular, afección de la línea cementerial y espacios intersticiales en todas las osteonas en forma de porosidad generalizada. Las laminillas osteonales comienzan a separarse (Figura 130).

La otra muestra (ARQ2) prácticamente ha sufrido una destrucción completa del hueso. A mayor aumento se observa que las osteonas han desaparecido, conservándose algunos complejos. También se documenta que el tejido compacto presenta gran alteración separando las laminillas osteonales en un bandeado (Figura 134).

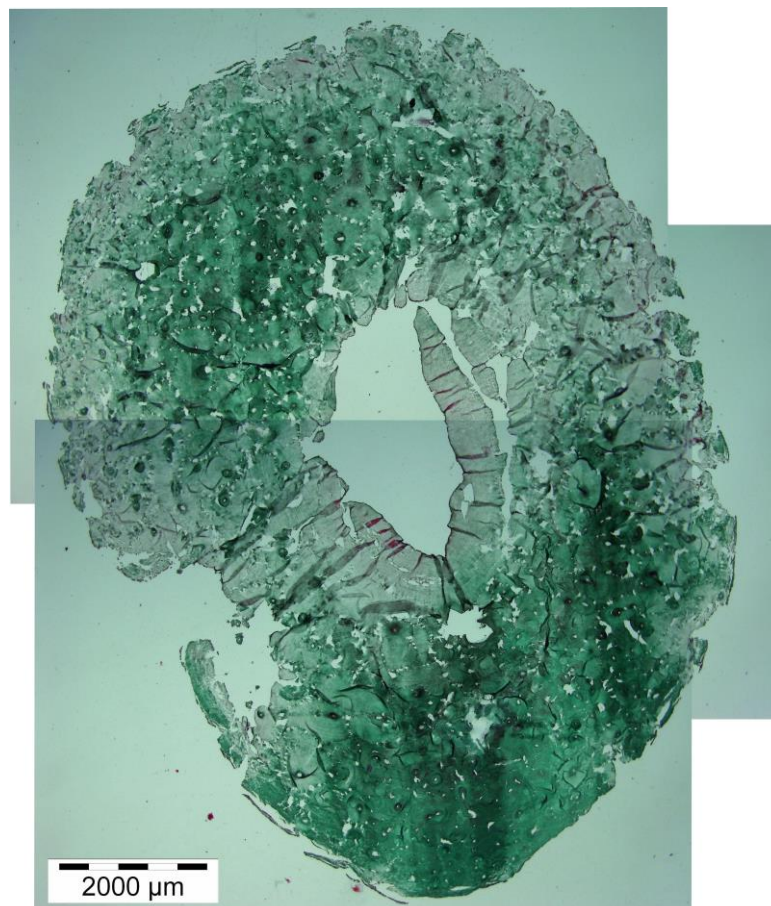


Figura 129. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 2 aumentos.

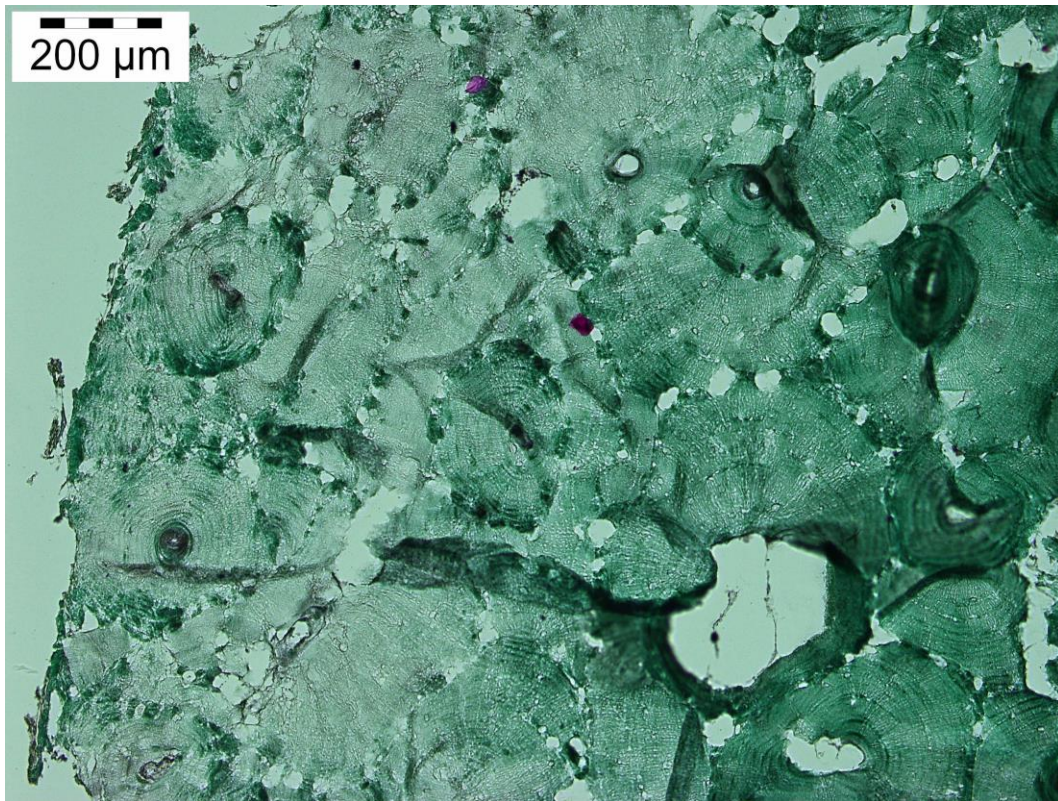


Figura 130. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 10 aumentos.

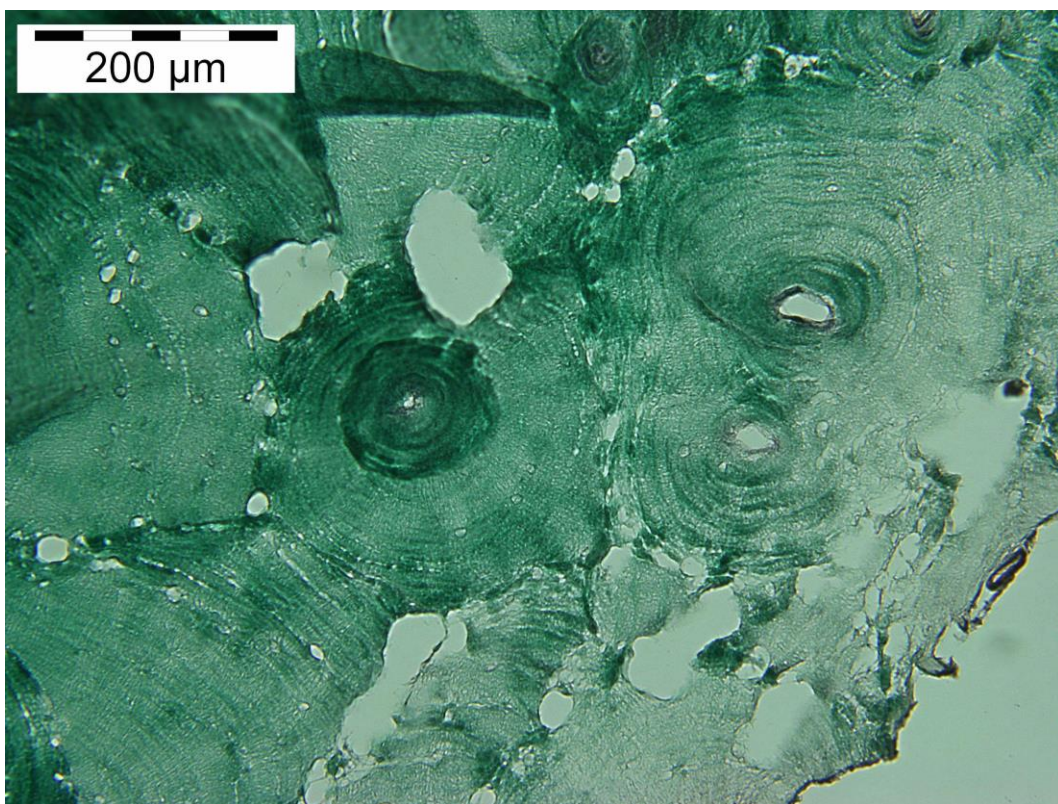


Figura 131. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 20 aumentos.

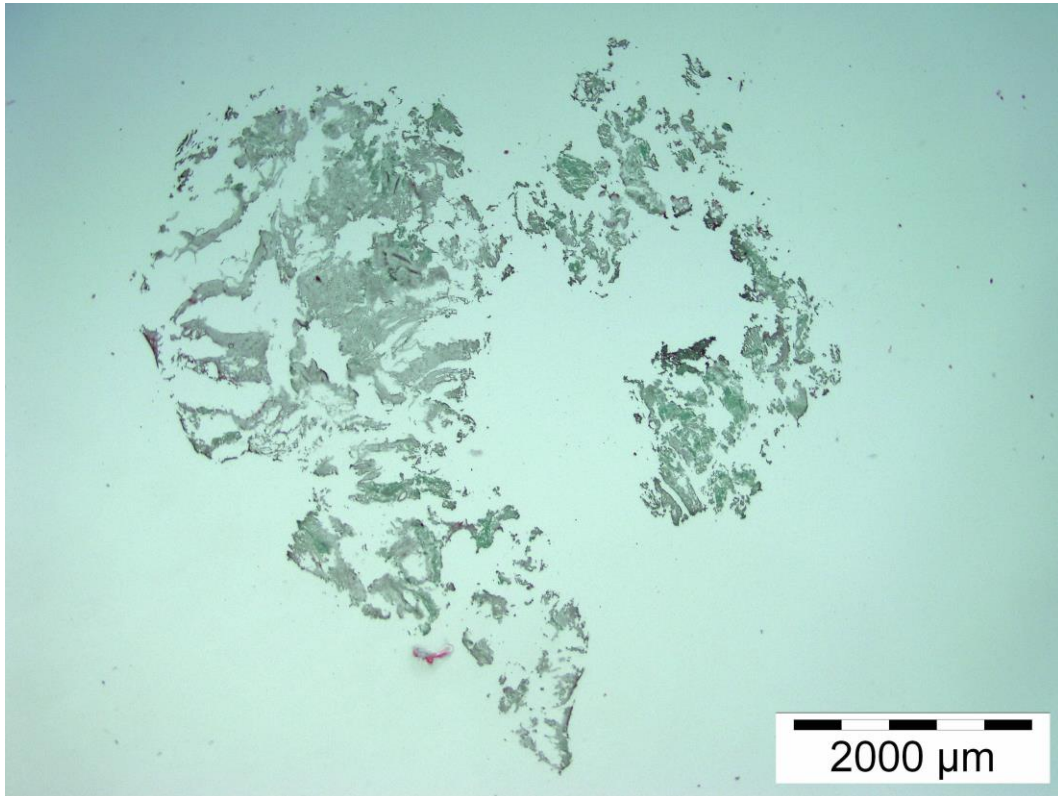


Figura 132. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 2 aumentos.

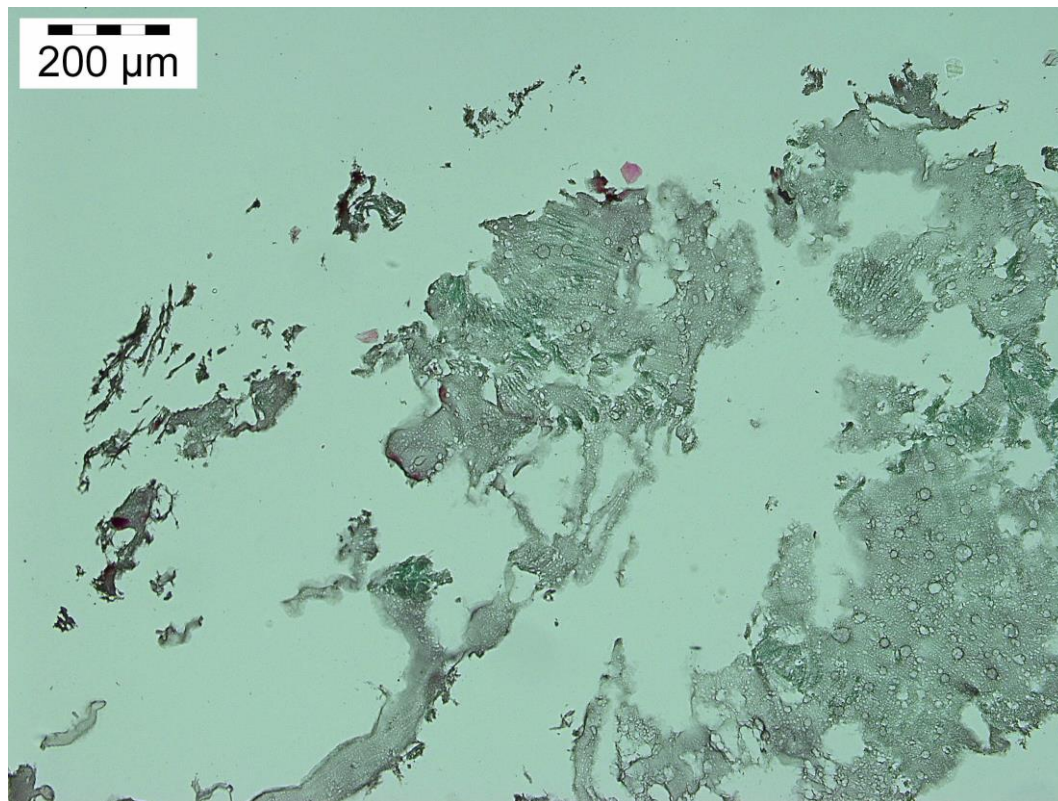


Figura 133. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 10 aumentos.

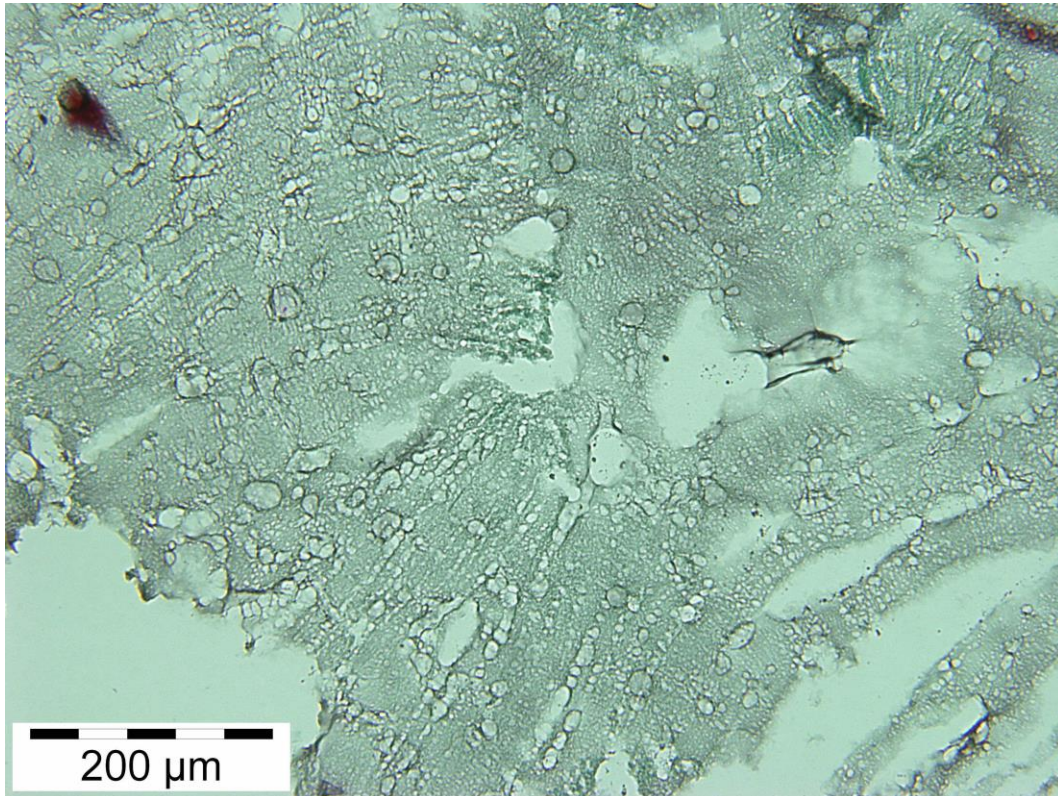


Figura 134. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 20 aumentos.

### Análisis de Imagen

El análisis de las imágenes obtenidas para cuantificar el área degradada nos indica que en un medio de NaOH 0,05M la muestra menos afectada es la contemporánea (11,51%), seguida de la muestra arqueológica ARQ1 (21,12%) y de la segunda muestra arqueológica ARQ2 (45,18%) (Figura 135).

El medio 0,1M influyó en las muestras de manera similar, siendo la menos alterada la contemporánea (24,55%), seguida de la muestra ARQ1 (25,78%) y de la ARQ2 (28,20%) (Figura 135).

Por último, el medio de mayor concentración molar (1M) presentó diferentes resultados siendo la muestra menos degradada la muestra ARQ1 (23%), seguida de la muestra contemporánea (27,7%) y de la muestra ARQ2 (67,31%) (Figura 135).

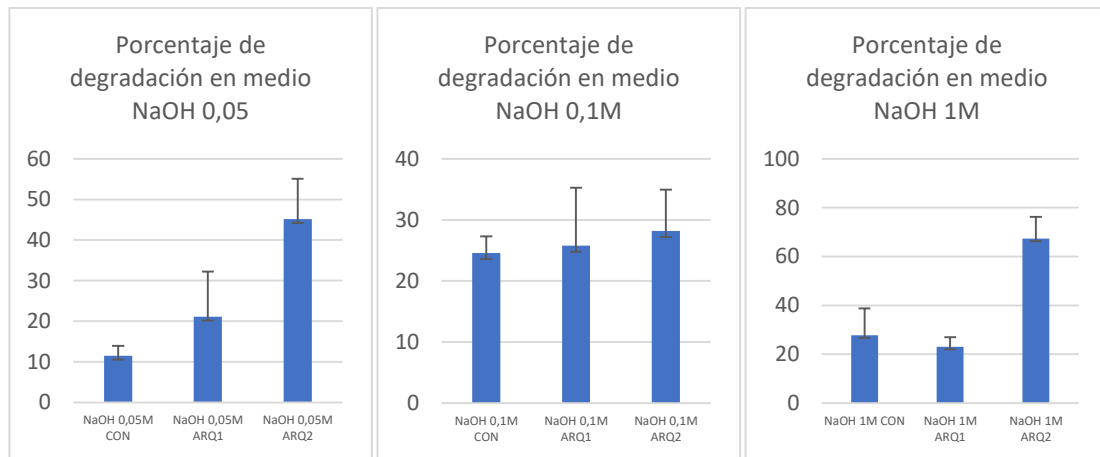


Figura 135. Gráfico del porcentaje de degradación de las tres muestras expuestas a diferentes concentraciones molares de NaOH.

Según los datos obtenidos las muestras utilizadas actúan de manera diferente según el medio al que son expuestas. La muestra contemporánea se degrada exponencialmente a medida que aumenta la concentración molar de la disolución de NaOH (Figura 136). Sin embargo, la muestra ARQ1 se degrada más en el medio 0,1M que en el 1M (Figura 136). Y la muestra ARQ2, que sufre mayor destrucción en el medio 1M, se degrada más en medio de menor molaridad (0,05M) que en el medio de molaridad intermedia (Figura 136).

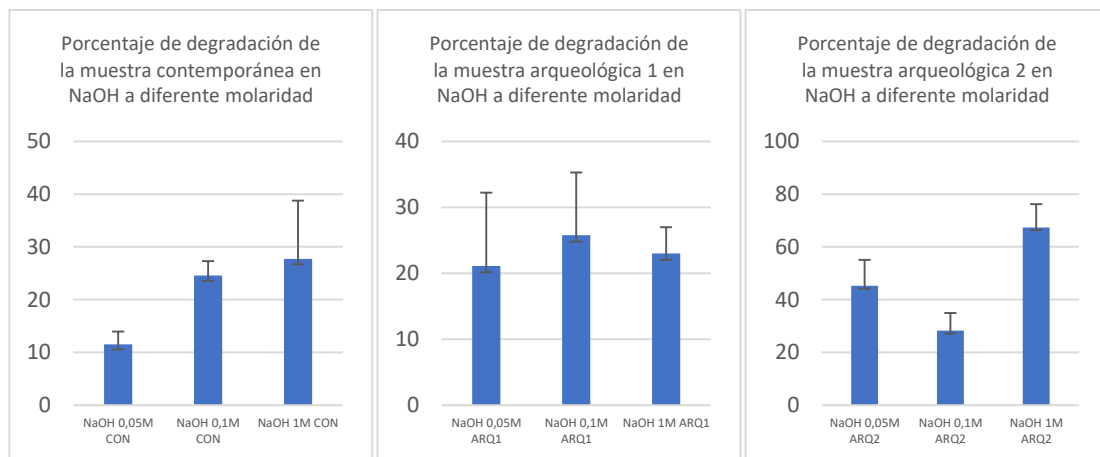


Figura 136. Gráfico del porcentaje de degradación de cada muestra expuesta a diferentes concentraciones molares de NaOH.

El análisis de varianza (ANOVA) de indica que el medio de mayor concentración molar (NaOH 1M) y el de menor concentración (NaOH 0,05M) afectan significativamente a la degradación de las muestras expuestas en ellos durante 24

horas (Anexo. Tablas 8 y 10 respectivamente). El medio de molaridad intermedia (NaOH 0,1M) no influye significativamente en la degradación de las muestras (Anexo. Tabla 9).

Para cada muestra el análisis de varianza indica que la muestra arqueológica 2 está afectada significativamente por la exposición a los diferentes medios (Anexo. Tabla 13). Para los otros dos tipos de muestras no existe diferencias significativas según el medio al que se expongan (Anexo. Tablas 11 y 12).

## **8.8. Ensayo en un medio de NaClO (hipoclorito de sodio, lejía) durante 28 días**

De las muestras utilizadas para la experimentación sólo sobrevivieron las submuestras de origen arqueológico y, además, en muy mal estado de conservación. En el momento que fueron sumergidas en un medio de hipoclorito de sodio todas las muestras produjeron efervescencia como consecuencia de la reacción con el medio.

La primera submuestra analizada conserva su estructura ósea original, se trata de un fragmento de diáfisis. A menor aumento se observa que tanto la cortical como el límite de la cavidad medular han sido degradadas. Ambas se han destruido completamente. También se distingue una tinción selectiva, de fuera hacia dentro, tanto en el límite subperióstico como en el de la cavidad medular. Siendo más intensa en el exterior (Figura 137).

A mayor aumento el borde más externo y en el interno presentan un halo ausente de tinción que recorre todo el contorno de la muestra. También se observa en el interior de los canales de Havers de aquellas osteonas que comienzan a ser degradadas y que se sitúan en la parte más externa del corte histológico (Figura 139).

La línea de cemento de las osteonas, algunos espacios intersticiales, el interior de los canaliculos y de las lagunillas osteocíticas se ven afectadas por la acción del medio mostrando una porosidad inicial. También se ha comprobado que el colágeno sufre una alteración similar a la observada en los medios alcalinos antes descritos donde las laminillas osteonales comienzan a separarse unas de otras (Figura 140).

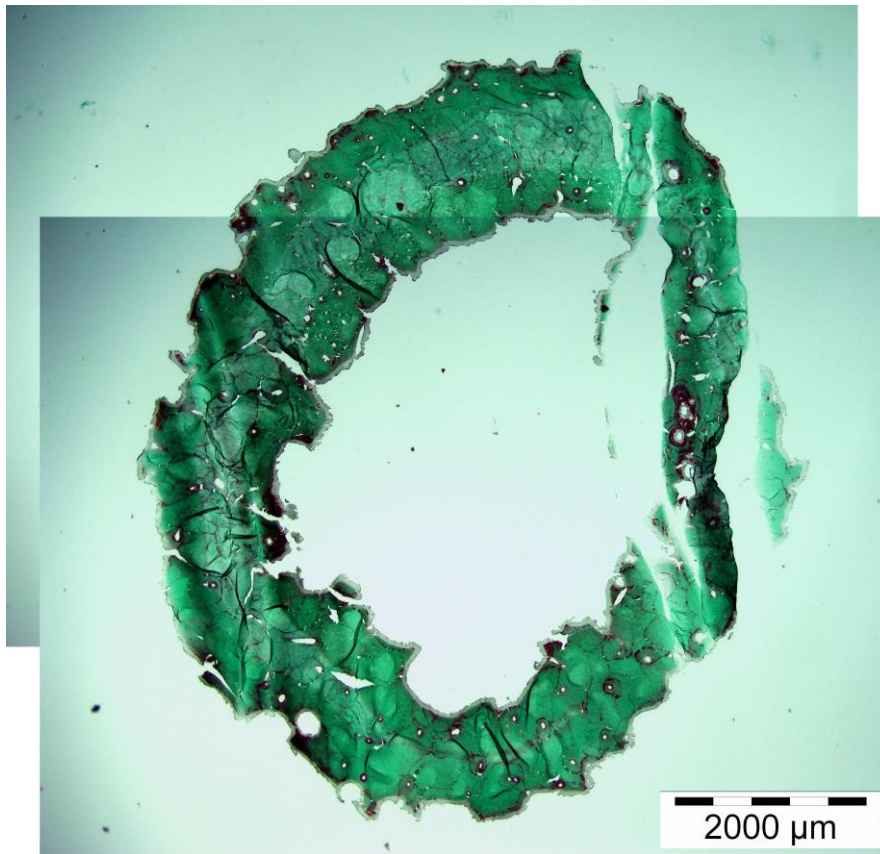


Figura 137. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.

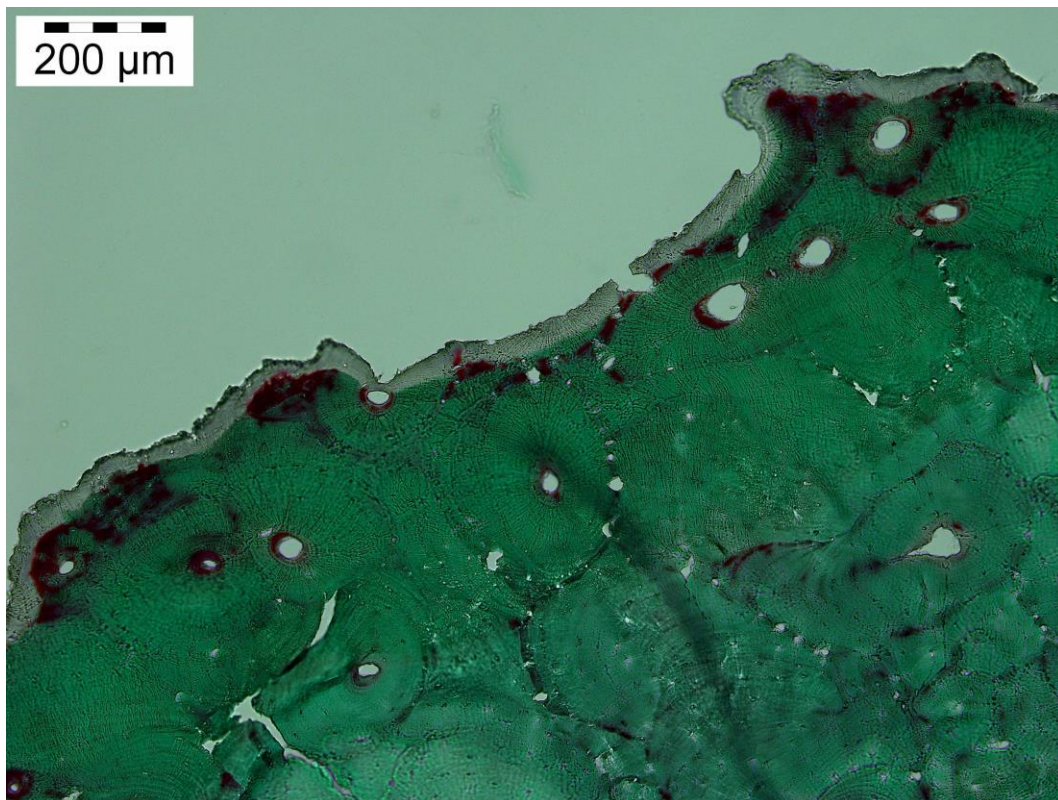


Figura 138. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 10 aumentos.

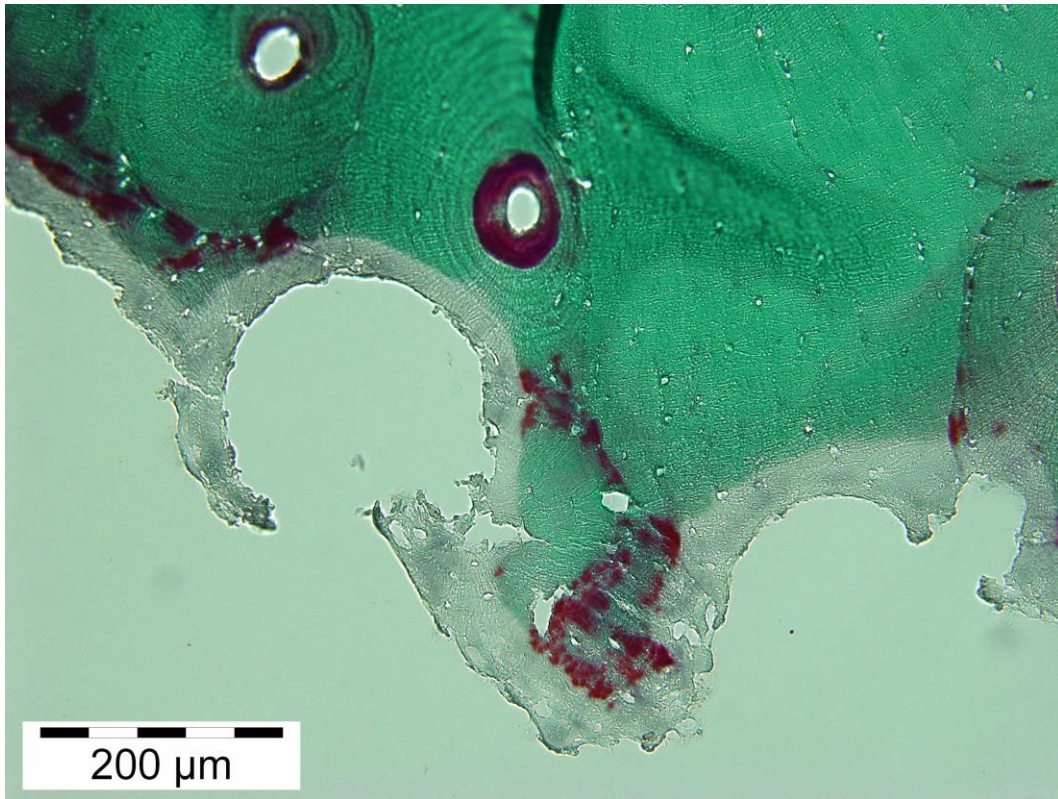


Figura 139. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

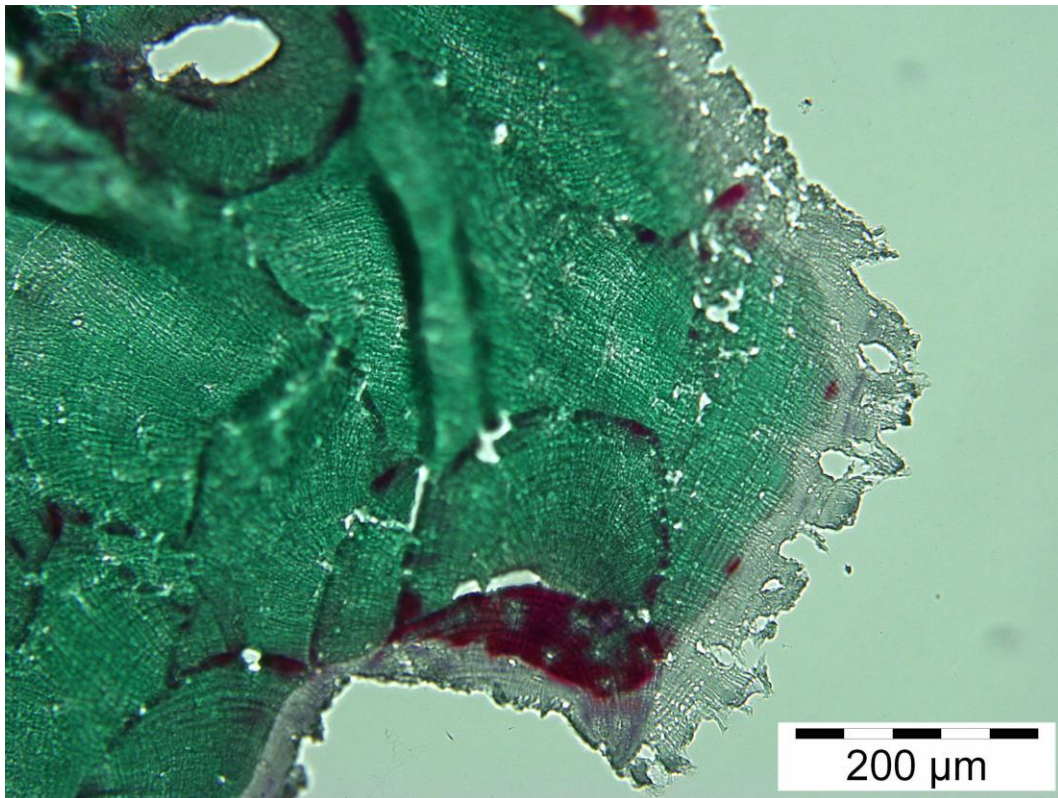


Figura 140. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

La otra submuestra arqueológica superviviente al medio de hipoclorito de sodio y del mismo hueso que la anterior presenta un estado de conservación más alterado (Figura 141).

La muestra se ha deshecho dividiéndose en diferentes fragmentos. A mayor aumento se observa que todos los fragmentos contienen una franja alrededor, inmediatamente próximo al borde externo, sin tinción (Figura 142). Apenas se conservan osteonas y aquellas que lo hacen tienen alterada su estructura. Los canales de Havers conservados están afectados por el medio aumentando considerablemente la luz del canal (Figura 143).

La tinción es completamente heterogénea debido a la influencia del hipoclorito.

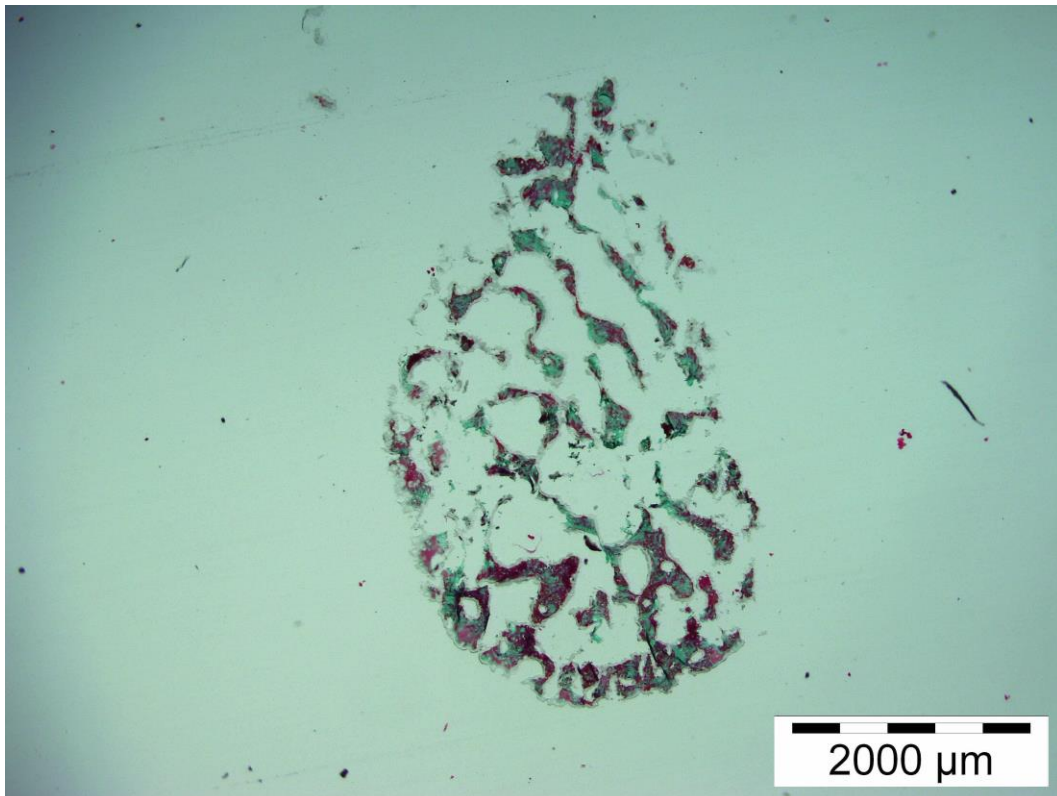


Figura 141. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.

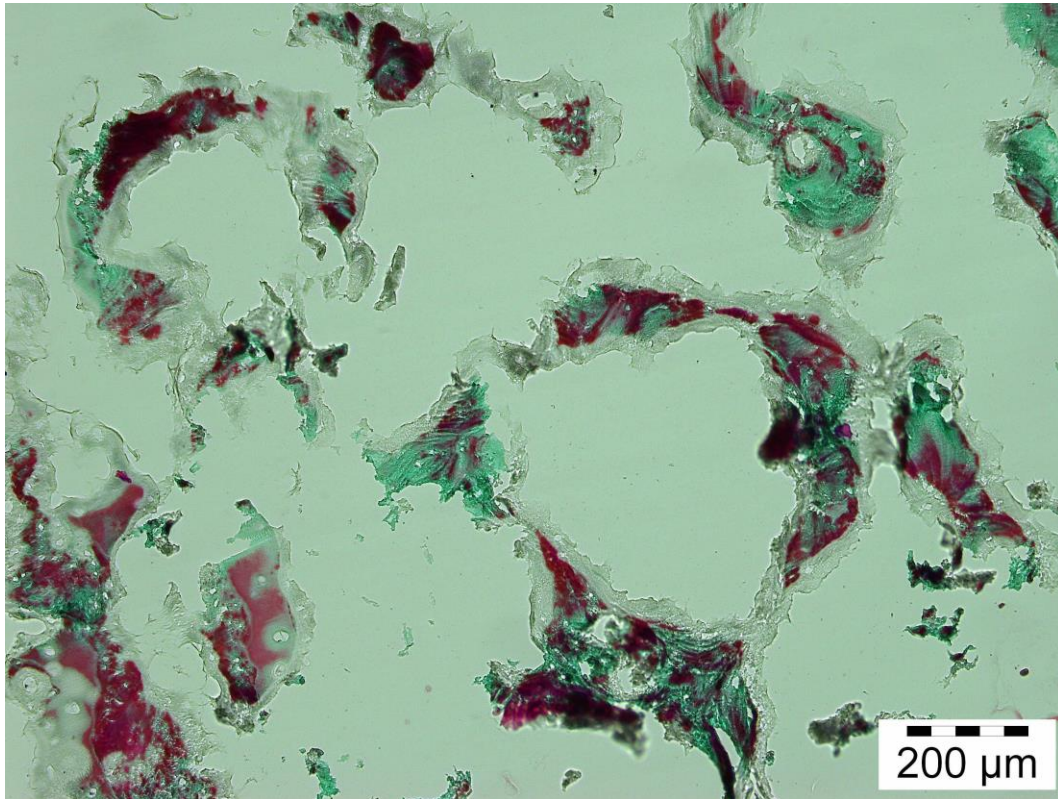


Figura 142. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 10 aumentos.

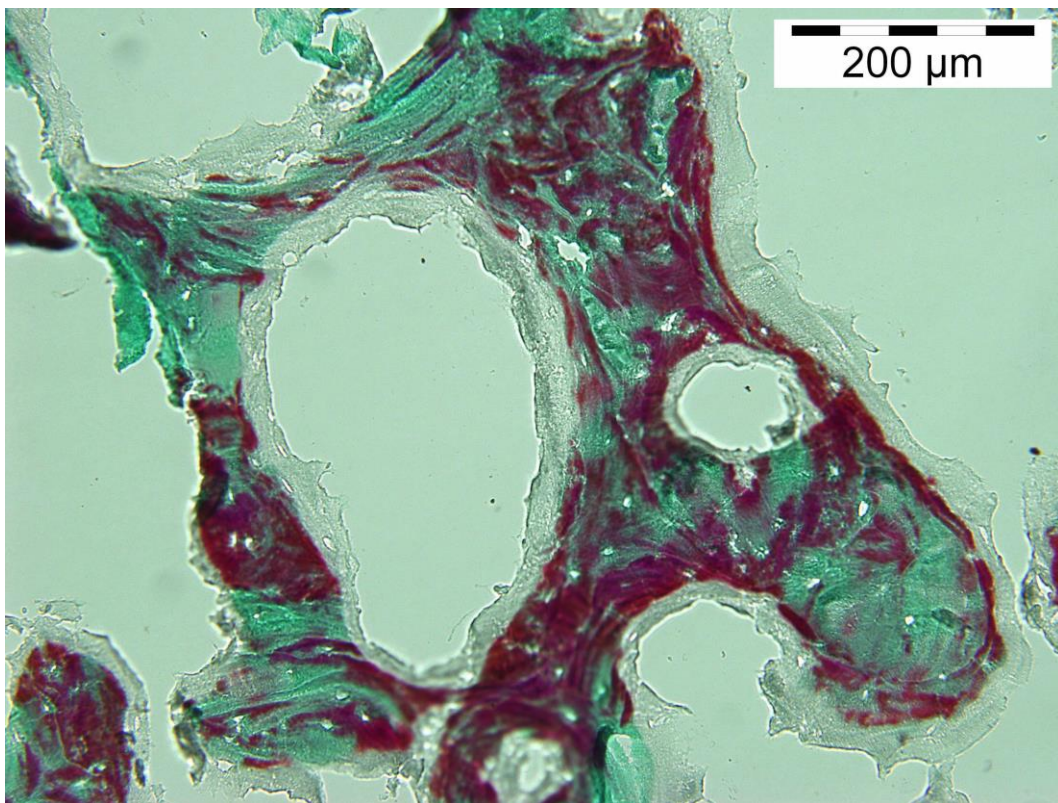


Figura 143. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

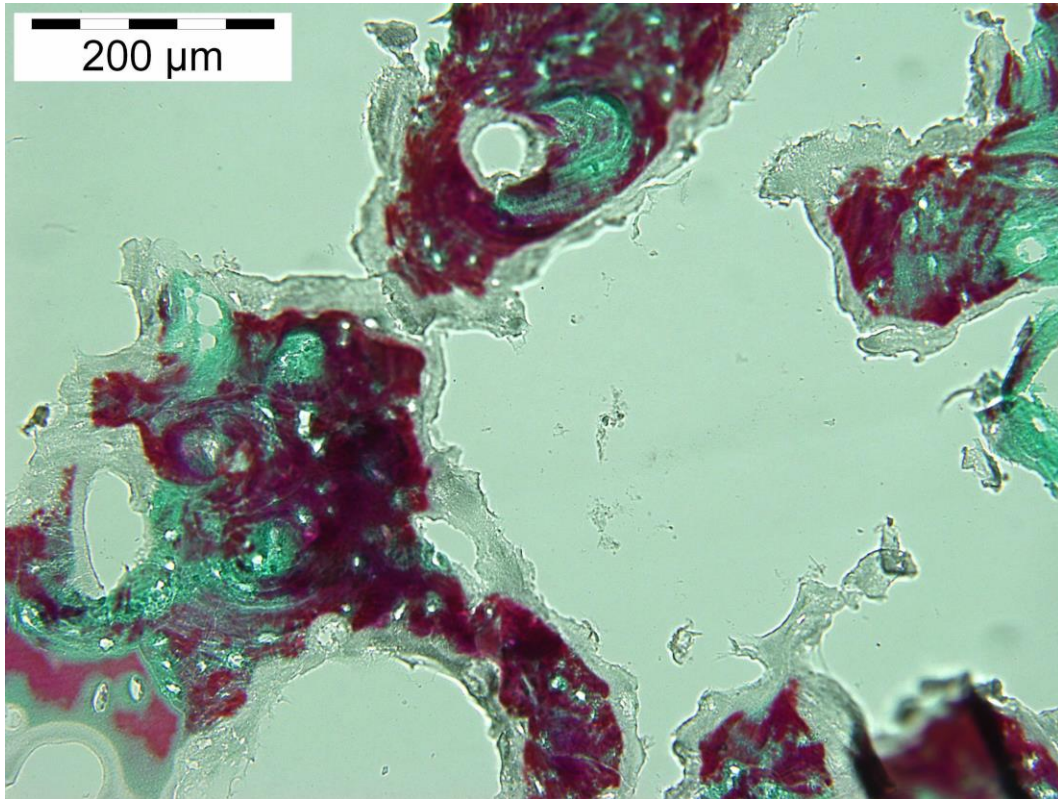


Figura 144. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

## **8.9. Ensayo en un medio de NaClO (hipoclorito de sodio, lejía) durante varios días**

A continuación, se exponen los resultados obtenidos a partir de las imágenes del microscopio óptico sobre las muestras óseas contemporáneas sumergidas en un medio de hipoclorito de sodio durante 2, 3, 4, 9 y 11 días.

Como todas las muestras presentan el mismo estado de conservación se analizarán en su conjunto. El efecto del hipoclorito de sodio se hace efectivo en el mismo momento en el que se sumergen las muestras produciéndose una gran efervescencia que disminuye a medida que pasa el tiempo de exposición. Como resultado se han recuperado pequeños fragmentos de hueso que se han podido procesar para su análisis histológico.

Los efectos degradantes que se observan alteran completamente la estructura original del hueso. El interior de los fragmentos recuperados se puede comprobar que la estructura laminar concéntrica de las osteonas se conserva en algunas muestras (Figuras 148, 150, 155, 159, 161, 162, 163, 164 y 165) sin mostrar alteración del colágeno. Sin embargo, todos los cortes histológicos muestran un avanzado estado de degradación de los canales de Havers (Figura 151, 153 y 157). Todos los fragmentos analizados de todas las muestras y los canales de Havers alterados presentan una franja ausente de tinción alrededor de ellos como se observó en las muestras arqueológicas expuestas durante 28 días.

La tinción es homogénea en todos los fragmentos a excepción de la muestra que estuvo más tiempo expuesta que comienza a presentar regiones menos teñidas e incluso teñidas de coloración rojiza (Figura 159, 161, 162, 163, 164 y 165).

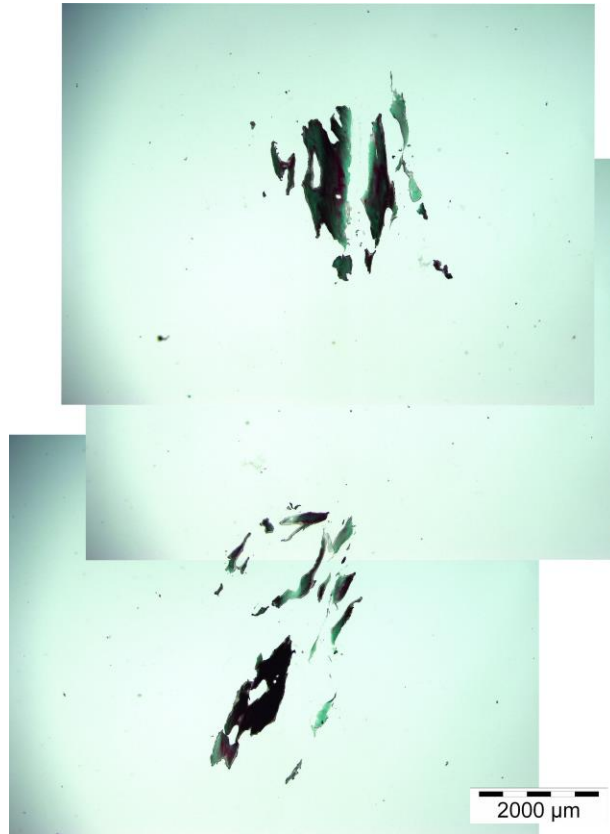


Figura 145. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.

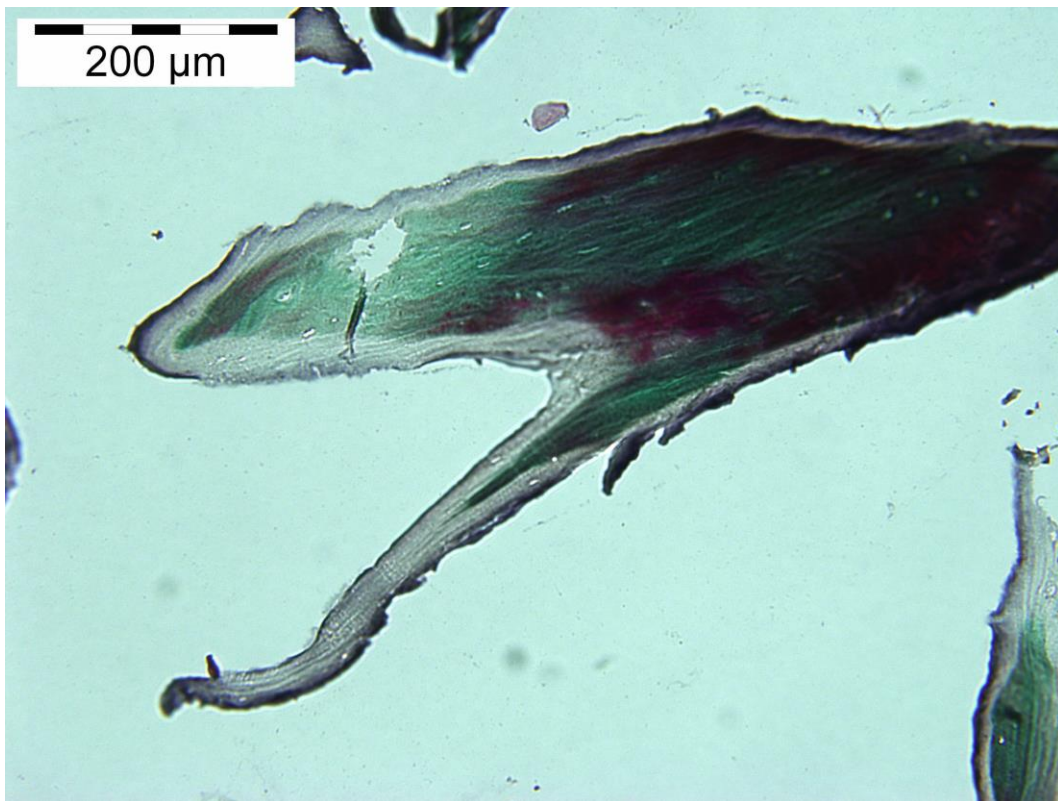


Figura 146. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.

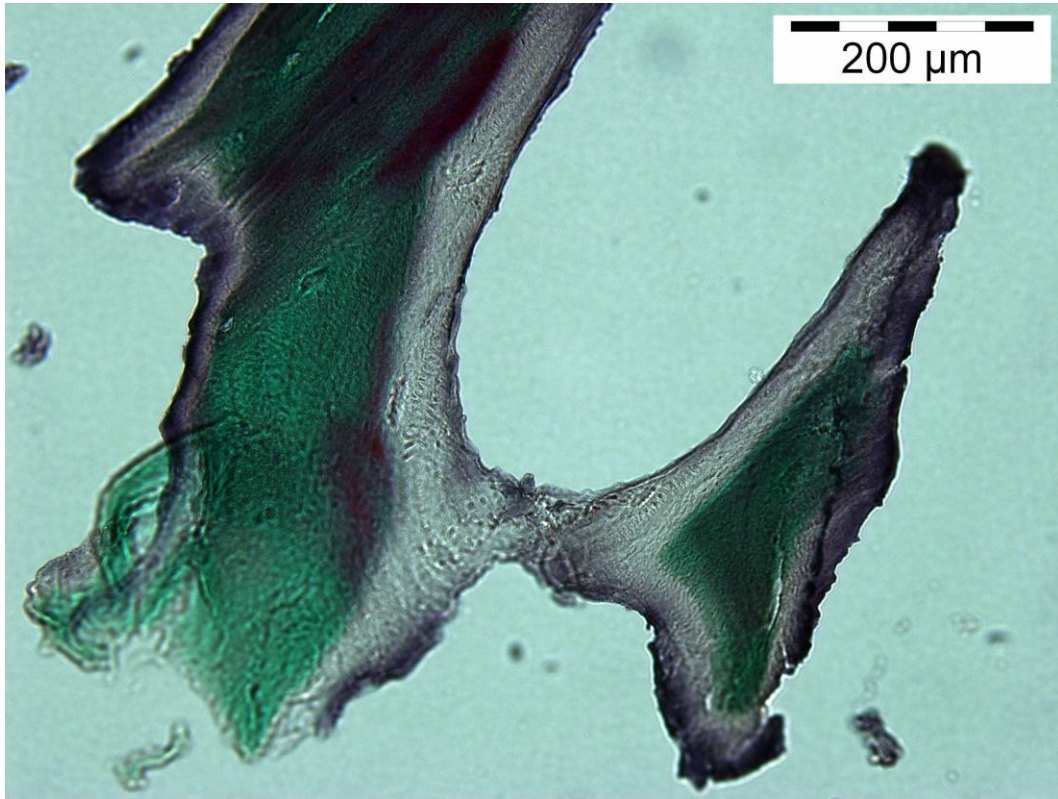


Figura 147. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

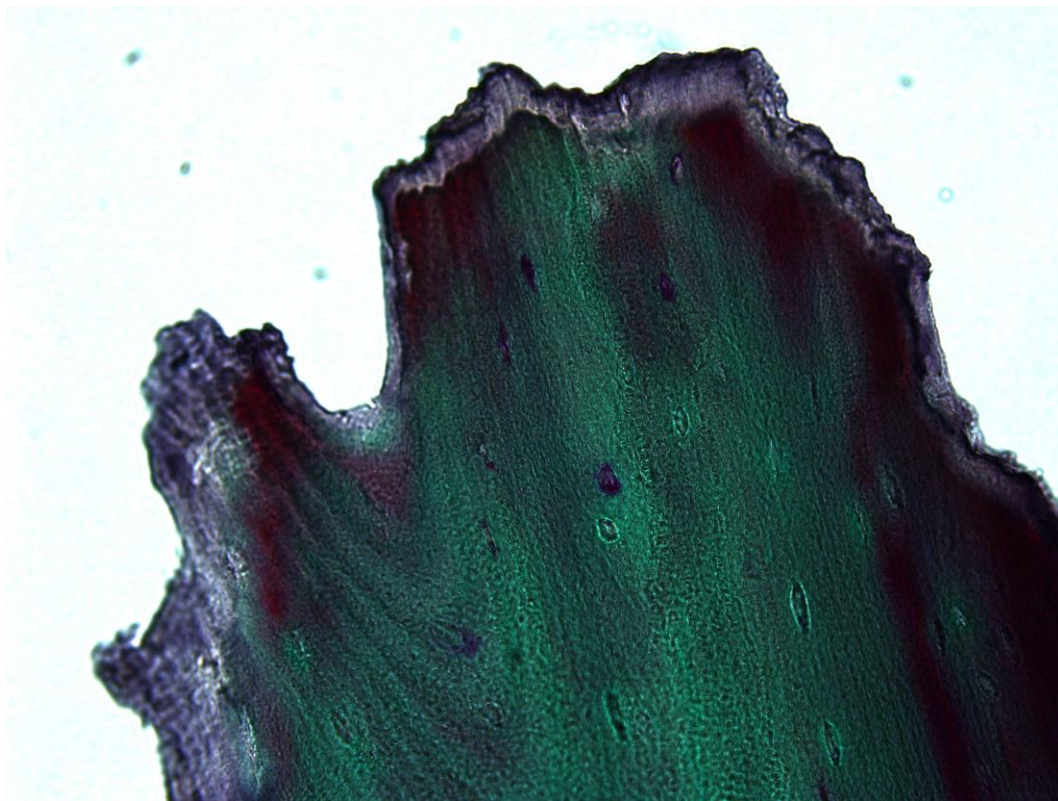


Figura 148. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 días en un medio de hipoclorito de sodio a 40 aumentos.

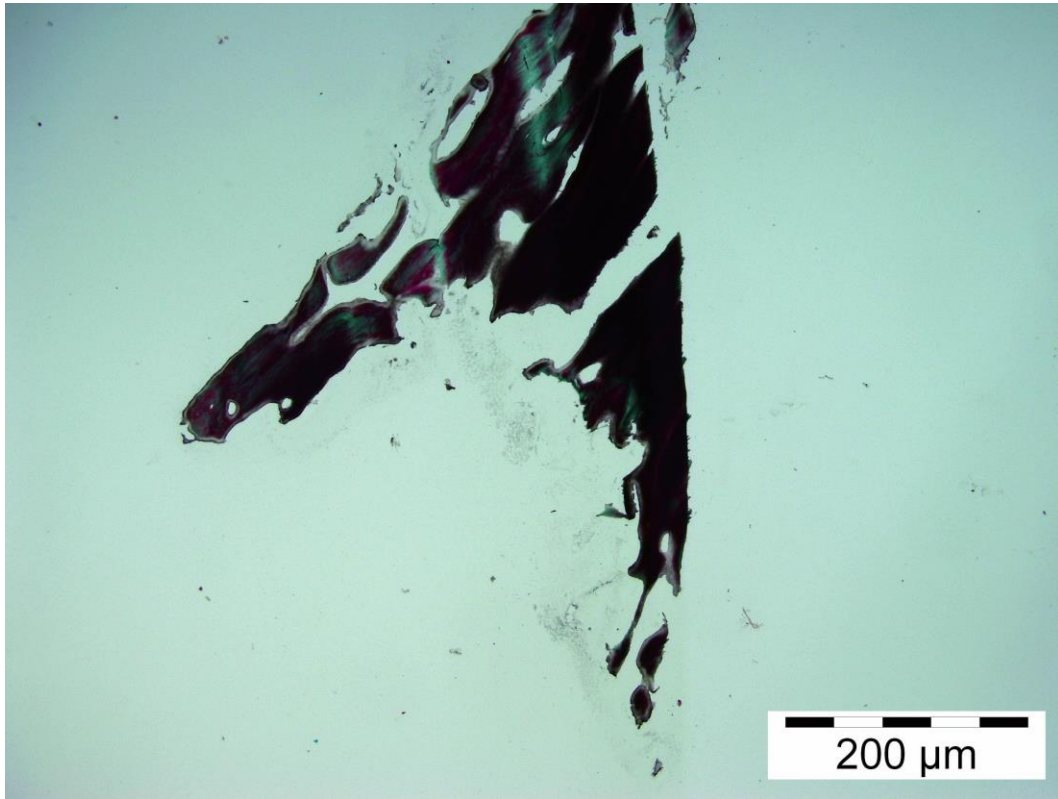


Figura 149. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.



Figura 150. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.



Figura 151. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

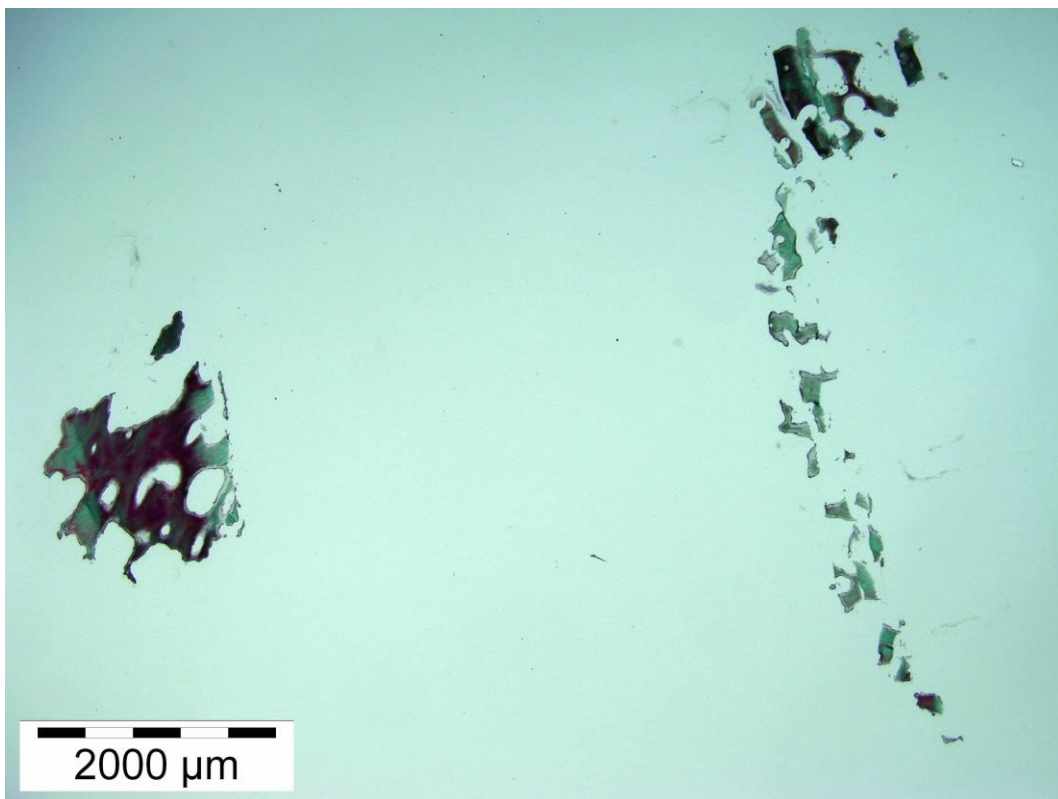


Figura 152. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.

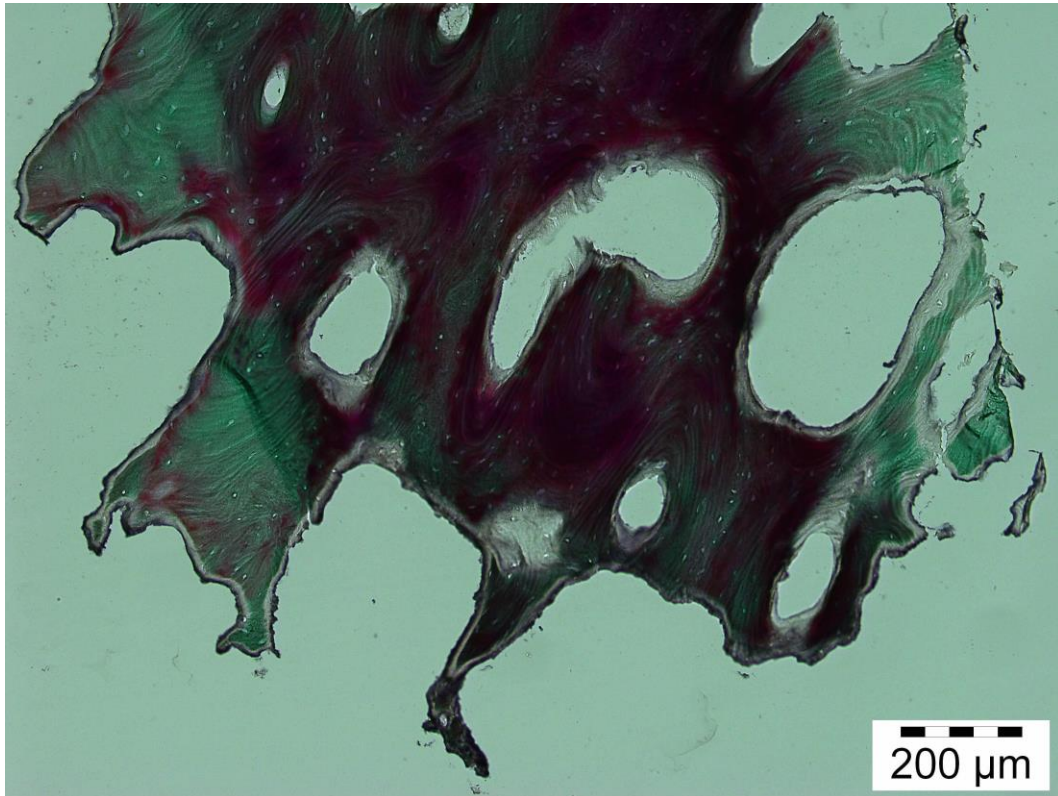


Figura 153. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 días en un medio de hipoclorito de sodio a 10 aumentos.

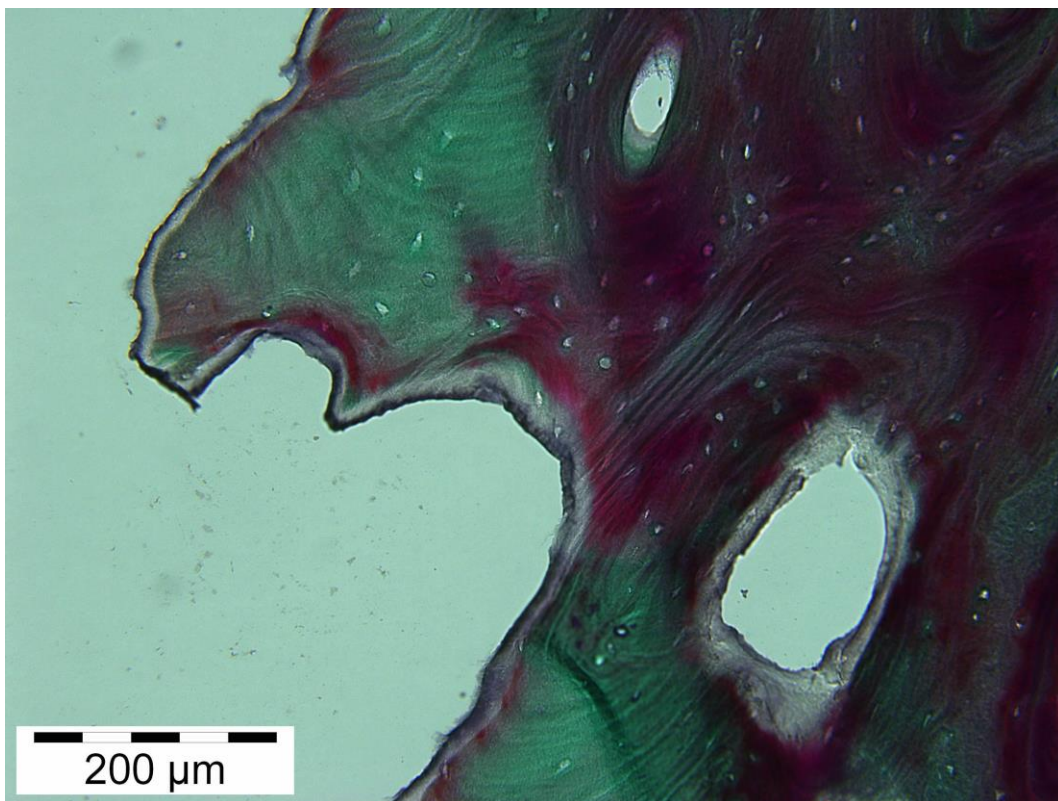


Figura 154. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

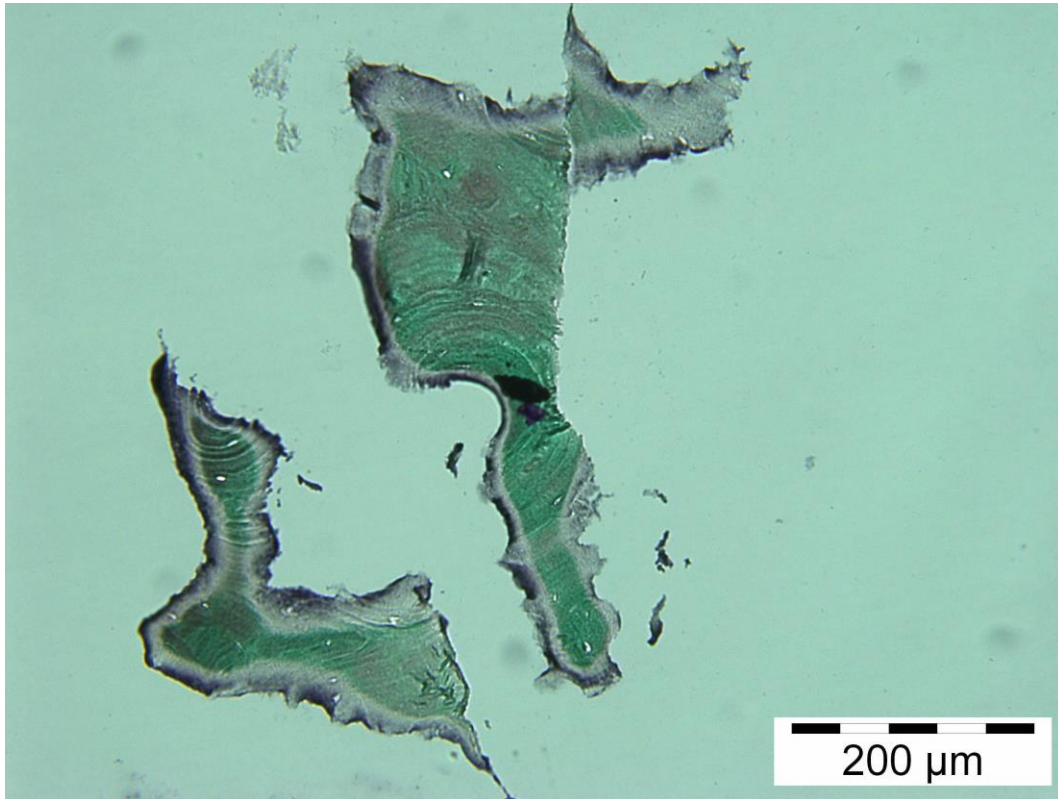


Figura 155. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

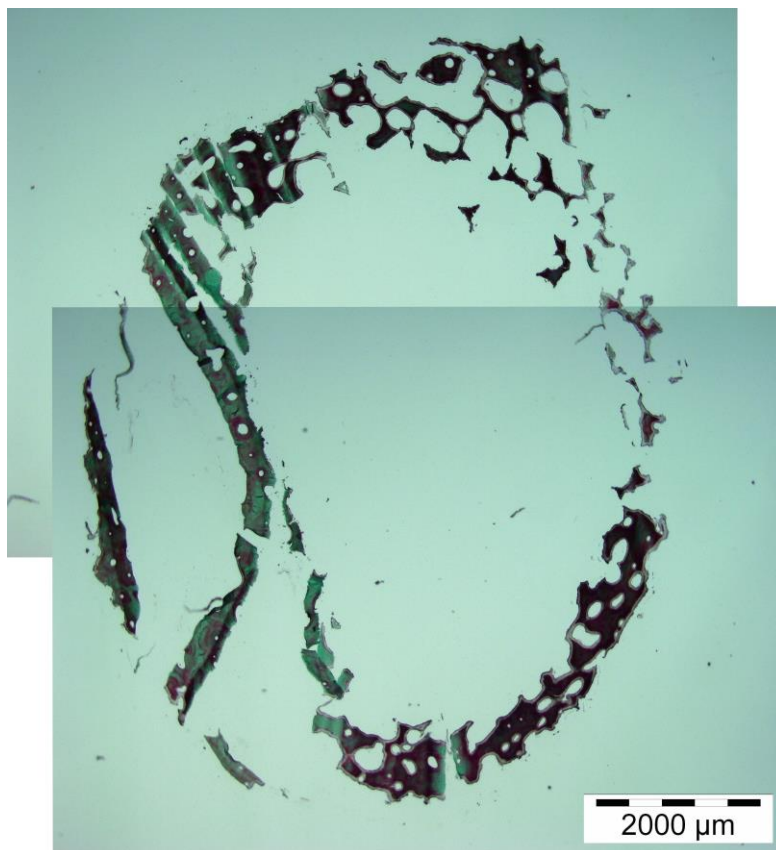


Figura 156. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 9 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.

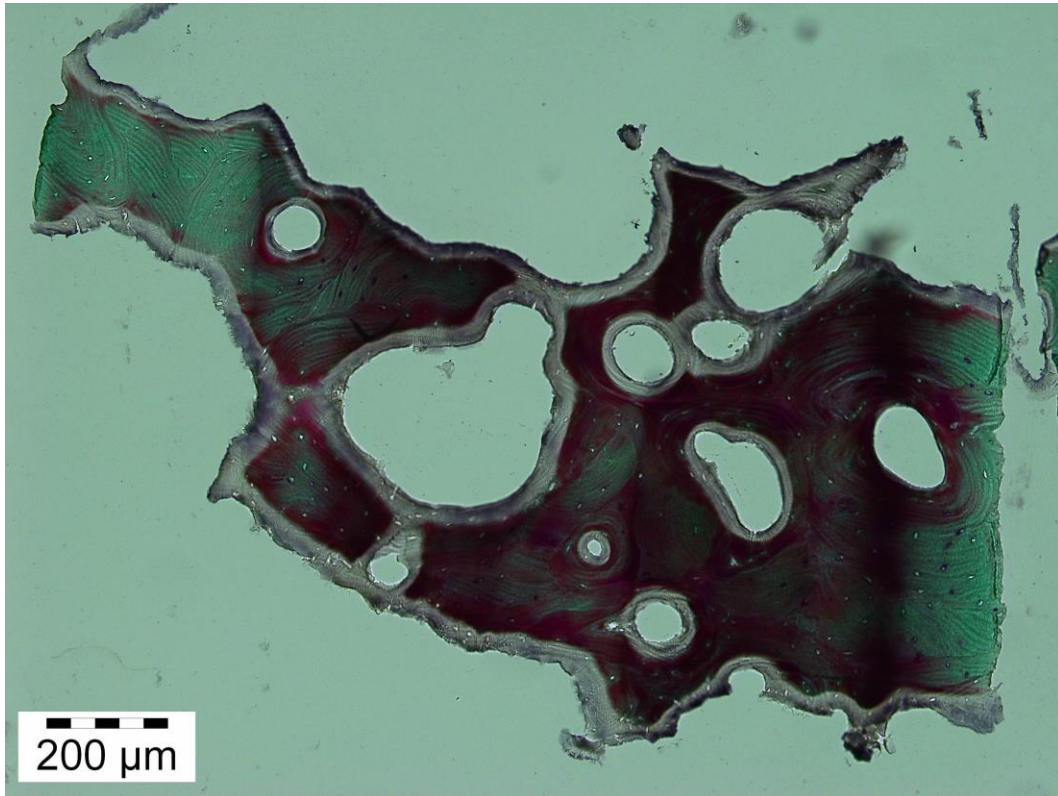


Figura 157. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 9 días en un medio de hipoclorito de sodio a 10 aumentos.



Figura 158. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 9 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

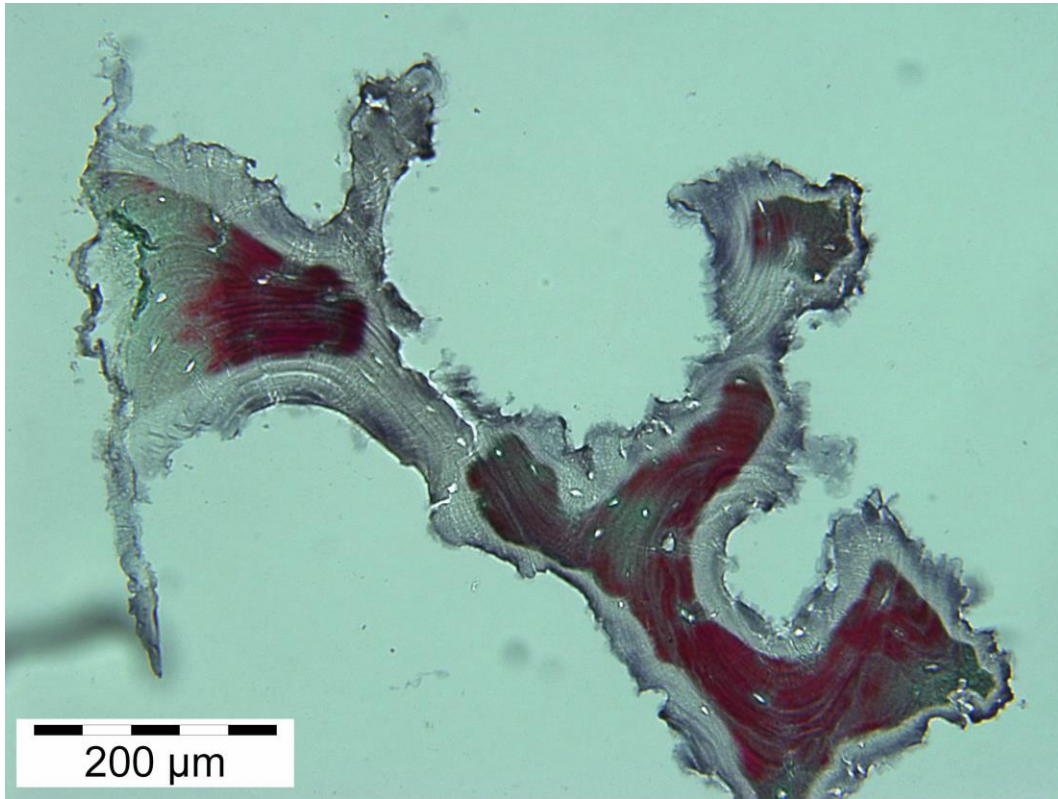


Figura 159. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 9 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

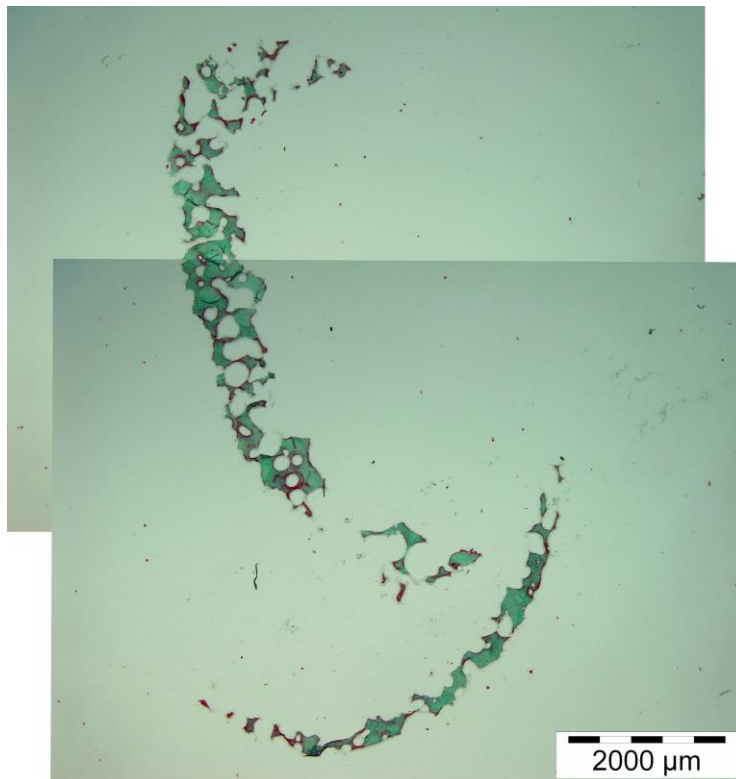


Figura 160. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.

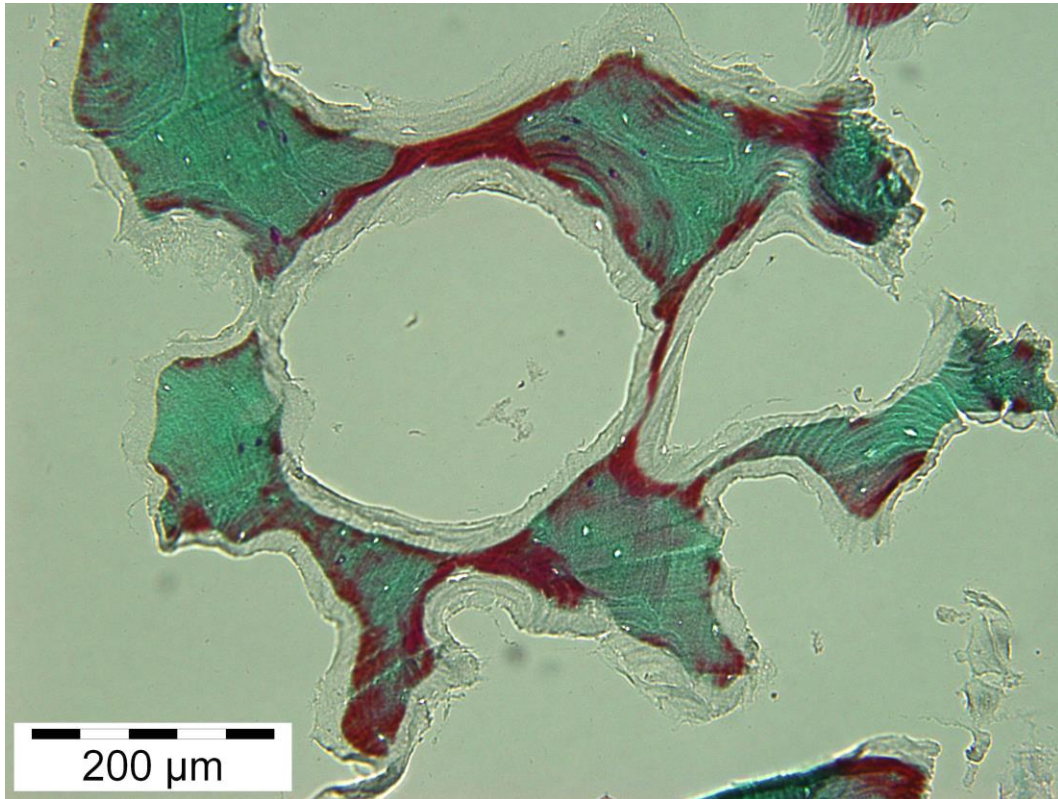


Figura 161. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

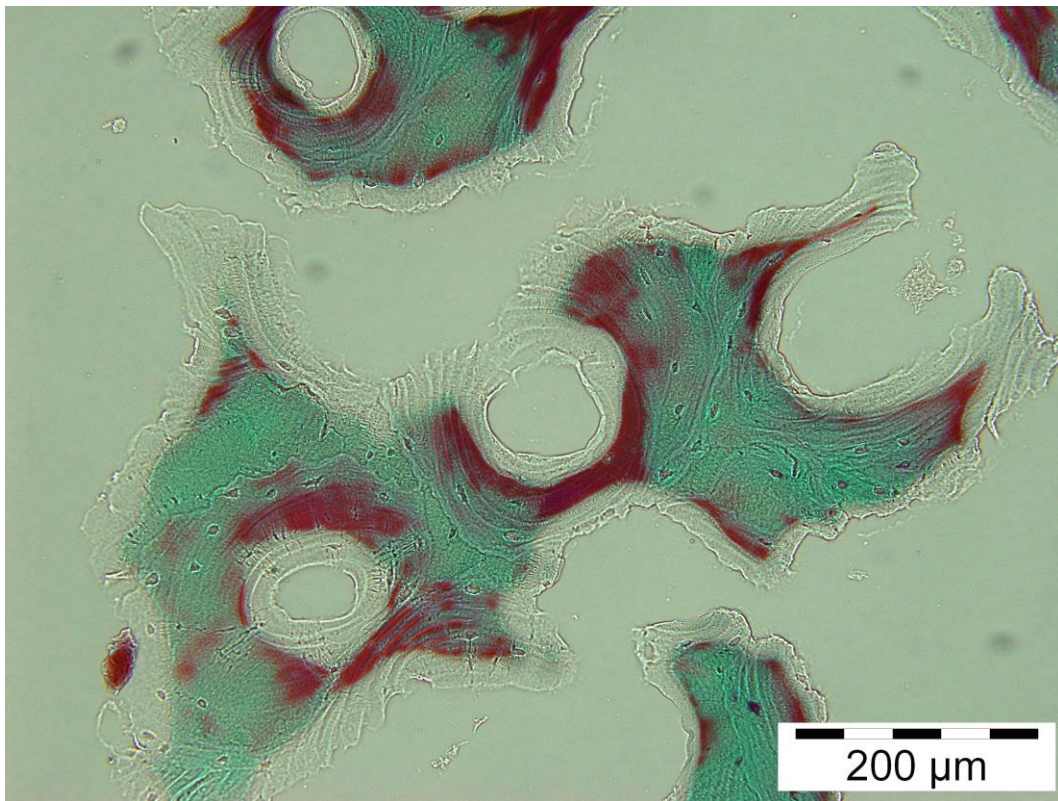


Figura 162. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

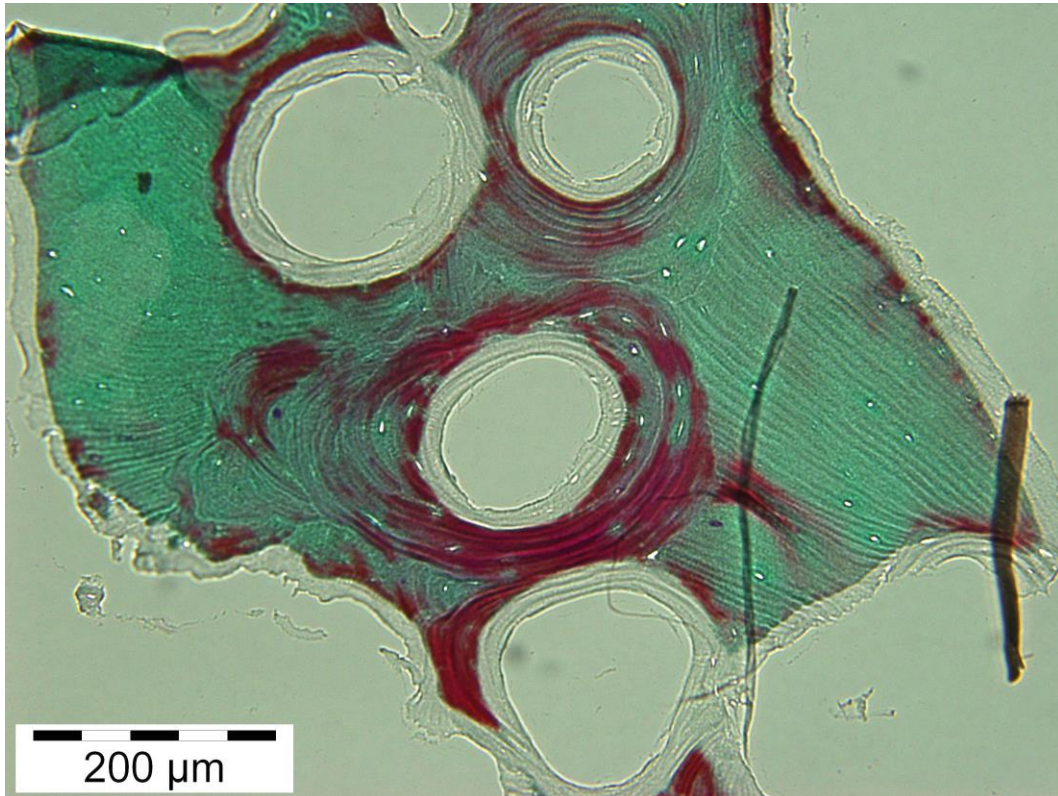


Figura 163. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.

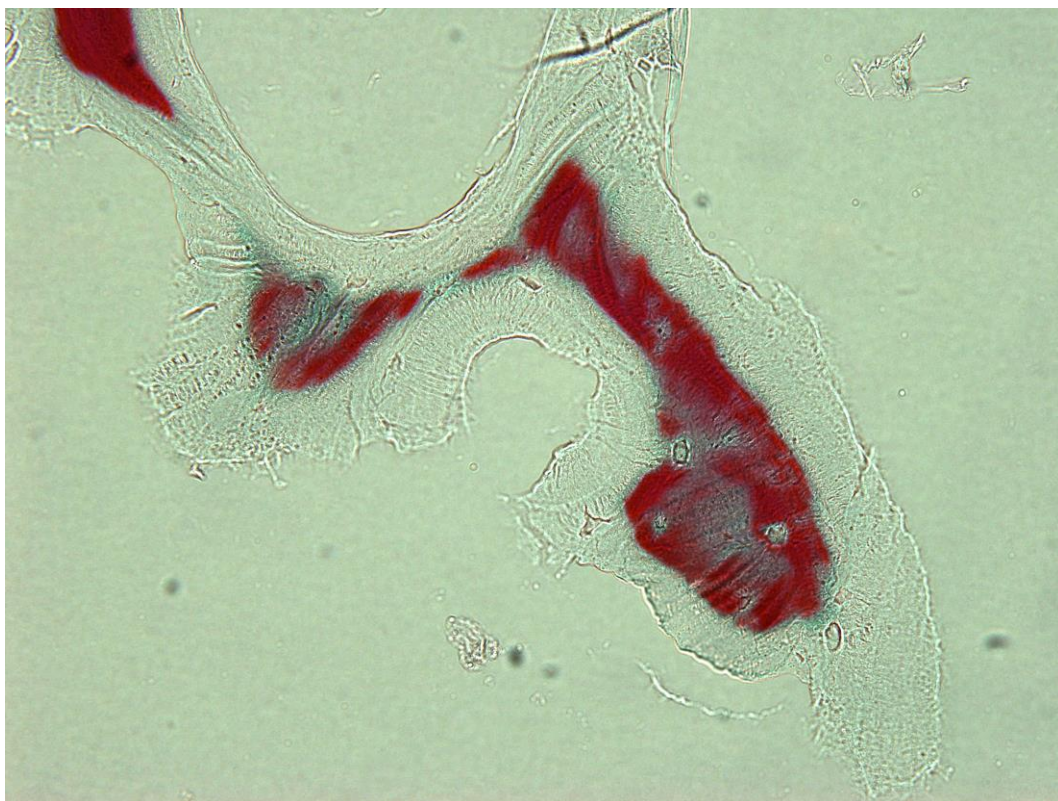


Figura 164. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 40 aumentos.

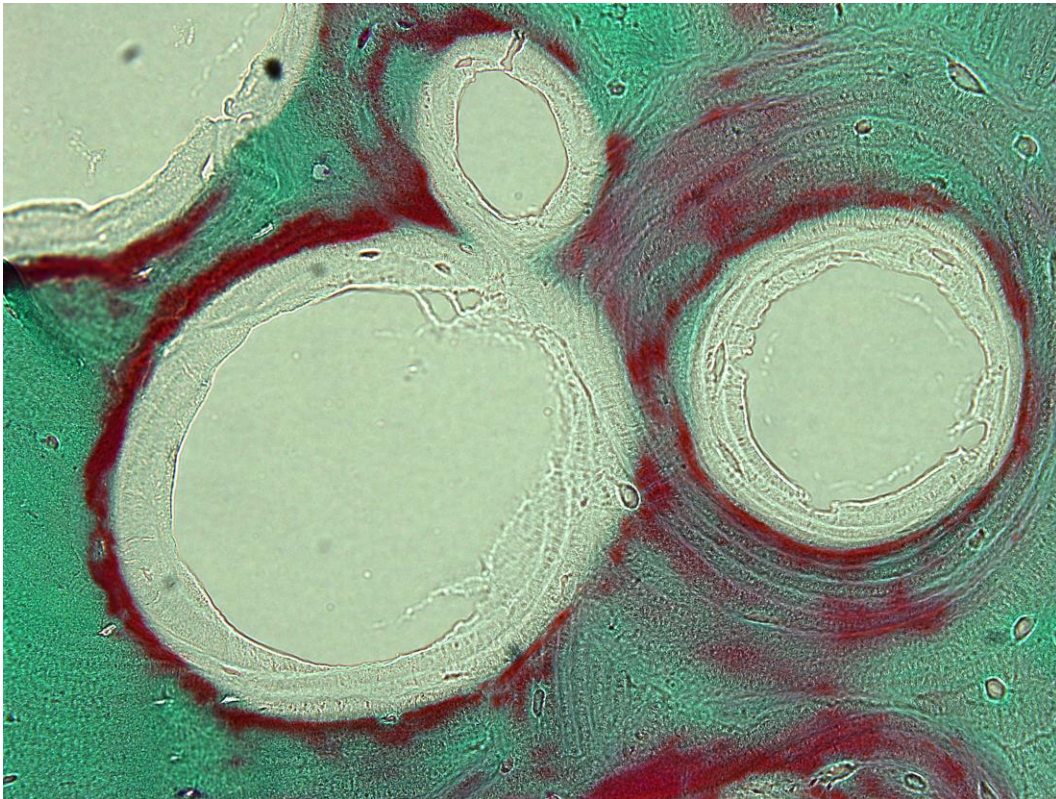


Figura 165. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 40 aumentos.

Para comprobar el efecto que tiene el hipoclorito sobre las muestras y, al no poder cuantificar el área degradada debido al alto grado de destrucción, se procedió a comprobar si existía un incremento en el grosor de la franja sin teñir según el tiempo de exposición. El resultado obtenido indica que se incrementa a medida que pasa el tiempo de exposición, reduciendo su incremento en las últimas etapas del ensayo (Figura 166).

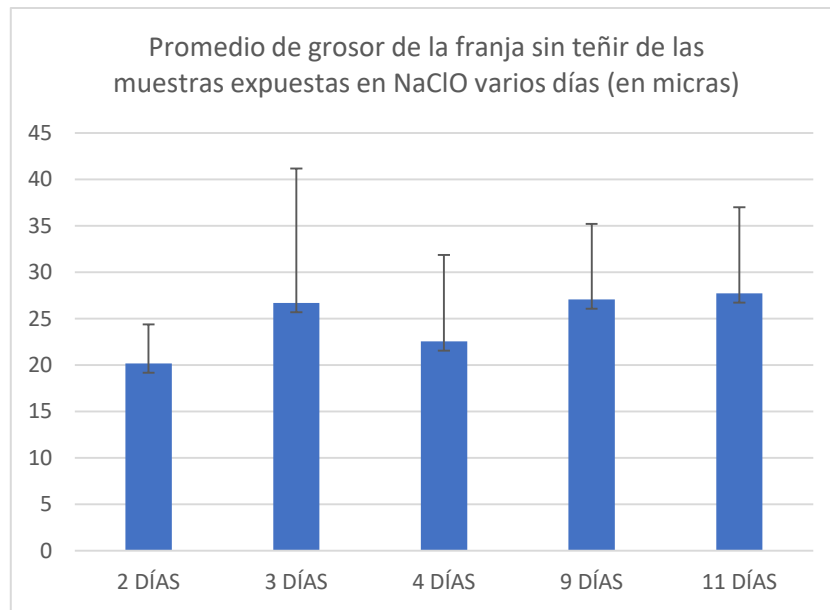


Figura 166. Gráfico del promedio del grosor de la franja descolorida observada en las muestras tratadas con NaClO durante varios días.

El análisis de varianza de los datos obtenidos en la medición del grosor de la línea desconocida indica que existen diferencias significativas según el tiempo en el que han sido expuestas las muestras en el medio de hipoclorito de sodio (Anexo. Tabla 14).

## **8.10. Ensayo en un medio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno, agua oxigenada) durante 26 días**

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en el ensayo con peróxido de hidrógeno durante 26 días sobre una muestra contemporánea y arqueológica de hueso.

En momento de la introducción de la muestra de hueso en el medio peróxido de hidrógeno se produjo una efervescencia en el tubo de ensayo debido a la reacción química con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Todas las muestras sufrieron una gran alteración estructural que afectó a la totalidad del hueso que impidió el análisis cuantitativo del área degradada.

Las submuestras contemporáneas (CON1 y CON2), mostraron reacciones diferentes. De la submuestra CON1 sólo se pudo recuperar un fragmento completamente destruido. No se observó ninguna estructura interna del hueso. A mayor aumento se distinguen algunos fragmentos de hueso compacto y fibras de colágeno. La tinción es heterogénea y se puede distinguir una gran porosidad del medio como consecuencia de la efervescencia producida (Figura 170).

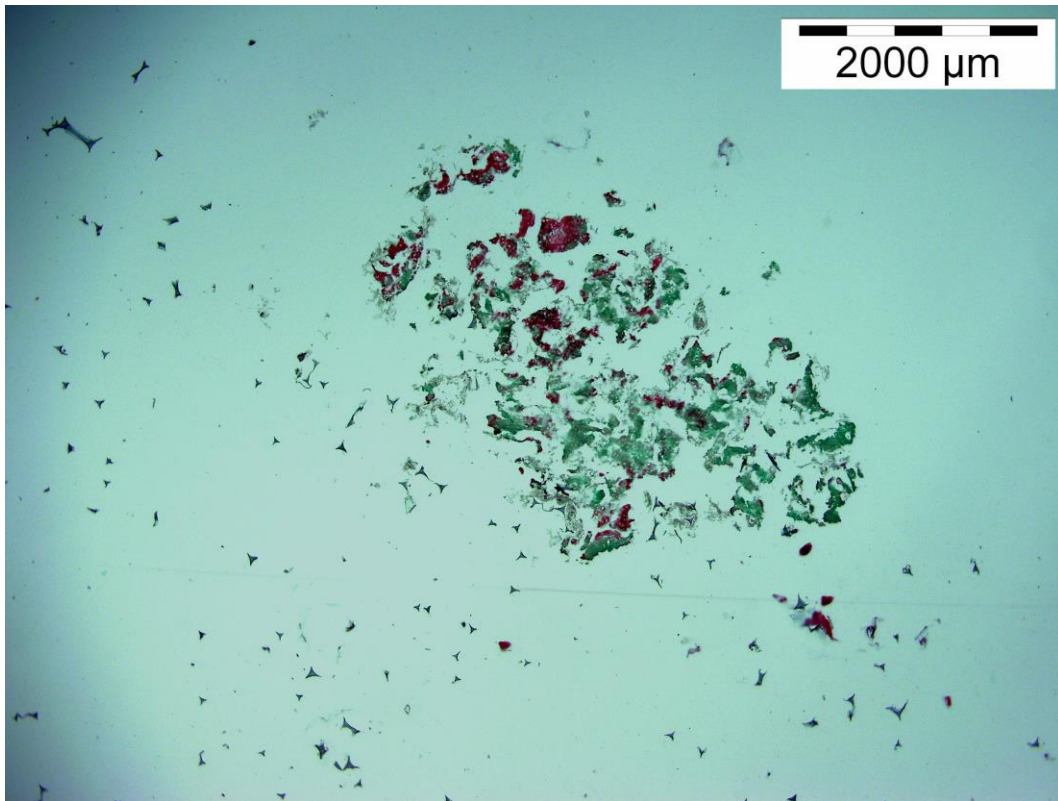


Figura 167. Corte histológico de la muestra contemporánea 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 2 aumentos.

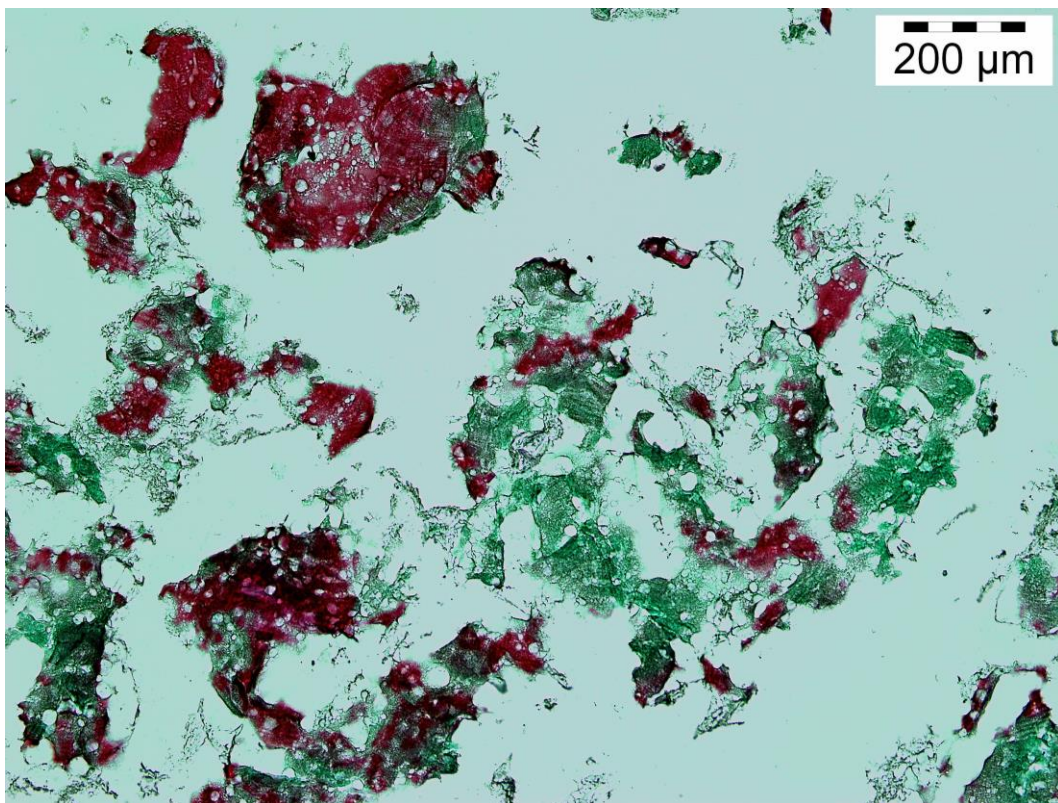


Figura 168. Corte histológico de la muestra contemporánea 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 10 aumentos.

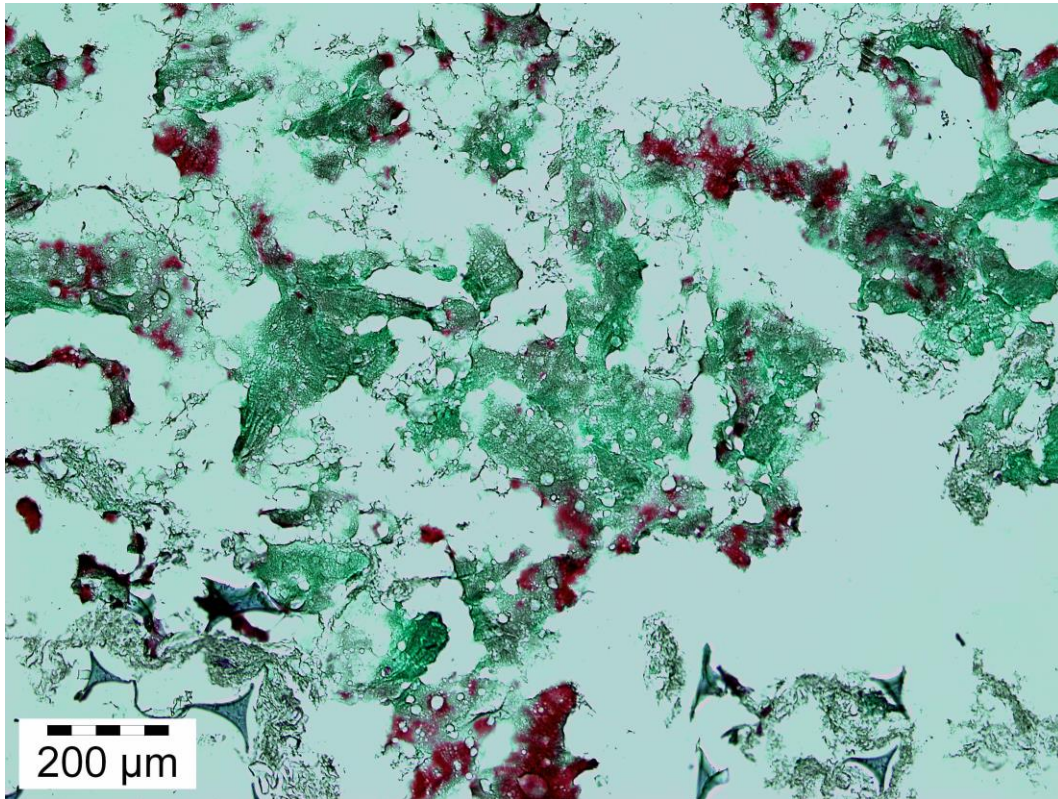


Figura 169. Corte histológico de la muestra contemporánea 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 10 aumentos.

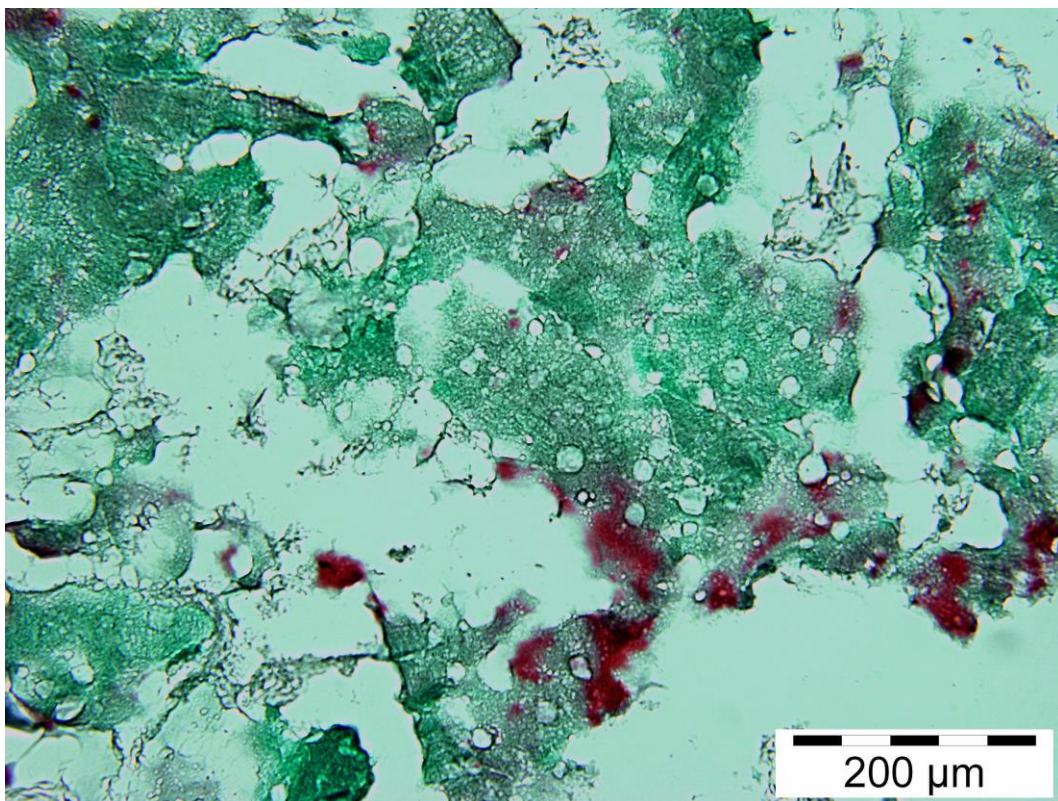


Figura 170. Corte histológico de la muestra contemporánea 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.

De la otra submuestra contemporánea, se conservaron dos fragmentos de hueso. Ambos también perdieron su estructura original. A menor aumento microscópico se puede ver una zona alrededor de los fragmentos con menor tinción. A mayor aumento se comprueba que se han conservado algunas estructuras osteonales muy afectadas. Se distinguen los complejos osteonales separados unos de otros y con los canales de Havers completamente alterados (Figura 172). En la región externa de la muestra, en su zona periférica se distingue un entramado similar al observado en las muestras expuestas en un medio ácido (Figura 173).

La tinción es heterogénea en toda la muestra destacando la región externa de la muestra que presenta menor concentración de colágeno.

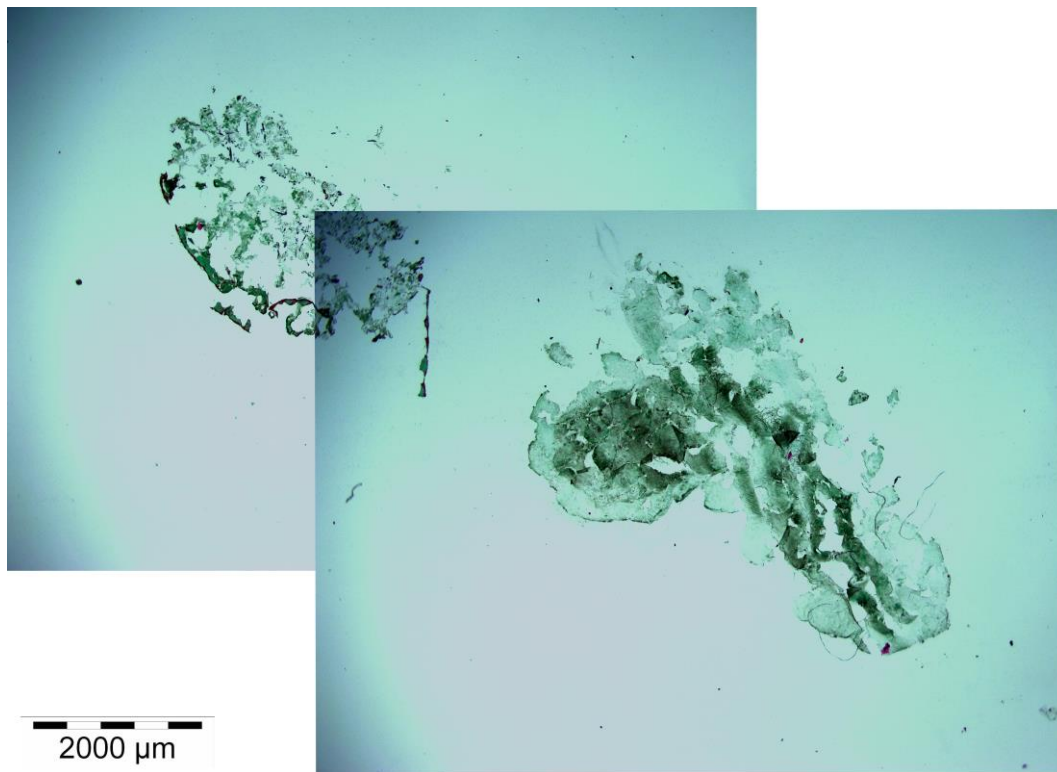


Figura 171. Corte histológico de la muestra contemporánea 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 2 aumentos.

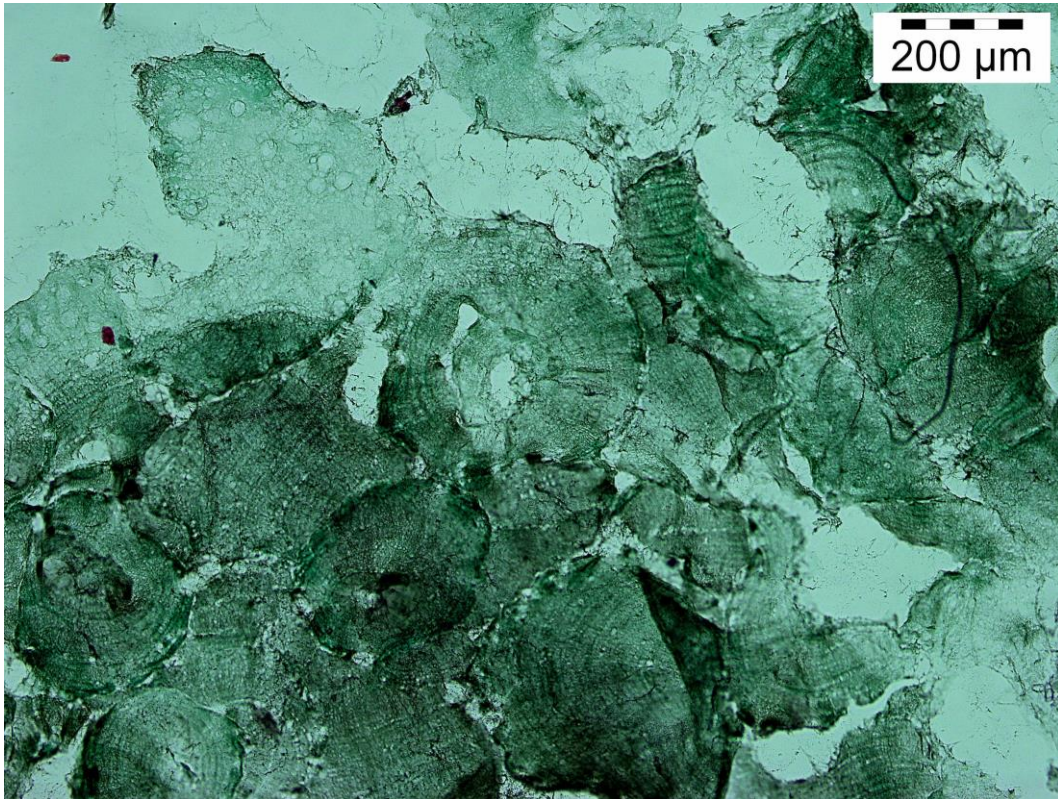


Figura 172. Corte histológico de la muestra contemporánea 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 10 aumentos.

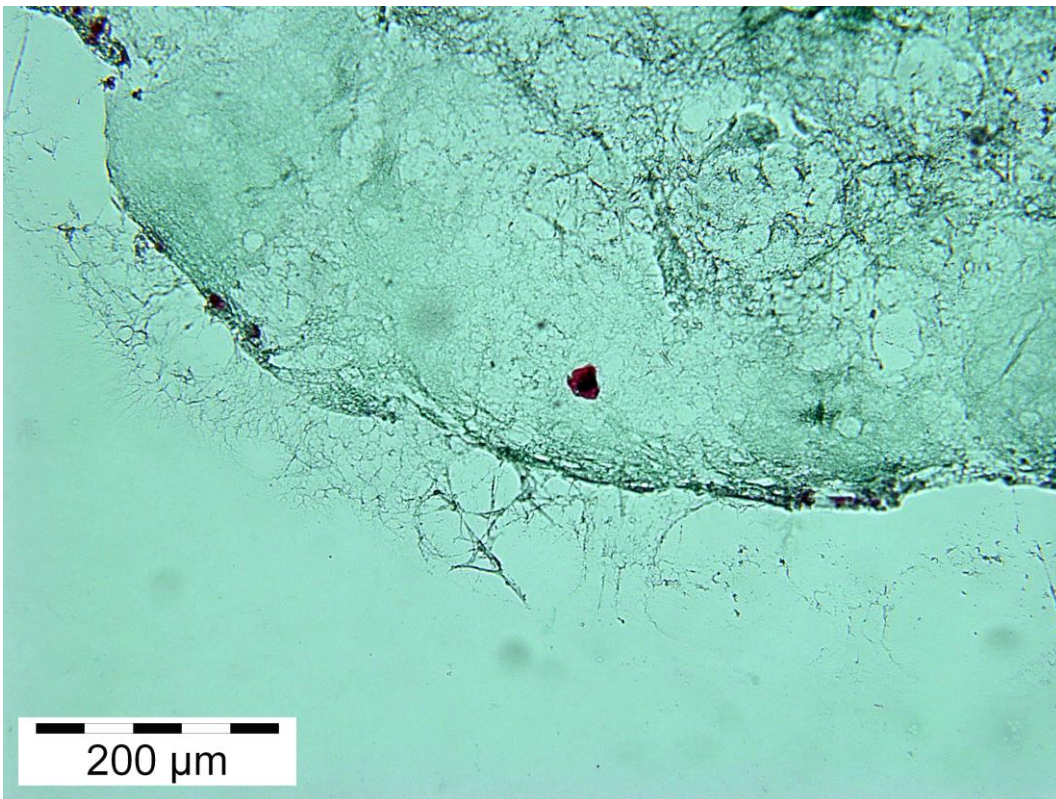


Figura 173. Corte histológico de la muestra contemporánea 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.

Las submuestras arqueológicas presentan una degradación similar. De ambas muestras se ha podido recuperar más cantidad de material, pero que analizado al microscopio óptico se comprueba que las estructuras internas del hueso están completamente destruidas. Se pueden distinguir algunas osteonas y canales de Havers (Figura 179). También se observa la destrucción de los canalículos en aquellas regiones mejor conservadas. En toda la muestra la porosidad está muy presente como consecuencia de la efervescencia. La tinción no es heterogénea en ambas muestras (Figuras 176 y 181).

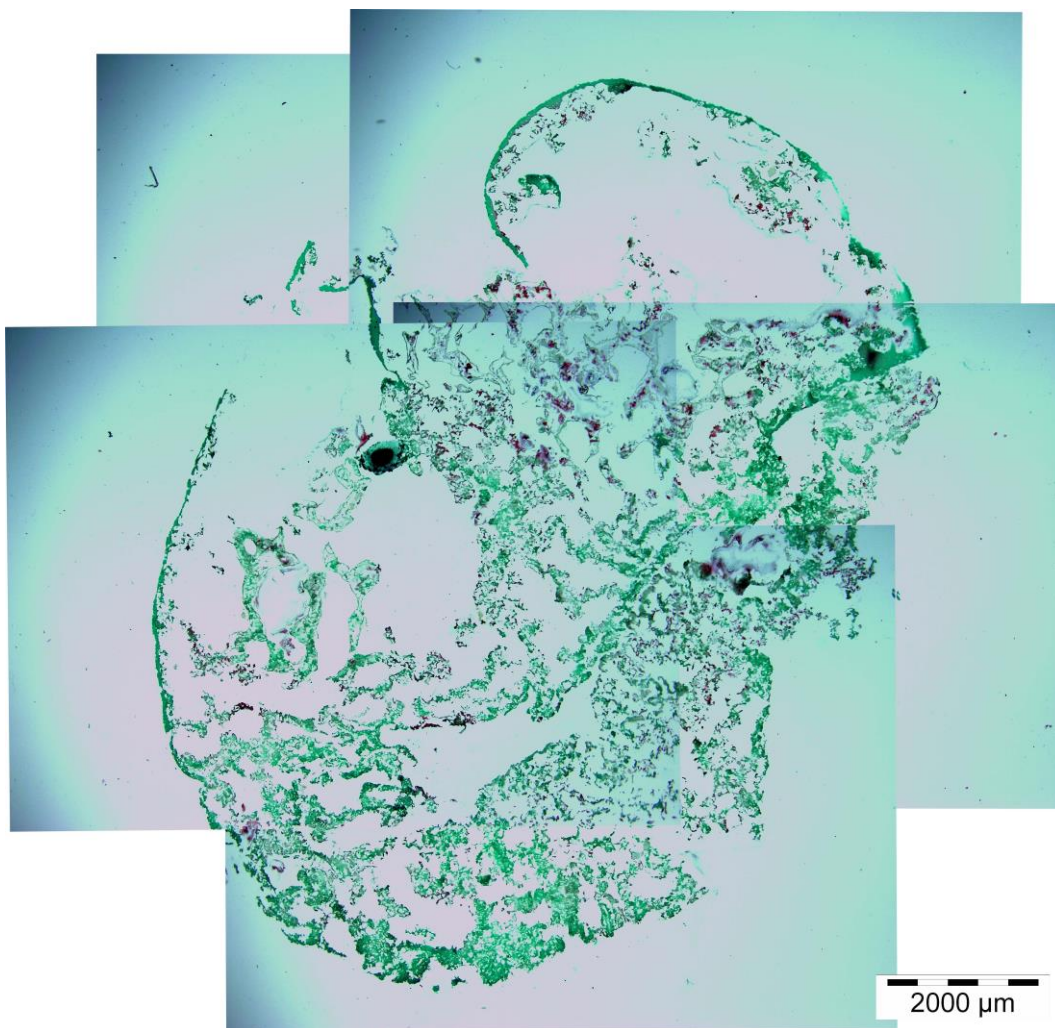


Figura 174. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 2 aumentos.

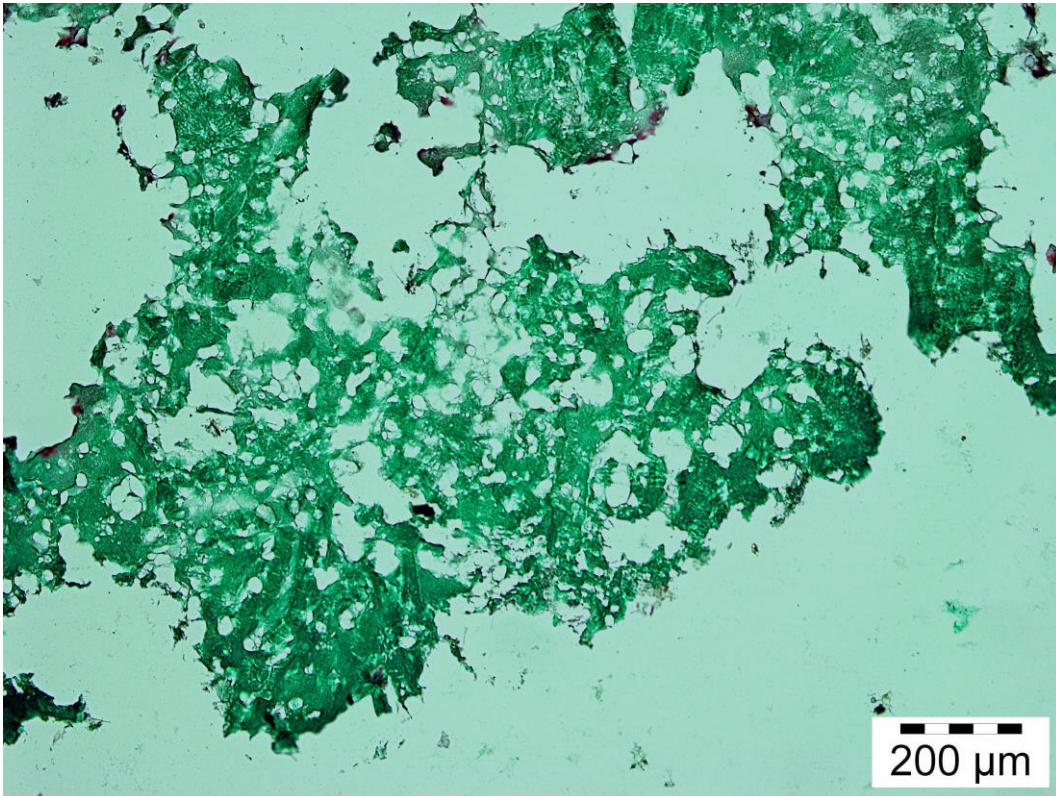


Figura 175. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 10 aumentos.

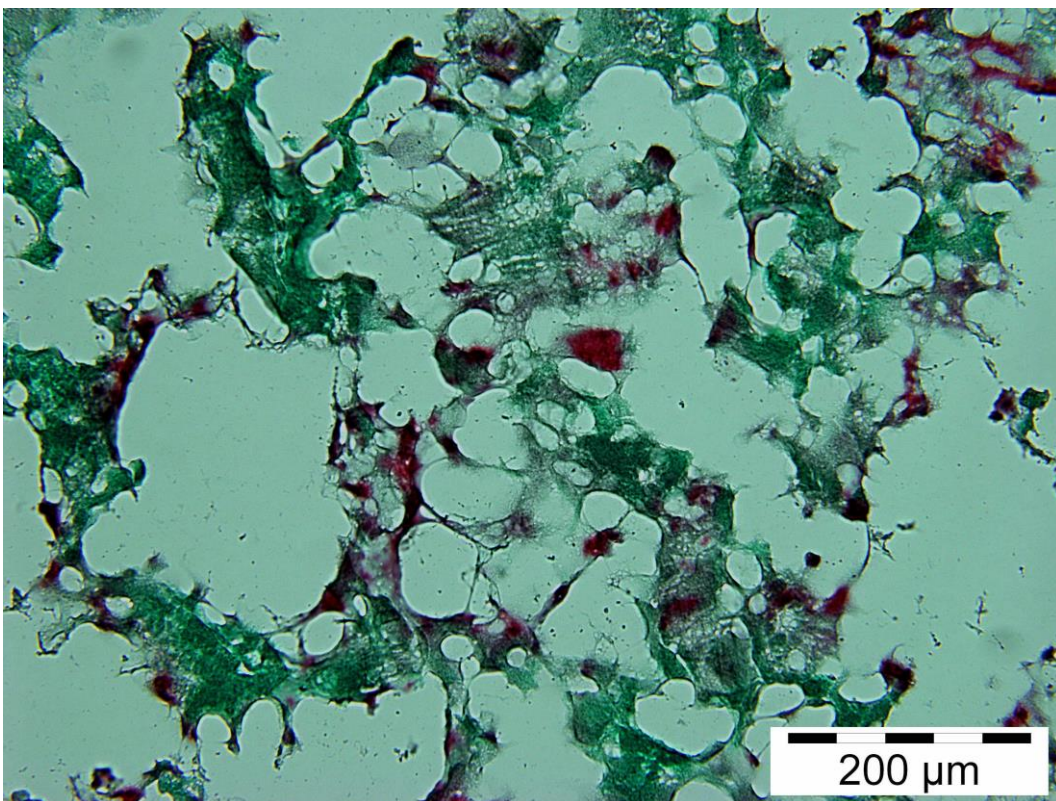


Figura 176. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.

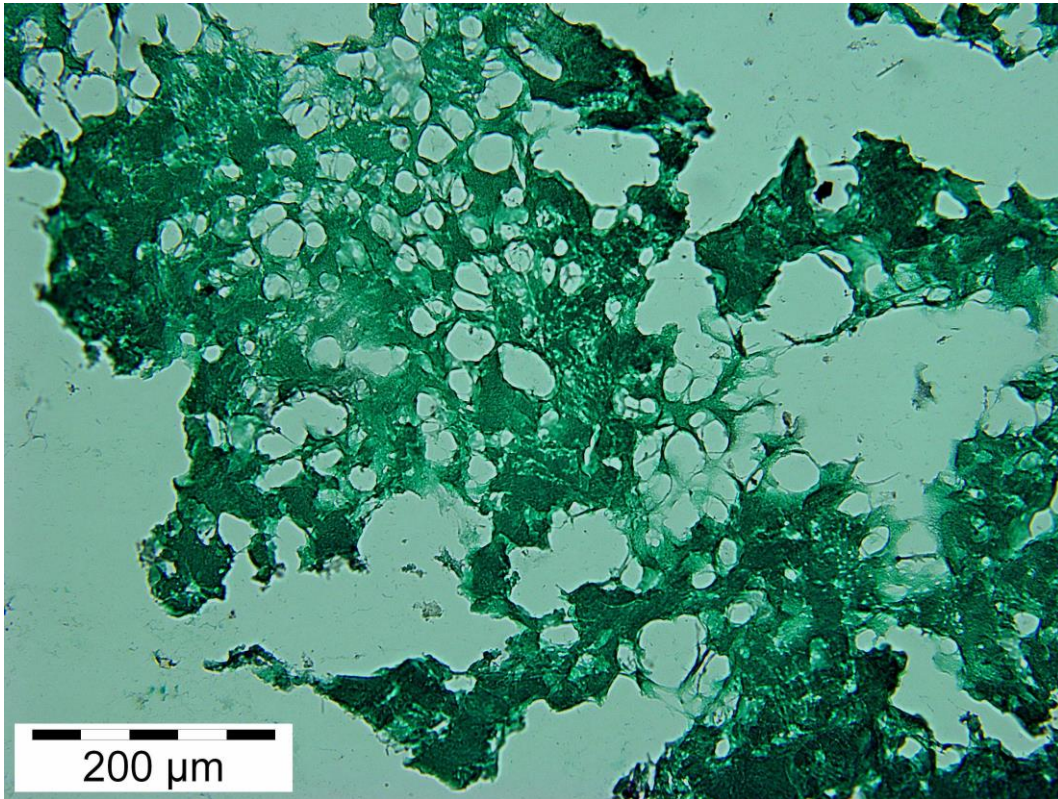


Figura 177. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.

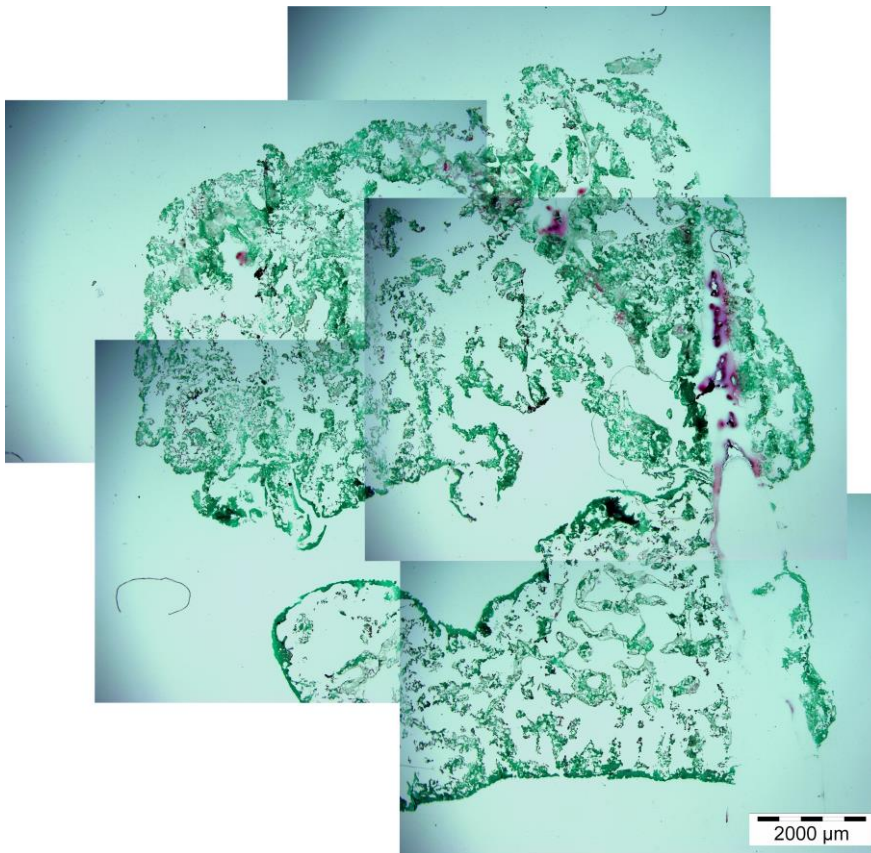


Figura 178. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 2 aumentos.

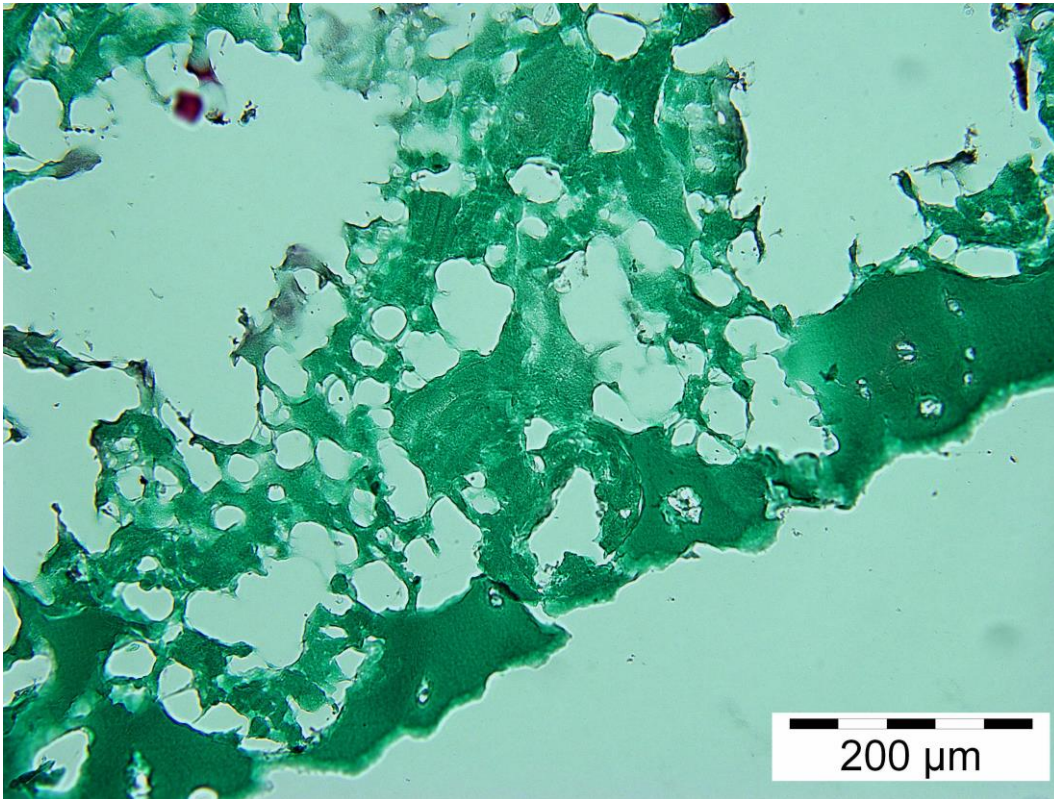


Figura 179. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.

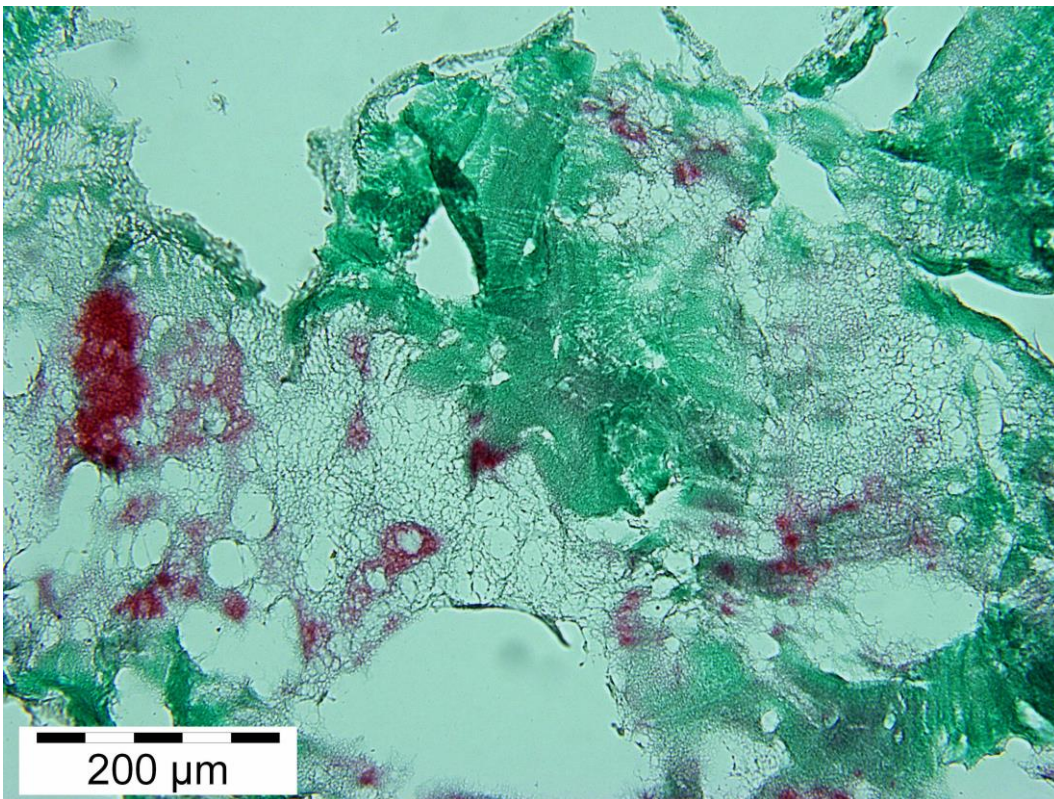


Figura 180. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.

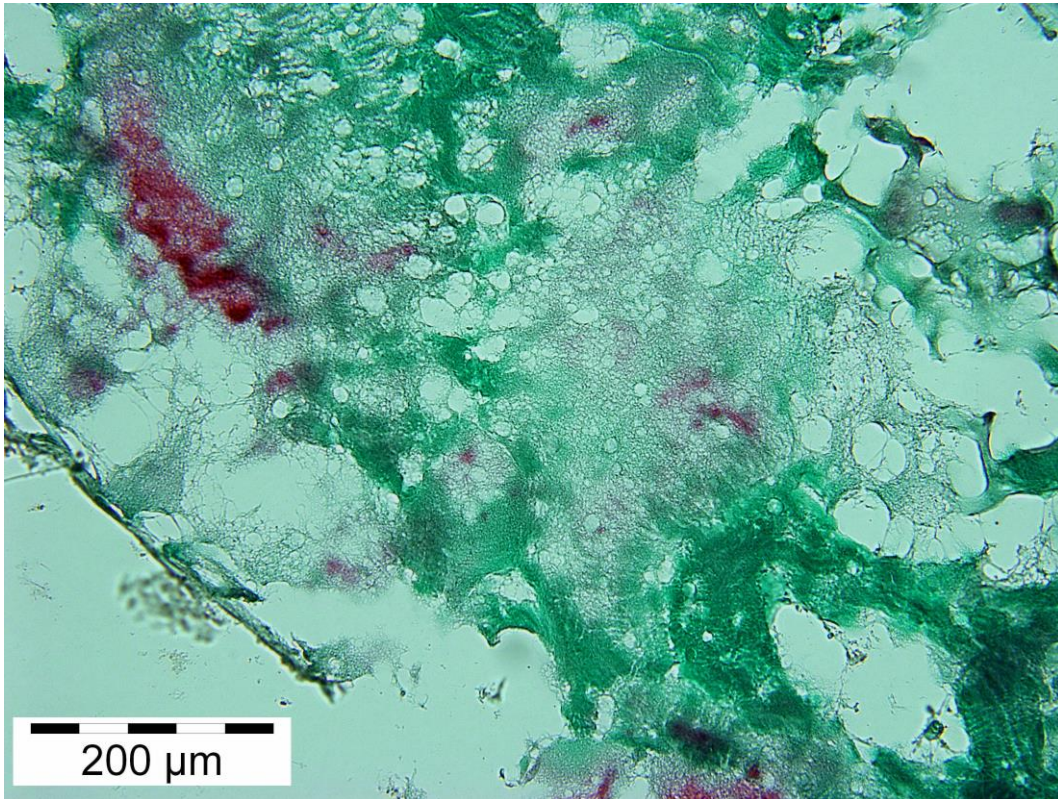


Figura 181. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.

## **9. DISCUSIÓN**



Los resultados obtenidos en la experimentación realizada con los diferentes medios sobre una muestra osteológica arrojan información muy interesante para el cumplimiento de los objetivos de esta tesis. Las características del medio han hecho que la reacción con la fase orgánica e inorgánica del hueso se pueda identificar de manera precisa dando lugar a unos resultados llamativos que se discuten a continuación.

### **Ensayo preliminar a pH 5.5 durante 4,5 horas**

La experimentación preliminar para comprobar si un medio con un pH 5.5 a distintos tiempos afecta a una muestra de hueso seco contemporánea y arqueológica, ha dado como resultado que, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, la muestra sufre una degradación observada microscópicamente tanto en las muestras que terminaron el proceso de descalcificación para su corte histológico, como en aquellas que no lo superaron.

Este fenómeno no está relacionado con la naturaleza de las muestras ya que tampoco existen diferencias significativas entre las muestras de origen arqueológico y las de origen contemporáneo (Turner-Walker, 2007).

En todas las imágenes obtenidas se observa que el hueso cortical se ve afectado en mayor o menor medida produciendo una separación o destrucción del mismo, tanto en el exterior de la muestra como en el canal diafisiario. Esto es debido al mayor contacto de estas superficies con el medio.

Por la propia estructura interna del hueso y el tiempo transcurrido, la penetración del medio ácido dentro de la muestra a través de la porosidad generada de nuevo, actúa sobre las líneas de cemento entre las osteonas y los espacios intersticiales, permitiendo la degradación en estos lugares (Turner-Walker, 2007). Además, la intrusión del medio ácido a través de los canalículos, que comunican las lagunillas que albergan a los osteoclastos, conduce a la destrucción de los microcanales del hueso haciendo más visible estas estructuras al microscopio óptico.

En algunas regiones de las muestras, como por ejemplo en la muestra contemporánea expuesta durante 150 minutos (ver Figura 13), se ha observado que el colágeno sufre un proceso de “desnaturalización” que hace que las fibras se separen unas de otras, al diluirse la estructura mineral interna, proporcionando una imagen de aspecto deshilachado o reticulado.

En resumen, el medio ácido ha penetrado por los canales naturales que tiene el hueso actuando sobre la fase mineral y sobre aquellas regiones que contienen más concentración de hidroxiapatita como, por ejemplo, en la cortical del hueso.

En aquellos canales más estrechos donde la difusión del medio es más lenta, la propia disolución de la hidroxiapatita, que consume iones de hidrógeno, aumenta el pH circundante llegando incluso a detener la reacción al no permitir su flujo (Turner-Walker, 2007).

### **Ensayo en un medio ácido a pH 3.8**

El efecto que tiene un medio ácido extremo sobre una muestra de hueso seco contemporánea en diferentes tiempos es el deseado. A un pH ácido extremo es esperable que las estructuras óseas se degraden mostrando una ausencia de la fase mineral y se conserve gran parte del colágeno.

A medida que aumenta la exposición de la muestra en el medio ácido se incrementa significativamente el porcentaje de degradación del hueso y, por consiguiente, el área degradada (Nielsen *et al.*, 2000).

El límite subperióstico y el de la cavidad medular, estructuras fuertemente mineralizadas, prácticamente han desaparecido de la muestra que estuvo más tiempo expuesta. Esta destrucción se presenta como una separación de la cortical en forma de bandeado, y una destrucción total en aquellas regiones donde el medio ha tenido mayor acceso, como pueden ser los forámenes nutricios o la porosidad natural presente en los huesos.

Las líneas de cemento se ven afectadas por la porosidad emergente, más marcada en los espacios intersticiales. A medida que el medio con un pH ácido extremo penetra mediante gradiente positivo en los complejos osteonales, actúa sobre la matriz mineral que sostiene las fibras de colágeno que configuran las laminillas concéntricas y sobre las que forman las lagunillas osteocíticas y los canalículos. Esto se traduce en un aumento de la porosidad que permite que el medio se renueve en esos espacios, y a la vez se incrementa la concentración de iones de hidrógeno favoreciendo de nuevo la acción sobre la hidroxiapatita (Turner-Walker, 2007). El resultado observado en la muestra que estuvo más tiempo expuesta es el “esqueleto” de la osteona a modo de red de fibras de colágeno sin una estructura organizada (Figura 182).

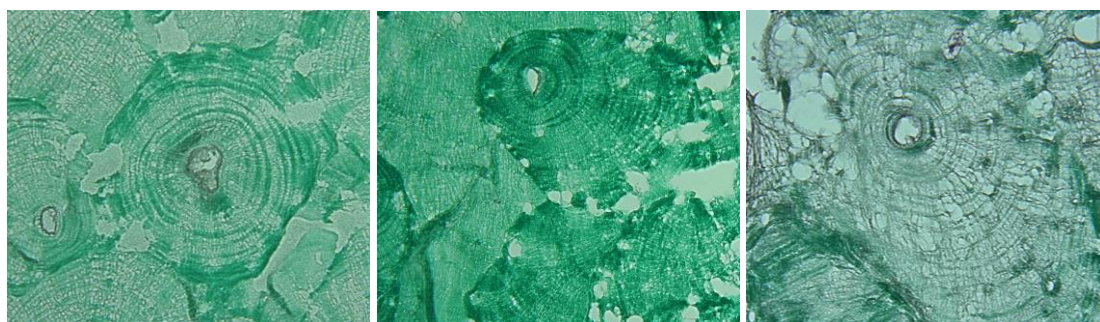


Figura 182. Efecto del medio ácido sobre los complejos osteonales de una muestra a las 1, 6 y 8 horas

Se ha observado también que la muestra que más tiempo estuvo expuesta al medio, y cuyas osteonas están afectadas en su línea cementicial, presenta una reducción del canal de Havers como consecuencia de la disolución del armazón mineral permitiendo el encogimiento de las fibras de colágeno (Nielsen-Marsh *et al.*, 2000).

La disolución de la matriz mineral tiene su efecto en la tinción de la muestra con el método del tricrómico de Masson. Este método de tinción, como se comentó antes, tiñe las fibras de colágeno de color verde, lo que va a permitir observar si el efecto del medio se centra en la fase mineral o en la fase orgánica. En este caso la disolución de la hidroxiapatita por parte medio se puede comprobar, porque la tinción sigue siendo homogénea en las primeras horas de exposición tornándose a

un color verde-rojizo por la ausencia de fibras de colágeno compactas. Como resultado se obtiene un esqueleto de fibras de colágeno que han perdido su estructura mineral, pero manteniendo su estructura original más laxa.

### **Ensayo en un medio ácido a pH 5.5**

La exposición de los huesos contemporáneos en un medio ácido a pH 5.5, durante 8, 14, 32, 48 y 56 horas, muestra unos resultados similares a los obtenidos en el ensayo con un medio más ácido en menos tiempo de exposición. El diseño de la experimentación ha permitido observar con más claridad las fases de destrucción de las estructuras óseas.

A medida que el medio ácido actúa sobre la muestra el hueso aumenta significativamente el porcentaje de degradación, y por consiguiente el área afectada.

La cortical y el límite de la cavidad medular del hueso sufren la desmineralización de las capas inmediatamente internas, lo que se traduce en una separación de la cortical y disolución del mineral. Una vez que se ha perdido la región más externa se observa que la fase orgánica también se ve afectada por hidrólisis de los enlaces de las cadenas de colágeno, creando grandes oquedades en el interior de la muestra.

En el interior ocurre un aumento de la porosidad que permite el acceso del medio ácido, tanto por los canales degradados de Havers como por los nuevos huecos abiertos en la línea cementicial de las osteonas y en los espacios intersticiales. El medio también penetra a través de los diferentes canalículos hasta alcanzar las lagunillas intersticiales desde donde continúa la degradación de la matriz mineral. A medida que recircula el medio por el interior del hueso aumentan los espacios libres de hidroxapatita dando como resultado un esqueleto de fibras colágeno como se indicó anteriormente (Turner-Walker, 2007) (Figura 183).

Las osteonas que presentan más afección en la línea de cemento y en el interior de las mismas han visto reducido considerablemente la luz del canal de Harvers como consecuencia del acortamiento de las fibras de colágeno al perder su afinidad con la matriz mineral ya disuelta. Este “empaquetamiento” fortuito de las osteonas permite observar un aumento de la tinción en el interior de las mismas como consecuencia de la agrupación de las fibras de colágeno en aquellas muestras más degradadas.

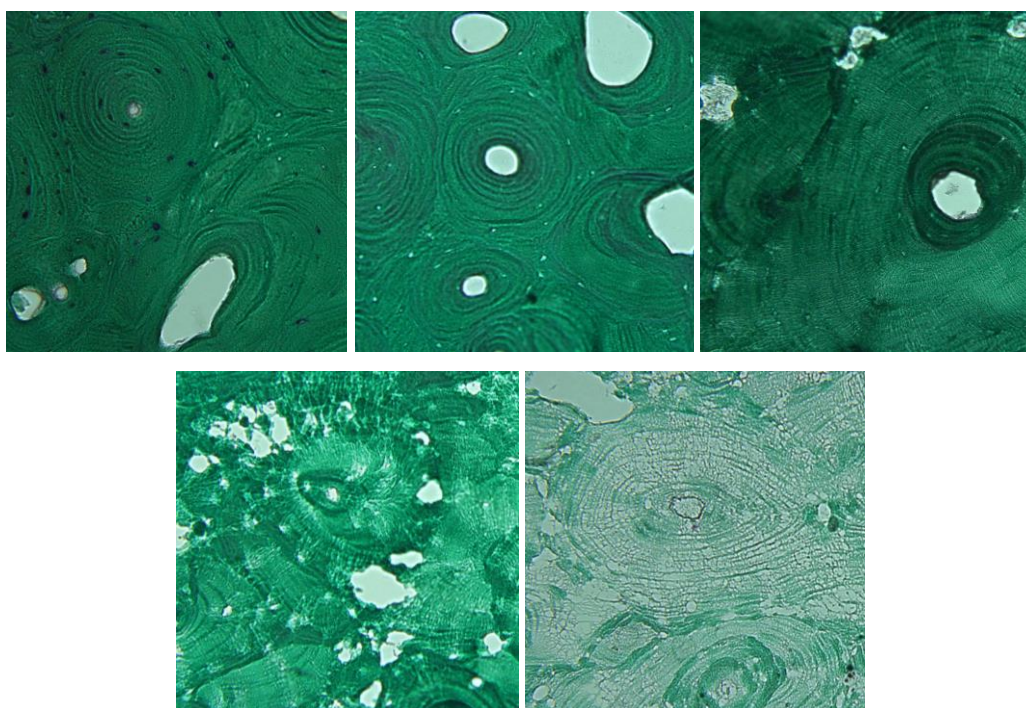


Figura 183. Detalle de las osteonas de cada una de las muestras expuestas en un medio ácido durante diferentes horas. De izquierda a derecha de arriba abajo aumentan los tiempos de exposición.

### **Ensayo en un medio de NaOH 12,5M durante varias horas**

La bibliografía analizada sugiere que exposición a un medio alcalino con un pH extremo y una alta concentración molar de una muestra de hueso afectará principalmente a la fase orgánica del hueso.

Los resultados obtenidos de una muestra ósea de origen contemporáneo y otra de origen arqueológico indican que existen diferencias significativas según el tiempo al que están expuestas al medio alcalino.

El porcentaje de degradación de las muestras arqueológicas es notablemente mayor que en el de las muestras contemporáneas expuestas en los mismos tiempos.

Durante la primera hora de experimentación las muestras se ven afectadas, comenzando con la rotura de los límites externos e internos del hueso. Por la morfología de los cortes histológicos observados la degradación se entiende que el medio penetra dentro de la muestra por orificios presentes en la superficie cortical, actuando principalmente desde fuera hacia dentro.

La porosidad observada en el interior de las muestras, en la región de las líneas de cemento y en los espacios intersticiales, es mayor que la observada en las muestras tratadas en un medio ácido. El tamaño de poro creado en los últimos estadios de las muestras contemporáneas y en el resto de las arqueológicas abarca grandes áreas afectando a más de una osteona. Un medio con una alta concentración molar no solo actúa sobre los enlaces peptídicos las cadenas de colágeno, sino que también lo hace sobre la matriz mineral contribuyendo a su precipitación. Las grandes oquedades presentan un borde liso y sinuoso (Mao, 2015; Collins *et al.*, 1995; Hedges y Millard, 1995).

En el interior de las osteonas se ha observado una menor afección en las muestras contemporáneas debido a que se trata de un material óseo que tiene una composición interna mejor conservada que las muestras de origen arqueológico. Esta consolidación de la estructura, con los canales internos mejor conservados, junto con la saturación del medio circundante por deposición de carbonatos cálcicos, hace que el poder de penetración sea menor y, por consiguiente, la muestra se vea menos afectada (Turner-Walker, 2007).

En el caso de las muestras arqueológicas se observa que el medio alcalino actúa rápidamente sobre el interior de los complejos osteonales. La menor presencia de colágeno arqueológico es una de las causas por las que las muestras se degradan a menor tiempo de exposición. El efecto es notable en las lagunillas osteocíticas y en

los conductos de los canalículos haciéndolos visibles desde el comienzo al microscopio óptico.

En ambos tipos de muestras, aunque más evidente en las arqueológicas, se produce una alteración de las laminillas de manera que comienzan a separarse unas de otras. Esta separación difiere de la observada anteriormente en el medio ácido, siendo lineal y no reticular (Figura 184).

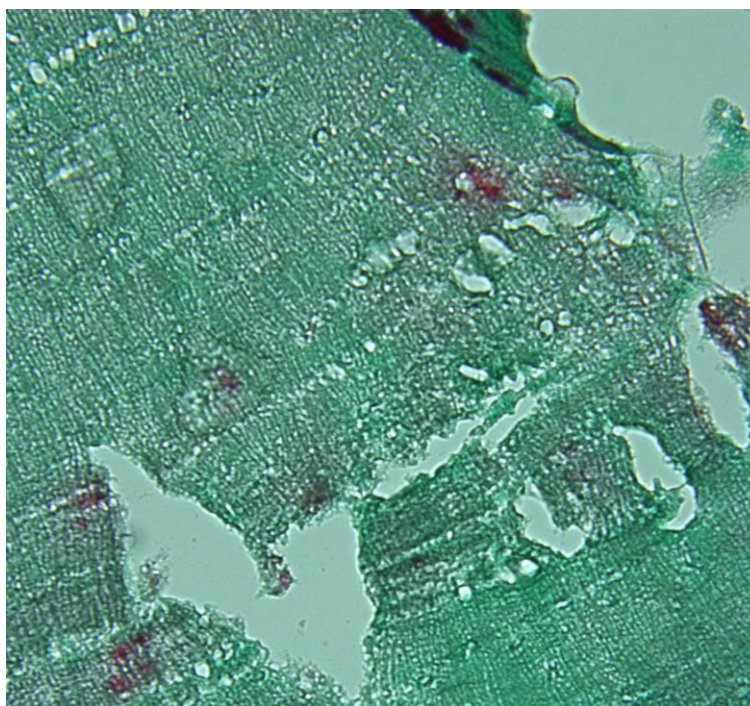


Figura 184. Detalle de la afección del medio alcalino extremo observado en una región de una muestra arqueológica expuesta durante tres horas.

A diferencia de las muestras expuestas en medios ácidos se conservan los canales de Havers. En las muestras contemporáneas el tamaño es similar al original, sin embargo, en las arqueológicas muchos de los canales han sufrido afección aumentando de tamaño e incluso, en algunos casos, son el lugar donde produce una mayor alteración el medio alcalino.

La tinción se mantiene homogénea en todos los casos observados, aunque es más intensa en los tiempos de mayor exposición, centrándose principalmente en la parte más externa de las osteonas. Los solutos generados y acumulados como

consecuencia de la reacción química del medio permiten que estas regiones se tiñan con mayor intensidad (Tresguerres *et al.*, 2005; Bernabé Salazar *et al.*, 2013).

### **Ensayo en un medio de NaOH 0,1M durante varios días**

Para poder analizar detenidamente los efectos histológicos que causa un medio alcalino sobre un hueso contemporáneo se diseñó un ensayo en un medio alcalino, con menor concentración molar (0,1M) durante 5, 7, 11 y 13 días.

Las observaciones cuantitativas realizadas sobre la muestra estudiada indican que a medida que aumenta el tiempo de exposición en este tipo de medio también lo hace el porcentaje de degradación, es decir, el área afectada. El tiempo de exposición afecta significativamente sobre la muestra.

La cortical y el límite de la cavidad medular del hueso se ven alterados por las condiciones del medio alcalino que comienza a actuar en aquellas zonas por donde tiene el paso más accesible, como pueden ser los forámenes naturales de la superficie ósea. En estas regiones el efecto degradante aumenta considerablemente actuando sobre grandes áreas de la muestra a medida que transcurre el tiempo de exposición.

También penetra hacia el interior de la muestra por los canales internos de la estructura del hueso a la velocidad que permite la solubilidad del medio. Las líneas de cemento de las osteonas y los espacios intersticiales son las primeras regiones que se ven afectadas debido al incremento de la porosidad.

El hidróxido de sodio actúa principalmente sobre el colágeno, rompiendo las cadenas de aminoácidos. Aunque sobre la hidroxiapatita actúa degradándola a altas temperaturas, generando hidróxido de calcio y fosfato de sodio, que se pierden por difusión (Mao, 2014), es posible que en medios con pH extremos o variables también altere la composición de matriz mineral (Harttinet *et al.*, 2011; Cope *et al.*, 2009).

En aquellos conductos donde la difusión está mediada por la disolución, los cambios de pH y los movimientos internos del medio, la reacción se hace más lenta llegando incluso a pararse (Mao, 2015; Turner-Walker, 2007).

En los últimos estadios del ensayo, a partir de los 11 días, se hace más evidente la rotura de las fibras de colágeno y la ausencia de la parte proteica encargada de la unión del colágeno con la hidroxiapatita. Las laminillas concéntricas de las osteonas comienzan a separarse unas de otras de manera lineal. También es evidente el efecto que causa sobre los canalículos y de las lagunillas osteocíticas que llegan a desaparecer.

La tinción en todos los cortes histológicos es homogénea excepto en algunas regiones de la muestra más degradada, que adquiere tonalidades rojizas y moradas como consecuencia de la ausencia de colágeno principalmente. Este cambio de coloración se debe a que la propia característica del medio alcalino hace que esas regiones se *basifiquen* y la tinción torne a esa coloración.

### **Ensayo en un medio de NaOH durante 24 horas a diferente molaridad**

Para comprobar el efecto que causa un medio alcalino a diferente concentración molar, se planteó llevar a cabo un ensayo en un medio de hidróxido de sodio 0,05M, 0,1M y 1M con dos muestras, una de origen contemporáneo y la otra de origen arqueológico.

Los resultados cuantitativos indican que las muestras se degradan de manera diferente según el tipo de hueso que sea de origen y el tipo de medio en el que se expongan. Sin embargo, las muestras arqueológicas se vieron afectadas de manera diferente a la muestra contemporánea en los tres medios. La muestra arqueológica 2 tuvo una afección significativamente diferente según el medio en el que se sumergió. Los medios a concentración 0,1 y 1 molar afectaron significativamente a las tres muestras.

### **Ensayo en un medio de NaOH 0,05M durante 24 horas**

La muestra contemporánea sumergida en el medio a menor concentración molar (0,05M) apenas presentó cambios estructurales. Sin embargo, las muestras arqueológicas sí que lo hacen. Esta diferencia se debe a que las muestras arqueológicas presentan un contenido menor de colágeno y/o de hidroxiapatita, en el interior de sus estructuras, por acción de otros agentes tafonómicos en el lugar de entierro (Collins, 1995).

Por las características descritas anteriormente la muestra arqueológica utilizada para este ensayo contenía una menor cantidad de matriz orgánica, ya que la afección analizada en las dos muestras supervivientes es semejante a los estadios de mayor exposición al medio alcalino durante la experimentación de varios días: rotura de la cortical y del límite interno del hueso, aumento de la porosidad en la línea de cemento de las osteonas, degradación y grandes oquedades en los espacios intersticiales, alteración de los canalículos y de las lagunillas osteocíticas observables al microscopio óptico a menor aumento y separación de las capas de laminillas concéntricas.

La tinción de los cortes analizados es homogénea, más intensa en la muestra contemporánea y menor en las arqueológicas debido también a la pérdida de colágeno por acción del medio.

### **Ensayo en un medio de NaOH 0,1M durante 24 horas**

En el ensayo con hidróxido de sodio 0,1M las alteraciones observadas son muy semejantes a las descritas para el medio de menor concentración. Estas alteraciones son más evidentes en las muestras arqueológicas que en la contemporánea. Sobre todo, el aumento de porosidad que se observa respecto a la muestra 0,05M.

## **Ensayo en un medio de NaOH 1M durante 24 horas**

Cuando la concentración molar aumenta a 1M los cambios en las estructuras óseas del interior de los huesos son más evidentes. El poder oxidativo del medio actúa fuertemente sobre la fase orgánica más expuesta, como se pudo comprobar también en la solución 12,5M.

La muestra contemporánea, cuando se observa al microscopio óptico, revela que ha habido una afección importante sobre los límites de las osteonas y de los contornos interno y externo de los huesos. Estos últimos han desaparecido por rotura de los enlaces peptídicos de las cadenas de colágeno. El medio alcalino actúa sobre las líneas de cemento de las osteonas y sobre los espacios intersticiales creando una alta porosidad que aumenta de tal manera que separa los complejos osteonales secundarios, aquellos que tienen una composición molecular más compacta, es decir, mejor preservada. Además, estos complejos presentan una tinción mayor que los complejos primarios adyacentes cuyas fibras de colágeno están siendo degradadas.

En el caso de las muestras arqueológicas la degradación es diferente, incluso entre ellas. La primera muestra presentó una alteración grave en la cortical y en el límite de la cavidad medular semejante a la muestra contemporánea. También se observó un aumento de la porosidad interna que afecta sobre todo a los espacios intersticiales. Sin embargo, los complejos osteonales se conservaron, aunque las laminillas más externas sufrieron afecciones como las descritas anteriormente, es decir, separación unas de otras. La tinción de la del corte histológico es heterogénea y muestra unas zonas más degradadas que otras. Por su alto contenido de colágeno, bien organizado, en esta región el hidróxido de sodio no ha podido actuar de la misma manera. Cuando la unión química colágeno-hidroxiapatita y la concentración de ambas se conserva en buenas condiciones, actúan como impedimento para la acción del hidróxido de sodio sobre la matriz orgánica.

La segunda muestra arqueológica ha sufrido una alteración extrema de todas las estructuras internas. La acción del medio alcalino prácticamente ha eliminado los restos orgánicos presentes en la muestra y ha alterado su matriz mineral. Según los resultados obtenidos de esta muestra, a diferentes concentraciones molares, están indicando que la cantidad de colágeno conservado en el hueso es menor que en el resto de los huesos analizados. Además, es probable que el contenido en hidroxiapatita también sea significativamente menor. Para comprobarlo es necesario realizar un análisis molecular del contenido en calcio y fosfato. Pero estos datos concuerdan con la agresividad con la que el medio ha actuado sobre la muestra.

Las composiciones químicas de la matriz mineral son diferentes entre las tres muestras dando unos resultados distintos para cada medio y cada muestra analizada.

### **Ensayo en un medio de NaClO (hipoclorito de sodio, lejía) durante 28 días**

El uso del hipoclorito de sodio sobre el hueso no mostró resultados que se hubieran esperado semejantes a los obtenidos en los medios alcalinos de hidróxido de sodio debido a su poder oxidante ya que, el hipoclorito de sodio reacciona con el agua generando iones hidroxilo y oxígeno.

De las dos muestras arqueológicas que sobrevivieron a la exposición durante 28 días una de ellas conservó su estructura original y la otra prácticamente se destruyó.

En ambas es muy llamativo que presenten una región ausente de tinción en el límite de los fragmentos, es decir, en las zonas expuestas directamente sobre el medio. La degradación de las fibras de colágeno es tal que la tinción no se ha podido llevar a cabo en esta franja. La muestra mejor conservada presenta una tinción más acusada y definida de dentro a fuera y en el contorno del corte histológico.

Ésta muestra presenta también una ausencia completa de la cortical y del límite interno del hueso con un borde sinuoso. En el interior se observan las estructuras óseas en buen estado de conservación. La línea de cemento sufre un incremento de la porosidad, pero de tamaño de poro menor al observado en los otros medios analizados. Existen otras regiones que si están más alteradas por la intrusión del medio. La propia estructura interna del hueso actúa como freno a la entrada del hipoclorito de sodio que se limita a actuar principalmente en las zonas expuestas. En aquellos lugares donde puede penetrar mejor físicamente, como son los canales de Havers y de Volkmann, actúa degradando las paredes de los mismos. En la mayoría de ellos está presente la franja descolorida alrededor de ellos.

En la muestra que presenta una mayor degradación se puede observar que gran parte de los fragmentos de huesos conservados contienen osteonas, e incluso el bandeo de las laminillas y las lagunillas osteocíticas preservados en su interior. Algunos son restos de osteonas separadas unas de otras por disolución de la línea de cemento que las unía. La tinción de los fragmentos es heterogénea debido a la ausencia de colágeno.

Por lo que se puede observar el medio está actuando de dos maneras, por un lado, actúa como solución alcalina sobre las estructuras internas del hueso, preservando la fase mineral y, por otro lado, actúa con mayor agresividad sobre el colágeno más expuesto (Tartari *et al.*, 2016; Guevara, 2014; Baker, 1947).

### **Ensayo en un medio de NaClO (hipoclorito de sodio, lejía) durante varios días**

La supervivencia de las muestras expuestas durante 2, 3, 4, 9 y 11 días en un medio de hipoclorito de sodio está restringida a unos pocos fragmentos de cada una de ellas. El efecto de la lejía es semejante al observado en las muestras anteriores. Todos los fragmentos presentan la decoloración de sus bordes y el interior de los canales más degradados.

Como ya se ha comentado las estructuras internas del hueso se conservan gracias a que el hipoclorito, al tratarse de una base débil, no actúa directamente sobre la hidroxiapatita. La fractura de las fibras de colágeno por la hidrólisis de sus cadenas hace que el hueso literalmente se rompa o se fragmente. También está influido por el efecto de la efervescencia producida por la reacción química que ayuda a su desintegración (Guevara, 2014). A la vez la estructura molecular impide que el medio actúe sobre toda la muestra. La intrusión limitada del hipoclorito de sodio dentro del hueso aumenta a medida que aumenta el tiempo de exposición de la muestra (Turner-Walker, 2007).

### **Ensayo en un medio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno, agua oxigenada) durante 26 días**

La experimentación con un medio de peróxido de hidrógeno también mostró resultados muy significativos. La introducción del hueso en el medio produjo una efervescencia leve que también contribuyó a la degradación de la muestra.

Los cortes histológicos de las muestras contemporáneas presentaron resultados diferentes posiblemente debido a la naturaleza de los huesos. La primera muestra analizada contiene multitud de poros esféricos producidos por la acción del oxígeno liberado. A mayor aumento, en algunos fragmentos, se reconocen algunas estructuras como laminillas osteonales y masas de colágeno de aspecto reticulado. En el resto de fragmentos el colágeno forma una masa sin definición, de apariencia desnaturalizada. La acción del peróxido de hidrógeno actúa principalmente sobre la matriz mineral del hueso dejando al colágeno aglutinado (Tanizawa, 2005).

La segunda muestra contemporánea analizada conserva las estructuras internas pero muy alteradas. La acción del peróxido de hidrógeno comienza en las regiones de hueso más expuestas. Esta conduce a la disolución de la matriz mineral del hueso dejando una masa reticulada de colágeno. Las osteonas presentes también tienen afectada su estructura interna como consecuencia de la separación de las fibras de colágeno de la hidroxiapatita a la que estaban fuertemente unidas. A mayor aumento se puede observar como las osteonas se han separado de las

adyacentes por la eliminación de la línea de cemento (Turner Walker y Mays, 2007).

En las dos muestras arqueológicas la degradación es similar a la observada en la primera muestra contemporánea. La disolución de la fase mineral por parte del peróxido de hidrógeno actúa liberando al colágeno de la matriz que adquiere un aspecto reticulado y sin forma definida. La acción del oxígeno liberado sobre el corte histológico aumenta la porosidad de la muestra a la vez que acelera su destrucción (Drożdż *et al.* 1988).

## **Discusión de los aspectos generales**

El método histológico aplicado para la determinación de los efectos que producen los distintos medios analizados puede llegar a ser una herramienta eficaz para el análisis tafonómico forense.

Durante la experimentación se ha podido comprobar que el material contemporáneo utilizado por sus características moleculares y estructurales responde muy bien a las expectativas buscadas. Aunque la historia tafonómica de los restos arqueológicos es desconocida, al tratarse de huesos que no tienen una gran antigüedad, ha permitido que las estructuras internas se conserven en buen estado. La cantidad de matriz orgánica y mineral no ha sido alterada significativamente respecto de los mismos huesos en estado fresco. La intervención de los microorganismos, principales actores en la descomposición del esqueleto, es probable que se haya dado, pero en las muestras analizadas antes de comenzar la experimentación fue mínima.

La posibilidad de utilizar en futuras investigaciones huesos frescos de cadáveres cedidos a la investigación o a la docencia permitirá descartar completamente o en gran medida la acción de los microorganismos. Para este trabajo nos hemos basado en los criterios de investigación actualista que nos permiten discernir de la acción microbiana.

El protocolo propuesto para el tratamiento histológico de las muestras ha permitido la obtención de varios centenares de cortes histológicos útiles para el análisis. Aunque el uso de la parafina como sustrato para confinar las muestras antes del corte en el micrótopo esté desechado en la investigación “paleotafonómica”, creemos que para el análisis de muestras forenses es el más adecuado por tratarse de un método rápido y económico. Además, es el protocolo utilizado diariamente para el estudio óseo en laboratorios de experimentación de regeneración de tejidos.

El uso de la tinción por el método del Tricrómico de Masson ha permitido la lectura de los efectos producidos sobre la muestra. Al contener un colorante específico para el colágeno tipo I de los huesos (verde luz) ha actuado como un buen indicador de la fase orgánica preservada en el hueso ayudando a discernir aquellas zonas que han sufrido alteraciones en las fibras de colágeno.

La elección de las estructuras óseas para su análisis cualitativo ha sido acertada ya que, como se ha demostrado a lo largo de la Tesis Doctoral, han permitido comprobar mediante las técnicas histológicas los cambios que producen en los diferentes experimentos.

El análisis de las imágenes para cuantificar el área degradada de cada muestra de hueso mediante el uso de la herramienta de tratamiento de fotografías Adobe Photoshop® ha permitido obtener datos útiles para los objetivos propuestos.

Los ensayos con los diferentes medios han permitido detectar los cambios moleculares sobre las estructuras óseas, abriendo la puerta a futuras investigaciones aplicadas a la identificación de agentes tafonómicos en materia legal.

A modo resumen se muestran los efectos producidos por los medios utilizados sobre las estructuras óseas de los cortes histológicos analizada en la tabla 2.

ENSAYO	CORTICAL Y LÍMITE CAVIDAD MEDULAR	LÍNEA DE CEMENTO	CANALÍCULOS	LAGUNILLAS OSTEOCÍTICAS	LAMINILLAS	CANAL DE HAVERS	RETICULACIÓN COLÁGENO	TINCIÓN	POROSIDAD
<b>Preliminar Acético-Acetato</b>	Degradación y separación.	Degradada. Porosidad.	Alterados. Aumentan de tamaño.	Alteradas. Aumentan de tamaño.	Se conservan bien unidas. Algunas comienzan a separarse.	Conserva su tamaño natural.	Si. Leve.	Homogénea	Incrementada en líneas de cemento y espacios intersticiales.
<b>Acético-Acetato pH 3.8</b>	Degradación gradual.	Degradada. Porosidad.	Alterados. Desaparecen a las 8 horas.	Alteradas. Desaparecen a las 8 horas.	Matriz mineral desaparecida. Solo se conserva el colágeno.	Se reduce de tamaño.	Si. Grave en los últimos tiempos de exposición.	Pasa de Homogénea a heterogénea.	Incrementada en líneas de cemento y espacios intersticiales.
<b>Acético-Acetato pH 5.5</b>	Degradación gradual.	Degradada. Porosidad.	Alterados. Desaparecen a las 56 horas.	Alterados. Desaparecen a las 56 horas.	Matriz mineral desaparecida. Solo se conserva el colágeno.	Se reduce de tamaño.	Si. Grave en los últimos tiempos de exposición.	Pasa de Homogénea a heterogénea.	Incrementada en líneas de cemento y espacios intersticiales.
<b>NaOH 12,5M</b>	Degradación por regiones.	Degradada. Porosidad.	Alterados. Saturación temprana.	Alterados. Aumentan de tamaño.	Alteradas. Se separan unas de otras con mayor tiempo de exposición.	Se conservan enteros o desaparecen por degradación.	No. Separación de las laminillas por degradación de las fibras de colágeno.	Homogénea. Más intensa en línea de cemento.	Incrementada en líneas de cemento y espacios intersticiales.
<b>NaOH 0,1M varios días</b>	Degradación en fragmentos.	Degradada. Porosidad.	Alterados. Porosidad.	Alteradas. Porosidad.	Alteradas. Se separan unas de otras.	Se conservan enteros o desaparecen por degradación.	No. Separación de las laminillas por degradación de las fibras de colágeno.	Homogénea. Más leve en la muestra más degradada.	Incrementada en líneas de cemento, espacios intersticiales, lagunillas y canalículos.
<b>NaOH 0,05M</b>	CON.: Poco degradada. ARQ.: Fragmentados	CON.: Intacta. ARQ.: Degradada.	CON.: Intactos. ARQ.: Porosidad.	CON.: Intactas. ARQ.: Porosidad.	CON.: Bien conservadas. ARQ.: Alteradas.	Conserva su tamaño natural.	CON.: No. ARQ.: Leve.	CON.: Homogénea. ARQ.: Homogénea pero más leve.	CON.: Ninguna. ARQ.: Alta.

	por distintos sitios.	Porosidad.							
<b>NaOH 0,1M</b>	CONT.: Poco degradada. ARQ.: Fragmentados por distintos sitios.	CONT.: Intacta. ARQ.: Degradada. Porosidad.	CONT.: Intactos. ARQ.: Alterados. Porosidad.	CONT.: Intactas. ARQ.: Alteradas. Porosidad.	CONT.: Bien conservadas. ARQ.: Alteradas.	Conserva su tamaño natural.	CONT.: No. ARQ.: Leve.	CONT.: Homogénea. ARQ.: Homogénea pero más leve.	CONT.: Ninguna. ARQ.: Alta.
<b>NaOH 1M</b>	Destruídos.	Degradada. Alta porosidad.	CONT.: Intactos. ARQ.: Alterados. Porosidad.	CONT.: Intactas. ARQ.: Alteradas. Porosidad.	Alteradas. Se separan unas de otras.	Se conservan enteros o desaparecen por degradación.	CONT.: No. ARQ.: Separación de las laminillas por degradación de las fibras de colágeno.	CONT.: Homogénea. ARQ.: Homogénea pero más leve.	Alta porosidad.
<b>NaClO 28 días</b>	Destruídos.	Alterada. Porosidad leve.	Intactos.	Intactas.	Intactas.	Algunos se conservan en su estado natural y otros son altamente degradados.	No.	Heterogénea. Tinción decolorada en el margen externo de la muestra y fragmentos.	Leve.
<b>NaClO varios días</b>	Destruídos.	Intactos.	Intactos.	Intactas.	Intactas.	Alterados. Aumentan de tamaño.	No.	Heterogénea. Tinción decolorada en el margen externo de la muestra y fragmentos.	Ausente.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 26 días</b>	Destruídos.	Alterados. Ausentes.	Alteradas. Ausentes.	Alteradas. Ausentes.	Alteradas. Ausentes.	Ausentes. Destruídos.	Si. Pero aspecto desnaturalizado. No se conserva retícula.	Heterogénea.	Presente.

Tabla 2. Resumen de los resultados cualitativos obtenidos durante los ensayos

Se ha podido comprobar que las muestras sumergidas en medios ácidos, como el tampón acético-acetato, sufren una disolución de la hidroxiapatita dando como resultado un corte histológico con todas las estructuras internas alteradas. Siendo la característica más llamativa el aspecto reticulado que adquieren las fibras de colágeno que conforman las laminillas concéntricas de las osteonas. El incremento de la porosidad es notable, alrededor de los complejos osteonales y de los espacios intersticiales.

Las muestras expuestas en un medio alcalino como el hidróxido de sodio presentan una alteración diferente que las del medio ácido. Esta alteración está mediada por la rotura de las cadenas de aminoácidos de las fibras de colágeno. La muestra tiende a disgregarse en fragmentos de diferente tamaño como consecuencia de la alta porosidad aparecida en las líneas de cemento y espacios intersticiales.

Como se comentó anteriormente la unión entre las osteonas adyacentes se produce por la línea de cemento, aislando los espacios intersticiales formados por los restos osteonas primarias. Esta línea de unión ha presentado una gran alteración, tanto en los medios ácidos como en los alcalinos, por lo que se deduce que la interacción química entre la fase mineral y la orgánica es más laxa que en el interior de los complejos osteonales, siendo a su vez una de las zonas que más degradada.

El hipoclorito de sodio en contacto con el hueso produce su destrucción, pero de manera diferente al resto de medios experimentados. La penetración del medio se realiza poco a poco dependiendo de la capacidad de flujo por los canales naturales de las estructuras del hueso. Esta intrusión degrada poco a poco la fase orgánica y la inorgánica. Como resultado se obtiene un área sin teñir alrededor de los fragmentos de hueso conservados que aumenta en grosor a medida que lo hace el tiempo de exposición. El resto de las estructuras internas del hueso no sufren alteraciones llamativas.

El peróxido de hidrógeno en contacto con el hueso es muy destructivo. Su acción se centra sobre todo en la fase mineral. La disolución de la hidroxiapatita, junto con la efervescencia producida en la reacción, da como resultado una masa globosa, a veces reticulada, de colágeno.

Por motivos temporales no fue posible incluir el desarrollo de otros experimentos diseñados para esta Tesis Doctoral. Entre otros se estableció un protocolo para comprobar la reacción de una muestra de hueso seco en dos climas diferentes (seco extremo y húmedo extremo), gracias a la colaboración del departamento de Tafonomía del Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC este ensayo se encuentra en proceso de elaboración. También se diseñaron otros ensayos para comprobar el efecto de ácido nítrico, la capacidad de penetración de óxidos de hierro, el efecto de ácido clorhídrico sobre la superficie de la cortical del hueso y la reacción ósea de las muestras de hueso frente a cambios radicales de temperatura.

Aunque el tamaño muestral utilizado es relativamente bajo, los resultados obtenidos son bastante significativos. Sería conveniente repetir los ensayos de nuevo junto con nuevas muestras de diferentes huesos para comparar los resultados obtenidos. También sería conveniente comenzar nuevos ensayos, tanto en condiciones controladas como azarosas, en diferentes medios para ampliar el registro tafonómico sobre una muestra contemporánea.

## **10. CONCLUSIONES**



1. El protocolo propuesto para la investigación histológica, aplicado en Antropología Forense, para comprobar las alteraciones que causan los agentes intrínsecos y extrínsecos que determinan las condiciones tafonómicas, cumple con las expectativas iniciales de esta tesis. Ayuda a comprender los cambios estructurales que se dan como consecuencia de la alteración de la fase orgánica e inorgánica del hueso.
2. La metodología aplicada en condiciones controladas de laboratorio, para el análisis de los efectos que causan los agentes ambientales que afectan a la estructura y composición de los restos óseos humanos ha permitido obtener resultados cualitativos y cuantitativos específicos para determinadas situaciones. Es, por tanto, un buen método para el estudio histológico de muestras contemporáneas.
3. Las muestras de origen contemporáneo seleccionadas para la realización de la experimentación, han demostrado ser un material de estudio muy útil al no haber sufrido una exposición prolongada a los agentes tafonómicos. En el futuro sería conveniente ampliar el registro de ensayos, en condiciones controladas de laboratorio, en diferentes medios y con distintos huesos.
4. La exposición de una muestra de hueso seco a un medio ácido en diferentes tiempos afecta la fase mineral del hueso alterando las estructuras internas. La disolución de la hidroxiapatita da como resultado: una destrucción la cortical y del límite de la cavidad medular; un aumento generalizado de la porosidad en torno a la línea de cemento de las osteonas y de los espacios intersticiales de las osteonas adyacentes; y la reticulación del colágeno de los complejos osteonales.
5. La exposición de una muestra de hueso seco a un medio alcalino a diferente molaridad y tiempos afecta principalmente a la fase orgánica de hueso alterando las estructuras internas. La hidrólisis de los enlaces peptídicos del colágeno da como resultado: la rotura y separación por capas de la cortical y del límite de la cavidad medular; un aumento generalizado de la porosidad y del tamaño de los poros sobre la línea de cemento y de los

espacios intersticiales de las osteonas primarias y la separación en capas de las laminillas osteonales.

6. Los efectos a la exposición de una muestra de hueso seco a un medio de hipoclorito de sodio dependen principalmente de la capacidad de flujo por los canales naturales de las estructuras óseas. El hipoclorito de sodio actúa conjuntamente sobre la fase orgánica y mineral del hueso en aquellos lugares donde el hueso está más expuesto. La tinción por la técnica del Tricrómico de Masson muestra un borde externo de la muestra sin teñir por ausencia de colágeno.
7. El peróxido de hidrógeno en contacto con una muestra de hueso seco tiene una acción muy destructiva. Las muestras expuestas en este medio sufrieron una alta degradación de sus estructuras internas.

## **11. BIBLIOGRAFÍA**



- Alemán I. y Botella MC. Guía de Estudio en Laboratorio. 2013. En Serrulla F. (Coor.) Recomendaciones en Antropología Forense. Asociación Española de Antropología y Odontología Forense.
- Andrews P. Experiments in Taphonomy. *Journal of Archaeological Science*. 1995. 22, 147-153.
- Baker RWR. Studies on the Reaction between Sodium Hypochlorite and Proteins. 1947. *Biochem* 41 (3): 337-42.
- Baxter K. Extrinsic factors that effect the preservation of bone. 2004. *The Nebraska Anthropologist*, vol 19, pp. 38-45.
- Benito M. El estudio de la edad para la identificación humana. Estudio antropológico forense en el complejo articular del hombro y en el esternón para la estimación de la mayoría de edad legal y de la edad de la muerte. 2016. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Behrensmeyer AK. Taphonomic and ecologic information from bone weathering. 1978. *Paleobiology*, 4 (2), pp. 150-162.
- Bernabé Salazar, A., Navarro Cámara J.A. y Pallarés Martínez F.J. Tema 11. Tejido óseo: concepto y composición. Modalidades de tejido óseo: esponjoso y compacto. Células del tejido óseo: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Matriz ósea. Periostio y endostio. Crecimiento y Remodelación. 2013. Material de Clase. CC. De la Salud. Universidad de Murcia.
- Bernabéu Martínez, E., López-Oliva Muñoz, F., Larena Pellejero, A., Tur Gil, A., de la Piedra Gordo, M<sup>a</sup>. C. y Montero Escobar, M. Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados. *Patología del Aparato Locomotor*. Ed. Fundación Mafre. 2006. Vol 4. (3):202-207.
- Bosch P., Alemán I., Moreno-Castilla C. y Botella M. Boiled versus unboiled: a study on Neolithic and contemporary human bones. 2011. *Journal of Archaeological Science* 38: 2561-2570.
- Calmon M. *Forensic Anthropology*. 2014. Tulane University. [https://www.researchgate.net/publication/285446449 Taphonomy](https://www.researchgate.net/publication/285446449_Taphonomy).

- Cambra Moo O. Bioestratinomía y Fosildiagénesis de Arcosaurios. Aplicación de la Actuotafonomía el estudio de la influencia paleobiológica en el proceso tafonómico. 2006. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Cope DJ, Tosha BA y Dupras TL. The Effects of Household Corrosive Chemicals on Human Dentition. 2009. J Forensic Sci. Vol. 54, No. 6. 1238-1246.
- Collins MJ., Riley M., Child AM, Turner-Walker G. A Basic Mathematical Simulation of the Chemical Degradation of Ancient Collagen. 1995. Journal of Archaeological Science. 22, 175-83.
- Collins M.J., Nielsen-Marsh, C.M., Hiller J., Smith C.I., Roberts J.P., Prigodich R.V., Wess T.J., Csapò J., Millard A.R. and Turner-Walker G. The Survival of Organic Matter in Bone: A Review. 2002. Archaeometry 44: 383-394.
- Crowder C. and Stout Sam. Bone Histology. An Anthropological Perspective. 2012. Boca Ratón FL: CRC Press.
- Cummings PM, Trelka DP and Srpinger KM. Atlas of Forensic Histopathology. 2011. Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-11089.
- De Boer HH. and Maat GJ. The Histology of Human Dry Bone (A Review). 2013. <https://www.researchgate.net/publication/281618582> The histology of human dry bone a review
- De la Horra, J. Estadística Aplicada. 2003. 3ª Edición. Editorial Díaz de Santos.
- Dirkmaat DC y Adovasio JM. The role of archaeology in the recovery and interpretation of human remains from an outdoor forensic setting. En Haglund WD and Sorg MH (Eds.) Forensic Taphonomy. The Postmortem Fate of Human Remains. 1997. CRC Press.
- Dirkmaat DC y Passalacqua NV. Introduction to part VI. Forensic Taphonomy. En DC Dirkmaat (Ed.) A Companion to Forensic Anthropology. 2012. Pp. 473-476. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blacwell.
- Dixon, R. and Dawson, L. and Taylor, D. The experimental degradation of archaeological human bone by anaerobic bacteria and the implications for

- recovery of ancient DNA. 2008. In: The 9th International Conference on Ancient DNA and Associated Biomolecules, 19-22 October 2008, Pompeii, Italy.
- Domínguez-Rodrigo M. Tafonomía y ciencia ficción: algunos casos prácticos. 1998. *Quad. Preh. Arq. Cast.* 19.
  - Drożdż R., Naskalski J.W. and Sznajd J. Oxidation of amino acids and peptides in reaction with myeloperoxidase, chloride and hydrogen peroxide. 1988. *Biochimica et Biophysica Acta*, 957: 47-52.
  - Efremov, J.A. Taphonomy: New branch of paleontology. 1940. *Pan-American Geologist*, 124, 81-93.
  - Etxeberria F. Aspectos macroscópicos del hueso sometido al fuego. Revisión de las cremaciones descritas en el País Vasco desde la Arqueología. *MUNIBE. (Antropología-Arkeologia)* 1994; 46:111-6.
  - Fernández-Jalvo Y. y Andrews P. Atlas of Taphonomic Identifications. 1001+ Images of Fossil and Recent Mammal Bone Modification. 2016. *Vertebrate Paleobiology and Paleoanthropology Series*, Springer.
  - Fernández-Jalvo Y., Sánchez-Chillón B., Andrews P., Fernández-López S. and Alcalá Martínez. Morphological Taphonomic Transformations of Fossil Bones in Continental Environments, and Repercussions on Their Chemical Composition. 2002. *Archaeometry* 44(3): 353-361.
  - Frederick LA. Osseous Tissue and Bone Structure. Lecture Presentation. 2015. University of Texas at Arlington. <http://slideplayer.com/slide/10536532/>.
  - Forbes S.L. Decomposition Chemistry in a Burial Environment. 2008. In Tibbett M. and Carter D.O. (Eds.) *Soil Analysis in Forensic Taphonomy. Chemical and Biological Effects of Buried Human Remains*. CRC Press. Pages 203-223.
  - Gartner LP. And Hiatt JL. Color atlas and text of histology. 2009. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolter Kluwer business. Baltimore.

- Gifford-González DP. Bones are not enough: analogues, knowledge, and interpretive strategies in zooarchaeology. 1995. *Journal of Anthropological Archaeology*, 10, 215-254.
- Grupe G. Preservation of Collagen in Bone From Dry, Sandy Soil. 1995. *Journal of Archaeological Science* 22, 193-199.
- Guerra Delgado, A.; Guitián Ojea, F.; Paneque Guerrero, Guillermo; García Rodríguez, A.; Sánchez Fernández, Juan Antonio; Monturiol, F.; Mudarra Gómez, José Luis. Mapa de los suelos de España. Península y Baleares. Escala 1/1000000. Descripción de las asociaciones y tipos principales de suelos. 1968. CSIC-Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología José María Albareda.
- Guevara D. Efecto de Diferentes Concentraciones de Hipoclorito de Sodio como Irrigante Endodóntico sobre Propiedades Físicas de la Dentina. Una Revisión de la Literatura. 2014. Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Especialista en Endodoncia. Universidad Nacional de Colombia.
- Gutierrez M.A. Bone Diagenesis and Taphonomic History of the Paso Otero 1 Bone Bed, Pampas of Argentina. 2000. *Journal of Archaeological Science* 28: 1277-1290.
- Haglund WD, Reay DT, Swindler D R. Tooth Mark Artifacts and Survival of Bones in Anlmai Scavenged Human Skeletons. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*. 1988;33(4):985-97.
- Haglund WD and Sorg MH. Introduction to Forensic Taphonomy. En Haglund WD and Sorg MH (Eds.) *Forensic Taphonomy. The Postmortem Fate of Human Remains*. 1997. CRC Press.
- Haglund WD and Sorg MH. *Advances in forensic taphonomy: Method, theory and archaeological perspectives*. 2002. Boca Ratón, FL: CRC Press.
- Hartnett KM, Fulginiti LC and Di Modica F. The Effects of Corrosive Substances on Human Bone, Teeth, Hair, Nails, and Soft Tissue. 2011. *Journal of Forensic Sciences*. Vol. 56, No. 4: 954-959.

- Haslam T.C.F. and Tibbett M. Soils of Contrasting pH Affect the Decomposition of Buried Mammalian (*Ovis aries*) Skeletal Muscle Tissue. 2009. *Journal of Forensic Science*, Vol. 54, No. 4: 900-904
- Hedges REM. and Millar AR. Bone and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. 1995. *Journal of Archaeological Science*. 22: 155-165.
- Jagers K.A., Rogers T.L. The Effects of Soil Environment on Postmortem Interval: A Macroscopic Analysis. 2009. *J Forensic Sci*, November Vol. 54, No. 6.
- Jefferson J and Bass W. 2017. <http://www.jeffersonbass.com>
- Karr LP. and Outram AK. Bone degradation and Environment: Understanding, Assessing and Conducting Archaeological Experiments Using Modern Animal Bones. 2012. *International Journal of Osteoarchaeology*. Vol. 25; 2: 201-212.
- Krogman MW. *The Human Skeleton in Forensic Medicine*. 1962. Springfield, III.
- Krogman MW. and Isçan MY. *The Human Skeleton in Forensic Medicine*. 1986. Charles C. Thomas. Springfield (USA).
- Lloveras L., Rissech C. y Rosado N. Tafonomía Forense. En 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* 2016. Bogotá D.C., Colombia: Forensic Publisher. (pp. 453-523).
- Lyman RL. *Vertebrate Taphonomy*. 1994. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mao ZL, Yang XJ, Zhu SL, Cui ZD and Li ZY. 2015. Effect of Na<sup>+</sup> and NaOH concentrations on the surface morphology and dissolution behavior of hydroxyapatite. *Ceramics International* 41:3461-3468.
- Márquez-Grant N. y Roberts J. (Eds.). *Forensic Ecology Handbook. From Crime Scene Court*. 2012. Chichester, United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Morcillo, Jesús (1989). *Temas básicos de química* (2.<sup>a</sup> edición). Alhambra Universidad. p. 270-272.

- Nicholson R. Bone Degradation in a Compost Heap. 1998. *Journal of Archaeological Science*. 25, 393-403.
- Nielsen-Marsh C. M. Hedges R.E.M. Patterns of Diagenesis in Bone I: The Effects of Site Environments. 2000. *Journal of Archaeological Science* 27, 1139–1150.
- Nielsen CM and Hedge REM. Patterns of Diagenesis in Bone II: Effects of Acetic Acid Treatment and the Removal of Diagenetic CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. 2000. *Journal of Archaeological Science* 27, 1151–1159.
- Nielsen-Marsh CM., Gernaey A., Turner-Walker G., Hedges R., Pike A. and Collins M. The Chemical Degradation of Bone. In: Cox M., Mays S. (eds.). *Human Osteology in Archaeology and Forensic Science*. 2000. Greenwich Medical Media, London, pp. 439-454.
- Nociarová D, Adserias MJ, Armentano N, Galtés I y Malgosa A. Exhumaciones de los restos humanos no reclamados como modelo tafonómico. 2014. *Rev Esp Med Legal*. 41 (2): 53-57.
- Pickering RB, Bachman DC. *The Use of Forensic Anthropology*. 1997. CRC Press, Boca Ratón, USA.
- Nicholson RA. Bone Degradation in a Compost Heap. 1998. *Journal of Archaeological Science*. 25, 393-403.
- Nielsen-Marsh CM., Gernaey A., Turner-Walker G., Hedges R., Pike A. and Collins M. The Chemical Degradation of Bone. In: Cox M., Mays S. (eds.). *Human Osteology in Archaeology and Forensic Science*. 2000. Greenwich Medical Media, London, pp. 439-454.
- Ortner DJ. And Turner-Walker. *The Biology of Skeletal Tissues*. En *Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*. 2003. Academic Press. Pp. 11-35.
- Rodríguez D. y Ramírez. Técnica de conservación de huesos en peróxido de hidrógeno. 2009. *Med. Leg. Costa Rica*. Vol. 6. N.2.

- Revete JM. Antropología Forense. 1999. 2ª Ed. Ministerio de Justicia. Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones. Madrid.
- Robledo MM. y Sánchez JA. Antropología Forense. Investigación Criminal en Restos Óseos. En Anadón MJ y Robledo MM (Eds.). Manual de Criminalística y Ciencias Forenses. Técnicas Forenses Aplicadas a la Investigación Criminal. 2010. Editorial Tébar S.L., Madrid.
- Rodríguez, JV. Introducción a la Antropología Forense. Análisis e identificación de restos óseos humanos. 1994. Departamento de Antropología. Universidad Nacional de Colombia, Santa Fe de Bogotá.
- Rodríguez-Cuenca J.V. La Antropología Forense. 2004. Universidad Nacional de Colombia.
- Sala Burgos MN. Tafonomía de Yacimientos Kársticos de Carnívoros en el Pleistoceno. 2012. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Sánchez Sánchez JA. Estudio de un enterramiento colectivo de 1834 en la Fortaleza de la Mota (Alcalá la Real). 1999. Instituto de Estudios Giennenses. Diputación Provincial de Jaén.
- Sánchez JA. y Dorado E. Antropología Forense. Concepto, revisión histórica y estado actual. Tema 1. 2015. Apuntes Curso Online Especialista en Antropología Forense. Universidad Complutense de Madrid.
- Serrulla F., Herrasti L, Navarro C., Cascallana JL., Bermejo AM., Marquez-Grant N. and Etxeberria F. Preserved brains from the Spanish Civil War mass grave (1936) at La Pedraja1, Burgos, Spain. 2026. Sci Justice. 56 (6): 453-463.
- Setúbal Andrade M.G. Neves Sá C., Texeira Marchionni A.M. Bório dos Santos T.C. Sadigursky M. Effects of freezing on bone histological morphology. 2008. Cell Tissue Banking 9: 279-287.
- Smith CI, Nielsen-Marsh CM, Jans MME. y Collins Mj. Bone diagenesis in the European Holocene I: patterns and mechanisms. 2007. Journal of Archaeological Science 34: 1484-1493.

- Soares CL. Efecto del Peróxido de Hidrógeno y Carbamida sobre la Capacidad Descalcificante del Ácido Fosfórico sobre el Esmalte. 2008. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Stewart TD. Essentials of Forensic Anthropology. 1979. Charles C. Thomas, Illinois. USA.
- Symes SA, Berryman HE, Smith OC. Saw Marks in Bone: Introduction and Examination of Residual Kerf Contour. En.: Reichs KJ, Springfield IL. Forensic Osteology II, Advances in the Identification of Human Remains. Charles C. Thomas. 1998, pp. 333-52.
- Tanizawa Y. Reaction characteristics of a tooth-bleaching agent containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NaF: In vitro study of cristal structure change in treated hydroxiapatite and chemical states of incorporated fluorine. 2005. Journal of Cosmetic Science 56 (2): 121-34.
- Tartari T., Bachmann L., Maliza A. G. A., Andrade F. B., Duarte M. A. H. and Bramante C. M. Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. 2016. 24 (3): 291-298.
- Trujillo-Mederos. A., Alemán I., Botella M. and Bosch P. Changes in human bones boiled in seawater. 2012. Journal of Archaeological Science. 39: 1072-1079.
- Tresguerres J.A.F., Cachifeiro V., Cardinali D., Escrich E., Gil Loyzaga P, Lahera Juliá V., Mora Teruel F., Romano Pardo M. y Tamargo Menéndez J. Histología Humana. 2005. 3ª Edición. Editoria McGraw-Hill Interamericana.
- Turner-Walker G. The Chemical and Microbial Degradation of Bones and Teeth. 2007. In Advances in human palaeopathology. Pinhasi R. and Mays S (eds.). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Turner Walker G and Mays S. Histological Studies on Ancient Bone. 2007. In Advances in human palaeopathology. Pinhasi R. and Mays S (eds.). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

- Ubelaker DH. The forensic evaluation of burned skeletal remains: A synthesis. *Forensic Science International*. 2009; 183 (1-2);1-5.
- Ubelaker DH and Sperber ND. Alterations in human bones and Teeth as a result of restricted sun exposure in contact with corrosive agents. *J Forensic Sci*. 1988; 33: 540-8.
- Vermeij E, Zoon P, van Wijk M and Gerretsen R. Microscopic Residues of Bone from Dissolving Human Remains in Acids. 2015. *Journal of Forensic Science*. Volume 60, Issue 3, pp. 770-776.
- Willis A. and Tayles N. Field anthropology: application on burial contexts in prehistoric Southeast Asia. 2009. *Journal of Archaeological Science* 36: 547-554.
- Zimmermann, EA., Busse B. and Ritchie RO. The fracture mechanics of human bone: influence of disease and treatment. 2015. *Nature. BoneKey Reports* 4, Article number: 743.



## **12. ANEXOS**



Anexo 1

<b>Análisis de varianza de un factor</b>						
<b>RESUMEN</b>						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
<b>CON 1 150 min</b>	3	16410	5470	860725		
<b>ARQ 1 270 min</b>	3	14170	4723,333333	8176826,333		
<b>CON 2 270 min</b>	3	31565	10521,66667	16108158,33		
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<b>Entre grupos</b>	59697516,67	2	29848758,33	3,561095558	0,095594889	5,14325285
<b>Dentro de los grupos</b>	50291419,33	6	8381903,222			
<b>Total</b>	109988936	8				

Tabla 1. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo preliminar con acético-acetato durante 150 y 279 minutos.

<b>Análisis de varianza de un factor</b>						
<b>RESUMEN</b>						
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>		
<b>ARQ 1 270 min</b>	3	14170	4723,333333	8176826,333		
<b>CON 2 270 min</b>	3	31565	10521,66667	16108158,33		
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<b>Entre grupos</b>	50431004,17	1	50431004,17	4,153266297	0,11120168	7,708647422
<b>Dentro de los grupos</b>	48569969,33	4	12142492,33			
<b>Total</b>	99000973,5	5				

Tabla 2. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo preliminar con acético-acetato de las muestras arqueológica y contemporánea durante 270 minutos de exposición.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
1 HORA	3	55,12223407	18,37407802	60,74614522		
6 HORAS	3	140,7852159	46,92840531	76,70172783		
8 HORAS	3	161,8091016	53,93636721	33,07502095		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2129,137549	2	1064,568775	18,72890055	0,002631786	5,14325285
Dentro de los grupos	341,045788	6	56,84096467			
Total	2470,183337	8				

Tabla 3. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con acético-acetato a pH 3.8 durante 1, 6 y 8 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
8 HORAS	3	5585	1861,666667	3711905,333		
24 HORAS	3	6071	2023,666667	1003874,333		
32 HORAS	3	24421	8140,333333	3808670,333		
48 HORAS	3	57461	19153,66667	5030097,333		
56 HORAS	3	83021	27673,66667	29868476,33		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1541357124	4	385339281,1	44,37038793	2,47521E-06	3,478049691
Dentro de los grupos	86846047,33	10	8684604,733			
Total	1628203172	14				

Tabla 4. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con acético-acetato a pH 3.8 durante 8, 24, 32, 48 y 56 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
CON HORA 1	3	24,47861138	8,159537125	3,455889761		
CON HORAS 2	3	21,43725567	7,145751891	2,277084529		
CON HORAS 3	3	35,48809457	11,82936486	8,412496074		
CON HORAS 4	3	41,32951761	13,77650587	12,82577099		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	86,80516563	3	28,93505521	4,291245602	0,044169735	4,066180551
Dentro de los grupos	53,9424827	8	6,742810338			
Total	140,7476483	11				

Tabla 5. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con NaOH 12,5M en una muestra contemporánea durante 1, 2, 3 y 4 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
ARQ HORA 1	3	103,3817781	34,46059268	122,0059946		
ARQ HORAS 2	3	155,7320016	51,91066719	6,00754499		
ARQ HORAS 3	3	177,4853637	59,1617879	25,05745182		
ARQ HORAS 4	3	111,707162	37,23572065	22,96008765		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1253,280535	3	417,7601783	9,492873202	0,005167927	4,066180551
Dentro de los grupos	352,0621581	8	44,00776977			
Total	1605,342693	11				

Tabla 6. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con NaOH 12,5M en una muestra contemporánea durante 1, 2, 3 y 4 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
5 DIAS	3	33532	11177,33333	16028504,33		
7 DIAS	3	40892	13630,66667	13234472,33		
11 DIAS	3	48248	16082,66667	123266,3333		
13 DIAS	3	62231	20743,66667	10938441,33		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	149945900,3	3	49981966,75	4,957952438	0,03122492	4,066180551
Dentro de los grupos	80649368,67	8	10081171,08			
Total	230595268,9	11				

Tabla 7. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con NaOH 0,1M en una muestra contemporánea durante 5, 7, 11 y 13 días.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
NaOH 0,05M CON	3	18466	6155,333333	1663204,333		
NaOH 0,05M ARQ1	3	33884	11294,66667	35189646,33		
NaOH 0,05M ARQ2	3	72471	24157	28012023		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	515912368,7	2	257956184,3	11,93047191	0,008112284	5,14325285
Dentro de los grupos	129729747,3	6	21621624,56			
Total	645642116	8				

Tabla 8. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con NaOH 0,05M para las tres muestras durante 24 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
NaOH 0,1M CON	3	39385	13128,33333	2157280,333		
NaOH 0,1M ARQ1	3	41359	13786,33333	25814490,33		
NaOH 0,1M ARQ2	3	45243	15081	12936469		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5922032,889	2	2961016,444	0,217145724	0,810870619	5,14325285
Dentro de los grupos	81816479,33	6	13636079,89			
Total	87738512,22	8				

Tabla 9. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con NaOH 0,1M para las tres muestras durante 24 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
NaOH 1M CON	3	44434	14811,33333	35070100,33		
NaOH 1M ARQ1	3	36899	12299,66667	4482225,333		
NaOH 1M ARQ2	3	107963	35987,66667	22645414,33		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1015866907	2	507933453,4	24,49928824	0,001298373	5,14325285
Dentro de los grupos	124395480	6	20732580			
Total	1140262387	8				

Tabla 10. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con NaOH 1M para las tres muestras durante 24 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
NaOH 0,05M CON	3	18466	6155,333333	1663204,333		
NaOH 0,1M CON	3	39385	13128,33333	2157280,333		
NaOH 1M CON	3	44434	14811,33333	35070100,33		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	126381554	2	63190777	4,874504485	0,055296044	5,14325285
Dentro de los grupos	77781170	6	12963528,33			
Total	204162724	8				

Tabla11. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con NaOH 0,05M, 0,1M y 1M para muestra contemporánea durante 24 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
NaOH 0,05M ARQ1	3	33884	11294,66667	35189646,33		
NaOH 0,1M ARQ1	3	41359	13786,33333	25814490,33		
NaOH 1M ARQ1	3	36899	12299,66667	4482225,333		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9428605,556	2	4714302,778	0,215967232	0,811762377	5,14325285
Dentro de los grupos	130972724	6	21828787,33			
Total	140401329,6	8				

Tabla12. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con NaOH 0,05M, 0,1M y 1M para muestra arqueológica 1 durante 24 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
NaOH 0,05M ARQ2	3	72471	24157	28012023		
NaOH 0,1M ARQ2	3	45243	15081	12936469		
NaOH 1M ARQ2	3	107963	35987,66667	22645414,33		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	659427160,9	2	329713580,4	15,55401765	0,004227172	5,14325285
Dentro de los grupos	127187812,7	6	21197968,78			
Total	786614973,6	8				

Tabla13. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el ensayo con NaOH 0,05M, 0,1M y 1M para muestra arqueológica 2 durante 24 horas.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
2 DÍAS	27	644,15	23,85740741	57,78030456		
3 DÍAS	39	1180,99	30,28179487	334,2233941		
4 DÍAS	42	947,41	22,55738095	86,23110761		
9 DÍAS	53	1434,65	27,06886792	66,04466792		
11 DÍAS	52	1440,98	27,71115385	86,25548492		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1492,550453	4	373,1376133	3,035109617	0,018457452	2,415056673
Dentro de los grupos	25571,60477	208	122,9404075			
Total	27064,15522	212				

Tabla 14. Análisis de varianza de los datos obtenidos en las mediciones de la línea descolorida de las muestras expuestas en NaClO 2, 3, 4, 9 y 11 días.

## ANEXO 2

- Figura 1. Familia del osteoblasto.
- Figura 2. Estructura del tejido óseo compacto. Adaptado de Frederick, 2015.
- Figura 3. Estructura del tejido óseo trabecular. Adaptado de Frederick, 2015.
- Figura 4. Estructura jerárquica del hueso humano.
- Figura 5. Ejemplo de corte histológico generado sobre una muestra control de uno de los ensayos.
- Figura 6. Estructuras óseas observadas en los cortes histológicos.
- Figura 7. Secuencia del proceso de cuantificación del porcentaje del área degradada sobre un corte histológico.
- Figura 8. Imágenes de los cortes histológicos de las muestras control de hueso contemporáneo, a 10 aumentos, obtenidas de cada uno de los ensayos en el orden de presentación de esta tesis.
- Figura 9. Imágenes de los cortes histológicos de las muestras control de hueso arqueológico, a 10 aumentos, obtenidas de cada uno de los ensayos en el orden de presentación de esta tesis.
- Figura 10. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 150 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.
- Figura 11. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 150 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 5 aumentos.
- Figura 12. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 150 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 13. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 150 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.
- Figura 14. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.
- Figura 15. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 5 aumentos.
- Figura 16. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 17. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.
- Figura 18. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.
- Figura 19. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 20. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.

- Figura 21. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 270 minutos en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.
- Figura 22. Gráfico del porcentaje de degradación analizado en las muestras del ensayo preliminar en un medio de acético acetato a pH 5.5.
- Figura 23. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 2 aumentos.
- Figura 24. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.
- Figura 25. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 20 aumentos.
- Figura 26. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 20 aumentos.
- Figura 27. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 6 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 2 aumentos.
- Figura 28. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 6 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.
- Figura 29. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 6 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.
- Figura 30. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 6 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.
- Figura 31. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 2 aumentos.
- Figura 32. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 10 aumentos.
- Figura 33. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 20 aumentos.
- Figura 34. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 3.8 a 20 aumentos.
- Figura 35. Gráfico del porcentaje de degradación analizado en las muestras del ensayo en un medio de acético acetato a pH 3.8.
- Figura 36. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.
- Figura 37. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 38. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 39. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 8 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.

- Figura 40. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.
- Figura 41. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 42. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 43. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.
- Figura 44. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 32 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.
- Figura 45. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 32 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 46. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 32 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 47. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 32 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.
- Figura 48. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 48 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.
- Figura 49. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 48 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 50. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 48 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.
- Figura 51. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 48 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 40 aumentos.
- Figura 52. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 56 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 2 aumentos.
- Figura 53. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 56 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 54. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 56 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 10 aumentos.
- Figura 55. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 56 horas en un medio de acético-acetato a pH 5.5 a 20 aumentos.
- Figura 56. Gráfico del porcentaje de degradación analizado en las muestras del ensayo en un medio acético acetato a pH 5.5.
- Figura 57. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.
- Figura 58. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.

- Figura 59. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 60. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 61. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.
- Figura 62. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.
- Figura 63. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 64. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 65. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.
- Figura 66. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.
- Figura 67. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 68. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 69. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.
- Figura 70. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 5 aumentos.
- Figura 71. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 72. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 73. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.
- Figura 74. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.
- Figura 75. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.
- Figura 76. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 1 hora en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.

- Figura 77. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.
- Figura 78. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.
- Figura 79. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 80. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 2 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 81. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.
- Figura 82. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 83. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 84. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 3 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 85. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 2 aumentos.
- Figura 86. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 10 aumentos.
- Figura 87. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 88. Corte histológico de la muestra arqueológica expuesta durante 4 horas en un medio de hidróxido de sodio 12,5M a 20 aumentos.
- Figura 89. Gráfico con los porcentajes de degradación de la muestra contemporánea expuesta a un medio de NaOH 12,5M durante 1, 2, 3 y 4 horas.
- Figura 90. Gráfico con los porcentajes de degradación de la muestra arqueológica expuesta a un medio de NaOH 12,5M durante 1, 2, 3 y 4 horas.
- Figura 91. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 5 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.
- Figura 92. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 5 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.
- Figura 93. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 5 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 94. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 5 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.

- Figura 95. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 7 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.
- Figura 96. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 7 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.
- Figura 97. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 7 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 98. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 7 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 99. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.
- Figura 100. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos
- Figura 101. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 102. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 103. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 13 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.
- Figura 104. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 13 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.
- Figura 105. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 13 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 106. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 13 días en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 107. Gráfico del porcentaje de degradación de una muestra en un medio de NaOH 0,1M durante 5, 7, 11 y 13 días.
- Figura 108. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 2 aumentos.
- Figura 109. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 10 aumentos.
- Figura 110. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 20 aumentos.
- Figura 111. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 2 aumentos.
- Figura 112. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 10 aumentos.

- Figura 113. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 2 aumentos.
- Figura 114. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 2 aumentos.
- Figura 115. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 10 aumentos.
- Figura 116. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,05M a 20 aumentos.
- Figura 117. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.
- Figura 118. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.
- Figura 119. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 120. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.
- Figura 121. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.
- Figura 122. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 123. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 2 aumentos.
- Figura 124. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 10 aumentos.
- Figura 125. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 0,1M a 20 aumentos.
- Figura 126. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 2 aumentos.
- Figura 127. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 10 aumentos.
- Figura 128. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 20 aumentos.
- Figura 129. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 2 aumentos.
- Figura 130. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 10 aumentos.

- Figura 131. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 20 aumentos.
- Figura 132. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 2 aumentos.
- Figura 133. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 10 aumentos.
- Figura 134. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 24 horas en un medio de hidróxido de sodio 1M a 20 aumentos.
- Figura 135. Gráfico del porcentaje de degradación de las tres muestras expuestas a diferentes concentraciones molares de NaOH.
- Figura 136. Gráfico del porcentaje de degradación de cada muestra expuesta a diferentes concentraciones molares de NaOH.
- Figura 137. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.
- Figura 138. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 10 aumentos.
- Figura 139. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 140. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 141. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.
- Figura 142. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 10 aumentos.
- Figura 143. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 144. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 28 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 145. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.
- Figura 146. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.
- Figura 147. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 148. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 2 días en un medio de hipoclorito de sodio a 40 aumentos.

- Figura 149. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.
- Figura 150. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 151. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 3 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 152. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.
- Figura 153. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 días en un medio de hipoclorito de sodio a 10 aumentos.
- Figura 154. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 155. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 4 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 156. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 9 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.
- Figura 157. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 9 días en un medio de hipoclorito de sodio a 10 aumentos.
- Figura 158. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 9 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 159. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 9 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 160. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 2 aumentos.
- Figura 161. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 162. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 163. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 20 aumentos.
- Figura 164. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 40 aumentos.
- Figura 165. Corte histológico de la muestra contemporánea expuesta durante 11 días en un medio de hipoclorito de sodio a 40 aumentos.
- Figura 166. Gráfico del promedio del grosor de la franja descolorida observada en las muestras tratadas con NaClO durante varios días.

- Figura 167. Corte histológico de la muestra contemporánea 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 2 aumentos.
- Figura 168. Corte histológico de la muestra contemporánea 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 10 aumentos.
- Figura 169. Corte histológico de la muestra contemporánea 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 10 aumentos.
- Figura 170. Corte histológico de la muestra contemporánea 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.
- Figura 171. Corte histológico de la muestra contemporánea 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 2 aumentos.
- Figura 172. Corte histológico de la muestra contemporánea 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 10 aumentos.
- Figura 173. Corte histológico de la muestra contemporánea 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.
- Figura 174. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 2 aumentos.
- Figura 175. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 10 aumentos.
- Figura 176. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.
- Figura 177. Corte histológico de la muestra arqueológica 1 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.
- Figura 178. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 2 aumentos.
- Figura 179. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.
- Figura 180. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.
- Figura 181. Corte histológico de la muestra arqueológica 2 expuesta durante 26 días en un medio de peróxido de hidrógeno a 20 aumentos.
- Figura 182. Efecto del medio ácido sobre los complejos osteonales de una muestra a las 1, 6 y 8 horas
- Figura 183. Detalle de las osteonas de cada una de las muestras expuestas en un medio ácido durante diferentes horas. De izquierda a derecha de arriba abajo aumentan los tiempos de exposición.
- Figura 184. Detalle de la afección del medio alcalino extremo observado en una región de una muestra arqueológica expuesta durante tres horas.





