



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia

Unitat de Antropologia Biològica

Facultat de Ciències

PALEOHISTOLOGÍA: AVANCES Y APLICACIONES

Gemma Prats Muñoz

Dra. Assumpció Malgosa

Dr. Ignasi Galtés

Doctorat en Biodiversitat

Tesi Doctoral

2015

PALEOHISTOLOGÍA: AVANCES Y APLICACIONES

Memoria de Tesis presentada per obtenir el títol de Doctor en
Biodiversidad por la Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Assumpció Malgosa, Catedrática de la Unitat d'Antropologia
Biològica, Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal y
d'Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona.

Dr. Ignasi Galtés, Médico forense y antropólogo del Servei de
Patologia Forense, Unitat d'Antropologia Forense, Institut de
Medicina Legal de Catalunya, and profesor asociado de la Unitat
de Medicina Legal y Forense, Departament de Psiquiatria y de
Medicina Legal, Universitat Autònoma de Barcelona.

Dra. Assumpció Malgosa

Dr. Ignasi Galtés

Gemma Prats Muñoz

A la meva mare i germana, per estar sempre al meu costat

RESUMEN

El uso de la paleohistología ha supuesto un avance dentro del campo de la antropología física, en particular para comprender los procesos post mórtem que sufren los tejidos blandos, establecer el intervalo post mórtem y ampliar el conocimiento de las enfermedades del pasado. Sin embargo, se trata de una disciplina compleja ya que analiza materiales únicos, que presentan modificaciones tafonómicas que alteran su arquitectura normal, y cuyo procesamiento debe ser diferente al de los tejidos recientes. La presente tesis propone un estudio integral sobre los tejidos blandos que engloba avances en las metodologías empleadas,

proporciona descripciones histológicas tejidos preservados y caracteriza fenómenos tafonómicos, para poder aplicarlos finalmente a la resolución de casos específicos.

Para su realización se ha dispuesto de un amplio abanico de material arqueológico y reciente con distintos estados de preservación y distintas cronologías. Se han analizados restos procedentes del yacimiento talayótico de la Cova des Pas (Menorca), muestras de un individuo del yacimiento copto de Qarara (Egipto Medio), especímenes provenientes del panteón real de la Corona de Aragón ubicado en monasterio de Santes Creus y finalmente diversas muestras recientes procedentes del Institut de Medicina Legal i Ciències Forenses de Catalunya.(IMLCFC).

El análisis de tejidos blandos antiguos implica dificultades metodológicas que deben ser superadas para poder obtener preparaciones de buena calidad y interpretaciones correctas. La principal dificultad que presentan los tejidos desecados reside en una dureza extrema debido a la intensa deshidratación que han sufrido. Tras los análisis se determinó que la metodología óptima para su tratamiento requería: 1) una solución de rehidratación con un alto contenido en agua,

siendo idónea la solución descrita por Ruffer, 2) la aplicación de un pulso de calor, el cual mejora la penetración de los colorantes, y 3) la fijación con la solución de Schaffer. En el caso de los tejidos saponificados, muy frágiles y con tendencia a la desintegración, la metodología que aseguró los mejores resultados fue la rehidratación con la solución de Sandison que evita que el tejido se fragmente, seguida de la fijación con formaldehído. En este caso, la labilidad del tejido desaconseja el pulso de calor.

La interpretación de este tipo de tejidos preservados es muy compleja debido a las múltiples modificaciones tafonómicas a que están expuestos. En este sentido, se ha considerado necesario ofrecer soluciones a los investigadores de este campo, por lo que en la presente tesis se ha creado un atlas histológico de diferentes tejidos con la caracterización de las estructuras preservadas y la definición de los artefactos tafonómicos observados como los pigmentos cadavéricos, pseudomicelas de descomposición o ensanchamiento de capilares o vasos sanguíneos, entre otros.

Por otro lado, la comprensión de los mecanismos de preservación es necesaria para poder aplicar la metodología apropiada, e interpretar los patrones histológicos. Mayoritariamente los procesos de desecación y saponificación se tratan como procesos independientes, pero no siempre es así, pudiendo coexistir ambos procesos o sucederse cronológicamente. Un ejemplo es la Cova des Pas, en el que la modificación de las características ambientales promovió que los dos procesos se sucedieran. En la presente tesis se utilizan los tejidos blandos preservados para el diagnóstico diferencial, siendo el de perfil de químico de ácidos grasos conjuntamente con la paleohistología necesarios para el diagnóstico definitivo. El perfil químico no solo ha permitido conocer con exactitud el mecanismo de preservación que se ha dado, sino que en función del tipo de ácido graso que se encuentra y su concentración se infieren los aspectos característicos del medio ambiente en que la preservación se ha producido.

Finalmente todos los estudios realizados en la presente tesis se han puesto en práctica para un caso concreto, el de la identificación de la momia hallada en el panteón de Santes Creus. En este estudio el análisis histológico de los tejidos internos ayudó a la reconstrucción de los restos,

así como a determinar su identidad como restos pertenecientes a la reina Blanca de Anjou, estableciéndose la hipótesis de que probablemente murió por complicaciones en el parto.

ÍNDICE

1. Introducción.....	17
1.1. Descomposición cadavérica.....	21
1.1.1. Etapas de descomposición.....	22
1.2. Fenómenos conservadores del cadáver.....	26
1.2.1. Desección.....	26
1.2.2. Saponificación.....	29.
2. Justificación y Objetivos.....	33
2.1. Justificación.....	33
2.2. Objetivos.....	36
3. Material y Métodos.....	39
3.1. Material.....	39
3.2. Métodos.....	44
4. Resultados.....	47
4.1. Optimizing specimen processing for ancient soft tissue specimens.....	49

4.2. A paleoneurohistological study of 3000-year-old mummified brain tissue from the Mediterranean Bronze Age	61
4.3. Anthracosis in a Coptic Mummy	71
4.4. Human soft tissues preservation of Cova des Pas site (Minorca Bronze Age)	75
4.5. The Death of Queen Blanca of Anjou (c. 13-14).....	87
5. Discusión general.....	111
5.1. Implementación de la técnica histológica adaptada a los tejidos blandos	112
5.2. Elaboración de un atlas histológico de referencia.....	121
5.3. Los fenómenos tafonómicos asociados a los tejidos preservados de la Cova des Pas.....	123
5.4. Aplicación de los estudios histológicos a la resolución de casos paleoantropológicos	130
6. Conclusiones generales.....	135
7. Bibliografía.....	141
8. ANEXO.....	163

INTRODUCCIÓN

Los inicios de la paleohistología se remontan al siglo XIX, y tienen como principal exponente al bacteriólogo Sir Marc Armand Ruffer (1859-1917). Éste desarrolló diversas técnicas para estudiar la patología de los tejidos blandos antiguos, principalmente momias, y entre ellas destaca la formulación de una solución de rehidratación que hoy en día se sigue empleando y que permite que los tejidos sean sometidos a los procesos convencionales de histología (Ruffer 1909). A pesar de que Ruffer es considerado el pionero en esta materia, existen otros autores anteriores que ya habían realizado estudios sobre histología de tejidos preservados, como el checo Csermak (1852) o el francés Fouquet (1889). Sin embargo

la trascendencia de estos estudios fue menor si atendemos a la sistemática desarrollada por Ruffer y la repercusión científica de sus hallazgos. Posteriormente, el interés por esta disciplina fue intermitente, y no fue hasta la década de los 60s cuando de nuevo aumentó el interés por el estudio de los tejidos momificados. En esta nueva etapa destacan los estudios de Sandison (Sandison 1963; Sandison 1966), el cual se centró en la línea de mejorar el método para rehidratar las muestras y ampliar la posibilidad de aplicar nuevas técnicas de tinción al examen histológico.

La paleoantropología tradicionalmente se ha centrado en el análisis de los restos óseos, aunque en las últimas décadas las investigaciones se han dirigido también al estudio de los tejidos blandos ya que estos pueden aportar información a diversos campos. Existen muchos estudios que analizan los procesos post mórtem que sufren los tejidos blandos durante la descomposición. Esto ayuda a entender aspectos como la determinación de la supervivencia de los restos orgánicos o a detectar pseudo-patologías, e incluso a establecer con más fiabilidad el intervalo post-mortem (PMI) (Clark et al. 1997; Coe 1993; Galloway et al. 1989;

Gill-King 1997; Hart Hensen 1998; Janaway et al. 2009; Lee Goff 2009; Micozzi 1997).

En la actualidad, existe un creciente interés en explotar este tipo muestras como análisis complementario que permite profundizar en el conocimiento de patologías o establecer con más detalle las posibles causas de muerte de un individuo (Fornaciari et al. 1999; Ordi et al. 2006; Pabst and Hofer 1998; Pernter et al. 2007). A pesar de los numerosos estudios que utilizan los tejidos blandos como objeto de estudio (Aufderheide 2003; Buckley and Evershed 2001; Fiedler and Graw 2003; Forbes et al. 2011; Fornaciari and Capasso 1996; Gerszten et al. 1997; O'Brien and Kuehner 2007; Papageorgopoulou et al. 2009), la bibliografía respecto a la metodología que requiere este tipo de material es escasa, y la existente no adapta los procedimientos que se utilizan ni a la muestra específica, ni al tipo de conservación que ha seguido ese tejido (Grupe et al. 1997; Hoyle et al. 1997; Mekota and Vermehren 2005; Monsalve et al. 2008; Ottini et al. 2011; Papageorgopoulou et al. 2010; Rabino-Massa and Chiarelli 1972).

Cuando se trabaja con tejidos blandos antiguos es importante asumir que existen algunas dificultades en su interpretación. Los núcleos celulares se destruyen durante la autólisis, al igual que el resto de la célula, por lo que el tejido pierde así su patrón característico. La degradación de los hidratos de carbono y las proteínas durante la descomposición, así como la formación de ácidos grasos saturados e insaturados, modifican la arquitectura tisular haciendo que el tejido sea más inestable y pierda sus propiedades de tinción, y esto dificulta su caracterización y análisis (Dent et al. 2004). Todas estas dificultades técnicas también afectan a la interpretación.

En la bibliografía actual existen diversos artículos científicos con descripciones histológicas de tejidos antiguos concretos, pero no se centran en definir el patrón arquitectónico de los tejidos blandos conservados. Para el estudio de los tejidos blandos antiguos no existen este tipo de ayudas, y hay muy pocas publicaciones científicas que mencionen qué es característico de cada tejido. El problema surge cuando no es posible realizar una autopsia convencional; en muchos casos las muestras de tejido blando conservado se recogen sin poder localizar la zona anatómica de origen, por lo que el primer paso en el

estudio será identificar el tipo de tejido antes de analizar si hay alguna patología destacable. Para ofrecer soluciones a este vacío y a los investigadores de este campo, sería interesante disponer de un atlas de diferentes tejidos, así como establecer el patrón o las características más importantes de cada tipo de conservación.

Sin embargo, para poder entender los procesos conservadores, antes tenemos que conocer cómo se degrada el cadáver en condiciones normales y cómo actúan las condiciones que lo rodean para su conservación

1.1. DESCOMPOSICIÓN CADAVERICA

En condiciones normales, tras la muerte del individuo, se dan una serie de fenómenos que siguiendo una secuencia general comportan la descomposición y finalmente la esqueletización del cuerpo. Cuando estas condiciones se ven alteradas, implicando una inhibición, bloqueo o retraso en la descomposición, ocurre un fenómeno de conservación cadavérica. En este apartado, se describirán los estadios de descomposición y los procesos de conservación del cadáver.

1.1.1. Etapas de descomposición

La descomposición es un proceso continuo que empieza justo después de la muerte y termina cuando el cuerpo se ha reducido a esqueleto (huesos, dientes o cartílago) (Dent et al. 2004). Se pueden diferenciar 3 estadios principales de descomposición: la temprana, la avanzada y esqueletización (Janaway et al. 2009; Mann et al. 1990; Micozzi 1986; Rogers 2010).

Después de la muerte se inician los cambios post-mortem tempranos: la autólisis y la putrefacción. Tras el cese del bombeo del corazón se agota el oxígeno en los tejidos y aumenta el dióxido de carbono. Además hay un descenso del pH y los desechos se acumulan, envenenando a las células (Gill-King 1997). Con ello se inicia la autólisis; en ella, las enzimas celulares (lipasas, proteasas, amilasas etc..) son liberadas al citosol y empiezan a degradar a la célula, promoviendo que la respiración aeróbica se detenga y aumente la permeabilidad de la membrana celular (DiMaio and DiMaio 2001). Este proceso se da en todos los tejidos del cuerpo, pero se inicia antes en tejidos como hígado y cerebro debido a su alto contenido en enzimas digestivas y agua (Vass 2001). Mientras tanto, se

producen cambios físicos observables, el cuerpo baja su temperatura (*algor mortis*), la sangre se asienta en las zonas declives causando decoloración de la piel (*livor mortis*) y la liberación de iones calcio en las células musculares resulta en un endurecimiento de los músculos del cuerpo (*rigor mortis*) (Lee Goff 2009). Por otro lado, las bacterias del cuerpo, sobre todo las presentes en el tracto respiratorio e intestinal, se multiplican y rompen las paredes internas, expandiéndose por el sistema circulatorio e iniciando la putrefacción. Las bacterias aeróbicas se expanden por el cuerpo, agotando el oxígeno restante e iniciando la digestión de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Una vez consumido el oxígeno, las condiciones son favorables para el crecimiento de las bacterias anaeróbicas, que iniciarán la fermentación de las grasas (fermentación butírica) y de las sustancias albuminoideas (fermentación caseica) y la fermentación amoniacal. Estas reacciones aumentarán el olor y los fluidos de descomposición, atrayendo a los artrópodos hacia el cadáver, que lo colonizarán. También se produce una abundante cantidad de gases (sulfuro de hidrógeno, hidrógeno, aminas biogénicas, hidrocarburos, y compuestos de amonio), que resultan en el cambio de color del cadáver y que conducen a la aparición de la etapa de

hinchazón (Cantor 2010; Carter et al. 2007; Dent et al. 2004; Fiedler and Graw 2003; Reverte Coma 1999; Wilson-Taylor 2013). La formación de gases, sobretodo en el intestino, sigue hasta el punto de que la integridad de la piel se ve comprometida y se rompe. Esto permitirá una nueva entrada de oxígeno, precipitando la siguiente etapa: la descomposición activa (Carter and Tibbett 2008; Clark et al. 1997; Gill-King 1997; Micozzi 1986).

En esta etapa se acelera el proceso de descomposición dramáticamente. Durante la descomposición activa, los tejidos se rompen rápidamente y el cuerpo se reduce principalmente debido a la pérdida del 60-80% de agua. A su vez, los ácidos grasos volátiles se filtran en el suelo y alrededores del cadáver, creando lo que se conoce como la isla de descomposición cadavérica (Carter and Tibbett 2008). A pesar de que la autólisis y la putrefacción rompen los tejidos, la mayor parte de la descomposición se debe a las acciones de la fauna externa, sobretodo insectos y carroñeros. Durante la descomposición activa, la actividad de larvas de dípteros y coleópteros llega al máximo. Por otro lado, roedores y/o fauna carnívora también constituyen un potente mecanismo para la pérdida de materia orgánica cadavérica (Galloway et al. 1989). La etapa

de descomposición activa continúa hasta que las larvas de dípteros migran fuera del cadáver y son sustituidas por los coleópteros. Este fenómeno representa el inicio de la descomposición avanzada o etapa de secado (Carter and Tibbett 2008; Carter et al. 2007; Wilson-Taylor 2013).

El estado avanzado o secado representa una menor rapidez de descomposición. Aquí el incremento de la actividad de las larvas en la cavidad torácica y abdominal implica el drenaje de los fluidos corporales. Esto generalmente va seguido de una deshidratación de las superficies externas del cadáver, y la piel se endurece. Galloway y colaboradores (1989) mencionan que tanto la adipocira como la momificación pueden desarrollarse en esta etapa, dependiendo de las características ambientales que rodeen al cadáver. Elevadas temperaturas con una baja humedad y una ventilación apropiada favorecerán la momificación, mientras que un ambiente húmedo promueve el desarrollo de adipocira (Clark et al. 1997; Lee Goff 2009; Lynnerup 2007).

La última etapa de descomposición es la esqueletización, que se entiende como la eliminación de los tejidos blandos. Los restos se consideraran completamente esqueletizados cuando todos los tejidos han

sido eliminados, o parcialmente esqueletizados si sólo algunas partes del hueso están expuestas.

1.2. FENOMENOS CONSERVADORES DEL CADAVER

El proceso de descomposición puede detenerse por varias razones, dando lugar a la preservación de los tejidos blandos. Se puede entender que los fenómenos conservadores del cadáver dependen del equilibrio de diversos fenómenos sobre el cuerpo, como la desecación, la descomposición y factores externos, como la temperatura y la humedad (Aufderheide and Rodreguez-Martin 1998; Micozzi 1986; Micozzi 1991). La conservación puede lograrse de forma natural, debido a las condiciones ambientales específicas (clima cálido, frío, seco o húmedo), o puede ser facilitada por las prácticas mortuorias, como la eliminación de los órganos internos o el uso de tratamientos químicos (Lynnerup 2007).

1. 2.1. Desecación

La desecación es un proceso de conservación que se induce en un ambiente seco, con circulación de aire y con altas temperaturas (Jansen et al. 2002; Lee Goff 2009; Peck 1983). Estas características ambientales provocan la pérdida de agua, que paraliza las reacciones bioquímicas de

enzimas y microorganismos, disminuyendo la tasa de putrefacción, y resultando en la preservación de los tejidos blandos. Además, evita el desarrollo de los huevos y larvas de dípteros, inhibiendo así la descomposición (Haskell et al. 1997).

La desecación puede ocurrir también en ambientes secos pero ricos en cal o sales. La sal en el suelo absorbe los fluidos del cuerpo y va deshidratando el tejido blando (Lynnerup 2007; Wang 1996). Bajo estas condiciones, tanto la cal como la sal afectan al proceso de descomposición ya que la función enzimática se realiza normalmente en un ambiente ácido y con un alto contenido en agua (Lee Goff 2009; Vass 2001). Un suelo con cal tiene una gran capacidad de drenaje, por lo que éste absorbe el líquido que exuda el cadáver y, de esta manera, tanto la autólisis como la putrefacción se ven paralizadas debido a la falta de líquido, preservando así el cuerpo (Kim et al. 2008; Schotsmans et al. 2012; Shin et al. 2003). Las sales no sólo ayudan a la disminución de la humedad, sino que también afectan a las funciones biológicas de los microorganismos. En un ambiente con una alta concentración de sales, el agua se mueve hacia fuera de la célula bacteriana por un proceso de osmosis (Berkeley and Campbell 1985), lo que provoca una reducción de

su tamaño y una contracción de la membrana plasmática, impidiendo la realización de sus funciones normales, y por lo tanto deteniendo la descomposición temprana.

La momificación espontánea también puede darse en lugares extremadamente fríos. Las bajas temperaturas previenen de la actividad enzimática y el resultado es una tasa de putrefacción lenta (Aufderheide 2003; Lynnerup 2007). La congelación es un proceso que también implica la desecación del tejido blando, dando lugar a la momificación. Un ejemplo claro de este tipo de conservación es la momia de Otzi, descubierta en 1991 en los Alpes de Ötztal, en la frontera entre Austria e Italia, a una altitud de 3200 msnm y cuya antigüedad se remonta 3300 a.C. (Mayer et al. 1997; Pernter et al. 2007; Seidler et al. 1992; Spindler 2004).

Por tanto, eliminar el agua de un cuerpo, ya sea por calor, por osmosis o por evaporación, es un método muy efectivo de momificación (Aufderheide 2003).

1.2.2. Saponificación

La adipocira es una sustancia similar al jabón que se puede formar a partir de las grasas neutras de cuerpos en descomposición. Se sabe que es un cambio post mórtem tardío (Forbes et al. 2005) y su formación se inicia por la acción de lipasas intrínsecas que convierten los triglicéridos en sus correspondientes ácidos grasos saturados e insaturados (Liu et al. 2010). Aunque la adipocira se considera normalmente como un producto de un ambiente húmedo (Micozzi 1991), también se puede formar en una variedad de contextos, incluidos los ambientes secos (Forbes et al. 2011; O'Brien and Kuehner 2007; Ubelaker and Zarenko 2011).

La saponificación de los tejidos resulta de la hidrólisis e hidrogenación de las grasas del cuerpo (Bereuter et al. 1996; Cotton et al. 1987). De este modo, las partes del cuerpo con un alto contenido de grasa tienden a ser preservados por saponificación; un claro ejemplo es el cerebro. Gracias a este tipo de conservación se pueden encontrar cerebros bien preservados, incluso cuando todos los otros tejidos blandos se han descompuesto (Radanov et al. 1992; Tkocz et al. 1979).

Por otro lado, muchos autores postulan que la ropa que lleva el cadáver puede retardar los cambios post-mortem e incluso inducir a la formación adipocira (Dix and Graham 2000; Mellen et al. 1993). Además, según Mant (1987) la ropa mantiene alejados a los insectos y también favorece la absorción y el almacenamiento de la humedad, facilitando por lo tanto la formación de adipocira.

Muchos autores consideran que los mecanismos de descomposición y preservación son independientes entre ellos debido a que cada uno es promovido por un medio ambiente y unas circunstancias concretas. En cambio otros señalan que en un mismo cuerpo pueden coexistir dos o más mecanismos completamente distintos. Como se puede ver, tanto los procesos de destrucción como de conservación son fenómenos complejos en los que intervienen muchos actores, tanto internos, del propio cuerpo, como externos, biológicos y ambientales.

Hay que tener en cuenta también que todas estas reacciones y transformaciones implican cambios en la estructura del tejido, que se convierte en un material duro pero frágil, difícil de manejar. Por ello el uso de técnicas histológicas sobre tejidos antiguos supone una etapa crítica

en su estudio e interpretación. Si la metodología histológica no es adecuada, se podrían añadir más artefactos, provocando errores en el diagnóstico y generando pseudopatologías.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACION

El estudio histológico de los tejidos blandos en la antropología física contribuye a identificar los tejidos y a reconocer las eventuales alteraciones relacionadas tanto con procesos tafonómicos como las enfermedades en poblaciones antiguas. Sin embargo, su examen es complejo puesto que es un material sensible y único. Por otra parte, debido al tiempo transcurrido y el modo de preservación, los tejidos conservados presentan modificaciones tafonómicas que alteran su arquitectura normal. Actualmente, existen muy pocos estudios que

centren su atención en los aspectos metodológicos de la paleohistología, y además se presta escasa atención a las diferencias entre los procesos de conservación y tipologías de tejido, por lo que no se encuentran procedimientos adaptados a cada problemática. Un análisis exhaustivo utilizando distintas metodologías, aplicadas a tejidos de distinto origen, y con procesos de conservación diferentes, contribuiría a trazar las técnicas más adecuadas para cada caso, evitando errores metodológicos, mejorando la calidad de las preparaciones y ayudando en definitiva al diagnóstico final.

Como hemos comentado anteriormente, los tejidos blandos preservados presentan modificaciones en su arquitectura que dificultan la comprensión y diagnóstico. En la actualidad no existen referentes bibliográficos de cómo se modifica la arquitectura de estos y la mayoría de casos publicados hacen referencia a patologías halladas en muestras indubitadas y con descripciones muy breves del patrón histológico (Boano et al. 2009; Ciranni and Fornaciari 2004; Chang et al. 2006; Sokiranski et al. 2011). Por lo tanto existe una problemática en la identificación e interpretación tanto a nivel biológico como histopatológico, siendo importante la creación de un atlas de referencia donde se detalle el patrón

histológico de los tejidos más comunes. Sin embargo, para poder entender lo que se esté observando es importante conocer los procesos tafonómicos y como se degradan los tejidos. En la actualidad existe mucha bibliografía que estudia tanto la desecación como la saponificación y que las tratan como procesos independientes (Aturaliya and Lukasewycz 1999; Fornaciari et al. 2010; Janaway et al. 2009; O'Brien and Kuehner 2007; Schotsmans et al. 2011; Takatori 2001), pero existen múltiples factores ambientales que pueden alterar estos procesos tafonómicos y redirigirse. El análisis de los tejidos blandos tanto histológicamente como con otras técnicas ayuda a comprender estas relaciones tan complejas y a arrojar luz a los mecanismos de conservación.

Por otro lado, el análisis de tejidos blandos permite reconocer un tejido concreto, y determinar su estado ya sea patológico o no, aportando así datos imprescindibles para la identificación de restos antiguos y mejorando el conocimiento sobre las poblaciones antiguas y sobre cómo vivían.

2.1. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es mejorar el rendimiento de los procedimientos paleohistológicos y aplicarlos a casos de conservación que contribuyan al desarrollo de los estudios bioantropológicos.

Para ello se ha dividido en cuatro objetivos específicos:

- I. **Implementar una técnica histológica adaptada a los tejidos blandos antiguos según el estado de conservación y al tipo de muestra.**
 1. Optimizar tanto la solución de rehidratación como el tiempo de exposición para tejidos desecados vs saponificados.
 2. Optimizar la solución de fijación para tejidos desecados vs saponificados.

3. Analizar si el calor ayuda a mejorar la fijación o la calidad de la tinción en la preparación.

II. Elaborar de un atlas histológico de referencia.

1. Reconocimiento del patrón arquitectónico del cerebro.
2. Reconocimiento del patrón arquitectónico del pulmón.
3. Caracterización de tejidos saponificados a través de su microestructura.
4. Caracterización de tejidos desecados a través de su microestructura

III. Entender los fenómenos tafonómicos asociados a los tejidos preservados de la Cova des Pas.

1. Caracterizar el fenómeno de preservación que se ha dado en el yacimiento de la Cova des Pas.
2. Conocer la implicación del ambiente y que factores han intervenido en tal preservación

IV. Aplicar los estudios histológicos a la resolución de casos paleoantropológicos.

Estos objetivos se alcanzan en los cinco artículos que constituyen el apartado de resultados

Objetivo	Sección	Publicación	Yacimiento
I, II	Capítulo I	Optimizing specimen processing for ancient soft tissue specimens. Prats-Muñoz G, Malgosa A, Isidro A, Galtés I. 2015 Biotech Histochem 90(4):278-87	Cova des Pas Qarara Santes Creus
II, III, IV	Capítulo II	A paleoneurohistological study of 3000-year-old mummified brain tissue from the Mediterranean Bronze Age. Prats-Muñoz G, Malgosa A, Armentano N, Galtés I, Esteban J, Bombi JA, Tortosa M, Fernández E, Jordana X, Isidro A, Fullola JM, Petit MA, Guerrero VM, Calvo M, Fernández PL. 2012. Pathobiology, 79: 239-246	Cova des Pas
II, IV	Capítulo III	Anthracosis in a Coptic mummy. Isidro A, Malgosa A, Prats-Muñoz G. Arch Bronconeumol. 2014. 50(8):368–369	Qarara
II, III	Capítulo IV	Human soft tissue preservation in the Cova des Pas site (Minorca Bronze Age). Prats-Muñoz G, Galtés I, Armentano A, Cases S, Fernández PL, Malgosa A. 2013. J Archaeol Sci 40:4701-4710	Cova des Pas
II, IV	Capítulo V	The death of the Queen Blanca of Anjou (S.XIII-XIV). Prats-Muñoz G, Galtés I, Subirana M, Isidro A, Armentano N, Gonzalez M, Lalueza-Fox C, Froesch P, Malgosa A	Santes Creus

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

El material arqueológico utilizado en la presente tesis proviene de diversos yacimientos y se encuentra en distintos estados de preservación. Aunque los materiales y su procedencia se describen en detalle en cada uno de los artículos que constituyen los distintos capítulos de los resultados, se resumen a continuación los datos más relevantes.

Los restos más antiguos proceden del yacimiento arqueológico de la Cova des Pas, la cual se encuentra en el sur de la isla de Menorca, cerca de la localidad de Ferreries, en el barranco de Trebalúger. Se trata de una cavidad de unos 6,5 m de ancho y unos 4,5 m de largo, situada a

unos 15 m del suelo. Es un entierro muy significativo no sólo por la cantidad de esqueletos hallados en conexión anatómica, sino por la inmensa cantidad de material orgánico asociado a estos. El yacimiento se data entre el final de la Edad de Bronce (1220-1100 BC) y la primera Edad del Hierro de Baleares (900-8000 cal BC) perteneciendo a la cultura talayótica. Se trata de un entierro colectivo con inhumaciones de tipo primario donde los cuerpos fueron depositados directamente sobre el suelo con una disposición mayoritaria de decúbito lateral y siempre con las extremidades superiores e inferiores hiperflexionadas (Armentano et al. 2010; Fullola et al. 2007) (Fig. 1).

Estas muestras han sido utilizadas para alcanzar varios objetivos (artículos 1, 2 y 4) tanto por su buen estado de conservación como por su antigüedad. El gran número de muestras de material intracraneal nos permitió realizar el estudio de cómo se preservaba el encéfalo y definir sus patrones arquitectónicos ya que hasta el momento la mayoría de estudios de la bibliografía son de casos concretos que no se centran en su estructura. Por otro lado, se quiso conocer cuál fue el proceso tafonómico responsable de la preservación de éstos, pues las características ambientales eran muy específicas.

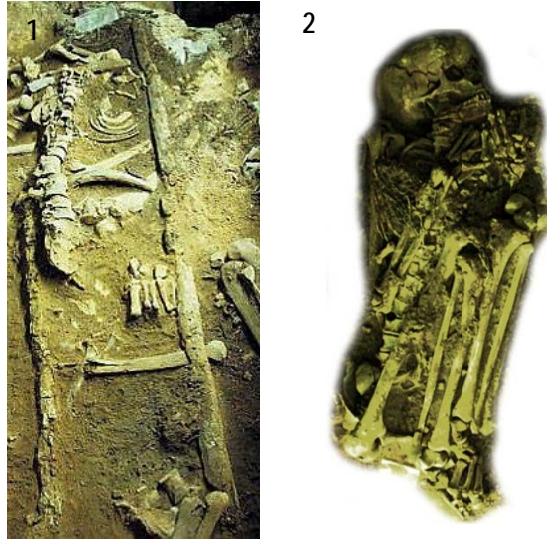


Fig. 1. 1. Detalle de una camilla para adulto conservada de la Cova des Pas. 2. Individuo adulto en posición hiperflexionada.

Otras muestras antiguas utilizadas en la presente tesis proceden del yacimiento inédito de Qarara (Egipto Medio) (artículos 1 y 3). Concretamente los tejidos analizados pertenecían a un individuo varón de entre 25 y 35 años, el cual fue recuperado de la necrópolis copta de Qarara, en Egipto Oriental, durante la excavación conjunta realizada por la Eberhard Karls Universität Tübingen (Alemania) y el Museo Egipcio de Barcelona en marzo de 2012. Estas muestras fueron usadas para establecer patrones arquitectónicos de muestras pulmonares, y así

ampliar el número de muestras del atlas así como para optimizar la metodología que se emplea, puesto que son muestras momificadas por desecación.



Fig. 2. Individuo adulto hallado necrópolis copta de Qarara (Egipto).

Por último, se incluyeron muestras medievales (siglos XIII y XIV) provenientes del panteón real de la Corona de Aragón ubicado en monasterio de Santes Creus (Miquel et al. 2015) (artículos 1 y 5). En el presbiterio de la iglesia, a ambos lados del altar mayor se encuentran los dos principales sepulcros reales. A un lado se encuentra el sarcófago de Pedro III de Aragón el cual fue enterrado en una bañera de pórfido púrpura tapada con una losa de jaspe. Al otro lado se encuentra

un sepulcro doble, en el que presumiblemente yacen los reyes Jaume II y Blanca de Anjou. El uso de los tejidos blandos en este caso fue de gran ayuda para la identificación del cuerpo hallado en la tumba.



Fig. 3. 1. Pedro III (s. XII). 2. Blanca de Anjou (s. XIV)

3.2. MÉTODOS

Los métodos aplicados en la presente tesis han sido elaborados a partir de las soluciones más utilizadas en este campo, las desarrolladas por Sir Marc Armand Ruffer (1909), pionero de los estudios histológicos de momias, y Sandison (1955). Esta metodología se basa en el uso de una solución de rehidratación que difiere según se utilice la formulación de Ruffer o la de Sandison, y que reconstituirá el tejido para su posterior procesamiento. Los siguientes pasos son los usados en la histología convencional: el uso de un fijador para dar estabilidad a la muestra, seguido de la inclusión en un medio que dé consistencia y dureza al tejido, que en el caso que nos ocupa será la parafina, y finalmente la tinción.

Actualmente estas técnicas pueden ser mejoradas, adaptándolas a cada tipo de tejido y de conservación. Para ello, nos centramos en analizar qué solución de rehidratación y fijación es más apropiada, así como en mejorar la calidad de la tinción en este tipo de muestras. Los resultados han sido publicados en un artículo que constituye el capítulo 1 de los resultados.

RESULTADOS

- 4.1. Optimizing specimen processing for ancient soft tissue specimens
- 4.2. A paleoneurohistological study of 3000-year-old mummified brain tissue from the Mediterranean Bronze Age
- 4.3. Anthracosis in a Coptic Mummy
- 4.4. Human soft tissues preservation of Cova des Pas site (Minorca Bronze Age)
- 4.5. The Death of Queen Blanca of Anjou (c. 13-14)



4.1

A PALEONEUROHISTOLOGICAL STUDY OF
3000-YEAR-OLD MUMMIFIED BRAIN TISSUE
FROM THE MEDITERRANEAN BRONZE AGE

Optimizing specimen processing for ancient soft tissue specimens

G Prats-Muñoz¹, A Malgosa¹, A Isidro¹, I Galtés^{2,3}

¹GROB, Biologic Anthropology Unit, BABVE Department, University Autonomous of Barcelona, 08193, ²Unit of Forensic Anthropology. Service of Forensic Pathology of Institute of Legal Medicine of Catalonia (IMLC), 08075 Barcelona, Catalonia, Spain, ³Unit of Legal Medicine and Forensic, Department of Psychiatry and Legal Medicin, University Autonomous of Barcelona, 08193, Cerdanyola del Vallès, Catalonia, Spain

Accepted November 15, 2014

Abstract

Despite many reports concerning processing of ancient soft tissues, scant attention has been paid to optimizing procedures for processing soft tissues that have been altered by taphonomic processes. To determine the best procedures, we investigated the rehydration solution, time of exposure to the solutions, fixative solution and exposure to heat. Processes were evaluated based on the minimum section thickness, degree of tissue fragmentation, definition of tissue architecture and penetration of stains. We found that in desiccated samples, tissue architecture was optimized by using Ruffer's solution for rehydration and Schaffer's solution as fixative, because these tissues require water restoration within the tissues due to their compacted character. Heating enhanced penetration of dyes in these specimens, which improved diagnosis. Saponified tissues that had suffered extensive decomposition were more labile and required slow water uptake. The best histological sections were obtained using Sandison's solution followed by fixation with formaldehyde and avoiding heat. To obtain the best results with paleohistological specimens, the procedure must be determined by the condition of the sample and by accounting for the nature of its damage.

Key words: adipocere, desiccation, fixation, histochemistry, mummified tissue, rehydration

Physical paleoanthropology traditionally has focused on analysis of skeletal remains, but recently, interest in soft tissues has increased with the goal of providing more complete studies of ancestral diseases (Rabino-Massa and Chiarelli 1972, David 1997, Magee 1998, Ciranni et al. 1999, Fornaciari et al. 1999, Aufderheide 2000).

Despite considerable literature concerning the histology of ancient soft tissues, there are few reports concerned with methodology (Rabino-Massa and Chiarelli 1972, Grupe et al. 1997, Mekota and Vermehren 2005). Scant attention has been paid to rehydration and fixation, and the effects of

taphonomic processes on soft tissues have not been considered. The efficacy of treatment of ancient tissues depends on a combination of processes that prevents the remains from becoming dry, brittle or allowing them to disintegrate.

Early studies used solutions developed by Sir Marc Armand Ruffer (1909), the pioneer of histological studies of mummies, and Sandison (1963), who modified Ruffer's solution and developed new techniques for histological examination. Researchers currently use various rehydration fluids that are based on Ruffer's and Sandison's solutions. Unfortunately, standard procedures including processing periods, processing fluids, rehydration and fixation have not been adapted to the environmental context in which the tissues were preserved (Hoyle et al. 1997, Monsalve et al. 2008, Papageorgopoulou et al. 2010, Ottini et al. 2011). These difficulties are greater in cases of saponification and there are few reports in the literature on this subject.

Correspondence: Ignasi Galtés, Institute of Legal Medicine of Catalonia, Ciutat de la Justícia, Gran Via de les Corts Catalanes, 111 Edifici G 08075 Barcelona, Spain. Tel: 00-34-93 554 82 78. Fax: 00-34-93 554 82 59. E-mail: ignasigaltés@gmail.com
© 2015 The Biological Stain Commission
Biotechnic & Histochemistry 2015, **Early Online: 1–10.**

Adipocere is a soap-like substance formed from the neutral fats of decomposing bodies (Forbes et al. 2005). Its formation is initiated by intrinsic lipases that convert triacylglycerides into their corresponding saturated and unsaturated fatty acids (Liu et al. 2010). This process commonly is caused by a damp environment, but it can appear in a variety of contexts (O'Brien and Kuehner 2007, Forbes et al. 2011, Ubelaker and Zarenko 2011, Prats-Muñoz et al. 2013). After saponification, the tissues are more labile and brittle, and disaggregation during histological procedures is frequent.

Mummification is an important process of preservation. It is caused by a dry environment, air circulation and elevated temperatures, which in turn lead to desiccation (Lynnerup 2007, Lee Goff 2009). Mummification causes changes in tissue structure; it hardens and becomes difficult to handle. If histological methodology is inadequate, more artifacts could be created, which could cause errors in diagnosis (pseudopathology).

We related our methodology to the state of preservation of the tissues. To do this, we focused on the rehydration and fixative solutions, and on enhancing staining to provide better diagnosis.

Material and methods

Desiccated and saponified samples of skin, lung and skeletal muscle were selected to determine an optimal methodology for ancient soft tissues. The desiccated specimens were from a Coptic mummy (KAS, V century AD) and a European mummy (SC'B, XIII century AD). The saponified samples were from European sites, one from the prehistoric site of Cova des Pas (CP, 5300 B.P.) and the other from a medieval mummy (XIII century AD, SC'P) (Table 1).

Small pieces (8–10 mm) of each specimen were rehydrated in either Ruffer's or Sandison's solutions. Exposure to these solutions was one half hour to 72 h depending on the sample. Heat was applied, avoiding boiling, using a microwave for 15

sec after the rehydration step in certain samples. All samples then were immersed in one of three fixatives: 4% paraformaldehyde, modified Schaffer's solution (9:1 80–96% ethanol:10% aqueous formaldehyde) and Farmer's solution (3:1 ethanol:100% glacial acetic acid) for 24 h. The experimental design is outlined in Fig. 1. Samples then were dehydrated through graded alcohols and cleared in xylene using standard histological techniques. Specimens were embedded in paraffin and 3–5 µm sections were cut using a rotary microtome. Sections were stained routinely with hematoxylin and eosin and Masson trichrome (McManus and Mowry 1968, Ross et al. 2003).

We determined the best technique for preparing paleohistological specimens by investigating the main steps in the methodology: rehydration solution and period of exposure, fixation solution, and exposure to heat. The success of the processes was evaluated using the following criteria: 1) how thin the section could be cut, 2) degree of tissue fragmentation, 3) clarity of tissue architecture and 4) penetration of stains.

Results

Our findings are summarized in Table 2, which shows the results of the rehydration and fixation solutions used, and the effects of applying heat.

Rehydration

The duration of exposure to rehydration solutions is crucial for moisturizing the samples. Table 2 shows the results obtained with Ruffer's solution for desiccated tissues. The exposure period is related to the nature of the tissues; for skin and muscle, rehydration was completed in 1 or 2 days, but in specimens of lung, it required only a few hours. KAS lung samples were examples of good rehydration with short exposure to Ruffer's solution (Fig. 2). Connective tissues were preserved with little fragmentation (Fig. 2A). Although the lung parenchyma architecture was incomplete, the intact alveoli and dark anthracotic pigments were preserved (Fig. 2B, C).

The results for saponified tissues were improved by using Sandison's solution; Ruffer's solution caused the material to shatter (Table 2). The exposure times were from 30 min to 24 h depending on the nature of the tissue. For example, muscle required a longer rehydration period because of the contraction that had occurred during the original preservation. In our specimen (Fig. 3) the internal

Table 1. Specimens used in study

Desiccated samples	Saponified samples			
	KAS Date	SC'B Date	CP Date	SC'P Date
Name	KAS	SC'B	CP	SC'P
Date	V century A.D.	XIII century A.D.	5300 B.P.	XIII century A.D.
Skin	3	2	1	1
Lung	1	1	5	4
Muscle	3	2	2	2

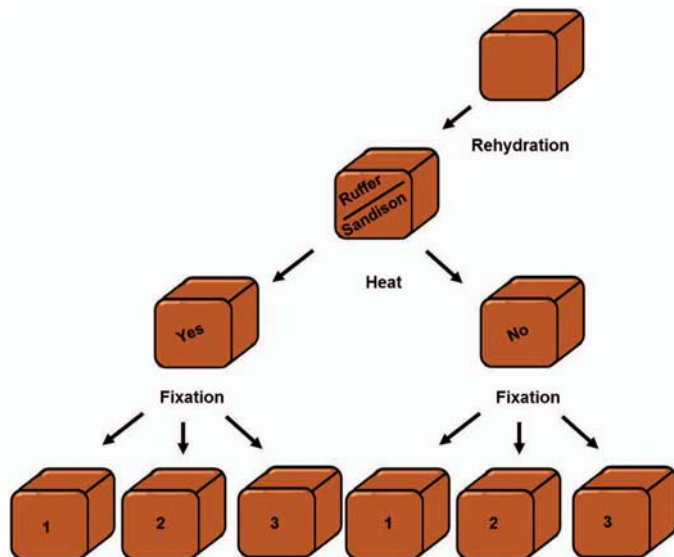


Fig. 1. Summary of procedures investigated. 1) Modified Schaffer's solution. 2) Paraformaldehyde 4%. 3) Farmer's solution).

architecture was slightly deteriorated, but a vestige of the location of one nucleus could be identified. Skeletal muscle striations were not observed, although the tissue fragmentation lines suggested the outlines of the sarcomeres (Fig. 3).

Fixation solution

Fixation is a determining factor for stabilizing samples. We tested three fixation solutions (4% paraformaldehyde, modified Schaffer's solution and Farmer's solution) and obtained different results for each soft tissue. Farmer's solution hardened all sample types excessively regardless of the prior hydration process, which prevented effective microtomy and produced fractures and artifacts (Table 2).

Paraformaldehyde 4% was unsuitable for desiccated soft tissues, because it hardened samples and only thick sections ($\geq 5 \mu\text{m}$) could be cut, which made microscopic observation difficult. Schaffer's solution, however, improved the quality of fixation and provided adequate stability to facilitate subsequent microtomy (Table 2). A dissected muscle of the SC'B mummy is shown as an example of this treatment in Fig. 4. The general extracellular architecture was well preserved and the dense connective tissue of the epimysial sheath surrounding a group

of fascicles was evident. The perimysium could not be differentiated, but the endomysium, which surrounds individual muscle fibers, was preserved in some areas.

Paraformaldehyde produced the best results for saponified soft tissues. This fixative caused hardening, but it prevented the fragmentation that typically occurs with this kind of material. On the other hand, modified Schaffer's solution was an inadequate fixative; soft tissues were damaged and fragmented during subsequent procedures. An example of good fixation of saponified tissue with paraformaldehyde is the skin of SCP mummy (Fig. 5). The use of paraformaldehyde preserves tissue architecture with little fragmentation. The epidermis could be identified including a keratinized cornified layer; the other epidermal layers had disappeared. The dermis had lost its typical structure and its color was changed, but it was recognizable by the presence of collagen fibers. A substantial fungal layer separated the epidermis and dermis

Heat

Heating the desiccated specimens that we studied prevented the excessive fragmentation that occurred during the rehydration steps, particularly for softer

Table 2. Results of study

Samples	Rehydration	Time exposure to rehydration	Fixation solution	Heat	Section thickness in ∞ -m	Degree of fragmentation	Tissue architecture	Quality of staining
Desiccated specimens skin	Ruffer	24 – 48 h	parafomaldehyde	yes	<5	+	poor	+++
			Schaffer's modified	no	5	++	moderate	+
			Farmer's parafomaldehyde	no	3 – 5	++	moderate	+++
	Sandison	48 – 72 h	Farmer's parafomaldehyde	hard	hard	+++	poor	++
			Schaffer's modified	no	>5	++	poor	–
			Farmer's parafomaldehyde	no	5	++	poor	++
lung	Ruffer	30 min – 3 h	Farmer's parafomaldehyde	hard	>5	++	poor	++
			Schaffer's modified	no	5	++	moderate	+
			Farmer's parafomaldehyde	yes	3 – 5	+	optimum	++
	Sandison	45 min	Schaffer's modified	no	3	+	moderate	+
			Farmer's parafomaldehyde	hard	hard	++	moderate	+
			Schaffer's modified	no	5	+	poor	++
muscle	Ruffer	24 – 48 h	Farmer's parafomaldehyde	yes	>5	++	moderate	+
			Schaffer's modified	no	3 – 5	+	poor	++
			Farmer's parafomaldehyde	hard	3 – 5	++	moderate	+
	Sandison	24 – 48 h	Farmer's parafomaldehyde	hard	5	++	moderate	+++
			Schaffer's modified	yes	3 – 5	+	poor	+
			Farmer's parafomaldehyde	no	3 – 5	++	optimum	++
Saponified specimens skin	Ruffer	30 min – 3 h	Farmer's parafomaldehyde	no	3	++	optimum	+
			Schaffer's modified	yes	hard	+	poor	+
			Farmer's parafomaldehyde	no	5	++	moderate	+
	Sandison	30 min – 3 h	Farmer's parafomaldehyde	yes	3 – 5	bad	++	+
			Schaffer's modified	no	3	moderate	++	+
			Farmer's parafomaldehyde	yes	3 – 5	bad	+++	++
Ruffer	30 min – 3 h	Schaffer's modified	no	disintegrated				
		Farmer's parafomaldehyde	no					
		Farmer's parafomaldehyde	hard					

(Continued)

Table 2. (Continued)

Samples	Rehydration	Time exposure to rehydration	Fixation solution	Heat	Section thickness in ∞ -m	Degree of fragmentation	Tissue architecture	Quality of staining
lung	Sandison	30 min – 30 h	paraformaldehyde	yes	5	+	poor	++
			Schafer's modified	no	5	+	optimum	++
			Farmer's paraformaldehyde	no	> 5	+++	poor	++
lung	Ruffer	30 min – 1 h	Farmer's paraformaldehyde	hard	disintegrated			
			Schafer's modified	yes	3–5	++	moderate	++
			Farmer's paraformaldehyde	yes	5	+	poor	++
lung	Sandison	30 min – 1 h	Schafer's modified	no	5	++	moderate	++
			Farmer's paraformaldehyde	hard	3–5	++	moderate	+
			Schafer's modified	yes	5	+++	moderate	++
muscle	Ruffer	30 min – 3 h	Farmer's paraformaldehyde	no	3	+++	poor	++
			Schafer's modified	hard	5	++	moderate	++
			Farmer's paraformaldehyde	yes	5	+++	moderate	+
muscle	Sandison	30 min – 3 h	Schafer's modified	yes	disintegrated			
			Farmer's paraformaldehyde	no	3–5	+++	poor	+
			Schafer's modified	hard	> 5	+	moderate	++
muscle	Ruffer	24 h	paraformaldehyde	yes	3–5	++	optimum	++
			Schafer's modified	no	5	+++	poor	++
			Farmer's paraformaldehyde	no	3–5	+++	poor	+

Hard and disintegrated samples were not suitable for use.

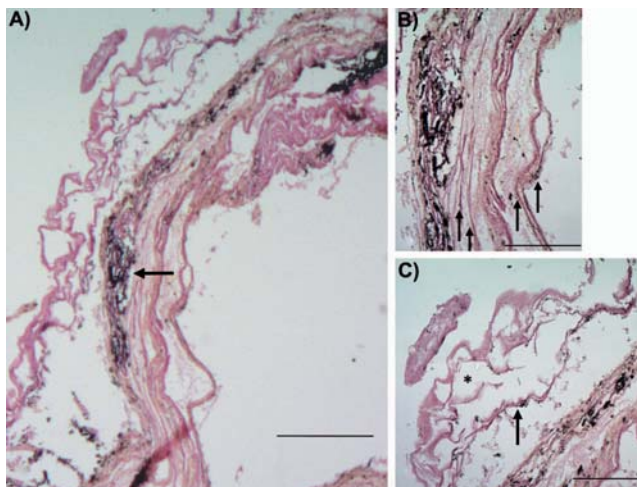


Fig. 2. Desiccated lung of KAS mummy. A) General microscopic appearance of lung with carbon particles preserved (arrow). $\times 50$. Scale bar = 200 μm . B) Enlarged image of lung parenchyma. Arrows show parallel connective tissue fibers. $\times 200$. Scale bar = 100 μm . C) Lung alveoli. Arrow indicates alveolar wall, asterisk shows air space of alveolus. $\times 20$. Scale bar = 100 μm . Hematoxylin and eosin.

samples such as lung. The most important effect, however, was improved staining. Light microscopy was easier, because morphological details could be differentiated more easily (Table 2). Heated mummified skin samples are shown in Fig. 6. The coloration of the epidermis made it easy to distinguish the stratum corneum. Collagen fibers in the dermis were stained weakly (Fig. 6).

Although heat improved the penetration of stains, heat made saponified soft tissues very labile. Tissue integrity was affected adversely; the distinc-

tive characteristics of the tissues were lost, even in durable structures such as skin (Table 2). For this reason, pulmonary tissue was not heated (Fig. 7) and the remains of the alveolar walls and anthracotic

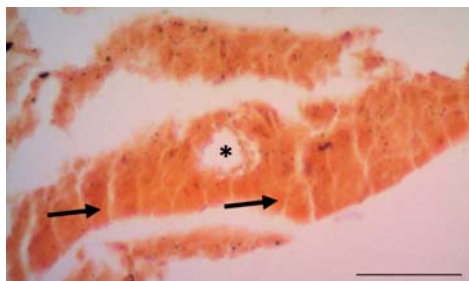


Fig. 3. Saponified muscle of CP. Asterisk shows area where one nucleus could have been located, arrows indicate outlines of sarcomeres. $\times 400$. Scale bar = 50 μm . Hematoxylin and eosin.

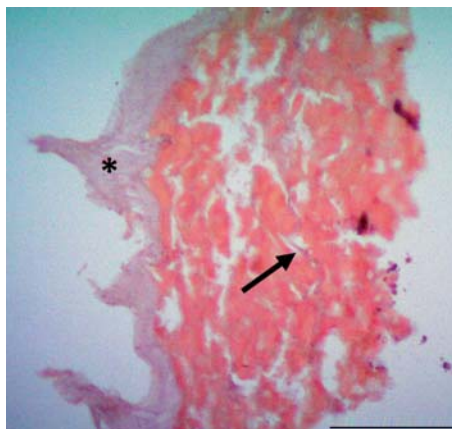


Fig. 4. Desiccated muscle from SC'B. General extracellular architecture, epimysium (*) and endomysium (arrow) are shown. $\times 400$ Scale bar = 50 μm . Hematoxylin and eosin.

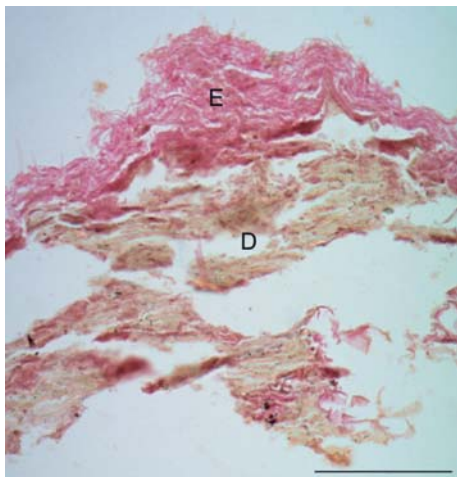


Fig. 5. Saponified skin from SC'P. Epidermis (E), and dermis (D) are shown. $\times 200$. Scale bar = 100 μm . Hematoxylin and eosin.

pigments were conserved; they are important elements for tissue identification and without such features diagnosis would be difficult. Figure 8

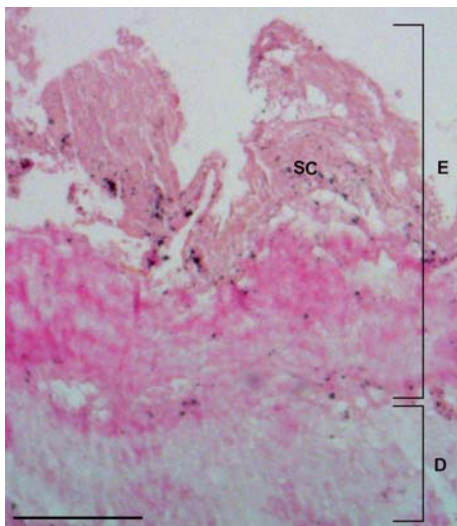


Fig. 6. Desiccated skin from KAS mummy. In the epidermis (E) a possible remaining cornified layer (SC) is shown, whereas the other epidermal layers are not recognizable. Connective fibers of the dermis (D) are shown. $\times 50$. Scale bar = 200 μm . Hematoxylin and eosin.

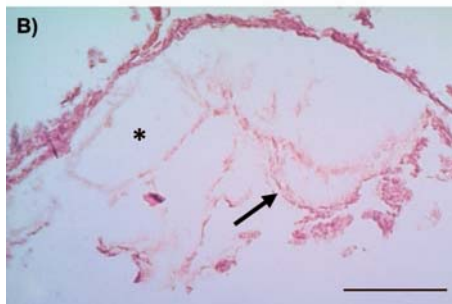
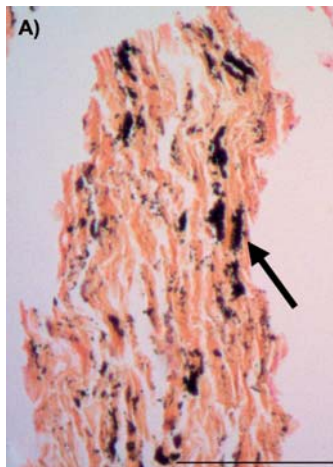


Fig. 7. Saponified corpse CP. A) Connective tissue fibers and carbon particles are shown (arrows). $\times 200$. Scale bar = 100 μm . B) Lung alveoli. Arrow indicates alveolar wall, asterisk shows the air space of the alveolus. $\times 200$. Scale bar = 100 μm . Hematoxylin and eosin.

summarizes the protocol that shows the best results for a given tissue.

Discussion

We have shown that different types of ancient tissue require different processing treatments to obtain high quality stained histological sections for microscopic observation; each step must be adapted to tissue characteristics. All histological techniques, however, have limitations for analyzing ancient remains.

Rehydration is the critical process for obtaining suitable material; replacement of water restores the mechanical properties of ancient soft tissues. An

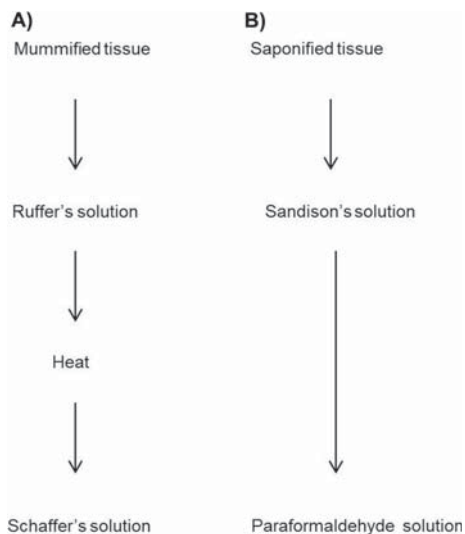


Fig. 8. A) Proposed protocol for processing mummified tissues. B) Proposed protocol for processing saponified tissues.

optimal rehydration fluid diffuses quickly and uniformly into the tissue, which allows it to stabilize its structure. Therefore, the rehydration solution should contain emulsifying and tensoactive agents, a preservative that inhibits bacterial growth and a rehydrating agent (Mekota and Vermehren 2005); it is important to adapt the solution to the conditions under which preservation occurred.

We found that Ruffer's solution is the better rehydrating agent for desiccated specimens and that Sandison's solution is preferable for saponified tissues. The differences we observed are due to the different hydrating agents; water is used in Ruffer's solution, and 1% formalin and 96% alcohol are used as hydrating and fixative agents in Sandison's solution. Thus, in Ruffer's solution, water flows in quickly, because it contains no fixative. Consequently, the architecture of labile soft tissues is compromised, which likely leads to breakage. Therefore, saponified samples require a solution such as Sandison's that penetrates slowly and fixes tissue at the same time. To the contrary, desiccated tissues collapsed and were dried during their original preservation (Clark et al. 1997); therefore, they require extra moisture such as that offered by Ruffer's solution.

The duration of rehydration also is important for obtaining tissue consistency similar to the original tissue. Excessive exposure to rehydration agents can

cause the sample to disintegrate rapidly; insufficient exposure may allow the tissue to remain excessively hard (Sandison 1966). To avoid tissue disaggregation, samples were observed every 15 min during the first hour; subsequent observations could be less frequent. The time required for mummified tissues usually is longer (24–72 h) than for saponified tissues (30 min–24 h). In all cases, the type of tissue determines the rehydration requirements, but excessive rehydration is unusual. Thus, as a general rule, it is better to extend the exposure time.

The quality of ancient soft tissue preparation also depends on the quality of fixation (Mekota and Vermehren 2005). Preparation of saponified tissues usually is complicated. The samples are fragile and tend to lose their structure even after fluid replacement. Fixation protects samples from the mechanical stress of sectioning (Krishnamurthy 1999). We found that paraformaldehyde fixation preserved the architecture of saponified tissues better and produced better defined morphological details than other fixatives. Formaldehyde penetrates slowly, but fixes tissue rapidly; therefore, it is better for saponified tissues. Unfortunately, formaldehyde fixation is disadvantageous for mummified samples. We found that paraformaldehyde increased the hardness of the tissue, which hindered section cutting, producing excessive mechanical strength, which causes tissue artifacts. Conversely, when Schaffer's solution is used the cut was less destructive, which preserved tissue integrity and improved the results. Schaffer's solution is based on a combination of alcohols that fix by dehydration. Therefore, the activity of this solution is reduced. Finally, we found that Farmer's solution was unsuitable for any kind of tissue, because it caused excessive tissue hardening. This fixative is based on acetic acid, which is efficient for precipitating chromatin, but this cellular component is absent in ancient soft tissues.

Staining mechanisms involve a variety of physicochemical phenomena; therefore, staining is the result of differential structural density, substrate-specific stain solubility, or molecular charge. All of these factors change unpredictably in degraded tissues and staining of ancient tissues generally is poor (Grupe et al. 1997, Sandison 1963, Turner and Holtom 1981). Stains are used to add contrast to ancient soft tissues to aid identification of tissues and pathological changes. Thus, in many cases, stains are used as diagnostic tools (Hess et al. 1998, Mekota et al. 2005, Ottini et al. 2011, Radanov et al. 1992). Therefore, improving the ability of the stains to penetrate the sample is crucial.

Heat may be used as a fixation cofactor, because it causes protein coagulation, which increases the

definition of histological patterns (Montuenga Badia et al. 2009) and to accelerate the fixation (Rhodes 2012). We found that heat decreased fragmentation of the tissue and improved the staining quality, because heat precipitates proteins.

Heating is not recommended as a standard procedure, however, for saponified tissues, which are particularly labile. Moreover, tissues should not be heated for more than a few seconds to prevent excessive tissue hardness.

To obtain the best results for paleohistology, processing must be tailored to individual samples by accounting for the prior preservation of the specimen. Therefore, for desiccated tissues, whose collagen and elastic fibers often are well preserved, we recommend rehydration with Ruffer's solution and fixation with Schaffer's solution plus heating to enhance stain penetration. These procedures preserved good architecture and morphological details. On the other hand, saponified tissues have suffered some degree of decomposition, have lost the majority of their macroscopic characteristics and are less stable. In these cases, the best histological sections are obtained by using Sandison's solution, fixing with formaldehyde and never using heat. Our observations may contribute to optimizing techniques for paleohistology and may improve studies of ancient preserved tissues.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

References

- Aufderheide AC (2000) Progress in soft tissue paleopathology. *J. Am. Med. Assoc.* 284: 2571–2573.
- Ciranni R, Castagna M, Fornaciari G (1999) Goiter in an eighteenth-century Sicilian mummy. *Am. J. Phys. Anthropol.* 108: 427–432.
- Clark MA, Worrell MB, John P (1997) Postmortem changes in soft tissues. In: Haglund WD, Sorg MH, Eds., *Forensic Taphonomy: the Postmortem Fate of Human Remains*, CRC Press LLC, Boca Raton. pp. 151–164.
- David AR (1997) Disease in Egyptian mummies: the contribution of new technologies. *Lancet* 349: 1760–1763.
- Forbes SL, Dent BB, Stuart BH (2005) The effect of soil type on adipocere formation. *Forensic Sci. Int.* 154: 35–43.
- Forbes SL, Wilson MEA, Stuart BH (2011) Examination of adipocere formation in a cold water environment. *Int. J. Leg. Med.* 125: 643–650.
- Fornaciari G, Marchetti A, Pellegrini S, Ciranni R (1999) K-ras mutation in the tumour of King Ferrante I of Aragon (1431–1494) and environmental mutagens at the Aragonese court of Naples. *Int. J. Osteoarchaeol.* 9: 302–306.
- Grupe G, Schmid EM, Soika J (1997) Identification of medieval human soft tissue remains in an advanced state of decomposition. *Biotech. & Histochem.* 72: 135–140.
- Hess MW, Klima G, Pfaller K, Kunzel KH, Gaber O (1998) Histological investigations on the Tyrolean Ice Man. *Am. J. Phys. Anthropol.* 106: 521–532.
- Hoyle CHV, Thomas PK, Burnstock G, Appenzeller O (1997) Immunohistochemical localisation of neuropeptides and nitric oxide synthase in sural nerves from Egyptian mummies. *J. Auton. Nerv. Syst.* 67: 105–108.
- Krishnamurthy KV (1999) Light microscopic cytochemistry. In: Krishnamurthy KV, Ed., *Methods In Cell Wall Cytochemistry*, CRC Press, Boca Raton. p. 336.
- Lee Goff M (2009) Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Exp. Appl. Acarol.* 49: 21–36.
- Liu C, Park HM, Monsalve MV, Chen DDY (2010) Free fatty acids composition in adipocere of the Kwaday Dan Ts'inchí ancient remains found in a glacier. *J. Forens. Sci. Int.* 55: 1039–1043.
- Lynnerup N (2007) Mummies. *Am. J. Phys. Anthropol. Suppl.* 45: 162–190.
- Magee R (1998) Arterial disease in antiquity. *Med. J. Australia* 169: 663–666.
- McManus JFA, Mowry RW (1968) *Técnica Histológica*, Atika, S.A., Madrid. p. 612.
- Mekota AM, Vermehren M (2005) Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues. *Biotech. & Histochem.* 80: 7–13.
- Mekota AM, Grupe G, Zimmerman MR, Vermehren M (2005) First identification of an ancient Egyptian mummified human placenta. *Int. J. Osteoarchaeol.* 15: 51–60.
- Monsalve MV, Humphrey E, Walker DC, Cheung C, Vogl W, Nimmo M (2008) Brief communication: state of preservation of tissues from ancient human remains found in a glacier in Canada. *Am. J. Phys. Anthropol.* 137: 348–355.
- Montuenga Badia L, Sesma Egozcue P, Calvo González A (2009) Introducción histórica a la biología celular y a la histología. In: Montuenga Badia L, Esteban Ruiz FJ, Calvo González A, Eds., *Técnicas en Histología y en Biología celular*, Masson, Barcelona. p. 392.
- O'Brien TG, Kuehner AC (2007) Waxing grave about adipocere: soft tissue change in an aquatic context. *J. Forens. Sci.* 52: 294–301.
- Ottini L, Falchetti M, Marinozzi S, Angeletti LR, Fornaciari G (2011) Gene-environment interactions in the pre-Industrial era: the cancer of King Ferrante I of Aragon (1431–1494). *Hum. Pathol.* 42: 332–339.
- Papageorgopoulou C, Rentsch K, Raghavan M, Hofmann MI, Colacicco G, Gallien V, Bianucci R, Ruhli F (2010) Preservation of cell structures in a medieval infant brain: a paleohistological, paleogenetic, radiological and physico-chemical study. *Neuroimage* 50: 893–901.
- Prats-Muñoz G, Galtés I, Armentano N, Cases S, Fernandez Ruiz PL, Malgosa A (2013) Human soft tissue

preservation in the Cova des Pas site (Minorca Bronze Age). *J. Archaeol. Sci.* 40: 4701–4710.

Rabino-Massa E, Chiarelli B (1972) The histology of naturally desiccated and mummified bodies. *J. Hum. Evol.* 1: 259–260.

Radanov S, Stoev S, Davidov M, Nachev S, Stanchev N, Kirova E (1992) A unique case of naturally-occurring mummification of human brain-tissue. *Int. J. Leg. Med.* 105: 173–175.

Rhodes A (2012) Fixation of tissues. In: Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD, Eds. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone Elsevier, London. p. 79

Ross HM, Kaye IG, Pawlina W (2003) *Histology: a Text and Atlas*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. p. 864.

Ruffer MA (1909) Preliminary note on the histology of Egyptian mummies. *Brit. Med. J.* 1909: 1005–1005.

Sandison AT (1963) The study of mummified and dried human tissues. In: Brothwell D, Higgs E, Eds., *Science in Archaeology*, Basic Books, Thames and Hudson, London, New York. pp. 490–502.

Sandison AT (1966) Reconstitution of dried-up tissue specimens for histological examination. *J. Clin. Pathol.* 19: 522–523.

Turner PJ, Holtom DB (1981) The use of a fabric softener in the reconstitution of mummified tissue prior to paraffin wax sectioning for light microscopical examination. *Stain Technol.* 56: 35–38.

Ubelaker DH, Zarenko KM (2011) Adipocere: what is known after over two centuries of research. *Forens. Sci. Int.* 208: 167–172.



4.2

A PALEONEUROHISTOLOGICAL STUDY OF
3000-YEAR-OLD MUMMIFIED BRAIN TISSUE
FROM THE MEDITERRANEAN BRONZE AGE

A Paleoneurohistological Study of 3,000-Year-Old Mummified Brain Tissue from the Mediterranean Bronze Age

Gemma Prats-Muñoz^e Assumpció Malgosa^e Nuria Armentano^e
Ignasi Galtés^{c, e} Jordi Esteban^b Josep A. Bombi^b Montserrat Tortosa^b
Eva Fernández^b Xavier Jordana^d Albert Isidro^f Josep M. Fullola^a
M. Àngels Petit^a Victor M. Guerrero^g Manuel Calvo^g Pedro L. Fernández^b

^aSeminar of Prehistoric Studies and Research, Department of Prehistory, Ancient History and Archaeology, and ^bDepartment of Pathology, Hospital Clínic and Institut d'Investigacions August Pi i Sunyer, University of Barcelona, ^cCentre de Patologia Forense de Collserola, Institut de Medicina Legal de Catalunya, ^dInstitut Català de Paleontologia Miquel Crusafont, and ^eUnitat d'Antropologia Biològica, Departament BABVE, Universitat Autònoma de Barcelona, and ^fServicio COT, Hospital Universitari Sagrat Cor, Barcelona, and ^gDepartament de Ciències Històriques i Teoria de les Arts, Àrea de Prehistòria, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain

Key Words

Bronze Age · Mummy · Nervous system · Paleopathology · Talaiotic culture

Abstract

Objectives: Mummified nervous tissue is very rarely found in ancient remains and usually corresponds to corpses which were frozen or preserved in bogs, conditions which limit tissue autolysis and bacterial degradation. Here, we show the unusual finding of spontaneously mummified brain tissue from several individuals from the little known megalithic talaiotic culture of the island of Minorca, dating approximately 3,000 years before present and corresponding to the late Mediterranean Bronze Age. **Methods:** These individuals were part of an intact burial site containing 66 subjects. Intracranial samples were carefully rehydrated with Sandison's solution. We used classical histochemical as well as 2D and 3D (scanning) electron-microscopic techniques. **Results:** We provide evidence of the nervous nature of the sam-

ples as well as a detailed description of the morphological features of these ancient tissues. The intracranial material consisted of well-preserved eosinophilic reticular tissue and, although mostly absent, some exceptional pigment-containing neurons were identified. **Conclusions:** We present a detailed morphological analysis which can provide valuable information and guidelines for the interpretation of this scarce type of mummified samples and provide explanations for this surprising preservation.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Introduction

In the spring of 2005, three speleologists climbed to the 15-meter-high entrance of a 6.5-meter-deep karstic cave located on an inland cliff on the island of Minorca (fig. 1). Their first glance from the entrance to the interior of the cave showed what they immediately recognized as osseous remnants and hair, prompting them to return to the city

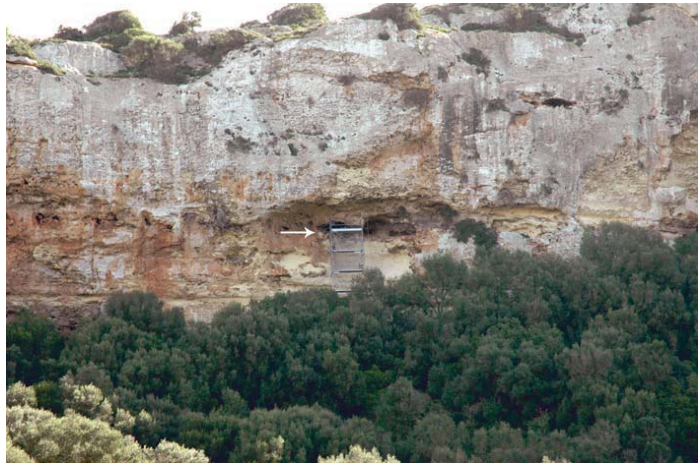


Fig. 1. The 15-meter-high entrance (arrow) to the ‘Cova des Pas’ (cave of the steps) on an inland cliff in Minorca (Spain).

and inform the public authorities, who diligently closed the site for further investigation. Archaeological studies revealed a burial site with a great number of individuals organized in several layers piled up at the bottom of the cave. Most of the individuals were bundled laterally in a fetal position with ropes and animal hides (fig. 2). Tin hair needles and some bronze bracelets reflect the high status of some of these individuals due to the scarcity of this metal on the island. Besides human remnants, different artifacts were recorded, including stretchers, floral blankets and bull-hide containers with hair inside. ^{14}C analyses of different samples estimated that burial activity took place during a short period in the late Bronze Age, from 900 to 800 BC [1], which corresponded to the talaiotic culture (‘talayots’ are stone table-shaped funerary and defensive constructions typical of this culture). Sixty-six individuals were finally identified at different levels, including 27 infants, 5 juveniles and 34 adults of both sexes. The abundant osseous remnants are still under analysis and have so far provided evidence of periostitis, cribra orbitalia, degenerative vertebral changes, osteochondritis and two probable neoplasms involving a femur and a coxal.

Although the anthropological and paleopathological analyses are far from completion at this point, it is now evident that abundant soft tissue elements have remained preserved in several individuals. Among these, muscle attached to the long bones, intrathoracic and abdominal content and, most interestingly, intracranial tissue were readily discovered in 4 individuals: No. 1 (female, age 25–

30 years), 6 (female, age 5–7 years), 22 (male, age 40–50 years) and 41 (female, age 35–40 years; fig. 3).

In this study, we provide interesting clues for the interpretation of both light- and electron-microscopic analyses of ancient nervous system samples, which could help to better understand findings of such unique material of future paleoneurohistological projects.

Materials and Methods

Samples of the intracranial content of the 4 individuals were carefully rehydrated with Sandison’s solution [2] for 30–60 min, depending on the size of the sample, and thereafter embedded in paraffin, sectioned at 3 μm and stained with hematoxylin-eosin, Masson’s trichrome and periodic acid-Schiff stain (PAS). Based on previous studies reporting sporadic success in this type of studies [3, 4], the expression of several immunohistochemical markers (neuron-specific enolase, Neu-N, glial fibrillary acidic protein, S100 protein, neurofilaments, CD56 and actin) was studied using primary monoclonal antibodies (table 1) detected with the EnVision Flex system (Dako, Glostrup) and diaminobenzidine as chromogen.

Samples for ultrastructural analysis were fixed in 2% glutaraldehyde for transmission electron microscopy. After fixation in 2% osmium tetroxide, the samples were dehydrated according to standard techniques and embedded in Araldite (Durcupan ACM). Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a JEOL 1200EX II transmission electron microscope. Scanning electron microscopy (Hitachi S-2300) was performed on 2 samples which were processed in glutaraldehyde for 30 min, then underwent critical-point drying and were coated with gold by a sputtering process.



Fig. 2. Most individuals were buried in a lateral, fetal position.

Table 1. Antibodies (type, dilution, pretreatment and source) used in immunohistochemistry

Antibody	Clone	Dilution	Pretreatment	Source
S100 protein	polyclonal	prediluted	EDTA buffer pH 9	DAKO
Neu-N	Mab37	1/500	citrate buffer pH 6	Millipore
GFAP	polyclonal	prediluted	citrate buffer pH 6	DAKO
CD56	123C3	prediluted	EDTA buffer pH 9	DAKO
NSE	BBS	prediluted	EDTA buffer pH 9	DAKO
Actin	HHF35	1/200	EDTA buffer pH 9	DAKO

GFAP = Glial fibrillar acidic protein; NSE = neuron-specific enolase.

Results

Light microscopy showed a similar histological pattern in the intracranial tissue samples from the 4 individuals with well-preserved eosinophilic reticular tissue, which, in some areas, was partially covered by a thick fibrous layer consistent with the dura mater, under which areas with abundant round 20- to 40- μm empty spaces suggested neuronal locations in the brain cortex (fig. 4, 5). Some larger spaces contained concentric structures reminiscent of vessels inside the cortex (fig. 6). Careful examination revealed rare areas in individual No. 41, in which aggregates of round-to-ovoid pallid and granular structures measuring 15–20 μm in the greatest diameter were interpreted as brain nuclei (fig. 7). Nearby, other individual structures contained PAS-positive granular ma-

terial and others displayed brown pigment consistent with neurons of the locus ceruleus or substantia nigra, thus suggesting a location in the midbrain (fig. 8). Moreover, in few instances, nuclear remnants were observed (fig. 9). Finally, round and oval aggregates of fibrillary structures were considered to represent nerve fascicles traversing the white matter or ganglia (fig. 10, 11). Microscopic images were compared with bona fide naturally mummified brain tissue from a local cemetery dating approximately 100 years ago, and histological features were similar, but no well-preserved neuron was found in the latter. All putative brain samples, including that of the ‘modern’ mummy, showed the consistent presence of small (50–100 μm) spherical structures at the periphery of the tissue with histological features similar to those of the rest of the sample, which we interpreted as a spec-



Fig. 3. Skull of individual No. 1 with brittle, whitish material attached to the right parietal bone (arrow).

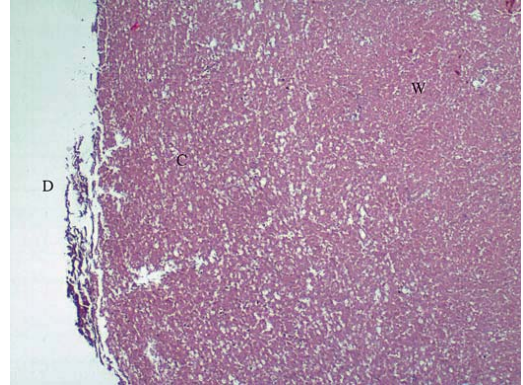


Fig. 4. Low-power view of rehydrated intracranial tissue of individual No. 41. The condensed laminar structure on the surface is suggestive of the dura mater (D), whereas the remaining tissue shows topographical differences: the outermost area displays small round spaces consistent with the cerebral cortex (C), whereas a more reticular and dense tissue was observed in the innermost region (W), which was interpreted as white matter. HE, $\times 40$.

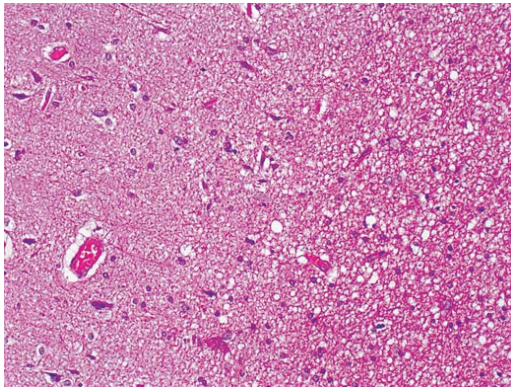


Fig. 5. Histological section of a modern brain for comparison with figures 4 and 6 showing vascular spaces on a reticular background and cortical neurons (left half). HE, $\times 100$.

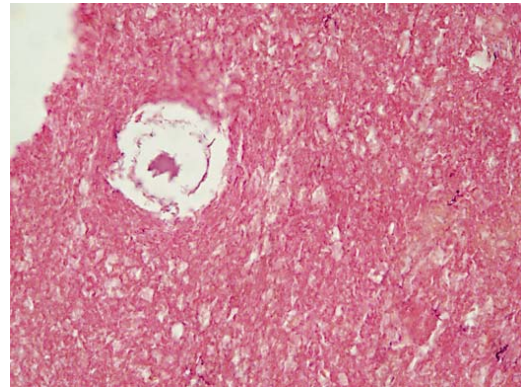


Fig. 6. Histological section of mummified intracranial material from individual No. 1 showing reticular tissue with a round space consistent with a vascular and perivascular space. HE, $\times 200$.

ic form of mummified nervous tissue disintegration (fig. 12). Immunohistochemical staining for all neural markers and actin were negative, as expected from previous studies on cerebral tissue [5]. Trichrome staining did not provide additional information due to the homoge-

neous results in all areas. Contrarily, Luxol-fast blue stain for myelin was strongly positive (not shown).

Scanning electron microscopy confirmed the reticular appearance of the samples (fig. 13) consistent with nervous tissue and identified vascular spaces (fig. 14).

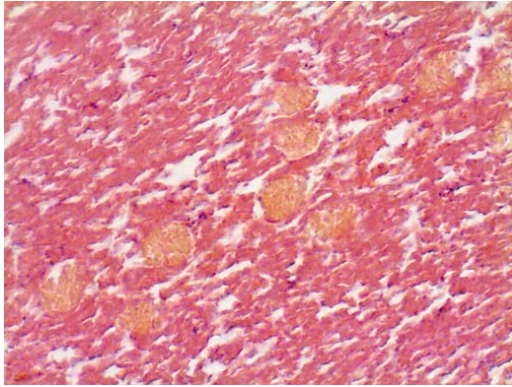


Fig. 7. Discrete oval grouped elements with pallid staining suggesting a brain nucleus. HE, $\times 600$.

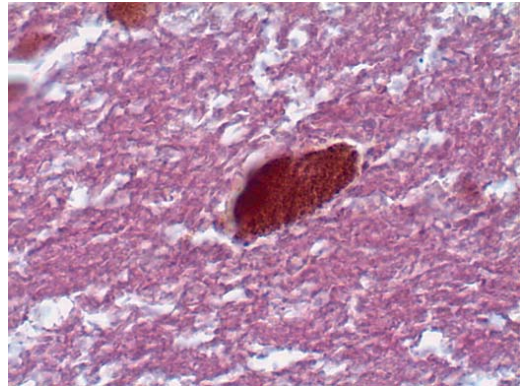


Fig. 8. High-power view of a pigment-containing neuron. HE, original magnification $\times 600$.

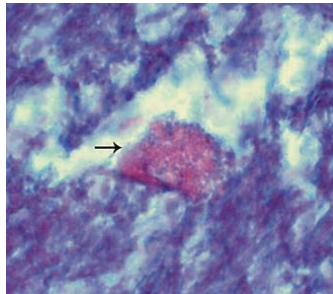


Fig. 9. High-power view of a polygonal element with granular cytoplasmic content and likely nuclear remains (arrow). HE, $\times 600$.

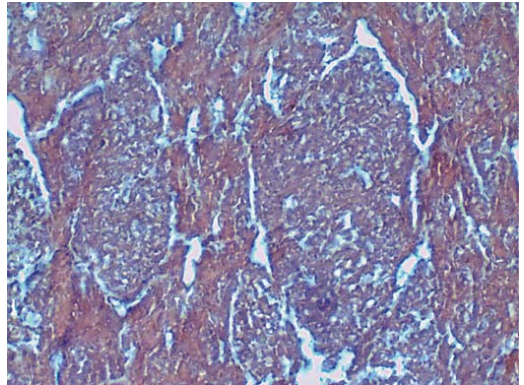


Fig. 10. Oval condensations inside reticular background indicative of nerve fascicles traversing white matter or ganglia. HE, $\times 400$.

Transmission electron microscopy showed the frequent presence of concentric membrane lamellae of myelin sheaths indicating nerve fibers (fig. 15)

Discussion

Although fast decay and decomposition is the usual fate of organisms after death, nature or human interference can sometimes, to some extent, preserve the exter-

nal and internal morphology of animal or human corpses by a rapid desiccation process commonly called mummification. Nonetheless, even in the better-preserved subjects, there are organs and tissues which, due to their high enzymatic content and/or lack of fibromuscular stroma (pancreas, salivary glands, prostate and adrenal gland), undergo quick degradation and virtually disappear. One such organ is the central nervous system, with few accounts of its discovery as mummified tissue for the above reasons.

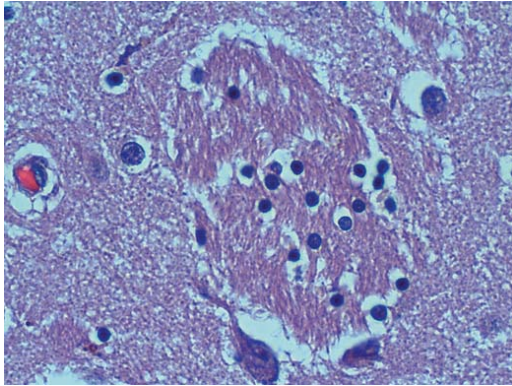


Fig. 11. Structures similar to those seen in figure 10 are presented, for comparison, in this area of nerve fascicles traversing the nucleus caudatus in a modern brain. HE, $\times 400$.

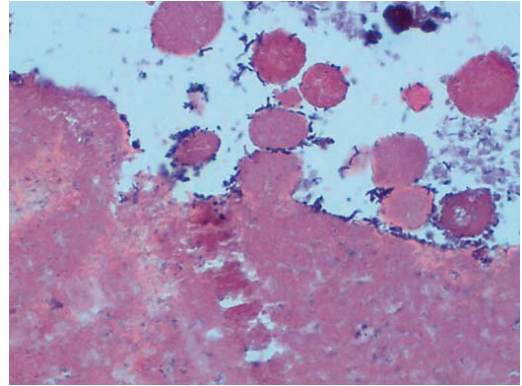


Fig. 12. Round tissue structures at the edge of mummified tissue suggesting a specific process of nervous tissue degradation. HE, $\times 400$.

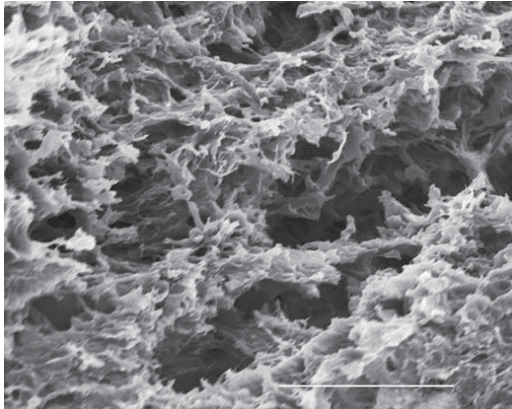


Fig. 13. Scanning 3D electron microscopy of intracranial material of individual No. 1 showing a reticular pattern typical of brain tissue. Scale bar: $50 \mu\text{m}$.

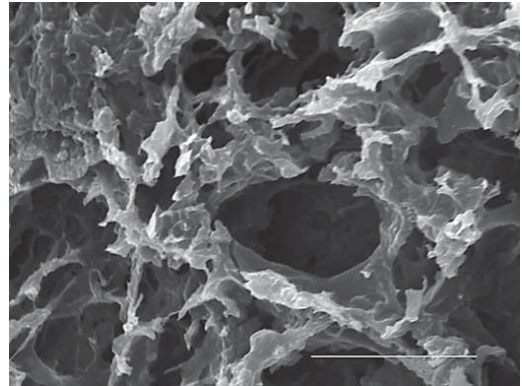


Fig. 14. High-power view of scanning electron microscopy showing 3D images with a reticular pattern and a central vascular space in one of the mummified intracranial samples. Scale bar: $20 \mu\text{m}$.

Findings of brain tissue are anecdotic in the already rare mummified subjects [6] and when this happens, mostly in frozen mummies, it is usually subject to the most sophisticated techniques to prove its neural origin. Early reports date back to 1902, when Elliot-Smith [7] described spontaneous mummification of brains in ancient Egypt. Later, in 1927, Aichel [8] briefly mentioned recog-

nizable myelin sheaths in a 1,500-year-old bog corpse without providing drawings or photographs. More recent reports have provided information on isolated individuals from different locations such as Egypt [9], Denmark [10], France [6], the South African Savannah [11] and Korea [12], but the largest microscopically analyzed series, to our knowledge, corresponds to 15 unrelated cases from

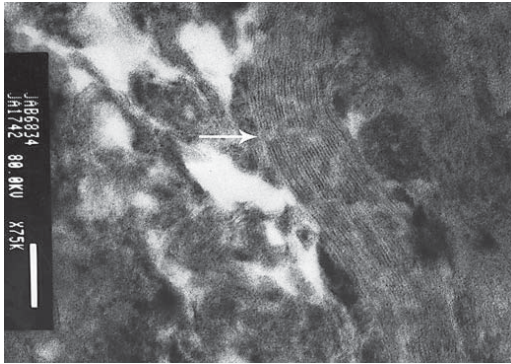


Fig. 15. Transmission electron microscopy of mummified intracranial tissue from individual No. 41 showing periodic laminar structures consistent with myelin sheaths. $\times 75,000$. Scale bar: 100 nm.

the desert of Northern Chile from 1000 BC to 1500 AD [5]. Using several histochemical stains, the latter study provided convincing evidence of the relatively good preservation of the brain tissue in the mummies found in addition to proof of intracranial hemorrhagic lesions. Much older, mummified, human, nervous tissue was reported in the Tyrolean Man [13], which very closely resembles ours depicted in figure 10 showing myelin layers, but the Tyrolean Man was a frozen mummy, in which, as mentioned, better preservation can be expected. Finally, the oldest well-documented brain tissue reported in a scientific article is, to our knowledge, that of Pääbo et al. [14], who were able to amplify mitochondrial DNA from 7,000-year-old brain tissue, although no histological evidence of the tissue type was presented at that time, and the classic report by Walter in which two cerebri-form fossilized human remains were preserved together with parts of a woolly mammoth at a site near Moscow [15].

Our report is unique in several aspects: first, it describes the simultaneous finding of 4 non-frozen mummified remnants of the human central nervous system in a small burial; second, these subjects belong to a very unique, not well-known and isolated Mediterranean community dating as far back as the Mediterranean Bronze Age, some 3,000 years ago, and, third, it carefully describes and provides evidence of very good spontaneous tissue preservation confirming its nervous tissue origin by the combined use of traditional and high-resolution microscopic techniques. In a very recent report [6], a

medieval mummified brain was analyzed by several sophisticated methods, including gas chromatography, mass spectroscopy, CT, MRI and histology, the latter producing very good images of nicely preserved neuronal elements [6]. These authors suggest preservation due to adipocere formation made possible by a humid environment coupled with acidic clay soil.

But, what can possibly explain such unusual preservation of an otherwise fragile matter in the subjects of our report? After several multidisciplinary analyses of the burial, it is now becoming evident that this was a very special site. First of all, the presence of sodium nitrate and gypsum in the cave suggests a relatively dry environment that has enabled the preservation of the organic material and contributed to the natural mummification [16]. Also, decomposition of the human bodies created a special environment that produced, for example, various PCR inhibitors, mainly Maillard and humic substances [17]. Therefore, we hypothesize that a unique combination of the dry climate of the interior of the small island, coupled with the elevated location of the cave, precluding exposure to rain and ground moisture, the known existence of dry air currents inside the cave, an adequate composition of the acid cave soil and walls, rich in sulfates and plaster and, finally, the covering of the bodies with plants, which could have add anti-microbial properties [18, 19], all provided a suitable environment for rapid desiccation and conservation of the bodies, which were able to escape human curiosity for the last three millennia and have now been preserved for science.

Acknowledgments

This work was supported by grant CGL-2008-00800/BOS. We thank Dr. Teresa Ribalta for helping with the microscopical review of brain tissue, and Cristina Durana, Elena Rull and the Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona for their excellent support in electron-microscopic techniques.

References

- 1 Van Strydonck M, Boudin M, Ayuso VMG, Calvo M, Fullola JM, Petit MA: The necessity of sample quality assessment in ^{14}C AMS dating: the case of Cova des Pas (Menorca, Spain). *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 2010;268:990–994.
- 2 Sandison AT: The histological examination of mummified material. *Stain Technol* 1955; 30:277–283.
- 3 Fulcheri E: Immunohistochemistry: a new outlook in histopaleopathology. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1995;71:105–110.

- 4 Mekota AM, Vermehren M: Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues. *Biotech Histochem* 2005;80:7–13.
- 5 Gerszten PC, Martinez AJ: The neuropathology of South American mummies. *Neurosurgery* 1995;36:756–761.
- 6 Papageorgopoulou C, Rentsch K, Raghavan M, Hofmann MI, Colacicco G, Gallien V, Bianucci R, Ruhli F: Preservation of cell structures in a medieval infant brain: a paleohistological, paleogenetic, radiological and physico-chemical study. *Neuroimage* 2010;50:893–901.
- 7 Elliot-Smith G: On the natural preservation of the brain in the ancient Egyptians. *J Anat Physiol* 1902;36:375–381.
- 8 Aichel O: Über Moorleichen, nebst Mitteilung eines neuen Falles (2.5jähriges Mädchen von Röst in Dithmarschen). *Anthropol Anz* 1927;4(suppl II):57–73.
- 9 Scott JW, Horne PD, Hart GD, Savage H: Autopsy of an Egyptian mummy. 3. Gross anatomic and miscellaneous studies. *Can Med Assoc J* 1977;117:464–469.
- 10 Tkocz D, Bytzer P, Bierring F: Preserved brain in medieval skull. *Am J Phys Anthropol* 1979;51:197–202.
- 11 Eklektos N, Dayal MR, Manger PR: A forensic case study of a naturally mummified brain from the bushveld of South Africa. *J Forensic Sci* 2006;51:498–503.
- 12 Kim MJ, Oh CS, Lee IS, Lee H, Choi JH, Lim DS, Yi YS, Han WJ, Kim YS, Bok GD, Lee SD, Shin DH: Human mummified brain from a medieval tomb with lime-soil mixture barrier of the Joseon Dynasty, Korea. *Int J Osteoarchaeol* 2008;18:614–623.
- 13 Hess MW, Klima G, Pfaller K, Kunzel KH, Gaber O: Histological investigations on the tyrolean ice man. *Am J Phys Anthropol* 1998; 106:521–532.
- 14 Pääbo S, Gifford JA, Wilson AC: Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res* 1988;16:9775–9787.
- 15 Aufderheide AC: *The Scientific Study of Mummies*, ed 1. Cambridge, Cambridge University Press, 2003.
- 16 Cabanes D, Albert RM: Microarchaeology of a collective burial: Cova des Pas (Minorca). *J Archaeol Sci* 2011;38:1119–1126.
- 17 Simón M, González-Ruiz M, Prats-Muñoz G, Malgosa A: Comparison of two DNA extraction methods in a Spanish Bronze Age burial cave. *ArchaeolSci* 2011, DOI: 10.1016/j.quaint.2011.04.026.
- 18 Micozzi M, Sledzik P: Postmortem preservation of human remains: natural and technical processes. *Proc 1st World Congr Mummy Study*, 1992, vol 2, pp 759–764.
- 19 Wisseman S: Preserved for the afterlife. *Nature* 2001;413:783–784.



4.3

ANTHRACOSIS IN A COPTIC MUMMY



Clinical Image

Anthracosis in a Coptic Mummy[☆]

Antracosis en una momia Copta

Albert Isidro,^{a,*} Assumpció Malgosa,^b Gemma Prats-Muñoz^b

^a Museu Egipci, Barcelona, Spain

^b Unitat d'Antropologia Biològica, Facultat de Ciències, Bellaterra, Barcelona, Spain



The laboratory results from the mummy of a 25–35-year-old adult male (“Moses”/Q.445-2012) dating from the Middle Coptic period (AD 4th to 8th century) are reported. This individual was recovered from the Coptic necropolis of Qarara in Middle Egypt during the joint excavation performed by the Eberhard Karls Universität, Tübingen (Germany) and the Egyptian Museum of Barcelona in March 2012.

Specimens obtained during the *in situ* autopsy were transferred to the mission laboratory (Sharuna/Middle Egypt) where

tissue from the right hemothorax was processed with rehydration (modified Sandison method), fixation (48 h) and staining (hematoxylin–eosin).

The histological slices revealed pulmonary tissue with solid deposits compatible with anthracosis (Fig. 1). Anthracosis is observed in mummies from all historical periods and geographical regions. The oldest Egyptian mummy with this histological diagnosis was described in 1938.¹ The case of the Roman child mummy of Grotta-Rossa is interesting, and there are also Guanche

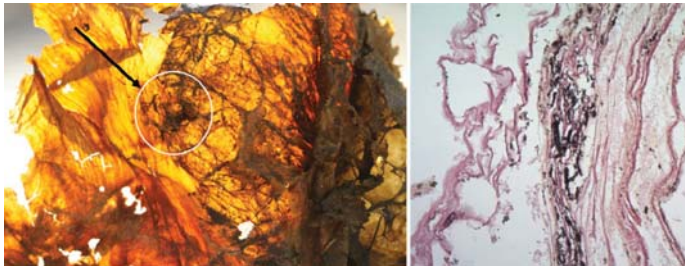


Fig. 1. The image on the left shows the lung region from which the sample was obtained. On the right is the histological image of anthracosis.

[☆] Please cite this article as: Isidro A, Malgosa A, Prats-Muñoz G. Anthracosis en una momia Copta. Arch Bronconeumol. 2014;50:368–369.

* Corresponding author.

E-mail address: aisidro.cot@gmail.com (A. Isidro).

mummies from Tenerife, Arctic mummies, Italian Renaissance mummies and others with anthracosis from the inhalation of smoke from solid fuel, in particular biomass (wood) and smoke² that, in Coptic communities, came from enclosed kitchens inside their dwelling places.

References

1. Shaw AFB. A histological study of the mummy of Har-Mose, the singer of the eighteenth dynasty (c. 1490 B.C.). *J Pathol Bacteriol*. 1938;47:115.
2. Torres-Duque C, Maldonado D, Pérez-Padilla R, Ezzati M, Viegi G. Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:577–90.



4.4

HUMAN SOFT TISSUES CONSERVATION OF
COVA DES PAS SITE (MINORCA BRONZE AGE)



Human soft tissue preservation in the Cova des Pas site (Minorca Bronze Age)[☆]



Gemma Prats-Muñoz^a, Ignasi Galtés^{b,c}, Núria Armentano^a, Sandra Cases^d, Pedro Luis Fernández^d, Assumpció Malgosa^{a,*}

^aUnitat d'Antropologia Biològica, Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Catalonia, Spain

^bCentre de Patologia Forense de Collserola, Institut de Medicina Legal de Catalunya, Carretera N-150, Km 1.5, Montcada i Reixach, 08110 Barcelona, Catalonia, Spain

^cUnitat de Medicina Legal i Forense, Departament de Psiquiatria i de Medicina Legal, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Catalonia, Spain

^dDepartament de Anatomia Patològica, Hospital Clínic i Institut d'Investigacions August Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2012

Received in revised form

17 July 2013

Accepted 20 July 2013

Keywords:

Taphonomy
Saponification
Mummification
Histology
Soft tissue

ABSTRACT

The preservation process of soft tissues in an archeological context is mainly unknown because they occur only in truly exceptional situations. The Cova des Pas is a Bronze Age site in Minorca where the special conditions enabled the preservation of some soft tissues associated with 66 individuals. This finding allows the study of the preservation process that took place by means of the analysis of the histological and chemical characteristics of the tissues. Our results show that the preservation mechanism was the adipocere, because the fatty acids profile shows higher concentration of saturated than unsaturated fatty acids. The evidence indicates that the kind of funerary ritual and the environmental conditions favored this preservation.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

References to preserved prehistoric human soft tissues in Europe are scarce. Hitherto, the most ancient tissue reported belongs to the Tyrolean Iceman (Tyrolean Ötztal Alps, Italy), that dates back to 5300 B.P. (Seidler et al., 1992) and has been preserved by cold conditions. Two semi-mummified individuals from Galera (Granada, Spain), (Molina et al., 2003), with an antiquity of 3500 years, were found in 1997. Also, in the prehistoric context, the site of Cova des Pas (Minorca, Spain, 3000 B.P.) can be added to this group due to the exceptional recovery of human soft tissues. The funerary complex of Cova des Pas is located in a cave in the

Trebalúger ravine (south of Minorca). This is a small cave, approximately 7 m wide and 4.5 m long, located in the cliff wall about 15 m above the ground (Fullola et al., 2008). The collective burial contains a minimum of 66 individuals found in a strongly flexed position (Armentano et al., 2012). The first burials were deposited around 1100 B.C. at the end of the Bronze Age, although the largest number of inhumations took place between 900 and 800 B.C., during the first Iron Age (Van Strydonck et al., 2010). The funerary rite involved a primary inhumation of individuals, which presented maximum flexion of the upper and lower limbs. Furthermore, they were wrapped in shrouds and tied up with ropes. The corpses were deposited in several layers, piled up among previously buried individuals. According to Armentano et al. (2012), the good preservation of soft tissues (intracranial, intrathoracic, abdominal cavities and among others soft tissues) could be related to the overlapping of the corpses, since there were a large number of bodies buried in such a small space.

Soil analysis of the Cova des Pas showed the presence of high amounts of nitrates and sulfates, as well as calcium, iron and aluminum. The salts were associated with the presence of gypsum,

[☆] Grant sponsor: Ministerio de Ciencia e Innovación. Grant number: CGL2008-00800/BOS. Grant sponsor: Consell Insular de Menorca.

* Corresponding author. Tel.: +34 935811860; fax: +34 935811321.

E-mail addresses: gems.pmunoz@gmail.com (G. Prats-Muñoz), ignasigaltés@gmail.com (I. Galtés), armentano.nuria@gmail.com (N. Armentano), sandracases@hotmail.com (S. Cases), PLFERNAN@clinic.ub.es (P.L. Fernández), assumpcio.malgosa@uab.cat (A. Malgosa).

quartz and sodium nitrate. The ions were the product of weathering of a clay mineral soil and calcite (Van Strydonck et al., 2010). Cabanes and Albert (2011) concluded that the presence of highly soluble minerals, such as sodium nitrate and gypsum, suggests stable dry conditions inside the cave. These minerals would have helped to absorb the humidity, facilitating the natural preservation of the corpses, the phytoliths and the vegetal remains.

Therefore, there are two possible explanations for the preservation of the organic remains in the Cova des Pas: a process of saponification, caused by the compacting and superimposition of individuals, and a process of mummification due to a dry environment.

Adipocere is the soap-like substance that can be formed from the neutral fats of decomposing bodies (Forbes et al., 2005a). Their formation is initiated by intrinsic lipases, which convert the triacylglycerides (TAG) into their corresponding saturated and unsaturated fatty acids, including myristic, palmitic and stearic acids (Liu et al., 2010). Hydroxyl forms are regularly identified in adipocere; however their presence appears to be dependent on the decomposition environment (Bereuter et al., 1996; Forbes et al., 2005b).

Although adipocere is typically regarded as a product of a damp environment, it can be formed in a variety of contexts, including dry environments and corpses in submersion (Quigley, 1998; O'Brien and Kuehner, 2007; Forbes et al., 2011; Ubelaker and Zarenko, 2011).

Nowadays, a "mummy" refers to any naturally or artificially preserved body, or soft tissue, where desiccation has prevented its decomposition (David, 1997). Dry environment, air circulation and elevated temperatures could lead to mummification of human tissue by means of desiccation (Makristathis et al., 2002). Taking into account that water is essential for the enzymatic activity and bacterial growth, as well as for arthropod colonization, dehydration of the tissues is a straightforward way to achieve mummification (Lynnerup, 2007).

The main goal of this work is to test both hypotheses of preservation, and to understand the taphonomical process responsible for the preservation of soft tissue. For this purpose, the characterization of these tissues through their microstructure and their fatty acids profiles was carried out.

2. Materials and methods

Nineteen samples belonging to 9 individuals were analyzed. They were, thus, representative samples of several soft tissues of different individuals located in different zones of the cave. The histological analysis was carried out on 15 samples belonging to these 9 individuals. They included soft tissues from intracranial, intrathoracic and abdominal regions, as well as some other tissues externally adhered to bones, and also bony tissue itself. Eleven samples were subjected to biochemical analysis (fatty acid profile) (Fig. 1) (Table 1).

2.1. Histological processing

Small pieces of each specimen (8–10 mm) were rehydrated in Sandison solution (Sandison, 1955) for 1–2 h. For bony samples, the tissue was decalcified for 1 h in 5% nitric acid prior to rehydration. Samples were then fixed in 10% formalin and immersed in multiple baths of increasing concentrations of ethanol and xylene. The specimens were then embedded in paraffin wax and micro-sectioned at 3–5 μm . Given the uniqueness and scarcity of samples, the uses of more general and informative stains (Hematoxylin–Eosin and Masson Trichrome) were used first, in order to obtain a comprehensive view of the soft tissue.

2.2. Biochemical analysis

Gas chromatography-mass spectrometry analysis was performed using 70 mg of tissue taken from the different individuals. Lipid extraction was performed following the method of Makristathis et al. (2002). In brief, each sample was mechanically homogenized with a mortar, and lipids were saponified using 8 M sodium hydroxide and methanol (1:1). Afterward, methylation of the fatty acids was performed using 6 M aqueous hydrochloric acid and methanol (54:46), and was then extracted into n-hexane and t-butylethylether (1:1). The organic extract was cleaned up by adding 0.3 M sodium hydroxide. The extracts were subjected to analysis by GC and GC–MS. Experimental conditions for GC were as follows: gas chromatograph Hewlett Packard 6890 series II GC System Agilent Technologies; capillary column HP5-MS 30 m \times 0.2 mm \times 0.25 mm film thickness; FID detector. Chromatographic volume was 1 μL with an injection temperature of 275 $^{\circ}\text{C}$. Program temperature was as follows: initial 120 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, ramp of 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until 220 $^{\circ}\text{C}$; the second ramp was 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until 270 $^{\circ}\text{C}$, and final ramp was 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until 300 $^{\circ}\text{C}$, which was maintained for 15 min. Total run time: 73 min.

The FA analyzed were the most informative acids in adipocere formation (Takatori, 2001; Dent et al., 2004; Ubelaker and Zarenko, 2011).

2.3. Data analysis

In order to understand the relationship between the fatty acid profiles of the specimens, box-plots were represented and a principal components analysis (PCA) was performed. Ten selected fatty acids from specimens from our study were compared to data from 21 specimens preserved in different environments, and 17 fresh tissue specimens from previous projects (Varmuza et al., 2005) (Table 2). The fatty acid profile of the Cova des Pas (CdP) was also analyzed and compared between tissues. The statistical analyses were performed using *Sps* 15.0.

3. Results

3.1. Paleohistology

Macroscopically, the soft tissues from the Cova des Pas were brittle and dry, and easily pulverized under soft pressing. The intracranial samples were found adhered to the inner surface of the cranium on the decubitus area. These tissues were shapeless and shrunken, about 5 \times 5 cm and *duramater* was not readily identified (Fig. 2). The intrathoracic tissues appeared totally collapsed in the decubitus zone of the costal margin. They formed a homogenous and flattened layer of about 10 \times 7 cm and with a low weight (Fig. 3). In contrast, abdominal mass was located in the hypochondriac region. Tissues showed an amorphous shape and a homogenous aspect (6 \times 4 cm) with a high density. Finally, the soft tissues attached to bones were distributed among all bony remains. They consisted of thin layers of variable sizes with a bright cover and salt deposits (Fig. 4).

Microscopically, intracranial soft tissue specimens showed the reticular and homogeneous eosinophilic background characteristic of brain tissues, indicating the presence of remnants of cytoplasmic structures (Eklektos et al., 2006). Furthermore, some larger spaces contained concentric structures, reminiscent of vessels inside the cortex. In some instances, abundant round empty spaces (20–40 μm) were observed, suggesting neuronal locations in the brain cortex (see Prats-Muñoz et al., 2012) (Fig. 5).

Some intrathoracic specimens showed typical characteristics of pulmonary parenchyma, since a thin connective tissue layer

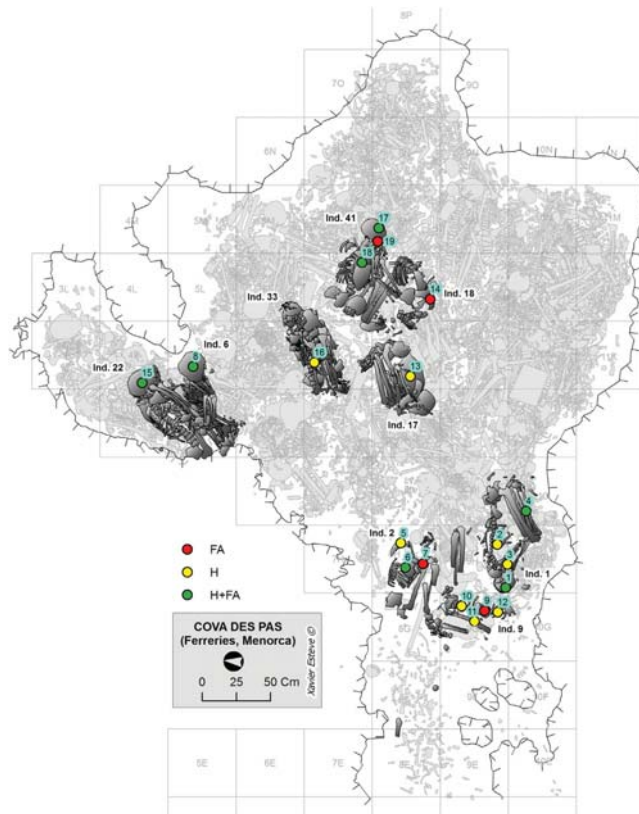


Fig. 1. Location of the analyzed individuals in the surface of the cavity.

Table 1

Samples of Cova des Pas used for histological (H) and fatty acid (FA) analyses.

Id	Individual	Anatomical location	Cave location	H	FA
1	1	Intracranial	9H	X	X
2		Intrathoracic	9H	X	X
3		Mandible	10H	X	
4		Tibia	10I	X	X
5	2	Intracranial	8H	X	
6		Intrathoracic	8H	X	X
7		Radius	8H	X	X
8	6	Intracranial	5K	X	X
9	9	Intrathoracic	9G		X
10		Abdominal zone	9G and 910	X	
11		Femur	9G	X	
12		Rib bone	9G	X	
13	17	Intrathoracic	8K	X	
14	18	Coxal	8L		X
15	22	Intracranial	4K	X	X
16	33	Femur	7K	X	
17	41	Intracranial	8M	X	X
18		Intrathoracic	8L and 7M	X	X
19		Skull	8M		X

surrounded and separated spaces in some areas, consistent with collapsed alveoli. Also, one specimen from the surface showed a thick layer of connective tissue, suggesting that it may be the visceral pleura. Finally, some accumulations of black granular deposits were observed, suggesting anthracosis (Fig. 6).

Soft tissues specimens initially interpreted within the abdominal cavity revealed high content of vegetal structures (Fig. 7). Due to the number of organs within the abdomen, it was difficult to differentiate between them after the compacting process.

With regard to tissue adhered to bone, bundles of fibers appeared discernible, although the cellular architecture, including

Table 2

Human conserved tissues used to compare.

Identifier	Name	Samples	Burial time	Reference
T	Tyrolen Iceman	4	5200	Varmuza et al., 2005
G	Glacier	9	<100	
L	Lake	3	<100	
P	Permafrost	2	2200–2500	
H	High mountain	2	500	
D	Desert	1	1000	
F	Fresh	17	–	
CdP	Cova des Pas	11	3500	Present study



Fig. 2. Skull from individual No. 1, a material shapeless and shrunken attached in the right parietal.



Fig. 3. Intrathoracic cavity from individual No. 5, showing a homogenous and flattened soft tissue located in the decubitus zone of the costal arches.

striation, was not observed. This morphology was consistent with striated muscle (Fig. 8).

Microscopical section of ribs showed a typical matrix of cortical bone with holes that were consistent with Haversian canals. Furthermore, small gaps compatible with osteocyte lacunes and remains of bone marrow were observed (Fig. 9).

3.2. Fatty acids profile

The fatty acid composition of the Cova des Pas (CdP) specimens was evaluated. Table 3 shows the concentrations of the 10 fatty

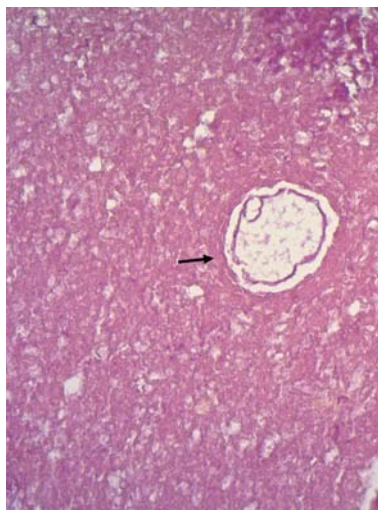


Fig. 5. Histological section of intracranial material from individual No. 1, showing a reticular tissue with a round space consistent with a vessel (arrow). HE, $\times 200$.

acids selected for the analysis. In general, concentrations of saturated fatty acids (SFA) were higher than unsaturated fatty acids (UFA). The highest concentrations of SFA corresponded to palmitic (\bar{x} 22.11%) and stearic acids (\bar{x} 13.5%), whereas the highest concentration of UFA was that of oleic acid (\bar{x} 9.12%). The presence of the 10-dihydroxy stearic acid, with a \bar{x} of 4.83% of the total amount of FA, must be highlighted.

Boxplots were used to compare the concentration of 5 relevant fatty acids in specimens with different types of preservation (Fig. 10). The other 7 FAs were not shown because they have a high degree of variation in all the specimen types, and no pattern could be observed. All specimens had similar levels of myristic acid, except for the specimens from the lake (L), which had high concentrations of this fatty acid. Oleic acid showed higher concentrations in fresh and desert samples. OH-Hydroxy stearic acid was absent in fresh samples (F), while CdP and high mountain samples contained low concentrations of it. Conversely, the samples of our study contained a slightly higher amount of pentadecanoic acid. Specimens belonging to CdP, Tyrolean Iceman (T), permafrost (P), and high mountain (H) showed slightly higher concentrations of stearic acid than the other groups.

The PCA analysis was performed to compare the fatty acid composition of specimens preserved in different environments. In



Fig. 4. Soft tissue attached to radius bone (arrow) from Individual No. 2.

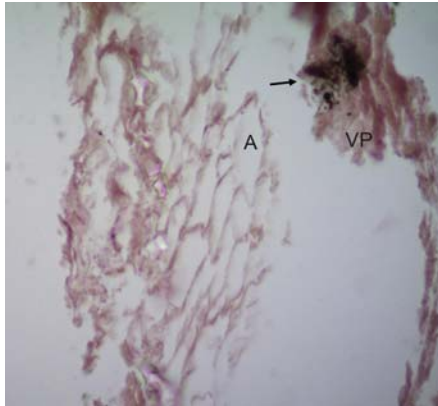


Fig. 6. Histological section of intrathoracic material from Individual No. 2, showing remains of lung parenchyma, such as alveoli (A) or visceral pleura (VP). Anthracotic pigment was also seen in the latter (arrow). HE, $\times 200$.

the loading plot, three groups can be observed (Fig. 11). The first group, which is located on the negative quadrant, includes unsaturated fatty acids (oleic, linoleic and palmitoleic acid). On the positive range of component 1, there are two groups; the first one includes all SFA, and the second one contains the hydroxyl forms. The latter were clearly separated in component 2. These associations reflected different clusters in the score plot which consisted of: 1) fresh and desert samples; 2) glaciers (G), Tyrolean Iceman and lake specimens, and 3) CdP and high mountain samples. Fresh and desert samples constitute the cluster located in the negative side of both components (PC1 and PC2). These samples are characterized by high concentrations of oleic, linoleic and palmitoleic acids. On the other hand, there are two clusters which are mainly separated by component 2. The specimens from la Cova des Pas, high mountain, and one specimen of permafrost are located on the negative quadrant. These specimens are mainly influenced by low levels of SFA. The other cluster (positive quadrant), including glacier, Tyrolean Iceman, and lake is more influenced by a high concentration of the hydroxyl forms.

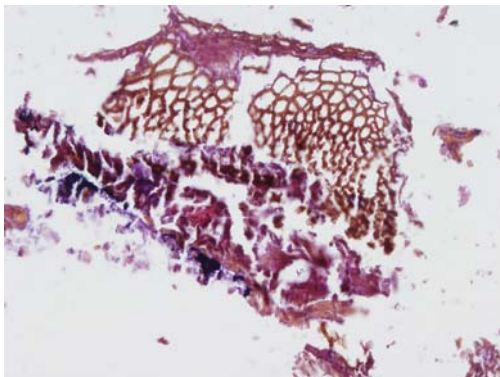


Fig. 7. Histological section of abdominal material from individual No. 9, showing a vegetal tissue with typical polyhedral structures and thick walls. HE, $\times 200$.

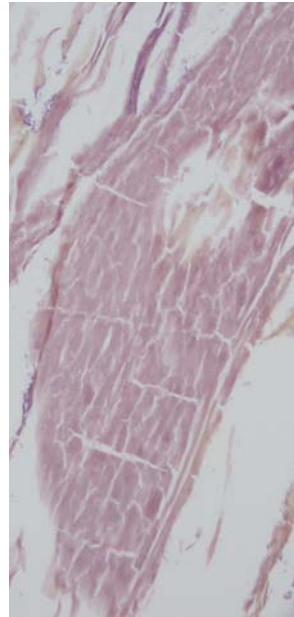


Fig. 8. Histological section of soft tissue attached to long bone from individual No. 9. It showed a tissue organized in fragmental bundles of fibers consistent with striated muscle. HE, $\times 200$.

To study the variability between the tissues from CdP, a PCA analysis using 8 FA of 11 specimens was performed (Fig. 12). The two first components of PCA explain 63% of the variability. The score plot considering each tissue showed dispersion in the obtained values. All specimens were mixed, indicating that there were no specific differences in the preservation state depending on the type of tissue. However, a cluster was defined for brain. The corresponding loading plot indicates that the stearic, myristic and pentadecanoic acids were the main influences in this cluster, as

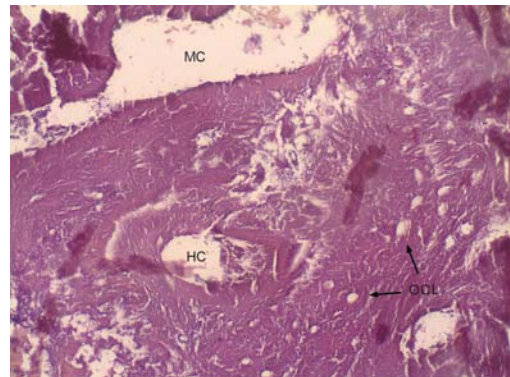


Fig. 9. Histological section of rib from individual No.9 showed a typical matrix of cortical bone with Haversian canals (HC) and medullary cavities (MC). Also, osteocyte lacunae (OCL) are observed. HE, $\times 1000$.

Table 3
Fatty acid profile.

Tissues	Individual	Lauric acid 12:0	Myristic acid 14:0	Pentadecanoic acid 15:0	Palmitoleic acid 16:1	Palmitic acid 16:0	Linoleic acid 18:2	Oleic acid 18:1	10 Hydroxy palmitic acid 16:0 10 OH	Stearic acid 18:0	10-Hydroxy- stearic acid 18:0 10 OH
Brain	6	0,00	2,05	1,37	0,00	6,99	1,42	4,29	0,00	16,40	2,00
Brain	22	1,23	3,86	2,10	0,00	15,84	3,71	7,81	0,00	15,67	2,21
Brain	41	1,28	3,70	2,43	0,00	19,07	6,13	9,84	1,18	14,46	3,69
Lung	1	1,35	2,61	0,00	1,57	29,12	1,15	7,44	0,00	7,39	7,90
Lung	2	1,32	2,88	0,00	3,32	25,11	3,53	18,50	0,00	9,13	2,63
Lung	9	1,42	5,33	2,43	0,00	18,95	1,14	4,27	1,02	26,05	4,85
Lung	41	0,00	2,84	1,06	0,00	42,50	1,26	7,70	0,00	9,43	4,60
Muscle	1	2,09	3,60	1,63	3,73	13,22	2,78	16,58	0,00	5,15	2,58
Muscle	2	1,28	3,78	1,01	1,89	17,34	1,96	13,00	1,17	11,45	17,02
Muscle	18	1,81	5,86	2,25	0,00	29,04	1,75	7,11	2,71	10,74	2,22
Skin	41	3,61	6,41	1,64	0,00	26,00	1,67	3,77	1,19	22,59	3,46
\bar{x}		1,4	3,91	1,44	0,96	22,11	2,41	9,12	0,66	13,5	4,83

well as a higher concentration of linoleic acid. Interestingly, two specimens were placed in an unexpected location in the PCA due to their high UFA concentration (positive quadrant), suggesting a different preservation process.

4. Discussion

Preservation of soft tissues that are more than 3000 years old is rarely seen in Europe, when no artificial methods are used to enhance it. European prehistoric mummies are scarce, and come from different extreme environments, such as cold locales in the case of Ötzi (Seidler et al., 1992), arid environments such as Galera Man (Molina et al., 2003), or bogs (Ravn, 2010). Nevertheless, in some historical periods more preserved bodies can be found over the entire European territory (Lynnerup, 2010; Papageorgopoulou et al., 2010; O'Connor et al., 2011). Mummified bodies dating from medieval times, such as Charles V (Ordi et al., 2006), or King Ferdinand I of Aragon (Fornaciari et al., 1999), have been studied. The discoveries of mummified remains increased in more modern times (Schotsmans et al., 2011), with a higher incidence between the 17th and the 19th centuries (Panzer et al., 2010). Therefore, natural preservation of bodies in prehistoric times is almost unknown, especially when it affects a large number of individuals. The Cova des Pas remains are among the few preserved bodies available from prehistoric time in Europe, with some soft tissues preserved in an exceptional manner. Two questions are central in the discussion about the preservation phenomenon in this archaeological site: What process led to the extraordinary preservation of the organic remains? And, what factors helped to preserve the corpses inside Cova des Pas?

The preserved tissues of CdP show the characteristic image of soft ancient tissues. Tissue remnants were collapsed and had lost their macroscopic characteristics. Histological sections showed soft tissue without its distinctive architecture, and cells without nucleus, as well as a low capacity to retain stain. Notwithstanding, the preservation state of different tissues is extraordinary. Brain samples show a relatively good preservation of the reticular tissue and some vessels, but no special conditions, like pathologies, can be observed. Conversely, the analyses of intrathoracic masses enable us to see pulmonary tissue where anthracite particles covered pleural walls. In Paleopathology, anthracosis has been attributed in different historical and cultural frames (Eskimos, Egyptian, Medieval Ages, etc.) to life-long exposure to open fires, for heating and cooking (Zimmerman, 2012). Another finding related to life style comes from the analysis of abdominal masses where vegetal remains were found. These remains demonstrated a consumption of vegetables.

Either way, all the preserved soft tissues in this archaeological site are highly modified due to a decomposition process. Bone

material from CdP does not contain enough collagen to perform a C14 analysis (Van Strydonck et al., 2010). Also, molecular analyses from teeth and bones show a low efficiency in the DNA recovery and amplification (Simón et al., 2012). Therefore, these analyses demonstrate a poor preservation of biomolecules. The same environmental conditions that destroyed organic molecules and acted as PCR inhibitors (Maillard products, humic and fulvic acids, iron, damaged DNA, among others) enabled the preservation of soft tissues.

As regards the preservation process, the histological analysis does not allow the mechanism of preservation in the CdP individuals to be determined. This may be related to the histological techniques use, because the standard methods, instead of specific analytical methods such as histology of fat remains, were applied (Mekota and Vermehren, 2005). This area clearly deserves further research and methodological improvements.

Paleoclimatic and sedimentologic studies also provide knowledge about the environmental conditions of CdP, showing stable, dry and warm conditions at the time of use of the cave. Specifically, this archaeological site presents 1) a stable acid pH (Van Strydonck et al., 2010), due to the high amount of nitrates and sulfates coming from the decomposition of the bodies, together with the presence of gypsum; and 2) the presence of relatively soluble minerals, such as sodium nitrate and gypsum, which regulated the humidity of the cave. In this regard, Cabanes and Albert (2011) claim that, once formed, sodium nitrate helps to preserve remains through humidity regulation and preventing bacterial activity (Bailey et al., 2002). Furthermore, geological data suggest that the entrance of the cave was first protected by a projection of the roof, being narrower than it is today. Blocks fell and the cliff stepped back, and so the entrance was enlarged. This dynamic could have modified the environmental conditions inside the cave, exposing it to fluctuations of the external environment.

According to Cabanes and Albert (2011), these dry conditions facilitated the natural mummification of the corpses and the preservation of vegetal remains. However, our chemical analyses indicated that saponification took place in soft tissues, and was possibly followed by dehydration. The fatty acid profile of the specimens of our study indicated, in all cases, a higher concentration of SFA than UFA. The most predominant fatty acid among the saturated acids is palmitic acid, followed by stearic acid, which is usually the second more abundant fatty acid in adipocere formation (O'Brien and Kuehner, 2007). OH- stearic and myristic acids are also found. All these SFA are identified as the main constituents of adipocere described in experimental conditions (Forbes et al., 2005a, Forbes, et al., 2005b, Forbes, et al., 2005c), as well as in ancient specimens (Varmuza et al., 2005). As regards UFA, only oleic acid is found in a slightly high concentration (Table 3).

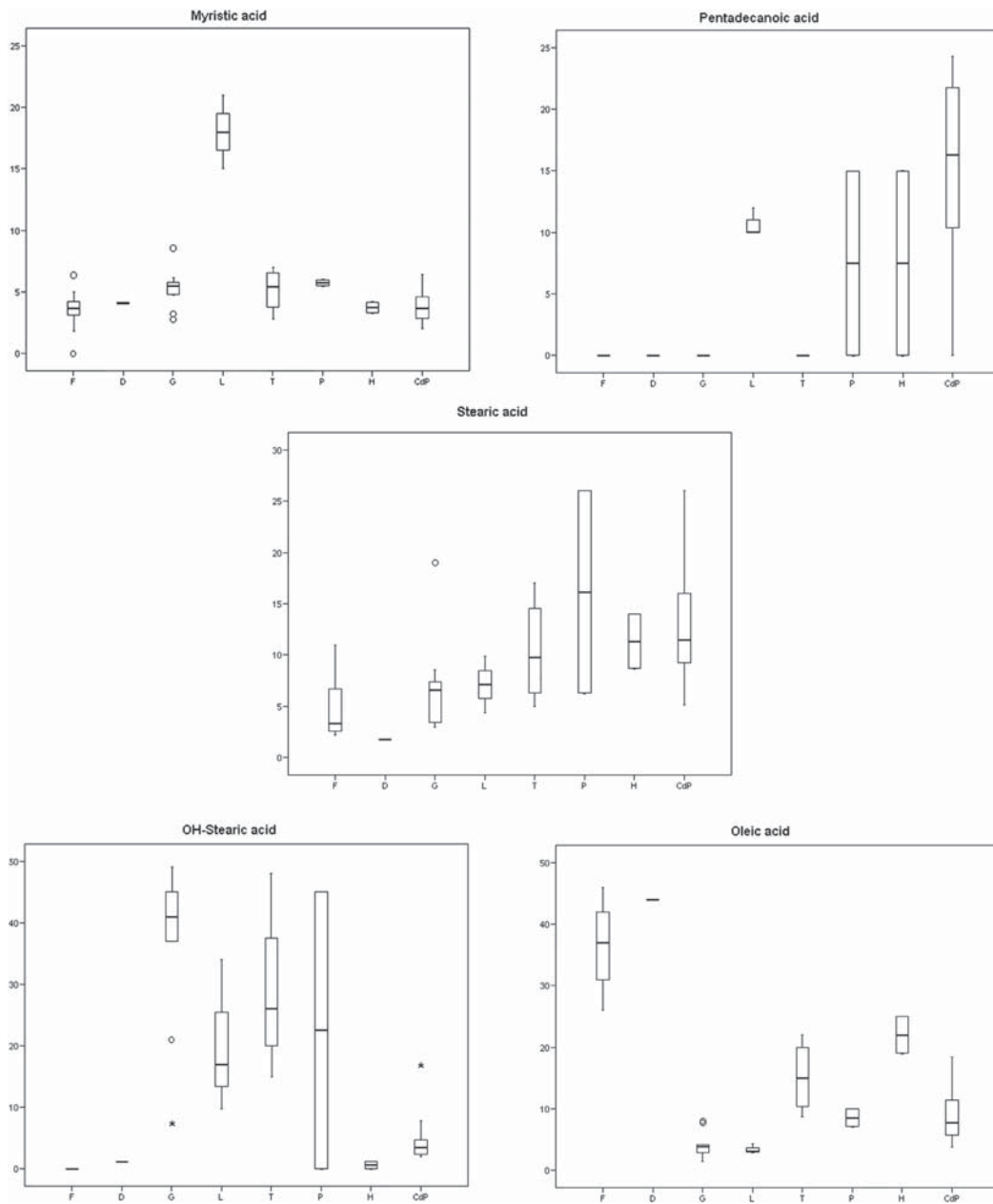


Fig. 10. Box-plots for 6 fatty acids. Ordinates show concentration ranges of the compounds in percent of total fatty acids (F: Fresh; D: Desert; G: Glacier; L: Lake; T: Tyrolean Iceman; P: Permafrost; H: High mountain and CDP: Cova des Pas).

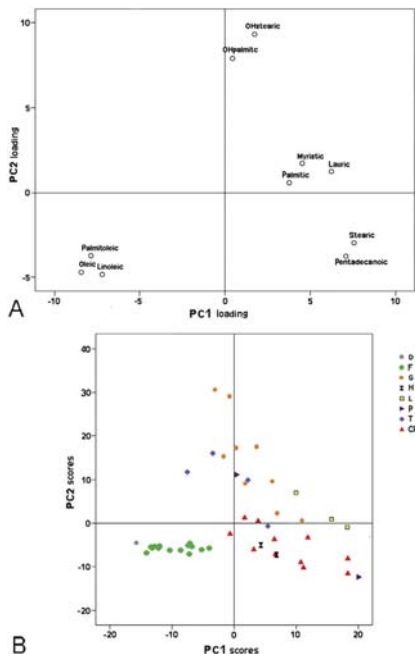


Fig. 11. Principal components analysis (PCA) to analyze samples from different origins. The first and second components explain 42% and 19% of total variance, respectively. **A.** Loading plot showing the fatty acids that are characteristic for the clusters in the score plot; **B.** Score plot showing clustering of the 49 samples (F: Fresh; D: Desert; G: Glacier; L: Lake; T: Tyrolean Ice; P: Permafrost; H: High mountain and Cdp: Cova des Pas).

Saponification and mummification have different requirements. Mummification involves a complete desiccation of the body. The lack of water inhibits microorganisms from both the body and the soil, so they cannot carry out the putrefaction process. In the case of saponification, the presence of water is needed to hydrolyze triglycerides to free FA. Moreover, this process requires a decrease in bacterial growth, but not a complete inhibition, because some of these bacteria are involved in the formation of adipocere (Takatori, 2001; Pfeiffer et al., 1998).

Acidic pH is the characteristic that mainly enhanced the preservation in the Cova des Pas. In a very acidic pH environment, the bacterial growth is slowed down, and therefore there is a lower concentration of bacteria in the environment, so the rate of decomposition also decreases. However, in the Cova des Pas the pH was 4.95 (Van Strydonck et al., 2010). According to Forbes et al. (2005a) the soil with a pH between 5 and 9 enhances adipocere formation. In this range of pH, the environments are not completely inhospitable to bacteria, allowing enough bacterial activity to achieve the fatty acid composition characteristic of adipocere.

On the other hand, several authors indicate that the anaerobic conditions are essential to induce the adipocere. Armentano et al. (2012) suggested that the compression and overlaying of such a great number of bodies buried in such a small space may be responsible for the preservation. This site could be similar to a mass grave inhumation, where an anaerobic environment is generated. Enough water could be retained to induce the adipocere formation thanks to clothes that improved the absorption and storage of moisture (Fiedler and Graw, 2003; Mant, 1987).

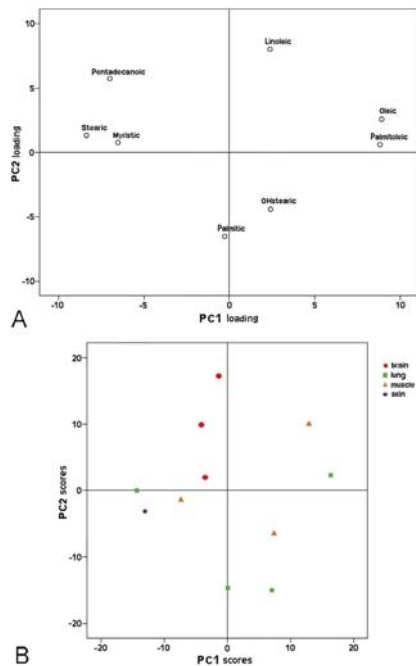


Fig. 12. Principal components analysis (PCA). The first and second components explain 43% and 21% of total variance, respectively. **A.** Loading plot showing the fatty acids that are characteristic for the clusters in the score plot; **B.** Score plot showing clustering of the 11 samples.

The comparison of Cova des Pas with other conservation series (Varmuza et al., 2005) supports the above mentioned theory. In the PCA, individuals of the Cova des Pas are located in the same quadrant as the corpses of high mountain and of the permafrost. The three series show a low level of hydroxyl forms, which play important roles in the formation of adipocere.

According to Varmuza (2005), the high mountain samples belong to individuals that do not have water availability and were desiccated by winds in a zone of eternal snow. On the other hand, the specimen from permafrost was found in a wooden coffin filled with ice and without evident thawing and therefore, in similar conditions to those of a dry environment with low water supply.

Takatori (2001) demonstrated that specific FA, such as OH-stearic and OH-palmitic, are synthesized by microbial enzymes of bacteria *Clostridium perfringens* or *Micrococcus luteus*. The oleic and palmitic acid suffer a beta-oxidation, followed by hydration of their double bond, turning into their saturated forms. Afterward, both of them are transformed to hydroxyl forms, through hydrogenation of this same bond. Therefore, low concentrations of these forms may be explained by a limitation of microbial activity and/or availability of water that caused that the hydroxylation these acids were not possible.

In relation to the differential conservation of tissues, it is interesting to highlight the separation between the brain cluster and the rest of tissues of Cova des Pas (Fig. 12). The corresponding loading plot indicates that it is mainly the high amount of linoleic acid what provokes this clustering. Although lipid analysis of degraded brain tissues from archaeological contexts is uncommon,

Papageorgopoulou et al. (2010) observed a typical profile of fatty acids of adipocere in brain tissues, but the 18:2 was not analyzed. In other the studies (Melton et al., 2010; O'Connor et al., 2011) the absence of phospholipids was almost complete and only a trace of cholesterol was detected, and amounts of free FA are not mentioned. On the other hand, Varmuza (2005) compared different sorts of tissues, observing slight differences among them, but no specimens of brain were compared.

Fresh central nervous system has the second greatest concentration of lipids of the body, immediately after adipose tissue. Brain contains very high amounts of polyunsaturated fatty acids, particularly arachidonic acid (AA; 20:4 n–6) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 n–3). However, these acids have not been detected in this study. This may be explained by the fact that these FA are unstable, even if the corpse is well preserved (Makrathathis et al., 2002). Arachidonic acid and DHA are the major constituents of neural cell membrane phospholipids, and are derived from two dietary precursors: linoleic acid (18:2 n–6) and α -linolenic acid (18:3 n–3), respectively (Benjamins et al., 2012). Vertebrates are unable to synthesize these two essential polyunsaturated fatty acids, so they must be provided by the diet. Consequently, this could be the biochemical interpretation of the high amounts of linoleic acids in specimens of the Cova des Pas.

On the other hand, there are two singular concentrations of two specimens, that had high levels of oleic and palmitoleic acids (UFA) (Fig. 12). These tissues do not present a typical profile of fatty acids saponification. The fact that these individuals were placed at the beginning of the cave and they were the last ones to be placed, could explain these UFA concentrations. The rate of transformation of oleic acid to other products can be used to determine the time of death. The low percentage of oleic acid indicates an advanced state of decay but adipocere formation did not undergo a complete process due to their location (Yan et al., 2001; Frund and Schoenen, 2009).

5. Conclusions

In conclusion, our results suggest that a wide number of factors interacted, leading to the conservation of soft human tissues in the Cova des Pas. The high number of overlapping corpses in decomposition and their wrapping could create an anaerobic and moisture environment, promoting the formation of adipocere. Therefore, saponification could play an important role in the preservation of soft tissues. Afterward, the environmental conditions probably changed, enhancing a dehydration of the remains due to the increase of temperature and the decrease of humidity. Finally, this study offers new insights into adipocere formation in different ancient tissues, and reflects the complexity of the factors that act in the conservation of archaeological remains.

Acknowledgments

We would like to thank Xavi Esteve for his work in realization of the Fig. 1 and Marc Simón and Pere Ibáñez-Gimeno for the advice on English language.

References

Armentano, N., Esteve, X., Nociaróv, D., Malgosa, A., 2012. Taphonomical study of the anthropological remains from Cova Des Pas (Minorca). *Quaternary International* 275, 112–119.

Bailey, R.A., Clark, H.M., Ferris, J.P., Krause, S., Strong, R.L., 2002. The Environmental Chemistry of Some Important Elements, Chemistry of the Environment, second ed. Academic Press, San Diego, pp. 347–414.

Benjamins, J.A., Hajra, A.K., Agranoff, B.W., 2012. Lipids. In: Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., Price, D.L. (Eds.), *Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Academic Press-Elsevier, London, pp. 33–49.

Bereuter, M.T.L., Lorbeer, E., Reiter, C., Seidler, H., Unterdorfer, H., 1996. Post-mortem alterations of human lipids — part I: evaluation of adipocere formation and mummification by desiccation. In: Spindler, K., Wilfling, H., Rastbichler-Zissernig, E., Zur Nedden, D., Notherdorfer, H. (Eds.), *Human Mummies: a Global Survey of Their Status and the Techniques of Conservation*. Springer-Verlag Wien GmbH, New York, pp. 265–273.

Cabanes, D., Albert, R.M., 2011. Microarchaeology of a collective burial: cova des Pas (Minorca). *Journal of Archaeological Science* 38, 1119–1126.

David, A.R., 1997. Disease in Egyptian mummies: the contribution of new technologies. *Lancet* 349, 1760–1763.

Dent, B.B., Forbes, S.L., Stuart, B.H., 2004. Review of human decomposition processes in soil. *Environmental Geology* 45, 576–585.

Eklektos, N., Dayal, M.R., Manger, P.R., 2006. A forensic case study of a naturally mummified brain from the Bushveld of South Africa. *Journal of Forensic Sciences* 51, 498–503.

Fiedler, S., Graw, M., 2003. Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere. *Naturwissenschaften* 90, 291–300.

Forbes, S.L., Dent, B.B., Stuart, B.H., 2005a. The effect of soil type on adipocere formation. *Forensic Science International* 154, 35–43.

Forbes, S.L., Stuart, B.H., Dent, B.B., 2005b. The effect of the burial environment on adipocere formation. *Forensic Science International* 154, 24–34.

Forbes, S.L., Stuart, B.H., Dent, B.B., 2005c. The effect of the method of burial on adipocere formation. *Forensic Science International* 154, 44–52.

Forbes, S.L., Wilson, M.E.A., Stuart, B.H., 2011. Examination of adipocere formation in a cold water environment. *International Journal of Legal Medicine* 125, 643–650.

Fornaciari, G., Marchetti, A., Pellegrini, S., Ciranni, R., 1999. K-ras Mutation in the tumour of King Ferrante I of Aragon (1431–1494) and environmental mutagens at the Aragonese court of Naples. *International Journal of Osteoarchaeology* 9, 302–306.

Frund, H.C., Schoenen, D., 2009. Quantification of adipocere degradation with and without access to oxygen and to the living soil. *Forensic Science International* 188, 18–22.

Fullola, J.M., Guerrero, V.M., Petit, M.A., Calvo, M., Malgosa, A., Armentano, N., Arnau, P., Cho, S., Esteve, X., Fadrigue, T., Galtés, I., García, E., Fornés, J., Jordana, X., Pedro, M., Riera, J., Sintes, E., Zubillaga, M., 2008. La Cova des Pas (Ferrières, Menorca): un jaciment cabdal en la prehistòria de les Balears. *Unicum* 7, 10–20.

Liu, C., Park, H.M., Monsalve, M.V., Chen, D.D.Y., 2010. Free fatty acids composition in adipocere of the Kwaday Dan Ts'inchí ancient remains found in a glacier. *Journal of Forensic Sciences* 55, 1039–1043.

Lynnerup, N., 2007. Mummies. *American Journal of Physical Anthropology Suppl* 45, 162–190.

Lynnerup, N., 2010. Medical imaging of mummies and bog bodies — a mini-review. *Gerontology* 56, 441–448.

Makrathathis, A., Schwarzmeier, J., Mader, R.M., Varmuza, K., Simonitsch, I., Chavez, J.C., Platzer, W., Unterdorfer, H., Scheithauer, R., Dereviakko, A., Seidler, H., 2002. Fatty acid composition and preservation of the Tyrolean Iceman and other mummies. *Journal of Lipid Research* 43, 2056–2061.

Mant, A.K., 1987. Knowledge acquired from post-war exhumations. In: Boddington, A., Garland, A.N., Janaway, R.C. (Eds.), *Death, Decay and Reconstruction: Approaches to Archaeology and Forensic Science*. Manchester University Press, Manchester, pp. 65–78.

Mekota, A.M., Vermehren, M., 2005. Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues. *Biotechnical and Histochemistry* 80, 7–13.

Melton, N., Montgomery, J., Knüsel, C.J., Batt, C., Needham, S., Parker Pearson, M., Sheridan, A., Heron, C., Horsley, T., Schmidt, A., Evans, A., Carter, E., Edwards, H., Hargreaves, M., Janaway, R., Lynnerup, N., Northover, P., O'Connor, S., Ogden, A., Taylor, T., Wastling, W., Wilson, A.C., 2010. Gristhorpe Man: an Early Bronze Age log-coffin burial scientifically defined. *Antiquity* 84, 796–815.

Molina, F., Rodríguez-Ariza, M.O., Jiménez, S., Botella, M., 2003. La sepultura 121 del yacimiento Argárico de Castellón Alto (Galera, Granada). *Trabajos de prehistoria* 60, 153–158.

O'Brien, T.G., Kuehner, A.C., 2007. Waxing grave about adipocere: soft tissue change in an aquatic context. *Journal of Forensic Sciences* 52, 294–301.

O'Connor, S., Ali, E., Al-Sabah, S., Anwar, D., Bergstrom, E., Brown, K.A., Buckberry, J., Buckley, S., Collins, M., Denton, J., Dorling, K.M., Dowle, A., Duffey, P., Edwards, H.G.M., Faria, E.C., Gardner, P., Gledhill, A., Heaton, K., Heron, C., Janaway, R., Keely, B.J., King, D., Masinton, A., Penkman, K., Petzold, A., Pickering, M.D., Rumsby, M., Schutkowski, H., Shackleton, K.A., Thomas, J., Thomas-Oates, J., Usai, M.R., Wilson, A.S., O'Connor, T., 2011. Exceptional preservation of a prehistoric human brain from Heslington, Yorkshire, UK. *Journal of Archaeological Science* 38, 1641–1654.

Ordi, J., Alonso, P.L., de Zulueta, J., Esteban, J., Velasco, M., Mas, E., Campo, E., Fernandez, P.L., 2006. The severe gout of Holy Roman Emperor Charles V. *The New England Journal of Medicine* 355, 516–520.

Panzer, S., Zink, A.R., Piombino-Mascali, D., 2010. Radiologic evidence of anthropogenic mummification in the Capuchin Catacombs of Palermo, Sicily. *Radiographics* 30, 1123–1132.

Papageorgopoulou, C., Rentsch, K., Raghavan, M., Hofmann, M.I., Colacicco, G., Gallien, V., Bianucci, R., Ruhli, F., 2010. Preservation of cell structures in a medieval infant brain: a paleohistological, paleogenetic, radiological and physico-chemical study. *NeuroImage* 50, 893–901.

Pfeiffer, S., Milne, S., Stevenson, R.M., 1998. The natural decomposition of adipocere. *Journal of Forensic Sciences* 43, 368–370.

Prats-Muñoz, G., Malgosa, A., Armentano, N., Galtés, I., Esteban, J., Bombi, J.A., Tortosa, M., Fernández, E., Jordana, X., Isidro, A., Fullola, J.M., Petit, M.A.,

- Guerrero, V.M., Calvo, V.M., Fernández, P.L., 2012. A paleoneurohistological study of 3000-year-old mummified brain tissue from the Mediterranean Bronze Age. *Pathobiology* 79, 239–246.
- Quigley, C., 1998. *Modern Mummies: the Preservation of the Human Body in the Twentieth Century*. McFarland & Company, Inc, Jefferson.
- Ravn, M., 2010. Bronze and Early Iron Age bog bodies from Denmark. *Acta Archaeologica* 81, 112–123.
- Sandison, A.T., 1955. The histological examination of mummified material. *Biotechnic and Histochemistry* 30, 277–283.
- Schotsmans, E.M.J., de Voorde, W.V., De Winne, J., Wilson, A.S., 2011. The impact of shallow burial on differential decomposition to the body: a temperate case study. *Forensic Science International* 206, E43–E48.
- Seidler, H., Bernhard, W., Teschlernicola, M., Platzer, W., Nedden, D.Z., Henn, R., Oberhauser, A., Sjøvold, T., 1992. Some anthropological aspects of the prehistoric Tyrolean ice Man. *Science* 258, 455–457.
- Simón, M., González-Ruiz, M., Prats-Muñoz, G., Malgosa, A., 2012. Comparison of two DNA extraction methods in a Spanish Bronze Age burial cave. *Quaternary International* 247, 358–362.
- SPSS 15.0, 2006. Software for Windows. SPSS Inc, Chicago.
- Takatori, T., 2001. The mechanism of human adipocere formation. *Legal Medicine* (Tokyo, Japan) 3, 193–204.
- Ubelaker, D.H., Zarenko, K.M., 2011. Adipocere: what is known after over two centuries of research. *Forensic Science International* 208, 167–172.
- Van Strydonck, M., Boudin, M., Guerrero, V.M., Calvo, M., Fullola, J.M., Petit, M.A., 2010. The necessity of sample quality assessment in (¹⁴C) AMS dating: the case of Cova des Pas (Menorca – Spain). *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-beam Interactions with Materials and Atoms* 268, 990–994.
- Varmuza, K., Makristathis, A., Schwarzmeier, J., Seidler, H., Mader, R.M., 2005. Exploration of anthropological specimens by GC–MS and chemometrics. *Mass Spectrometry Reviews* 24, 427–452.
- Yan, F., McNally, R., Kontanis, E.J., Sadik, O.A., 2001. Preliminary quantitative investigation of postmortem adipocere formation. *Journal of Forensic Sciences* 46, 609–614.
- Zimmerman, M.R., 2012. The analysis and interpretation of mummified remains. In: AL, G. (Ed.), *A Companion to Paleopathology*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 152–169.



4.5

THE DEATH OF QUEEN BLANCA OF ANJOU
(C. 13-14)



Blanca of Anjou (c. 13-14), the portrait of the queen of the Crown of Aragon

Journal:	<i>Journal of Forensic Sciences</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Prats-Muñoz, Gemma; Universitat Autònoma de Barcelona, Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia Galtés, Ignasi; Institut de Medicina Legal de Catalunya, Servei de Patologia Nord; Universitat Autònoma de Barcelona, Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia Subirana, Mercedes; Institut de Medicina Legal de Catalunya, Servei de Patologia Nord Isidro, Albert; Universitat Autònoma de Barcelona, Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia Armentano, Núria; Universitat Autònoma de Barcelona, Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia; Antropolegs Lab Lalueza-Fox, Carles; Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), Froesch, Philippe; Visual forensics; Universitat Autònoma de Barcelona, Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia Malgosa, Assumpció; Universitat Autònoma de Barcelona, Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia
Keywords:	identification, autopsy, mummy, histology, pregnancy, mtDNA, facial reconstruction

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4 **Blanca of Anjou (c. 13-14), the portrait of the queen of the Crown of**
5
6 **Aragon**
7
8
9

10
11
12 Prats-Muñoz G, Galtés I, Subirana M, Isidro A, Armentano N, Gonzalez-Ruiz M,
13
14 Lalueza-Fox C, Froesch P, Malgosa A,
15
16

17
18 Gemma Prats-Muñoz, GROB, Biological Anthropology Unit, BABVE Department,
19
20 Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.
21
22 *gems.pmunoz@gmail.com*
23

24 Ignasi Galtés Institute of Legal Medicine of Catalonia, Ciutat de la Justícia, Gran Via de
25
26 les Corts Catalanes, 111 Edifici G 08075 Barcelona, Spain. Dpt. Psiquiatria I Medicina
27
28 Legal. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. *ignasigaltes@gmail.com*
29

30 Mercè Subirana Domenech Institute of Legal Medicine of Catalonia, Ciutat de la
31
32 Justícia, Gran Via de les Corts Catalanes, 111 Edifici G 08075 Barcelona, Spain.
33
34 *mercedes.subirana@xij.gencat.cat*
35

36 Albert Isidro, GROB, Biological Anthropology Unit, BABVE Department, Universitat
37
38 Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain. *aisidro.cot@gmail.com*
39

40 Núria Armentano, Antropòlegs Lab. GROB, Biological Anthropology Unit, BABVE
41
42 Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.
43
44 *armentano.nuria@gmail.com*
45

46 Mercedes González, GROB, Biological Anthropology Unit, BABVE Department,
47
48 Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.
49
50 *merche.gruiz@gmail.com*
51

52 Carles Lalueza-Fox, Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu
53
54 Fabra), 08003 Barcelona, Spain. *carles.lalueza@upf.edu*
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Philippe Froesch, Visual Forensics. GROB, Biological Anthropology Unit, BABVE
4 Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.
5
6 *art@philippfroesch.com*
7

8
9 Assumpció Malgosa, GROB, Biological Anthropology Unit, BABVE Department,
10 Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.
11
12 *Assumpcio.malgosa@uab.cat*
13
14
15
16
17

18
19
20 **Corresponding author:**
21

22
23 Assumpció Malgosa, GROB, Biological Anthropology Unit, BABVE Department,
24 Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.
25
26 *Assumpcio.malgosa@uab.cat*
27
28
29
30

31 **Funding:** This work was supported by a grant of Museu d'Història de Catalunya
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **ABSTRACT**
43
44

45 On the pantheon of the Crown of Aragon in the monastery of Santes Creus
46 (Tarragona, Spain), the Queen Blanca of Anjou (1280 –1310) was buried. In 2010 a
47 multidisciplinary project was carried out in order to identify the remains located into the
48 tomb and to understand the cause and circumstances of her death.
49
50
51
52

53
54 The biological profile of the remains attributed to Blanca of Anjou corresponds
55 to a young woman 25-30-year-old and 150 cm in height. The presence
56
57
58
59
60

1
2
3 hyperpigmentation of white line and an enlarged and protruding uterus suggest that the
4
5 woman was pregnant or in a recently postpartum condition. The whole analyses allow
6
7 us to understand the mortuary treatment. All the evidences support that the remains are
8
9 those of the Queen Blanca. The genetic characterization and the facial reconstruction
10
11 help to give a portrait of the Queen.
12
13

14 **Key words:** Identification, Autopsy, Mummy, Histology, Pregnancy, mitochondrial
15
16 DNA, Facial reconstruction
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26
27 Little is known about the life and death of medieval queens, probably due to the
28
29 secondary role of women and their absence from political decision making in medieval
30
31 Europe. Blanca d'Anjou (1280-1310) was an exception. She was a member of the
32
33 Capetian House of Anjou, and is also known as Blanca of Naples. In 1295, she married
34
35 King Jaume II ("The Just"), sovereign of the Aragon Crown, becoming both his second
36
37 wife and Queen of Aragon; they had ten children. Blanca held significant political
38
39 influence during the reign of her husband, and this is probably the reason she appears
40
41 frequently in documents of the royal court. Certain medical data on Blanca are available
42
43 in chronicles, mainly concerning pregnancy-related difficulties that may be associated
44
45 to the high number of births [1]. The Queen died in Barcelona in 1310 at the age of
46
47 twenty-seven some days after her last childbirth and was subsequently buried in the
48
49 monastery of Santes Creus (Tarragona, Spain), in the pantheon of the Crown of
50
51 Aragon's royal lineage.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In 2010 a study aiming to investigate the Royal Tombs was launched into the
4
5 Monument Restoration Project in order to commemorate the 850th anniversary of the
6
7 foundation of the Santes Creus Monastery. A multidisciplinary team carried out the
8
9 study of the remains of the queen, including a forensic anthropological study with
10
11 external and internal examinations, radiological study, TC, histological analysis,
12
13 immunological test, molecular analysis and facial reconstruction.
14
15

16 17 **Case report**

18
19 The tomb of the Kings Jaume II The Just and Blanca of Anjou contained 72
20
21 fragments of human bodies. The majority of them belonged to the same partially
22
23 mummified corpse of a woman that could be reconstructed in the laboratory (Fig. 1).
24
25 The biological profile corresponds to a young female close to twenty-five years old and
26
27 150 cm tall [2-5]. The head is partially preserved; only the frontal bone with the
28
29 eyeballs, the jaw and the skin of the lower face and the front of the neck were safe.
30
31 Some tufts of hair were also recovered. She was lying on her back but slightly
32
33 lateralized to the left. Only the left forearm was preserved; it was in anatomical position,
34
35 but the back of the hand rested against the waist with a strong flexion of the wrist. The
36
37 lower extremities were semiflexed, the right over the left (Fig.1).
38
39
40
41

42 43 **Results**

44
45 External examination shows that it was the body of a woman. The breasts and
46
47 the abdomen were prominent and the abdominal white line can be clearly seen. Detailed
48
49 evaluation shows distinct contact marks distributed throughout the body surface,
50
51 allowing determine the signs of the clothes (Fig 2). The head exhibit oblique grooves on
52
53 the right side of the jaw, extending from around the ears to the peribucal area;
54
55 additionally, a transverse line on the forehead was observed (Fig 2a). On the body, a
56
57
58
59
60

1
2
3 plate-shaped groove around the abdomen was observed probably related to a belt (Fig
4
5 2b), and a transversal groove in the upper third of the right leg as a petticoat mark (Fig
6
7 2c). Finally, a wide depression was observed between both thighs suggesting the
8
9 presence of a pillow or clothing with folds placed between them (Fig 2d). Under the
10
11 right knee, an incised wound involving skin, patellar tendon and capsule was observed
12
13 (Fig 4). On the right ankle, another incised v-shaped lesion was located. The incision
14
15 did not reach the Achilles' tendon, but did cut the extensor apparatus of the ankle. The
16
17 right foot, the only complete preserved, shows an abnormal adduction in metatarsal
18
19 (hallux valgus) (Fig 3) and a hyperkeratosis plaque under the first right toe were also
20
21 recognized.
22
23
24
25

26
27 Internal exam shows well conserved soft tissues and some internal organs. In the
28
29 abdominal cavity intestine remains and uterus was found. The uterus was enlarged and
30
31 overhung the pelvic girdle (Fig 6); the uterine ligaments remained inserted into the
32
33 pelvic ring that did not showed metric or morphological abnormalities. Histological
34
35 analysis of the breast and uterus was carried out. In breast, epithelial tissue trace and
36
37 adipose tissue was suspected (Fig 7). The analysis of the uterus tissue showed collagen
38
39 fibres probably belonging to myometrium (Fig 8).
40
41

42
43 Genetic analyses were performed in three laboratories of Paleogenetics (UAB,
44
45 CSIC-UPF, and Natural History Museum of Denmark). Samples obtained from frontal
46
47 bone, incisor teeth, rib and hair gave the same result: the individual showed the 16300G
48
49 and 16362C motifs in the hypervariable region from mitochondrial DNA (mtDNA). The
50
51 analysis of the coding region by means of PCR-RFLP's with *A*luI enzyme showed the
52
53 7028C motif, indicating that the individual belongs to haplogroup H. This motif is very
54
55 infrequent (6/20.960 mtDNA haplotype database) finding them in few individuals from
56
57 North Africa, Near East, Italy and Russia. The original maternal ancestry of the Queen
58
59
60

1
2
3 is said to derive from The Cumans a nomadic Turkish people that settled in Hungary
4
5 after the Mongol invasion. Unfortunately, modern-day maternal relatives of the queen
6
7 Blanca are unknown and therefore it is not possible to authenticate the genetic results by
8
9 comparing them to additional individuals.
10
11

12
13 A draft of the facial reconstruction was conducted with the available elements
14
15 (frontal and mandibular bone and facial skin) and using average facial bone data from a
16
17 Catalan Medieval series [6]. The front and jaw have delicate and graceful forms, but
18
19 they are also quite thick. The jaw is small and does not show major muscle insertions;
20
21 however the mandibular body is considerably thick. The chin is squared, and in
22
23 conjunction with the width of the front, provides a quadrangular image of the face
24
25 (Fig.9).
26
27

28 29 Discussion

30
31
32 After a year in a delicate state of health, Blanca d'Anjou died on October 13th of
33
34 1310 at age 27 after giving birth to her tenth child, Violant of Aragon. Once completed
35
36 the embalming process, the body of the queen was placed inside a coffin that was stored
37
38 in the convent of San Francisco in Barcelona. At the end of January 1316, the corpse
39
40 was taken to the Monastery of Santes Creus where she had the last burial in the
41
42 monumental tomb. In 1834, two years before the despoliation of the tomb, a monk was
43
44 able to observe the royal corpse through a small aperture and say that the Queen, still
45
46 dressed, was of medium height, round face, big teeth, regular nose, and seemed dead a
47
48 few days [7]. The monk also indicated that the queen wore a tunic with sleeves, beneath
49
50 a short garment, buttoned at the front (*mozzetta*) that covered her chest and back. The
51
52 habit has a hood (*cuculla*) and a veil over her face. He also mentioned that the queen did
53
54 not wear stockings. All this clothing is related to clerical dresses, according to the usual
55
56
57
58
59
60

1
2
3 funerary attire of Spanish monarchs in the Middle Ages (c. 13), which wore religious
4 attributes [8]. -In 1835, under the law of Ecclesiastical confiscation of Mendizabal, the
5
6
7 monastic community left the monastery, its assets were sold and auctioned, and in
8
9
10 August 1836 the abandoned monastery was overtaken and the tombs desecrated.

11
12
13 Anthropological analysis of the remains found in the Queen Blanca of Anjou
14
15 tomb shows the corpse of a short young woman in her late twenties. The marks found
16
17 on the mummified skin surface suggest that the body was buried fully dressed, with
18
19 ceremonial clothing covering the face, trunk and the extremities. These observations
20
21 coincide with the marks found on the mummy, except for the depressions observed on
22
23 both thighs that suggest some kind of underclothing or petticoats not observed by the
24
25
26 monk.

27
28
29 Analysis of the corpse showed several signs suggesting that the mummy
30
31 belonged to a pregnant woman. The presence of a line of hyperpigmentation from the
32
33 navel to the pubis (the so called *white line*), and the enlarged and protruding uterus, are
34
35 consistent with this condition [9]. Additionally, histological study of the uterus revealed
36
37 high proportions of connective tissue and possible myometrial hyperplasia, suggesting
38
39 that the woman was pregnant or in a recently postpartum condition [10-14].
40
41
42

43
44 The autopsy depicted no pathological conditions that could be related to the
45
46 cause of death. However, the royal chronicles provided certain medical data, mainly
47
48 concerning the queen's difficulties with her pregnancies. When she was 25 and facing
49
50 the birth of her ninth child, the Queen took the decision to make a will. In describing the
51
52 reasons that carried to write his last wishes, the Queen says that she was "about to give
53
54 birth and terrified of the dangers of our own labour and those that generally affect
55
56 women before, during and after childbirth". The death came after her last delivery,
57
58
59
60

1
2 during which suffered greatly (“... *post dolores gravissimos quibus ratione par[tus] sui*
3 *extitit per dies aliquos multiplicite lacessita*”) [1]. Even if the specific causes of her
4
5 death are unknown, data suggest that this must be related to complications in childbirth.
6
7 Blanca of Anjou had several specific obstetric risk factors that may be related to her
8
9 premature death. Mainly, these include pregnancy at an early age (15 years-old) and
10
11 multiparity: 10 children throughout her marriage (1295-1310) with a short intergenetic
12
13 interval [14-17]. Moreover, Blanca had borne seven children until 1302, one for every
14
15 year of her marriage (from 1296 a 1302). In the next six years (1302 and 1310), she
16
17 gave birth to only three children, which may suggest that she could have been
18
19 experiencing difficulty in pregnancy [1]. In addition, medieval chronics said that four
20
21 years before died, the queen suffered quartan fevers [1]; however it cannot be confirmed
22
23 by immunological test.
24
25
26
27
28
29

30
31 Furthermore, the corpse shows evidence of a specific medical treatment that
32
33 obviously emphasises her social status [19,20]. Incised leg wounds have been found
34
35 affecting knees and ankles. These lesions were not produced in life because did not
36
37 present retraction of the tissues and haemorrhagic infiltration on their edge is absent.
38
39 Another indicator of post-mortem lesion was the non-retraction of tendon structures;
40
41 further, all sectioned structure occurred at the same plane. These marks could be related
42
43 to treatment of the corpse to exhibit it. The historical sources simply indicate that
44
45 Blanca’s corpse was moved to Santes Creus monastery after her death. During this
46
47 period, some kind of embalming process was carried out [19]. It is known that artefacts
48
49 and marks found near or on human remains are closely related to the practice of
50
51 autopsy, to thanatopraxie or to funeral practices [21,22]. In this regard, the incised
52
53 wounds could be produced as an attempt to reduce some of the effects of rigor mortis or
54
55 post-mortem rigidity and to place the body in a suitable position to be exhibited to the
56
57
58
59
60

1
2
3 court. The marks between both thighs, probably from some kind of pillow or clothing
4
5 with folds could have been placed in order to help with laying the body in a lateral
6
7 position, probably due to her pregnant condition.
8
9

10
11 In summary, anthropological study shows that the remains found in the tomb of
12
13 the Kings of Aragon, corresponds to Blanca of Anjou, a young adult woman, of
14
15 quadrangular face and approximately 150 cm in height, who died after give birth. Her
16
17 death would be caused by childbirth complications. On burial, she was ceremonially
18
19 dressed and her face was covered. The post-mortem cuts in her knees and ankles were
20
21 probably carried out to give a more appropriate position to be exhibited in public.
22
23

24
25 **Acknowledgments:** the author thanks to the all team of the Project of Santes Creus and
26
27 to Dr. Tom Gilbert for his help in the mtDNA characterization. Also we like to thanks
28
29 the support of Generalitat de Catalunya 2014 SGR 1420.
30
31

32
33 **Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.
34

35
36 **Authorship:** All authors had access to the data and played a role in writing this
37
38 manuscript.
39

40
41 Requests for reprints should be addressed to Ignasi Galtés, Institute of Legal Medicine
42
43 of Catalonia, Ciutat de la Justícia, Gran Via de les Corts Catalanes, 111 Edifici G
44
45 08075 Barcelona, Spain. Phone: 00-34-93 554 82 78, fax: 00-34-93 554 82 59
46
47
48
49

50 51 52 **References**

53
54
55 [1] McVaugh MR. Medicine before the Plague: Practitioners and Their Patients in the
56
57 Crown of Aragon, 1285-1345. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.
58
59
60

- 1
2
3 [2] Ferembach D, Schwidetzky I, Stoukal M. Recommendations for Age and Sex
4
5 Diagnoses of Skeletons. *J Hum Evol.* 1980;517-49.
6
7
8 [3] Krogman W, Iscan Y. *The Human Skeleton in Forensic Medicine.* Springfield,
9
10 Illinois: Ch.C. Thomas.; 1986.
11
12
13 [4] Lovejoy CO, Meindl RS, Pryzbeck TR, Mensforth RP. Chronological
14
15 Metamorphosis of the Auricular Surface of the Ilium -A New Method for the
16
17 Determination of Adult Skeletal Age at Death. *Am J Phys Anthr.* 1985;68:15-28.
18
19
20 [5] Olivier G. *Pratique Anthropologique.* París: Vigot Frères; 1960.
21
22
23 [6] Jordana X. *Characterització i evolució d'una comunitat medieval catalana. Estudi*
24
25 *bioantropològic de les inhumacions de les Esglésies de St. Pere de Terrassa. [PhD*
26
27 *dissertation]. Bellaterra-Cerdanyola del Vallès: Universitat Autònoma de Barcelona,*
28
29 *2007*
30
31
32 [7] Ramon y Vidales, J. *Las Momias dels Reys d'Aragó. La Renaixensa,* 1834
33
34
35 [8] de Sousa Congosto F. *Introducción a la historia de la indumentaria en España.*
36
37 *Madrid: Ediciones Itsmo S.A; 2007.*
38
39
40 [9] Cabero L. *Tratado de Ginecología y Obstetricia. Ginecología y Medicina de la*
41
42 *Reproducción. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2013.*
43
44
45 [10] Shynlova O, Kwong R, Lye SJ. *Mechanical stretch regulates hypertrophic*
46
47 *phenotype of the myometrium during pregnancy. Reproduction.* 2010;139:247-53.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [11] Shynlova O, Mitchell JA, Tsampalieros A, Langille BL, Lye SJ. Progesterone and
4
5 gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the
6
7 pregnant rat myometrium. *Biol Reprod.* 2004;70:986-92.
8
9
- 10 [12] Woessner JF, Brewer TH. Formation and Breakdown of Collagen and Elastin in
11
12 the Human Uterus during Pregnancy and Post-Partum Involution. *Biochem J.* 1963;89:
13
14 75–82.
15
16
- 17 [13] Cingillioglu B, Kulhan M, Yildirim Y. Extensive uterine prolapse during active
18
19 labor: a case report. *Int Urogynecol J.* 2010;21:1433-4.
20
21
22
- 23 [14] Tsikouras P, Dafopoulos A, Vrachnis N, Iliodromiti Z, Bouchlariotou S, Pinidis P,
24
25 et al. Uterine prolapse in pregnancy: risk factors, complications and management. *J*
26
27 *Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;27:297-302.
28
29
- 30 [15] Shechter Y, Levy A, Wiznitzer A, Zlotnik A, Sheiner E. Obstetric complications in
31
32 grand and great grand multiparous women. *J Matern Fetal Neonatal Med.*
33
34 2010;23:1211-7.
35
36
37
- 38 [16] Roman H, Robillard PY, Verspyck E, Hulsey TC, Marpeau L, Barau G. Obstetric
39
40 and neonatal outcomes in grand multiparity. *Obstet Gynecol.* 2004;103:1294-9.
41
42
43
- 44 [17] Nordin NM, Fen CK, Isa S, Symonds EM. Is grandmultiparity a significant risk
45
46 factor in this new millennium? *Malaysian Journal of Medical Sciences.* 2006;13:52-60.
47
48
- 49 [18] Mgaya AH, Massawe SN, Kidanto HL, Mgaya HN. Grand multiparity: is it still a
50
51 risk in pregnancy? *BMC Pregnancy and Childbirth.* 2013:241-8.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 [19] Panzer S, Zink AR, Piombino-Mascali D. Radiologic Evidence of Anthropogenic
4
5 Mummification in the Capuchin Catacombs of Palermo, Sicily. Radiographics.
6
7 2010;30:1123-32.
8

9
10 [20] Fornaciari G, Giuffra V, Giusiani S, Fornaciari A, Marchesini M, Vitiello A.
11
12 Autopsy and Embalming of the Medici Grand Dukes of Florence (16th-18th centuries).
13
14 2008. <http://www.paleopatologia.it/articoli/aticolo.php?recordID=36>
15
16

17
18 [21] Mondeville Htc, Bos A-, Malinowski W. La chirurgie de maître Henri de
19
20 Mondeville. New York: Paris Firmin Didot et cie; 1965.
21

22
23 [22] Nociarova D, Adserias MJ, Malgosa A, Galtés I, Malinowski W. Where do those
24
25 remains come from? Forensic Science International. 2014.
26
27

28 29 30 31 **Additional Information and Reprint Requests**

32
33 Dr. Assumpció Malgosa,
34

35
36 Biological Anthropology Unit, BABVE Department, Universitat Autònoma de
37
38 Barcelona, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain.
39

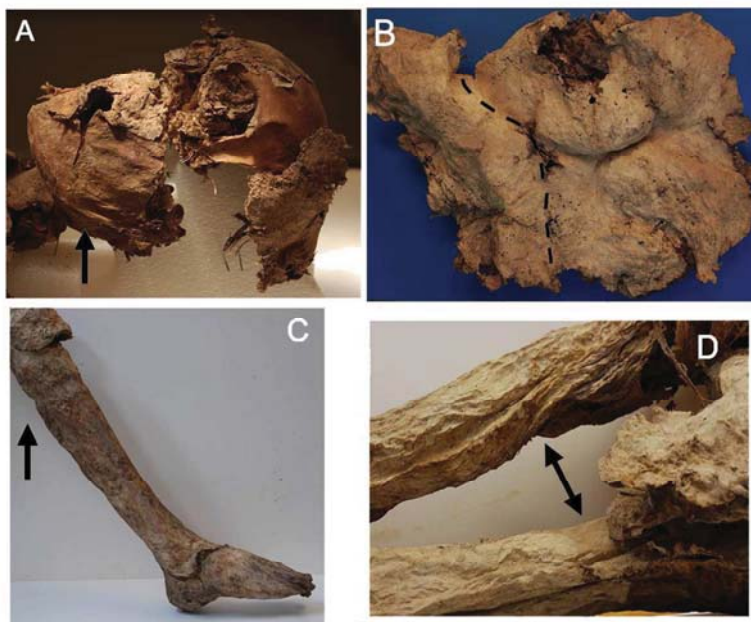
40
41 *assumpcio.malgosa@uab.cat*
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Reconstructed mummified body of the young woman found in the tomb of Santes Creus.
71x21mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review



35 Contact marks distributed throughout the body. A. Oblique depression in left cheek. B. Depression inside
36 both thighs. C. Transverse depression on the upper third of the right leg. D. Cross-groove mark
37 118x100mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



View of dorsal part of the foot, a bunion and overlapping toes were observed
88x88mm (300 x 300 DPI)



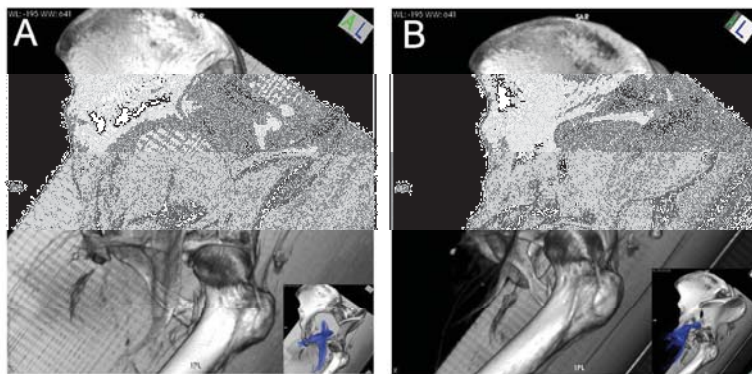


A. Incised wound in right knee. The incision starts at the internal side with a wide input line and terminates on the external side, where it is more superficial. b. Incised wound in right ankle. The incision starts at the more acute line of the forefoot, and terminates in a deeper section of the malleolus
135x94mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

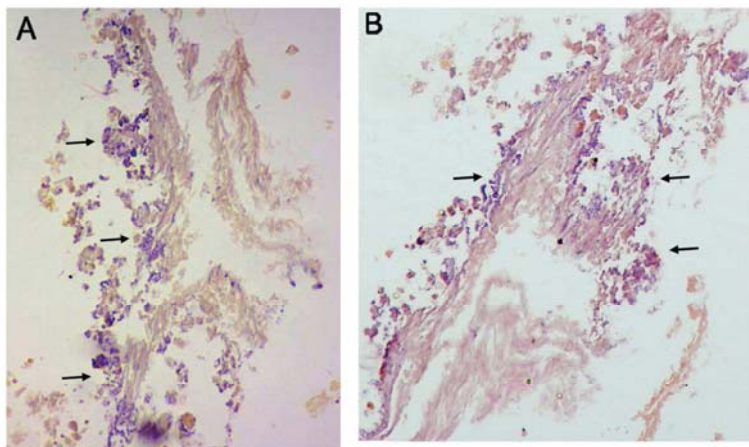


Conserved elements of the mummy's head from the royal tomb. The image shows a protrusion of dried eyeballs as well as half of the face with mummified lips.
190x244mm (150 x 150 DPI)



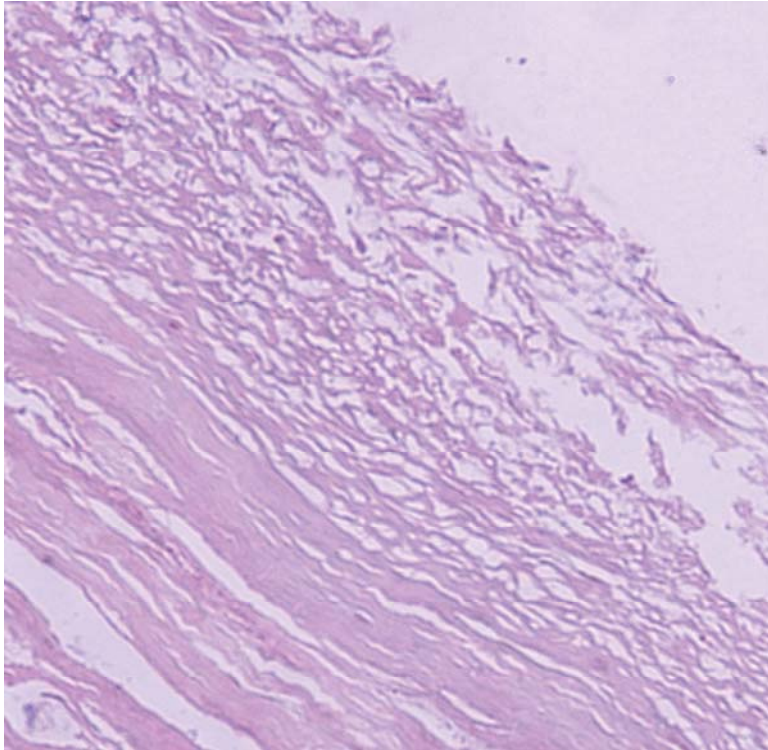
CT scan volumetric reconstruction of the pelvis showing how the uterus protrudes from the pelvis major over and above the superior ramus of the left pubis. OSIRIX. 10.0.
115x58mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Histological section of mummified breasts (right A and left B).
115x70mm (300 x 300 DPI)

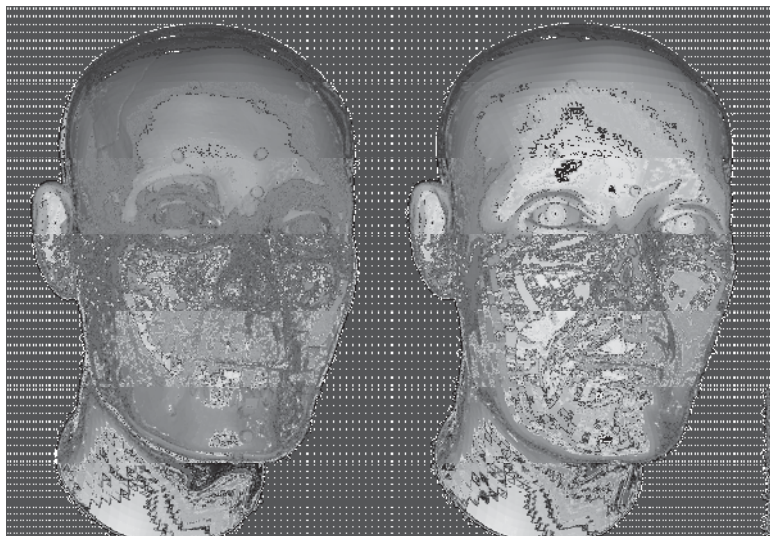
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Histological section of the mummified uterus showing a smooth muscle in the myometrium.
115x113mm (300 x 300 DPI)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Facial reconstruction of the queen Blanca d'Anjou
146x101mm (200 x 200 DPI)

Review

DISCUSIÓN GENERAL

Durante más de un siglo, la Antropología física ha utilizado la histología para el estudio de las momias, y con ella se ha obtenido información detallada sobre aspectos de la vida y la muerte de las comunidades humanas, así como de la dieta y de las enfermedades que sufrían. La histología también es conocida como la anatomía microscópica, puesto que no deja de ser un tratado sobre los distintos tipos de tejidos y células del cuerpo. Cuando se aplica el término a tejidos momificados generalmente se conoce como paleohistología, término acuñado por Moodie en 1920. Mientras que hoy en día la histología convencional es una herramienta de diagnóstico, la información que se extrae del examen de los tejidos blandos antiguos es muy distinta, ya que al estudiar un tejido preservado siempre es necesario primero identificar

el tejido y posteriormente determinar su estado de preservación y características.

5.1. IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA HISTOLÓGICA ADAPTADA A LOS TEJIDOS BLANDOS

Los tejidos blandos preservados son muestras muy codiciadas porque en un pequeño fragmento puede haber una cantidad importantísima de información. El procesamiento de estas muestras es clave para luego poder observar e interpretar la vida y muerte de ese individuo, y los errores metodológicos son fatales puesto que muy probablemente sea una muestra irrecuperable. El correcto procesamiento así como una buena calidad de las preparaciones es vital para el diagnóstico final. Sin embargo, las metodologías usadas no son siempre las óptimas para el tipo de muestra en estudio, por lo que a menudo se generan artefactos que dificultan el diagnóstico, impidiendo la recuperación de datos interesantes. Para un correcto desarrollo de la técnica y para evitar este tipo de errores, es de vital importancia conocer qué mecanismos de conservación existen y cómo éstos modifican la

estructura interna del tejido. De este modo, la metodología podrá posteriormente adaptarse a cada tipo de muestra.

Aunque existen diversos tipos de conservación, la desecación y la saponificación son los que más abundan en la literatura paleohistológica. En el caso de los tejidos blandos desecados, la buena preservación que en general presentan permite que puedan llevarse a cabo diversos tipos de estudios: la identificación del patrón arquitectónico típico de cada tipo de tejido (Ciranni and Fornaciari 2004; Eklektos et al. 2006; Shin et al. 2003), la observación de ciertos elementos celulares (Chang et al. 2006; Gerszten et al. 1997) e incluso la realización de análisis inmunohistoquímicos (Ciranni et al. 1999; Mekota et al. 2005). Sin embargo, donde estos tejidos realmente destacan es en el diagnóstico de enfermedades del pasado (Allison et al. 1977; Ciranni and Fornaciari 2004; Fornaciari et al. 2003; Nerlich et al. 1995). Por el contrario, cuando hablamos de muestras saponificadas el enfoque cambia y la mayoría de investigaciones se centran en conocer los mecanismos de su formación (Fiedler et al. 2009; Fiedler and Graw 2003; Forbes et al. 2011; Frund and Schoenen 2009; Janaway et al. 2009; Takatori 2001), o la composición de ácidos grasos que se forman durante este proceso (Liu

et al. 2010; Makristathis et al. 2002; Mayer et al. 1997; Yan et al. 2001), de manera que existen pocos casos dónde la paleohistología sea realmente el eje central de la investigación. Algunos de los ejemplos son las investigaciones sobre la momia de "Otzi", (Hess et al. 1998; Janko et al. 2010; Pabst and Hofer 1998) o casos individuales donde el cerebro se ha preservado y por lo tanto es objeto de estudio (Karlik et al. 2007; O'Connor et al. 2011; Papageorgopoulou et al. 2010).

Esta diferencia en cuanto a los estudios en paleohistología probablemente es debida a que los tejidos saponificados tienen una mayor complejidad metodológica por su baja estabilidad, siendo los resultados obtenidos de menor calidad y menos informativos. La búsqueda bibliográfica sobre las metodologías más empleadas en esta disciplina es compleja ya que existen un sinnúmero de posibilidades, en pocas ocasiones se detalla la técnica y mucho menos se adapta al tipo de conservación que ha sufrido el espécimen (Ciranni et al. 1999; Eklektos et al. 2006; Grupe et al. 1997; Holz et al. 2007; Papageorgopoulou et al. 2010; Radanov et al. 1992). Para los tejidos desecados, algunos autores se decantan por emplear las soluciones de rehidratación clásicas desarrolladas por Ruffer (Nerlich et al. 1995; Papageorgopoulou et al.

2010; Papageorgopoulou et al. 2015; Zimmerman and Gleeson 2015) o Sandison (Ciranni et al. 1999; Holz et al. 2007; Ottini et al. 2011; Ventura et al. 2009). Otros como Grupe y colaboradores (1997) se decantan por la utilización del DMSO, y Radanov y colaboradores (1992) por el uso del glicerol. Únicamente Mekota y Vermehren (2005) mencionan que en su estudio las soluciones más efectivas fueron las de Sandison y Ruffer. Para muestras saponificadas la mayoría de autores utilizan directamente soluciones de fijación con el objetivo de conseguir que el tejido sea procesable (Bereuter et al. 1997; Gerszten et al. 1997; Hess et al. 1998; Karlik et al. 2007; O'Connor et al. 2011).

De esta revisión bibliográfica se concluye que el proceso de preparación de la muestra es una cuestión muy importante puesto que de ello depende la obtención de resultados válidos para la posterior interpretación del caso. Sin embargo, la técnica está poco desarrollada y prácticamente no ha sufrido cambios en 100 años, o al menos éstos no han sido detallados por los autores. Así pues, el primer paso para el correcto tratamiento de una muestra debería contar con un análisis en profundidad sobre la idoneidad de las metodologías que se aplican, así como de cómo actúa cada componente químico y el efecto que éste

produce en la estructura del tejido que se analiza. Por ello, en la presente tesis se ha profundizado en la acción y eficiencia de cada una de las soluciones, con el fin de obtener la mejor preparación histológica posible.

Para muchos autores, la rehidratación es un paso imprescindible y crítico ya que restablece los fluidos del tejido seco devolviéndolo a una situación cercana al tejido fresco. Además proporciona la consistencia necesaria para el siguiente proceso (Denton 2008; Mekota and Vermehren 2005; Papageorgopoulou et al. 2015). La solución de rehidratación debería estar formada por diversos agentes: el rehidratante, que repone los fluidos perdidos durante el proceso de conservación; un agente tensoactivo para disminuir la tensión superficial del agua que elimine los elementos contaminantes como la arena o la grasa; y un agente conservante que evite el crecimiento bacteriano. Estos tres elementos se encuentran en las dos soluciones clásicas descritas por Ruffer y Sandison (Ruffer 1909; Sandison 1955). La principal diferencia entre ellas reside en la composición del agente rehidratante; en el caso de la solución de Ruffer se usa únicamente agua destilada, mientras que en la de Sandison se utilizan disoluciones de formol al 10% y alcohol al 96% para incorporar el agua. Estas distintas composiciones implican

diferencias en la velocidad de penetración del agente rehidratante, ya que en la solución de Sandison el agua difunde más lentamente que en Ruffer por que fija a la vez que hidrata. Por lo tanto, aquellos tejidos que se colapsan o se fragmentan con facilidad deberán ser tratados con una solución como la de Sandison. Sin embargo, la solución de Ruffer da buenos resultados en los tejidos que han sufrido un proceso de desecación y requieren incorporar más cantidad de agua y, como su estructura es más estable, esta rapidez no presenta efectos negativos para la estructura tisular.

El tiempo de exposición de la solución de la rehidratación es también un factor importante que puede causar dos tipos de problemas: la fragmentación de la muestra en forma de microroturas (Papageorgopoulou et al. 2015) y, aunque es poco habitual, que la muestra siga rígida por una falta de rehidratación. Para evitar estos problemas, se requiere una observación controlada en intervalos cortos de tiempo y, en función de la consistencia que se vea en el tejido, interrumpir el proceso de rehidratación. Los ensayos realizados en tejidos desecados muestran mejores resultados cuando el tiempo empleado en esta primera fase es de 24 a 72 horas, mientras que en los tejidos

saponificados, el periodo apropiado varía entre 30 minutos y un máximo de 24 horas.

El siguiente paso es la fijación que implica una serie de cambios químicos que estabilizan el tejido, mantienen la arquitectura lo más similar posible al estado en vida, y permiten el siguiente procesamiento (Denton 2008). Como ya se ha mencionado anteriormente, en los tejidos saponificados la fijación es de vital importancia para evitar las microrroturas y distorsión de la arquitectura tisular. El paraformaldehído es el candidato idóneo ya que es el fijador que difunde más rápido hacia la muestra, formando enlaces transversales entre las proteínas a modo de puente. Esta alta capacidad de difusión promueve una fijación fuerte permitiendo que los detalles morfológicos se preserven. Sin embargo, este fijador endurece la muestra de tejidos desecados con lo que la fuerza mecánica del micrótopo necesaria para obtener cortes suficientemente delgados es demasiado alta para que el tejido se mantenga intacto, añadiendo artefactos a la muestra. Para este tipo de muestras, la solución de Schaffer basada en alcohol, que penetra más lentamente y al mismo tiempo fija de manera moderada el tejido, facilita un procesamiento menos agresivo para la muestra.

Las técnicas de tinción, junto con la microscopía, permiten el reconocimiento de los restos de la arquitectura tisular, la matriz y del tipo celular, lo que significa que las muestras antiguas pueden ser evaluadas de manera similar a las actuales. La oxidación y la putrefacción pueden provocar importantes efectos en la coloración de los tejidos, incluso en algunos casos revertir el patrón normal de tinción (Denton 2008; Grupe et al. 1997). Las técnicas de tinción se basan en el hecho de que los poros se llenan de colorante en función de su tamaño molecular. La mayoría de tinciones se aplican en secuencia, de manera que el primer colorante añadido es el que tiene un tamaño molecular mayor, rellenando así los poros más grandes; seguidamente, se aplican los tintes de tamaño molecular más pequeño que llenarán los poros más pequeños y finalmente los poros de tamaño intermedio serán rellenados por el último tinte. Cada uno de los tintes presenta un color específico que se unirá a estructuras tisulares concretas (núcleos, proteínas, etc.), permitiendo que éstas sean diferenciadas. Este proceso a veces se ve afectado por daños en el tejido, provocando una inversión del patrón normal de tinción o sencillamente no tiñendo con normalidad (Denton 2008). Por lo tanto, mejorar la penetración de los colorantes es crucial para un correcto

análisis de las muestras, y en este sentido se ha trabajado en la presente tesis con diferentes modificaciones de la técnica estándar.

Se ha comprobado que el uso de calor aumenta la definición del patrón histológico, reparando en gran medida las microroturas provocadas por la rehidratación, debido a que induce la coagulación de las proteínas (Montuenga Badia et al. 2009). Esta coagulación posiblemente también provoca la reestructuración del tamaño molecular de los poros, permitiendo que el colorante pueda unirse correctamente a las zonas que le corresponden por tamaño molecular. Cabe destacar que este proceso sólo lo soportan los tejidos con una mayor consistencia, que en este caso serían los tejidos desecados ya que presentan una mejor conservación; en ningún caso podemos recomendar el uso del calor en los tejidos saponificados, porque son más inestables y este aumento de calor provoca distorsiones en la arquitectura del tejido, que incluso puede llegar a deteriorarse por completo.

5.2. ELABORACIÓN DE UN ATLAS HISTOLÓGICO DE REFERENCIA

Otra limitación en el estudio de los tejidos blandos conservados es la identificación del tipo de tejidos cuando éstos se encuentran

aislados y sin contexto, ocasionando problemas de interpretación para el observador. A menudo en la bibliografía se describen únicamente los tejidos que proceden de zonas anatómicas concretas y que han sido recuperados in situ y no con criterios de identificación morfológica específicas (Aufderheide and Rodreguez-Martin 1998). En aquellos casos en los que la recuperación no se ha podido basar en aspectos sistémicos, únicamente la histología tiene la capacidad de identificar el tipo de tejido y su grado de preservación (Denton 2008). Por ejemplo en el caso de la Cova des Pas analizada en esta tesis, muchos restos de tejido blando se recogieron fuera del contexto anatómico por lo que el reconocimiento del tipo de tejido fue más complejo.

En la histología convencional y en la histopatología existen atlas histológicos que definen patrones característicos de cada tejido y órgano, y que ayudan al reconocimiento de la muestra para, posteriormente, poder determinar si ese órgano es patológico o no. En el caso de los tejidos conservados no existen tales ayudas. Por esa razón, crear un atlas con las características histológicas de cada tipo de tejido en función de su conservación puede ayudar a la determinación de los patrones

arquitectónicos típicos, así como de los artefactos que se generan en los tejidos conservados.

Otra limitación en el estudio paleohistológico es la dificultad en la identificación de patologías, ya que la morfología anómala de los tejidos puede ser debida tanto a un cambio patológico ante mortem como a un artefacto post mortem. Las pseudopatologías son cambios estructurales en el tejido normal que se asemejan a una enfermedad o a una lesión ante mortem pero que en realidad son únicamente producto de los procesos tafonómicos. Aunque si bien es cierto que algunas características son muy típicas y se pueden identificar con cierta facilidad, interpretarlas es tarea del observador, y aquí interviene su experiencia (Aufderheide and Rodreguez-Martin 1998). En este sentido, un atlas de tejidos con este tipo de alteraciones puede resultar muy útil como material de apoyo, y en esta tesis se ha tratado de iniciar esta tarea.

En los distintos artículos que componen la tesis se describen algunos tejidos con objeto de dilucidar problemas concretos de identificación o de conservación. Por otro lado, en el anexo de la presente tesis se encuentra un extracto del atlas que proponemos. En este caso

las muestras son indubitadas, de manera que se puede definir y detallar la morfología de la matriz preservada con la certeza de conocer el tipo de tejido del que se trata. Hasta el momento se han definido patrones de tejido cerebral y pulmonar como casos más trascendentes, pero también tejido mamario, uterino, zonas musculares diversas, así como globos oculares, fragmentos de intestino grueso y un fragmento de saco dural (V. anexo).

5.3. LOS FENÓMENOS TAFONÓMICOS ASOCIADOS A LOS TEJIDOS PRESERVADOS DE LA COVA DES PAS

La conservación de los materiales orgánicos de la Cova des Pas generó mucha controversia, patente en las discusiones de los dos artículos que se centran en este yacimiento. En un primer momento y debido a la apariencia de los diversos tejidos (cuerdas, maderas, capas vegetales a modo de lecho mortuario, pieles animales, tejidos humanos, etc.) y a las características de la cueva, se asumió que los cuerpos habían sufrido un proceso de desecación (Armentano et al. 2012; Cabanes and Albert 2011; Fullola et al. 2007). Este tipo de preservación requiere una deshidratación completa del cuerpo y del suelo que está en

contacto con éste, con lo que normalmente se da en lugares secos y con corrientes de aire (Aufderheide 2003; Janaway et al. 2009; Lynnerup 2007).

El agua es vital para el proceso de descomposición porque presenta diversas características: (a) un alto calor específico que estabiliza las temperaturas; (b) capacidad de amortiguación que modera los efectos de los cambios de pH locales; (c) es una fuente de hidrógeno, necesario para numerosas reacciones bioquímicas; (d) efecto como un diluyente; y (e) capacidad para actuar como un disolvente polar para las moléculas (Gill-King 1997; Vass 2011). Todas estas funciones la hacen imprescindible para los procesos normales de enzimas y microorganismos, de manera que una rápida deshidratación de los tejidos disminuye la tasa de putrefacción, evita la descomposición, y resulta en la preservación de los tejidos blandos. Además, para el correcto desarrollo de los huevos y larvas de dípteros, se requiere tanto humedad como un lugar protegido de los rayos del sol (Galloway et al. 1989; Haskell et al. 1997), de manera que si hay una deshidratación del cuerpo en los primeros estadios de descomposición, los dípteros no actuarán, disminuyendo así la tasa de descomposición (Galloway 1997).

La Cova des Pas presentaba unas características que la hacían un lugar único para la preservación de material orgánico mediante este proceso. La cueva está ubicada en un barranco a unos 15 metros del fondo. La oquedad permaneció protegida de la lluvia y otras inclemencias meteorológicas por un saliente a modo de visera, además de tener una pequeña entrada que facilitaba las corrientes de aire seco. Por otro lado, la gran cantidad de nitratos y sulfatos encontrados en el suelo de la cueva debieron afectar la tasa de descomposición, alterando las funciones biológicas de los microorganismos por un proceso de plasmólisis (Berkeley and Campbell 1985) y previniendo el crecimiento bacteriano. Este efecto, unido a la presencia de yeso, sugería un ambiente seco que promovería la deshidratación de los cuerpos (Cabanés and Albert 2011) y la consiguiente conservación del material orgánico.

Sin embargo, el análisis paleohistológico reveló características poco comunes en aquellos tejidos que se conservan por desecación. En primer lugar, el procesamiento de las muestras fue dificultoso por su fácil disgregación durante la rehidratación; microscópicamente, la preservación de la arquitectura tisular fue baja y con pocos detalles morfológicos. Estas particularidades sugerían que probablemente el proceso de conservación

no había sido una desecación estricta, sino más bien una saponificación, por lo que se procedió al estudio del perfil de ácidos grasos con tal de corroborar tal teoría.

El perfil químico reveló una mayor concentración de ácidos grasos saturados (SFA) que de insaturados (UFA). El ácido graso saturado predominante fue el ácido palmítico, seguido de ácido esteárico, que es uno de los ácidos grasos que más abundan en cuerpos saponificados (O'Brien and Kuehner 2007), el mirístico, y finalmente las formas hidroxilo. Todos estos SFA se identifican como los principales constituyentes de la adipocira, tanto en condiciones experimentales (Forbes et al. 2005a; Forbes et al. 2002; Forbes et al. 2005b; Forbes et al. 2005c), como en casos arqueológicos (Varmuza et al. 2005).

La saponificación o formación de adipocira ocurre normalmente tras el inicio de la putrefacción con la hidrogenación de los ácidos grasos libres, que produce ácidos grasos saturados. Macroscópicamente se observa en forma de depósitos de una sustancia blanquecina-amarillenta similar a la cera (Bereuter et al. 1996; Vass 2001). La mayoría de autores mencionan que las condiciones favorables para la formación de adipocira

incluyen un pH ligeramente alcalino, humedad, calor, condiciones anaeróbicas y la presencia de bacterias adecuadas (Fiedler et al. 2009; Ubelaker and Zarenko 2011).

Las enzimas y las vías metabólicas de bacterias como *Clostridium perfringens* o *Micrococcus luteus* son las encargadas de formar las formas 10-hidroxy, que poseen los puntos de fusión más altos y por lo tanto juegan un papel importantísimo en la formación y estabilización de adipocira (Makrithis et al. 2002; Pfeiffer et al. 1998; Takatori 2001; Vass 2001). Ello implica que para su formación se requieran unas condiciones ambientales óptimas para una actividad bacteriana moderada. Por otra parte la capacidad catalítica de enzimas y las reacciones químicas intracelulares se ven afectadas por cambios en el pH, ya sea intracelular, extracelular o del entorno, provocando una disminución de su tasa metabólica y cesando los procesos bioquímicos (Gill-King 1997). De acuerdo con Forbes y colaboradores (2005a), el suelo con un pH entre 5 y 9 facilita la formación de adipocira, ya que este intervalo no genera un ambiente completamente inhóspito para las bacterias, permitiendo la suficiente actividad bacteriana para lograr la composición característica de ácidos grasos de adipocira. En el caso de

la Cova des Pas el pH es 4,95 (Van Strydonck et al. 2010), es decir un intervalo favorable para la saponificación de los cuerpos.

Por otra parte, varios autores indican que las condiciones anaeróbicas son esenciales para inducir la adipocira (Janaway et al. 2009; Mellen et al. 1993; Notter et al. 2009). En este sentido, la Cova des Pas también proporciona las condiciones adecuadas; Armentano y colaboradores (2012) sugieren que la compresión y superposición de un gran número de cuerpos enterrados en un espacio tan pequeño puede causar esta anaerobiosis de manera similar a lo que sucede en una fosa común (Fiedler and Graw 2003; Mant and Furbank 1957). Además los cuerpos estaban amortajados con pieles de animales (Cañas 2012), constituyendo una barrera física que podría retardar los cambios post mortem e incluso inducir la formación adipocira (Dix and Graham 2000; Mellen et al. 1993). Según Mant (1987) la ropa mantiene alejados a los insectos y también favorece la absorción y el almacenamiento de la humedad, con lo que se potenciaría la saponificación.

En conclusión, las condiciones ambientales del yacimiento en cuestión (temperatura, pH, humedad, fardo funerario, condiciones

anaeróbicas) potenciaron que la saponificación fuera el mecanismo de preservación principal. Sin embargo es muy probable que lo largo de los años las condiciones ambientales fueran modificándose favoreciendo también la desecación. Los nitratos, posiblemente de origen orgánico a partir de la acumulación de excrementos de aves, también propiciarían este ambiente más seco, al igual que la composición de fosfatos y yeso. La entrada de la cueva probablemente sufrió algún desprendimiento, ensanchándola y promoviendo cambios en la temperatura y más corrientes de aire. En suma, los cuerpos envueltos en fardos bien cerrados, sobre lechos de ramas y en algunos casos sobre las mismas parihuelas y suelo absorbente, junto con una temperatura estable y suave y corriente de aire son características que indican que los procesos de preservación de los cuerpos fueron complejos, siendo la formación de adipocira en un primer momento la predominante, pero con una posterior desecación.

5.4. APLICACIÓN DE LOS ESTUDIOS HISTOLÓGICOS A LA RESOLUCIÓN DE CASOS PALEOANTROPOLÓGICOS

Como capítulo final de la tesis se presenta el caso de la momia de la reina Blanca de Anjou en el contexto global de toda la investigación. Tanto la optimización metodológica, como la detección de cambios fisiológicos mediante la observación de un tejido y la paleohistología de los tejidos blandos contribuyeron a la identificación de la reina y a las posibles circunstancias en las que murió.

Se contrastaron el perfil biológico, el perfil histológico, los datos de la autopsia y la localización de los restos, llegando a concluir que el cuerpo aislado en la tumba de Blanca de Anjou correspondía a la reina en cuestión. Las evidencias morfológicas mostraron que la piel abdominal estaba distendida, llegando a contactar con la cara interna del muslo izquierdo. Además se identificó el útero momificado, el cual sobrepasaba la cavidad pélvica y se apoyaba en la cara anterior del abdomen, correspondiendo a un útero grávido y distendido. Por otro lado, el estudio histológico del útero reveló una alta proporción de tejido conectivo, indicando una posible hiperplasia miometrial. Todos estos datos podrían sugerir que la reina en el momento de la muerte se encontraba en una condición puerperal (Shynlova et al. 2010; Shynlova et al. 2004; Woessner and Brewer 1963). A pesar de que no se ha encontrado

ninguna evidencia patológica que explique directamente la muerte de la reina, los resultados concuerdan con una muerte alrededor del momento del parto, hecho que concuerda con los antecedentes históricos que existen. En este sentido, y en relación a la causa de la muerte, es altamente sugestivo que la muerte de Blanca de Anjou estuviera relacionada con alguna complicación derivada de este último parto. De hecho, las crónicas reales mencionan datos médicos, principalmente en relación con las dificultades de la reina con sus embarazos. Cuando tenía 25 años y frente al nacimiento de su noveno hijo, la reina tomó la decisión de hacer un testamento. En la descripción de las razones que llevaron a escribir su última voluntad, la Reina menciona que estaba "a punto de dar a luz y aterrorizada de los peligros de nuestro propio trabajo y las que generalmente afectan a las mujeres antes, durante y después del parto". La muerte se produjo después de su último parto, el cual se menciona en las crónicas como un parto muy doloroso ("...dolores gravissimos Quibus racione la par [tus] sui extiit por muere aliquos multiplicité lacessita") (McVaugh 1986). La reina presentaba varios factores de riesgo obstétrico específicos que pueden estar relacionadas con su muerte prematura. Principalmente, éstos incluyen el embarazo a temprana edad (15 años de

edad) y la multiparidad (10 hijos desde su matrimonio, 1295-1310) con un intervalo intergenésico corto (Nordin et al. 2006; Roman et al. 2004; Shechter et al. 2010; Tsikouras et al. 2014). Por otra parte, Blanca había dado a luz siete hijos hasta 1302, uno por cada año de su matrimonio (de 1296 a 1302). En los siguientes seis años (1302 y 1310), dio a luz a tres hijos, lo que puede sugerir que podría haber estado experimentando dificultades en el embarazo. Además, crónicas medievales citan que cuatro años antes de morir la reina sufrió fiebres cuartanas; sin embargo, no se ha podido confirmar mediante ensayo inmunológico (McVaugh 1986).

En resumen, el estudio antropológico completo y la utilización del análisis de los tejidos blandos sugieren que los restos encontrados en la tumba de los reyes de Aragón corresponden a Blanca de Anjou, una mujer adulta joven, de 150 cm de altura, que murió después de dar a luz, probablemente debido a complicaciones en el parto.

CONCLUSIONES

I. Optimización de la técnica histológica

1. El análisis de distintos tejidos muestra que para la optimización de los resultados en paleohistología se precisa de la adaptación de la técnica a los diversos procesos de preservación sufridos por los tejidos.
2. Para tejidos preservados por desecación el mejor medio de rehidratación es la solución de Ruffer. Su alta composición en agua hidrata el tejido con mayor rapidez, y garantiza una buena arquitectura tisular. Para la fijación de éstos la solución óptima es

la de Schaffer ya que conserva mejor las estructuras características del tejido. El uso de calor aumenta la penetración de los colorantes durante la tinción.

3. Para tejidos saponificados la mejor solución de rehidratación es la de Sandison ya que presenta componentes de fijación que ayuda a que el tejido no se fragmente y no pierda su identidad tisular. El fijador que mantiene mejor la estabilidad de los tejidos saponificados es el formaldehído. No se aconseja el calor ya que puede desintegrar la muestra y perder la arquitectura celular que presentan estas muestras.

II. Elaboración de un atlas histológico de referencia.

4. Los tejidos analizados muestran las características típicas de los tejidos: 1) A nivel de órgano se observa la pérdida o la desestructuración de las unidades funcionales que dificultan su reconocimiento. 2) A nivel de tejidos, la ausencia de las células específicas o el deterioro de los elementos químicos de la matriz extracelular provocan la pérdida de la arquitectura característica dificultando su interpretación.

5. Las estructuras que se preservan mejor son los elementos de soporte o las proteínas estructurales como colágeno o las fibras elásticas manteniendo la malla de soporte y permitiendo un diagnóstico.
6. Los artefactos tafonómicos más habituales en los tejidos preservados son: la aparición de pigmentos cadavéricos y que son típicos en órganos activos como el intestino, los globos oculares o la piel; la formación de pseudomicelas de descomposición, muy abundantes en el cerebro; el ensanchamiento de capilares o vasos sanguíneos que aumentan de tamaño por el efecto de los gases de descomposición y la separación de capas por la proliferación de hongos como en el caso de la piel.
7. Los tejidos blandos que muestran mejores resultados paleohistológicos son los desecados y se caracterizan en general por conservar mejor la estructura tisular. Por el contrario los tejidos saponificados presentan una preservación más pobre ya

que la arquitectura tisular es desorganizada y con menos elementos de diagnóstico conservados.

III. Descripción de los fenómenos tafonómicos asociados a los tejidos preservados de la Cova des Pas

10. El tipo de preservación de los tejidos de la Cova des Pas dependió de los procesos ambientales y su diagnóstico diferencial se basa en el perfil químico de los ácidos grasos y en la valoración de la presencia y la concentración de aquellos que son característicos de la adipocira.
11. La conservación de tejidos blandos en la Cova des Pas se debe a un amplio número de factores han interactuado entre ellos. El elevado número de cadáveres en descomposición superpuestos y su envoltura podría crear una anaeróbica y la humedad medio ambiente, promoviendo la formación de adipocira.
12. La evolución en las características ambientales de la cueva promovió cambios en el mecanismo de preservación revirtiendo tal situación, por lo que los tejidos saponificados de la Cova des Pas pasaron a deshidratarse y a presentar un aspecto de cuerpos desecados.

IV. Aplicar de los estudios histológicos a la resolución de casos paleoantropológicos

13. El estudio de los tejidos blandos permitió ampliar el estudio antropológico del cuerpo hallado en la tumba de Blanca de Anjou. El análisis paleohistológico demuestra una buena conservación de los tejidos blandos a pesar del estado de fragmentación del cuerpo y de los cambios tanto ambientales como deposicionales (expolio de la tumba, extracción y posterior recuperación del cuerpo) sufridos.
14. Los tejidos han sufrido desecación lo que favoreció el reconocimiento tanto de órganos como de estructuras tisulares específicas.
15. La histología tanto del útero como de otros tejidos permitió establecer que el cuerpo momificado era el de la reina ya que presentaba las características histológicas de una mujer en etapa de puerperio y que su muerte podría deberse a complicaciones en el parto.

BIBLIOGRAFÍA

- Allison MJ, Gerszten E, Martinez AJ, Klurfeld DM, and Pezzia A. 1977. Generalized connective-tissue disease in a mummy from Huari Culture (Peru). *Bull N Y Acad Med* 53(3):292-301.
- Armentano N, Esteve X, Nociarová D, and Malgosa A. 2012. Taphonomical study of the anthropological remains from Cova des Pas (Minorca). *Quatern Int* 275:112-119.
- Armentano N, Jordana X, and Malgosa A. 2010. Aproximación paleodemográfica a una población protohistórica de las Baleares. El yacimiento de la Cova des Pas (Ferreries, Menorca). *Revista de Demografía Histórica* XXVIII 1:91-108.

- Aturaliya S, and Lukasewycz A. 1999. Experimental forensic and bioanthropological aspects of soft tissue taphonomy: Factors influencing postmortem tissue desiccation rate. *J Forensic Sci* 44(5):893-896.
- Aufderheide AC. 2003. *The scientific study of mummies*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Aufderheide AC, and Rodreguez-Martin C. 1998. Pseudopathology. In: Aufderheide AC, and Rodreguez-Martin C, editors. *The Cambridge encyclopedia of human paleopathology*. Cambridge: Cambridge Univeristy Press. p 11-18.
- Bereuter MTL, Lorbeer E, Reiter C, Seidler H, and Unterdorfer H. 1996. Post-mortem alterations of human lipids - Part I: Evaluation of adipocere formation and mummification by desiccation. In: Spindler K, Wilfing H, Rastbichler-Zissernig E, Zur Nedden D, and Nothdurfter H, editors. *Human mummies: A global survey of their status and the techniques of conservation* New York: Springer-Verlag Wien GmbH. p 265-273.

- Bereuter TL, Werner M, and Reiter C. 1997. Iceman's mummification: implications from infrared spectroscopical and histological studies. *Chem-Eur J* 7(3):1032-1038.
- Berkeley RCW, and Campbell R. 1985. Nutrition and the influence of environmental factors on microbial activities. In: Hawker LE, and Linton AH, editors. *Microorganisms: Function, form and environment*. London: Edward Arnold. p 69 – 82.
- Boano R, Fulcheri E, Martina MC, Ferraris A, Grilletto R, Cremo R, Cesarani F, Gandini G, and Massa ER. 2009. Neural tube defect in a 4000-year-old Egyptian infant mummy: A case of meningocele from the museum of anthropology and ethnography of Turin (Italy). *Eur J Paediatr Neuro* 13(6):481-487.
- Buckley SA, and Evershed RP. 2001. Organic chemistry of embalming agents in Pharaonic and Graeco-Roman mummies. *Nature* 413(6858):837-841.
- Cabanes D, and Albert RM. 2011. Microarchaeology of a collective burial: Cova des Pas (Minorca). *J Archaeol Sci* 38:1119-1126.
- Cantor NL. 2010. *After we die: The life and times of the human cadaver*. Washington, D.C: Georgetown University Press. 372 p.

- Cañas R. 2012. Biological aspects of funeral ritual of the Cova des Pas (Talayotic, Minorca). Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona. 19 p.
- Carter DO, and Tibbett M. 2008. Soil analysis in forensic taphonomy: Chemical and biological effects of buried human remains. Boca Raton: CRC Press.
- Carter DO, Yellowlees D, and Tibbett M. 2007. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften* 94(1):12-24.
- Ciranni R, Castagna M, and Fornaciari G. 1999. Goiter in an eighteenth-century Sicilian mummy. *Am J Phys Anthropol* 108(4):427-432.
- Ciranni R, and Fornaciari G. 2004. Juvenile cirrhosis in a 16th century Italian mummy: Current technologies in pathology and ancient human tissues. *Virchows Archiv* 445(6):647-650.
- Clark MA, Worrell MB, and John P. 1997. Postmortem changes in soft tissues. In: Haglund WD, and Sorg MH, editors. *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains*. Boca Raton: CRC Press. p 151-164.
- Coe JI. 1993. Postmortem chemistry update: Emphasis on forensic application. *Am J Foren Med Path* 14(2):91-117.

- Cotton GE, Aufderheide AC, and Goldschmidt VG. 1987. Preservation of human tissue immersed for five years in fresh water of known temperature. *J Forensic Sci* 32(4):1125-1130.
- Chang BS, Uhm CS, Park CH, Kim HK, Lee GY, Cho HH, Chung YH, and Shin DH. 2006a. Ultramicroscopic study on the hair of newly found 15th century mummy in Daejeon, Korea. *Ann Anat* 188(5):439-445.
- Chang BS, Uhm CS, Park CH, Kim HK, Lee GY, Cho HH, Kim MJ, Chung YH, Song KW, Lim do S et al. . 2006b. Preserved skin structure of a recently found fifteenth-century mummy in Daejeon, Korea. *Journal of anatomy* 209(5):671-680.
- Dent BB, Forbes SL, and Stuart BH. 2004. Review of human decomposition processes in soil. *Environ Geol* 45:576–585.
- Denton J. 2008. Slices of mummy: A histologist's perspective. In: Dabid R, editor. *Egyptian mummies and modern science*. Cambridge: Cambridge University Press.
- DiMaio VJ, and DiMaio D. 2001. *Forensic pathology*. Boca Raton: CRC Press

- Dix J, and Graham M. 2000. Time of death, decomposition and identification: An atlas. Boca Raton: CRC Press 120 p.
- Eklektos N, Dayal MR, and Manger PR. 2006. A forensic case study of a naturally mummified brain from the Bushveld of South Africa. *J Forensic Sci* 51(3):498-503.
- Fiedler S, Buegger F, Klaubert B, Zipp K, Dohrmann R, Witteyer M, Zarei M, and Graw M. 2009. Adipocere withstands 1600 years of fluctuating groundwater levels in soil. *J Archaeol Sci* 36(7):1328-1333.
- Fiedler S, and Graw M. 2003. Decomposition of buried corpses with special reference to the formation of adipocere. *Naturwissenschaften* 90(7):291-300.
- Forbes SL, Dent BB, and Stuart BH. 2005a. The effect of soil type on adipocere formation. *Forensic Sci Int* 154(1):35-43.
- Forbes SL, Stuart BH, and Dent BB. 2002. The identification of adipocere in grave soils. *J Forensic Sci* 127(3):225-230.
- Forbes SL, Stuart BH, and Dent BB. 2005b. The effect of the burial environment on adipocere formation. *Forensic Sci Int* 154(1):24-34.

- Forbes SL, Stuart BH, and Dent BB. 2005c. The effect of the method of burial on adipocere formation. *Forensic Sci Int* 154(1):44-52.
- Forbes SL, Wilson MEA, and Stuart BH. 2011. Examination of adipocere formation in a cold water environment. *Int J Leg Med* 125(5):643-650.
- Fornaciari A, Giuffra V, and Pezzini F. 2010. Secondary burial and mummification practices in the Kingdom of the two Sicilies. *Mortality* 15(3):223-249.
- Fornaciari G, and Capasso L. 1996. Natural and artificial 13th-19th century mummies in Italy. In: Spindler K, Wilfing H, Rastbichler-Zissernig E, zur Nedden D, and Nothdurfter H, editors. *Human Mummies: A Global survey of their status and the techniques of conservation*. New-York: Springer-Verlag Wien. p 195-204.
- Fornaciari G, Marchetti A, Pellegrini S, and Ciranni R. 1999. K-ras mutation in the tumour of King Ferrante I of Aragon (1431-1494) and environmental mutagens at the Aragonese court of Naples. *Int J Osteoarchaeol* 9(5):302-306.

- Fornaciari G, Zavaglia K, Giusti L, Vultaggio C, and Ciranni R. 2003. Human papillomavirus in a 16th century mummy. *Lancet* 362(9390):1160.
- Frund HC, and Schoenen D. 2009. Quantification of adipocere degradation with and without access to oxygen and to the living soil. *Forensic Sci Int* 188(1-3):18-22.
- Fullola JM, Guerrero VM, Petit MA, Calvo M, Malgosa A, Armentano N, Arnau P, Cho S, Esteve X, Fadrique T et al. . 2007. La Cova del Pas (Ferrerries, Menorca): un avanç. *L'arqueologia a Menorca: Eina per al coneixement del passat*. Maó: Llibres del Patrimoni Històric i Cultural, Consell Insular de Menorca
- Galloway A. 1997. The process of decomposition: A model from the Arizona-Sonoran desert. In: Haglund WD, and Sorg MH, editors. *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains*. New York: CRC Press. p 139 – 150.
- Galloway A, Birkby WH, Jones AM, Henry TE, and Parks BO. 1989. Decay rates of human remains in an arid environment. *J Forensic Sci* 34(3):607-616.

- Gerszten PC, Gerszten E, and Allison MJ. 1997. Ultrastructure of a well-preserved lymphocyte from a mummified human. *J Electron Microscop* 46(5):443-445.
- Gill-King H. 1997. Chemical and ultrastructural aspects of decomposition. In: Haglund WD, and Sorg MH, editors. *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains*. Boca Raton: CRC Press. p 93-108.
- Grupe G, Schmid EM, and Soika J. 1997. Identification of medieval human soft tissue remains in an advanced state of decomposition. *Biotech Histochem* 72(3):135-140.
- Hart Hensen JP. 1998. Bodies from cold regions. In: Cockburn A, Cockburn E, and Reyman TA, editors. *Mummies, disease and ancient culture*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Haskell NH, Hall RD, Cervenka VJ, and Clark MA. 1997. On the body: Insects' life stage presence and their postmortem artifacts. In: Haglund WD, and Sorg MH, editors. *Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains*. New York: CRC Press. p 93-108.

- Hess MW, Klima G, Pfaller K, Kunzel KH, and Gaber O. 1998. Histological investigations on the Tyrolean ice man. *Am J Phys Anthropol* 106(4):521-532.
- Holz HA, Lloyd WC, Mannis MJ, and Aufderheide AC. 2007. Histopathologic findings in naturally preserved mummified human eyes. *Arch Ophthalmol* 125(7):978-981.
- Hoyle CHV, Thomas PK, Burnstock G, and Appenzeller O. 1997. Immunohistochemical localisation of neuropeptides and nitric oxide synthase in sural nerves from Egyptian mummies. *J Auton Nerv Syst* 67(1-2):105-108.
- Janaway RC, Wilson AS, Diaz GC, and Guillen S. 2009. Taphonomic changes to the buried body in arid environments: An experimental case study in Peru. In: Ritz K, Dawson L, and Miller D, editors. *Criminal and environmental soil forensics*. London: Springer Science. p 341-356.
- Janko M, Zink A, Gigler AM, Heckl WM, and Stark RW. 2010. Nanostructure and mechanics of mummified type I collagen from the 5300-year-old Tyrolean Iceman. *P Roy Soc B-Biol Sci* 277(1692):2301-2309.

- Jansen RJ, Poulus M, Taconis W, and Stoker J. 2002. High-resolution spiral computed tomography with multiplanar reformatting, 3D surface and volume rendering: A non-destructive method to visualize ancient Egyptian mummification techniques. *Comput Med Imaging Graph* 26(4):211-216.
- Karlik SJ, Bartha R, Kennedy K, and Chhem R. 2007. MRI and multinuclear MR spectroscopy of 3,200-year-old Egyptian mummy brain. *Am J Roentgenol* 189(2):W105-W110.
- Kim MJ, Oh CS, Lee IS, Lee H, Choi JH, Lim DS, Yi YS, Han WJ, Kim YS, Bok GD et al. . 2008. Human mummified brain from a medieval tomb with lime-soil mixture barrier of the Joseon Dynasty, Korea. *Int J Osteoarchaeol* 18(6):614-623.
- Lee Goff M. 2009. Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Exp Appl Acarol* 49(1-2):21-36.
- Liu C, Park HM, Monsalve MV, and Chen DDY. 2010. Free fatty acids composition in adipocere of the Kwaday Dan Ts'inchi ancient remains found in a glacier. *J Forensic Sci* 55(4):1039-1043.
- Lynnerup N. 2007. Mummies. *Am J Phys Anthropol Suppl* 45:162-190.

- Makristathis A, Schwarzmeier J, Mader RM, Varmuza K, Simonitsch I, Chavez JC, Platzer W, Unterdorfer H, Scheithauer R, Derevianko A et al. . 2002. Fatty acid composition and preservation of the Tyrolean Iceman and other mummies. *J Lipid Res* 43(12):2056-2061.
- Mann RW, Bass WM, and Meadows L. 1990. Time since death and decomposition of the human body - Variables and observations in case and experimental field studies. *J Forensic Sci* 35(1):103-111.
- Mant AK. 1987. Knowledge acquired from post-war exhumations. In: Boddington A, Garland AN, and Janaway RC, editors. *Death, decay and reconstruction: approaches to archaeology and forensic science*. Manchester: Manchester University Press. p 65–78.
- Mant AK, and Furbank R. 1957. Adipocere - A review. *J Forensic Med* 4:18-35.
- Mayer BX, Reiter C, and Bereuter TL. 1997. Investigation of the triacylglycerol composition of Iceman's mummified tissue by high-temperature gas chromatography. *J Chromatogr B* 692(1):1-6.

- McVaugh MR. 1986. The births of the children of Jaime II. (6):7-16.
- Mekota AM, Grupe G, Zimmerman MR, and Vermehren M. 2005. First identification of an ancient Egyptian mummified human placenta. *Int J Osteoarchaeol* 15(1):51-60.
- Mekota AM, and Vermehren M. 2005. Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues. *Biotech Histochem* 80(1):7-13.
- Mellen PF, Lowry MA, and Micozzi MS. 1993. Experimental observations on adipocere formation. *J Forensic Sci* 38(1):91-93.
- Micozzi MS. 1986. Experimental study of postmortem change under field conditions: Effects of freezing, thawing, and mechanical injury. *J Forensic Sci* 31(3):953-961.
- Micozzi MS. 1991. Postmortem change in human and animal remains: A systematic approach Springfield: Charles Thomas.
- Micozzi MS. 1997. Frozen environments and soft tissue preservation. In: Haglund WD, and Sorg MH, editors. *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*. Boca Raton CRC Press. p 171-180.

- Miquel M, Subiranas C, and Sarobe R. 2015. El Panteó Reial de Santes Creus: Estudi i restauració de les tombes dels Reis Pere El Gran, Jaume II i Blanca d'Anjou i de l'almirall Roger de Llúria. Barcelona: Museu d'Història de Catalunya (en premsa).
- Monsalve MV, Humphrey E, Walker DC, Cheung C, Vogl W, and Nimmo M. 2008. Brief Communication: State of preservation of tissues from ancient human remains found in a glacier in Canada. *Am J Phys Anthropol* 137(3):348-355.
- Montuenga Badia L, Sesma Egozcue P, and Calvo González A. 2009. Introducción histórica a la biología celular y a la histología. In: Montuenga Badia L, Esteban Ruiz FJ, and Calvo González A, editors. *Técnicas en Histología y en Biología celular*. Barcelona: Elsevier Masson. p 392.
- Nerlich AG, Parsche F, Wiest I, Schramel P, and Lohrs U. 1995. Extensive pulmonary haemorrhage in an Egyptian mummy. *Virchows Archiv* 427(4):423-429.
- Nordin NM, Fen CK, Isa S, and Symonds EM. 2006. Is grandmultiparity a significant risk factor in this new millennium? *MJMS* 13(2):52-60.

- Notter SJ, Stuart BH, Rowe R, and Langlois N. 2009. The initial changes of fat deposits during the decomposition of human and pig remains. *J Forensic Sci* 54(1):195-201.
- O'Brien TG, and Kuehner AC. 2007. Waxing grave about adipocere: Soft tissue change in an aquatic context. *J Forensic Sci* 52(2):294-301.
- O'Connor S, Ali E, Al-Sabah S, Anwar D, Bergstrom E, Brown KA, Buckberry J, Buckley S, Collins M, Denton J et al. . 2011. Exceptional preservation of a prehistoric human brain from Heslington, Yorkshire, UK. *J Archaeol Sci* 38(7):1641-1654.
- Ordi J, Alonso PL, de Zulueta J, Esteban J, Velasco M, Mas E, Campo E, and Fernandez PL. 2006. The severe gout of holy roman Emperor Charles V. *N Engl J Med* 355(5):516-520.
- Ottini L, Falchetti M, Marinozzi S, Angeletti LR, and Fornaciari G. 2011. Gene-environment interactions in the pre-Industrial Era: The cancer of King Ferrante I of Aragon (1431-1494). *Hum Pathol* 42(3):332-339.

- Pabst M, and Hofer F. 1998a. Deposits of different origin in the lungs of the 5,300-year-old Tyrolean Iceman. *Am J Phys Anthropol* 107(1):1-12.
- Pabst M, and Hofer F. 1998b. Deposits of different origin in the lungs of the 5,300-year-old Tyrolean Iceman. *Am J Phys Anthropol* 107(1):1-12.
- Papageorgopoulou C, Rentsch K, Raghavan M, Hofmann MI, Colacicco G, Gallien V, Bianucci R, and Ruhli F. 2010. Preservation of cell structures in a medieval infant brain: a paleohistological, paleogenetic, radiological and physico-chemical study. *NeuroImage* 50(3):893-901.
- Papageorgopoulou C, Shved N, Wanek J, and Ruhli FJ. 2015. Modeling ancient Egyptian mummification on fresh human tissue: macroscopic and histological aspects. *Anat Rec (Hoboken)* 298(6):974-987.
- Papageorgopoulou C, Xirotiris NI, Iten PX, Baumgartner MR, Schmid M, and Ruhli F. 2009. Indications of embalming in Roman Greece by physical, chemical and histological analysis. *J Archaeol Sci* 36(1):35-42.

- Peck WH. 1983. Mummies of ancient Egypt. In: Cockburn A, Cockburn E, and Reyman TA, editors. Mummies, disease and ancient cultures. Cambridge: Cambridge University Press. p 15 - 37.
- Pernter P, Gostner P, Vigl EE, and Ruhli FJ. 2007. Radiologic proof for the Iceman's cause of death (ca.5'300 BP). *J Archaeol Sci* 34(11):1784-1786.
- Pfeiffer S, Milne S, and Stevenson RM. 1998. The natural decomposition of adipocere. *J Forensic Sci* 43(2):368-370.
- Rabino-Massa E, and Chiarelli B. 1972. The histology of naturally desiccated and mummified bodies. *J Hum Evol* 1(3):259-260.
- Radanov S, Stoev S, Davidov M, Nachev S, Stanchev N, and Kirova E. 1992. A unique case of naturally-Occurring mummification of human brain tissue. *Int J Legal Med* 105(3):173-175.
- Reverte Coma JM. 1999. *Antropología forense*. Madrid: Ministerio de Justicia. Secretaría General Técnica. 1055 p.
- Rogers CJ. 2010. *Dating death: Forensic taphonomy and the postmortem interval*. Wolverhampton: University of Wolverhampton.

- Roman H, Robillard PY, Verspyck E, Hulseley TC, Marpeau L, and Barau G. 2004. Obstetric and neonatal outcomes in grand multiparity. *Obstet Gynecol* 103(6):1294-1299.
- Ruffer MA. 1909. Preliminary note on the histology of Egyptian mummies. *Brit Med J* 1909:1005-1005.
- Sandison AT. 1955. The histological examination of mummified material. *Biotech Histochem* 30(6):277-283.
- Sandison AT. 1963. The use of natron in mummification in ancient Egypt. *Journal of Near Eastern Studies* 22(4).
- Sandison AT. 1966. Reconstitution of dried-up tissue specimens for histological examination. *J Clin Pathol* 19(5):522-523.
- Schotsmans EMJ, de Voorde WV, De Winne J, and Wilson AS. 2011. The impact of shallow burial on differential decomposition to the body: A temperate case study. *Forensic Sci Int* 206(1-3):E43-E48.
- Schotsmans EMJ, Denton J, Dekeirsschieter J, Ivaneanu T, Leentjes S, Janaway RC, and Wilson AS. 2012. Effects of hydrated lime and quicklime on the decay of buried human remains using pig cadavers as human body analogues. *Forensic Sci Int* 217(1-3):50-59.

- Seidler H, Bernhard W, Teschlernicola M, Platzer W, Nedden DZ, Henn R, Oberhauser A, and Sjøvold T. 1992. Some anthropological aspects of the prehistoric Tyrolean Iceman. *Science* 258(5081):455-457.
- Shechter Y, Levy A, Wiznitzer A, Zlotnik A, and Sheiner E. 2010. Obstetric complications in grand and great grand multiparous women. *J Matern Fetal Neonatal Med* 23(10):1211-1217.
- Shin DH, Youn M, and Chang BS. 2003. Histological analysis on the medieval mummy in Korea. *Forensic Sci Int* 137(2-3):172-182.
- Shynlova O, Kwong R, and Lye SJ. 2010. Mechanical stretch regulates hypertrophic phenotype of the myometrium during pregnancy. *Reproduction* 139(1):247-253.
- Shynlova O, Mitchell JA, Tsampalieros A, Langille BL, and Lye SJ. 2004. Progesterone and gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium. *Biol Reprod* 70(4):986-992.
- Sokiranski R, Pirsig W, Richter HP, and Nerlich AG. 2011. Unique paleopathology in a pre-Columbian mummy remnant from

- Southern Peru-severe cervical rotation trauma with subluxation of the axis as cause of death. *Acta Neurochir* 153(3):609-616.
- Spindler K. 2004. *The Man in the Ice: The discovery of a 5000-Year-Old body reveals the secrets of the Stone Age*. New York: Harmony Books.
- Takatori T. 2001. The mechanism of human adipocere formation. *Legal medicine (Tokyo, Japan)* 3(4):193-204.
- Tkocz DL, Bytzer P, and Bierring F. 1979. Preserved brain in medieval skull. *Am J Phys Anthropol* 51:197-202.
- Tsikouras P, Dafopoulos A, Vrachnis N, Iliodromiti Z, Bouchlariotou S, Pinidis P, Tsagias N, Liberis V, Galazios G, and Von Tempelhoff GF. 2014. Uterine prolapse in pregnancy: risk factors, complications and management. *J Matern Fetal Neonatal Med* 27(3):297-302.
- Ubelaker DH, and Zarenko KM. 2011. Adipocere: What is known after over two centuries of research. *Forensic Sci Int* 208(1-3):167-172.
- Van Strydonck M, Boudin M, Guerrero VM, Calvo M, Fullola JM, and Petit MA. 2010. The necessity of sample quality assessment in (14)C

- AMS dating: The case of Cova des Pas (Menorca - Spain). *Nucl Instrum Meth B* 268(7-8):990-994.
- Varmuza K, Makristathis A, Schwarzmeier J, Seidler H, and Mader RM. 2005. Exploration of anthropological specimens by GC-MS and chemometrics. *Mass Spectrom Rev* 24(3):427-452.
- Vass AA. 2001. Beyond the grave: Understanding human decomposition. *Microbiol Today* 28:190-192.
- Vass AA. 2011. The elusive universal post-mortem interval formula. *Forensic Sci Int* 204(1-3):34-40.
- Ventura L, Urbani V, Di Franco M, Mercurio C, and Fornaciari G. 2009. Paleohistologic findings in the left eye of Maria d'Aragona (1503-1568). *Virchows Archiv* 455:440-441.
- Wang BH. 1996. Excavation and preliminary studies of the ancient mummies of Xinjiang in China. In: Spindler K, Wilfing H, Rastbichler-Zissernig E, zur Nedden D, and Nothdurfer H, editors. *Human Mummies: A global survey of their status and the techniques of conservation*. New York: Springer. p 59 - 71.
- Wilson-Taylor RJ. 2013. Time since death estimation and bone weathering: The postmortem interval. In: Tersigni-Tarrant MA,

and Shirley NR, editors. *Forensic Anthropology*. Boca, Raton: CRC Press. p 339-380.

Woessner JF, and Brewer TH. 1963. Formation and Breakdown of Collagen and Elastin in the Human Uterus during Pregnancy and Post-Partum Involution. *Biochem J* 89(1): 75–82.

Yan F, McNally R, Kontanis EJ, and Sadik OA. 2001. Preliminary quantitative investigation of postmortem adipocere formation. *J Forensic Sci* 46(3):609-614.

Zimmerman MR, and Gleeson M. 2015. PUM I revisited: Tradeoffs in preservation and discovery. *Anat Rec (Hoboken)* 298(6):949-953.

ANEXO

El estudio histológico de tejidos preservados en distintas condiciones y épocas ha permitido la realización de un atlas paleohistológico que pueda ser usado para el diagnóstico de tejidos antiguos o de casos forenses. Los tejidos proceden de zonas anatómicas definidas por lo que son muestras indubitadas, lo que permite su uso como elemento de comparación.

Las preparaciones histológicas se han realizado bajo las mejores condiciones de hidratación, fijación y tinción (V. capítulo 1 de resultados) y se han clasificado en función del tipo de tejido. Cuando ha sido posible se han incluido distintos tipos de preservación.

Para cada tejido, se describe la morfología macroscópica, y los diversos cortes histológicos con la descripción de la microestructura.

Piel

En general la piel macroscópicamente es una capa de un grosor medio teniendo las capas externas una dureza mayor. Es de textura dura pero con cierta flexibilidad. La coloración puede variar desde un color más pardo hasta un color marrón claro. Habitualmente se puede diferenciar la parte externa que es más dura, de la interna que es más oscura y esponjosa (Fig. 1).



Fig. 1. Imágenes macroscópicas de la piel. 1. Momia Qarara (s. IV-VIII) 2. Blanca de Anjou (s. XIV)

En las micrografías (Fig. 2) se observan las dos capas de la piel, la epidermis (a) y la dermis (b). En estos casos la epidermis se presenta como una capa que ha perdido parte de su grosor característico, con una coloración más intensa que la dermis y con tendencia a la basofilia. Habitualmente no se pueden diferenciar los distintos estratos que la forman, pero en algún caso el estrato córneo se ha preservado (Fig. 2.1.) viéndose como una capa homogénea, gruesa y que se distribuye laminarmente. Es habitual que se observe una separación entre la epidermis y la dermis debido a los fenómenos tafonómicos, en el caso de la figura 2.2 por la abundancia de hongos. La dermis es un tejido conectivo y que se organiza paralelamente y con una coloración más pálida que la epidermis.

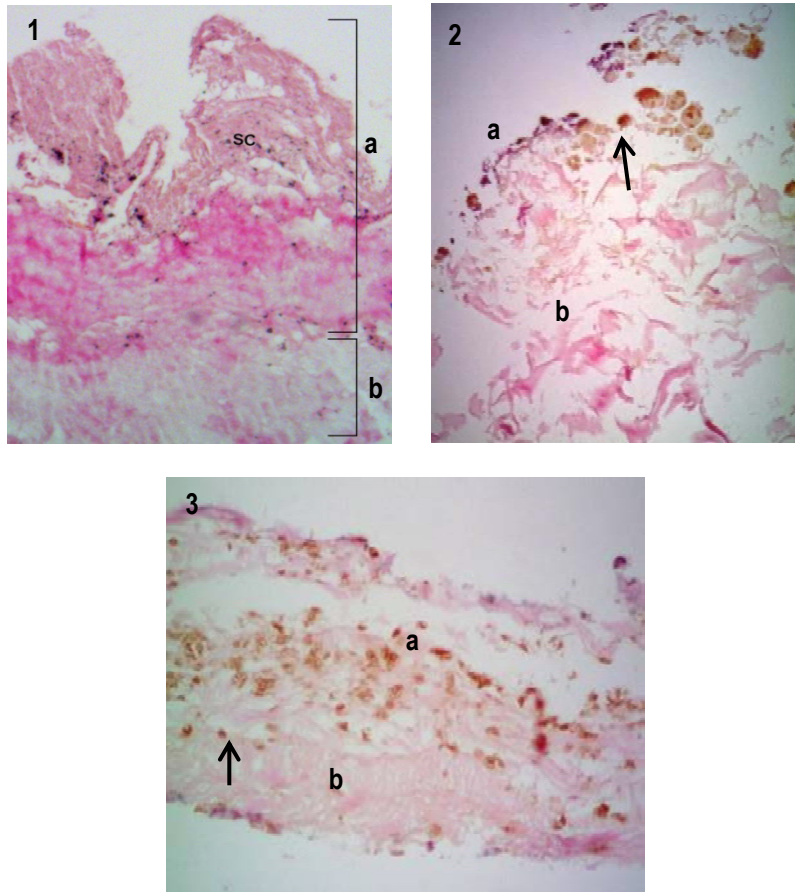


Fig. 2. Microfotografía de piel desecada. Se aprecian las dos capas de la piel la epidermis (a) y la dermis (b). **1.** Se conserva la capa cornea (SC) mientras que el resto de capas epidérmicas no son reconocibles (H-E 50x) (Momia Qarara s. IV-VIII) **2.** Se observa una dermis muy desestructurada. Las flechas indican los hongos (H-E 200x) (Blanca de Anjou s. XIV). **3.** Las flechas muestran pigmentos cadavéricos (H-E 200x) (Blanca de Anjou s. XIV)

La piel que ha sufrido saponificación macroscópicamente se observa como una pieza multicapa de un grosor medio, pero más quebradiza que las que han sufrido desecación. También se pueden apreciar que las capas exteriores presentan textura rígida con una coloración más oscura, mientras que las interiores son granuladas y más claras (Fig.3).



Fig. 3. Imágenes macroscópicas de piel saponificada (Pedro III s.XIII)

Histológicamente, se observan también las dos capas principales. La epidermis presenta una coloración eosinofílica y más intensa y, al igual que los tejidos desecados, no se pueden diferenciar los distintos estratos que la forman. La dermis presenta una coloración marrón, probablemente debido a una mala conservación de las estructuras como el colágeno o las fibras elásticas (Fig. 4).

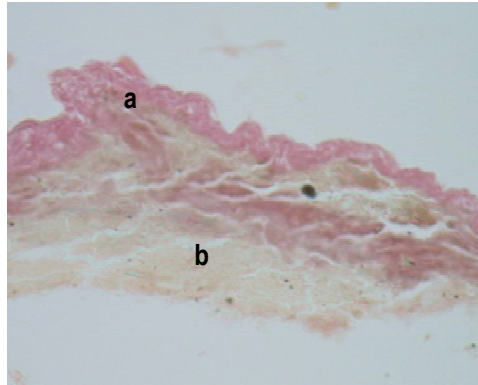


Fig. 4. Microfotografía de la piel saponificada (Pedro III s.XIII). Se observan las dos capas de la piel; la epidermis (a) y la dermis (b) (H-E 50x)

Encéfalo

Meninges

En el interior del cráneo se pueden conservar restos de tejido blando como láminas finas y quebradizas adheridas a la parte interna declive (Fig. 5.1). La histología revela que se trata de tejido conectivo denso y sin vestigios de parénquima cerebral (Fig. 5.2).

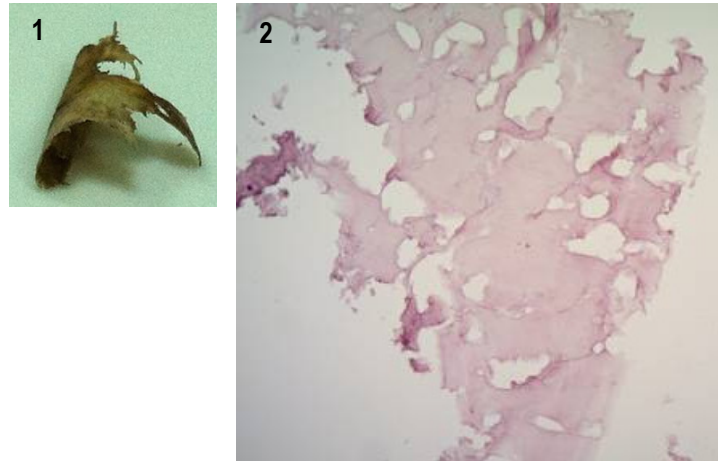


Fig. 5. 1. Lámina adherida a la parte interna del cráneo (Blanca de Anjou s. XIV). 2. Microfotografía de la duramadre (Blanca de Anjou s. XIV). Se trata de un tejido conectivo denso sin zonas del tejido reticular típico del sistema nervioso (H-E 50x)

Encéfalo

Presente en forma de masas amorfas, quebradizas que se disponen en las partes declives del cráneo. La morfología en este caso es variable; existen casos en los que puede ser muy compacta y dura y con una coloración negruzca (Fig. 6.1), o pueden tratarse de muestras granuladas, que se fragmenten con facilidad y con una coloración más clara (Fig. 6.2). El denominador común es una masa gruesa y amorfa.

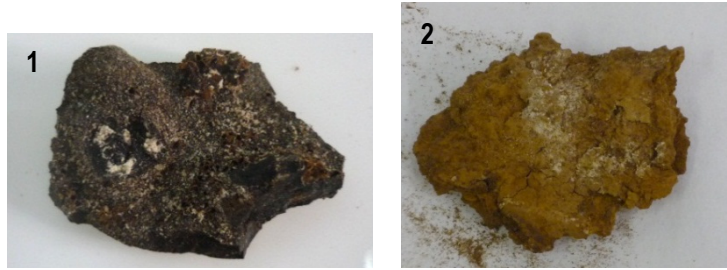


Fig. 6. Imagen macroscópica de las masas encefálicas 1. Pedro III (s. XIII). 2. Individuo 1 Cova des Pas (900-8000 cal BC)

Histológicamente se trata de un tejido en forma de malla reticular eosinofílica con dos zonas diferenciadas. Una más compacta y otra que presenta abundantes espacios vacíos redondeados de unas 20-40 micras que son los espacios donde se localizaban las neuronas, y por lo que se trata del córtex cerebral (Fig. 7.1 y 7.2). En ciertas ocasiones se observan un cromatismo marrón que podrían corresponder a restos de pigmentación neuronal (Fig. 7. 3).

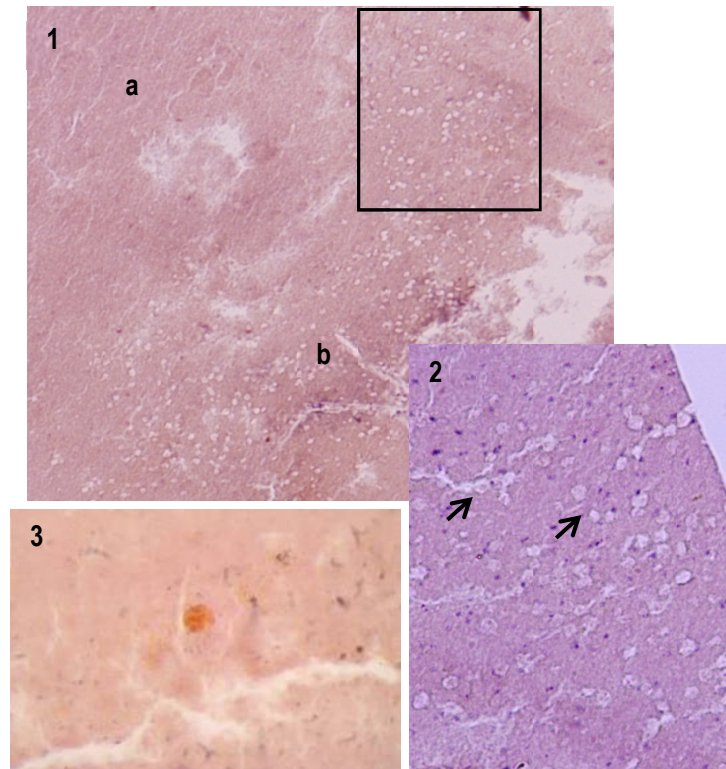


Fig.7. Microfotografía de masa encefálica individuo 1 de la Cova des Pas (900-8000 cal BC). 1. Se muestra una estructura en forma de malla reticular homogénea y eosinofílica con una zona más compacta (a) y otra con espacios redondeados (b) que podrían corresponder a espacios neuronales (40x H-E) **2.** Ampliación de la zona donde se encuentran los espacios neuronales (400x H-E) **3.** Microfotografía de la zona de pigmentación (1000x H-E)

La arquitectura tisular que se observa en el tejido cerebral de un cadáver en un estado de descomposición inicial (Fig. 8) es similar con las muestras antiguas; una malla reticular eosinofílica con las dos zonas diferenciadas (Fig. 8.1). En este caso reciente las neuronas no se habían destruido (Fig. 8.2), y se observa un halo que rodea las neuronas. Por lo tanto los espacios redondeados hallados en las muestras antiguas son compatibles con estos halos.

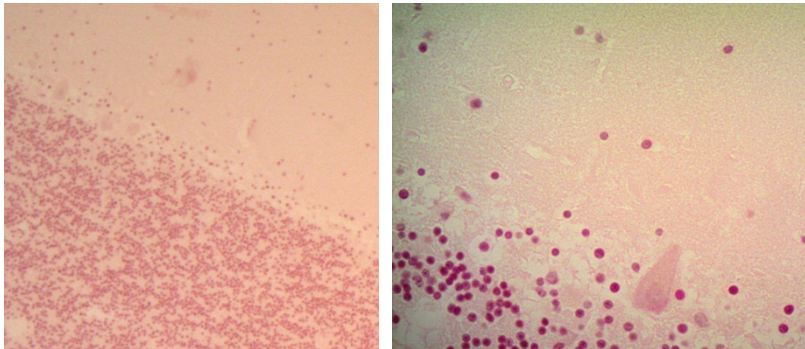


Fig. 8. Microfotografía de masa encefálica de un cadáver en estado inicial de descomposición. 1. Se observan dos zonas una más homogénea (a) y otra con espacios neuronales (b) (40x H-E). **2.** Detalle de la zona donde se encuentran los espacios neuronales, nótese el halo alrededor de la neurona (400x H-E)

Saco dural

Macroscópicamente se presenta como un cilindro constituido por una pared fibrosa, sólida y fina y en el interior se observa un tejido más esponjoso (Fig. 9).

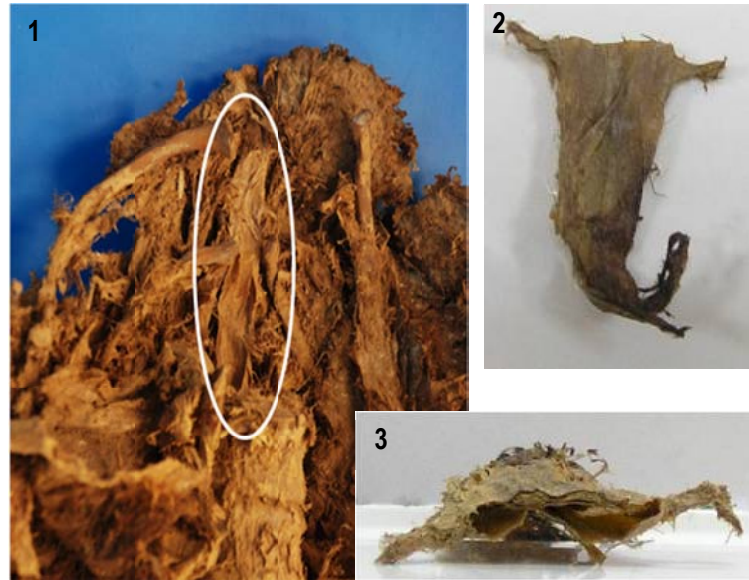


Fig. 9. Imagen macroscópica del saco dural (Blanca de Anjou s. XIV) 1. Vista anterior de la zona torácica dorsal donde se observan las vertebres D10-D12. El ovalo señala la localización de la muestra obtenida. **2-3.** Detalle del saco dural que se presenta como una pared fibrosa y en el interior una zona más esponjosa

La paleohistología muestra tres estructuras muy diferenciadas (Fig 10), la zona más externa que correspondería al tejido conectivo

denso de la duramadre que se tiñe con un color intenso en las dos tinciones (Fig. 11.1 y 11.2). Bajo ella se observa un tejido conjuntivo laxo correspondiente a la aracnoides (Fig. 11.2).

A diferencia de la duramadre, la aracnoides se tiñe de un color verde intenso (Masson), indicando que la preservación de esta capa es mejor. Finalmente se observa una zona más interna que se trata el tejido nervioso con su malla reticulada eosinofílica y coloración característica. (Fig. 10 y 11)

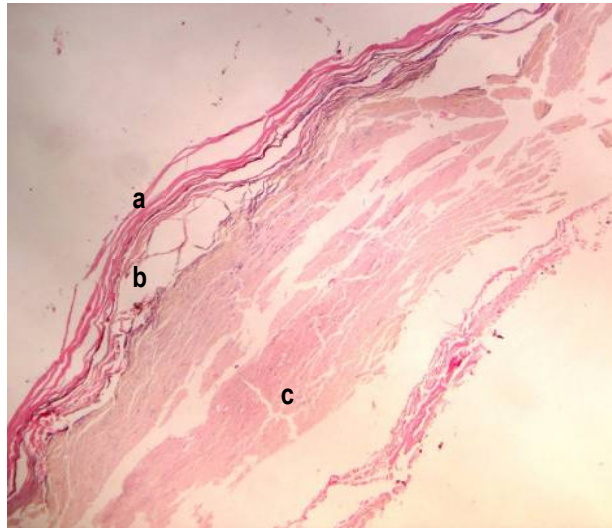


Fig 10. Microfotografía del saco dural (Blanca de Anjou s. XIV). Se observan las tres estructuras bien diferenciadas la duramadre (a), la aracnoides (b) y el parénquima cerebral (c) (H-E 40x)

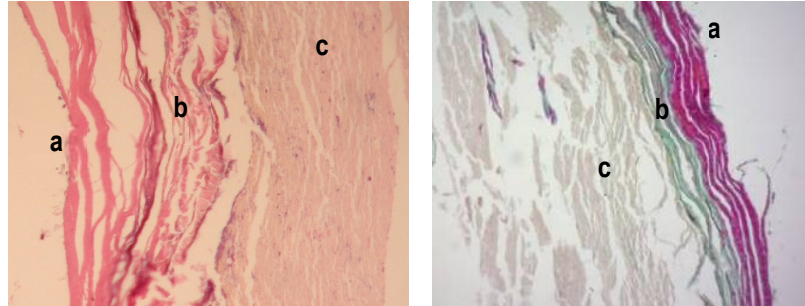


Fig. 11. Microfotografía del saco dural (Blanca de Anjou s. XIV). 1. Detalle de las capas del saco dural (H-E 400x): 1: duramadre, 2: aracnoides; 3: parénquima nervioso 2. Detalle de las capas del saco dural (H-E 400x): 1: duramadre, 2: aracnoides; 3: tejido nervioso (TR 200x)

Nervio óptico

Macroscópicamente el nervio óptico desecado queda a una vaina fibrosa y consistente (Fig. 12.1). En la microfotografía se aprecia el epineuro (Fig. 12.2), es decir la capa más externa del nervio que está constituida por tejido conectivo de disposición longitudinal. Además se pueden observar las fascias más pequeñas del nervio que es encuentran

rodeadas por el perineuro, la capa concéntrica de tejido conjuntivo que envuelve las fascias nerviosas (Fig 12. 3).

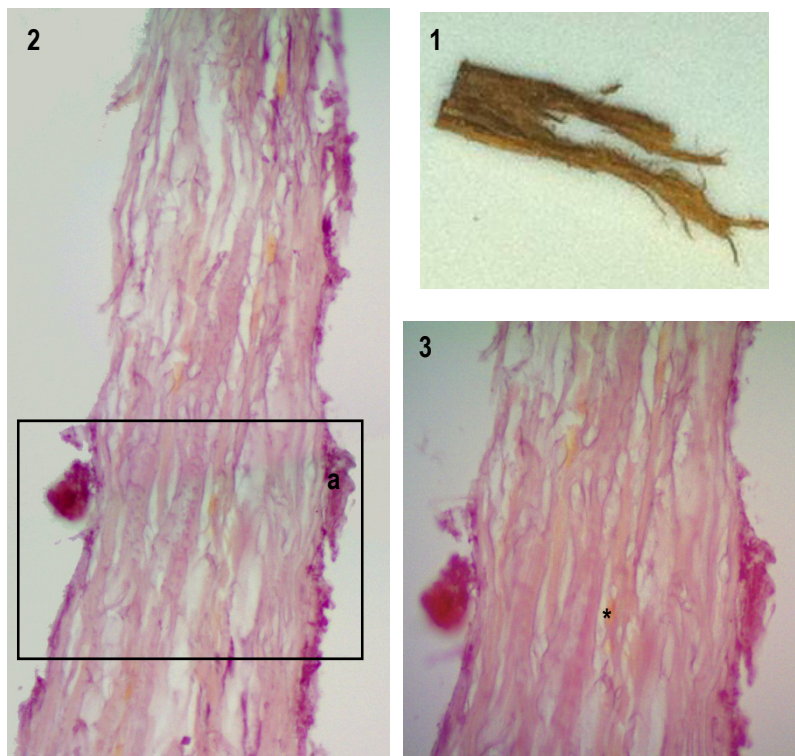


Fig. 12. 1. Imagen macroscópica del nervio óptico (Blanca de Anjou s. XIV)
2-3. Micrografías del nervio óptico (Blanca de Anjou s. XIV) 2. S observa el epineuro que es una vaina de tejido conectivo denso que envuelve el nervio (a) (H-E 400x). 3. Ampliación que muestra las fascias de fibras nerviosas con los vestigios de fibras reticulares que presentan una coloración anaranjada correspondiente al perineuro (*) (H-E 630x)

Globo ocular

Macroscópicamente los globos oculares de tejido desecado se colapsan y quedan reducidos (Fig. 13). Son estructuras de paredes finas y frágiles.



Fig. 13. Región frontal donde se observan los dos globos oculares (Blanca de Anjou s. XIV)

En la preparación histológica se observan vestigios de tejido epitelial de grosor irregular y una coloración basófila. (Fig. 14.1). Por debajo, aparece un tejido conectivo laxo con una disposición regular de las fibras de colágeno que forma el estroma de la esclerótica (Fig.14.2).

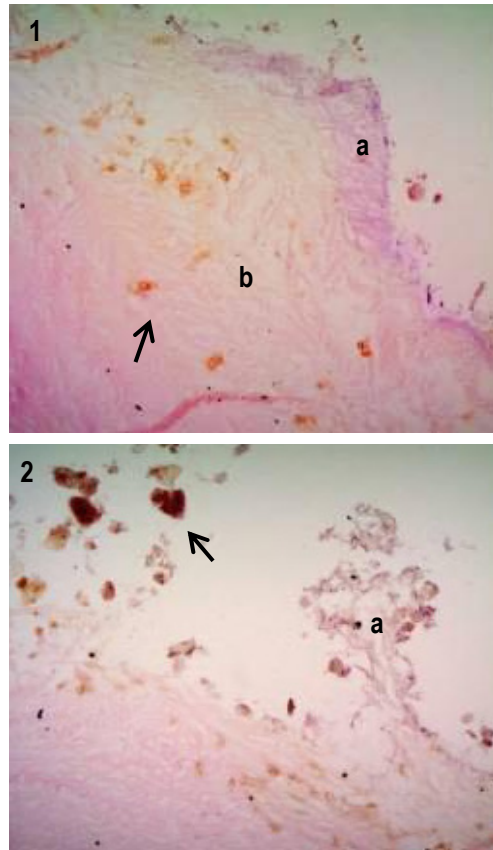


Fig. 14. Microfotografías del globo ocular (Blanca de Anjou s. XIV). 1. Se observan las dos capas, vestigios de tejido epitelial con una coloración basófila (a), y debajo tejido conectivo laxo que corresponde a la esclerótica (b). Las flechas muestran la contaminación por hongos (H-E 200x). 2. Detalle del tejido epitelial (a).Las flechas muestran estructuras corpusculares correspondientes a pigmentos cadavéricos (H-E 200x)

En otras ocasiones se aprecia un tejido conjuntivo laxo en el que las fibras de colágeno se organizan paralelamente. Además hay dos zonas diferenciadas, la parte superior que es más compacta (a), y la inferior con una zona más laxa (b). Esta disposición corresponde a la zona intermedia entre la córnea (transparente) y la esclerótica (fibrosa y opaca). En la parte superior se observa una zona más basófila que se podría confundir con tejido epitelial, pero es trata de depósitos de calcio de origen tafonómico.

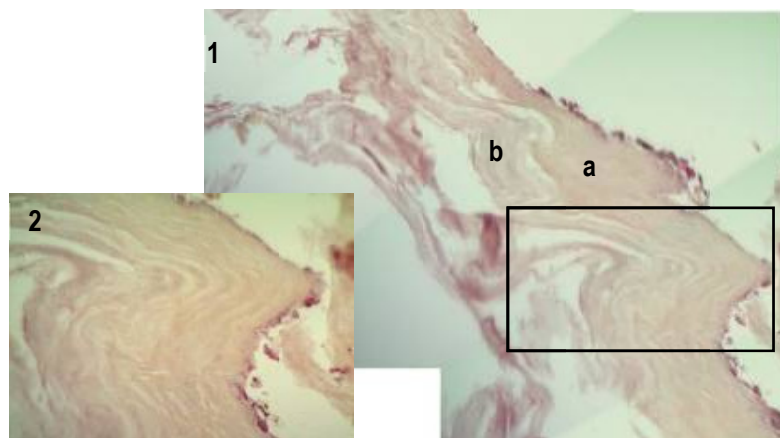


Fig. 15. Composición de microfotografías del globo ocular (Blanca de Anjou s. XIV) 1. Tejido conjuntivo con fibras paralelas de colágeno. La parte superior (a) es más densa mientras que la inferior (b) es laxa (H-E 50x). **2.** Detalle del tejido conjuntivo (H-E 200x)

Glándula mamaria

En el estudio macroscópico de las mamas se observan dos capas, una capa externa dura (Fig. 16.1) correspondiente a tejido cutáneo, y una cara interna que muestra un tejido de aspecto esponjoso, blando y con forma de panal de abeja (16.2 y 16.3).

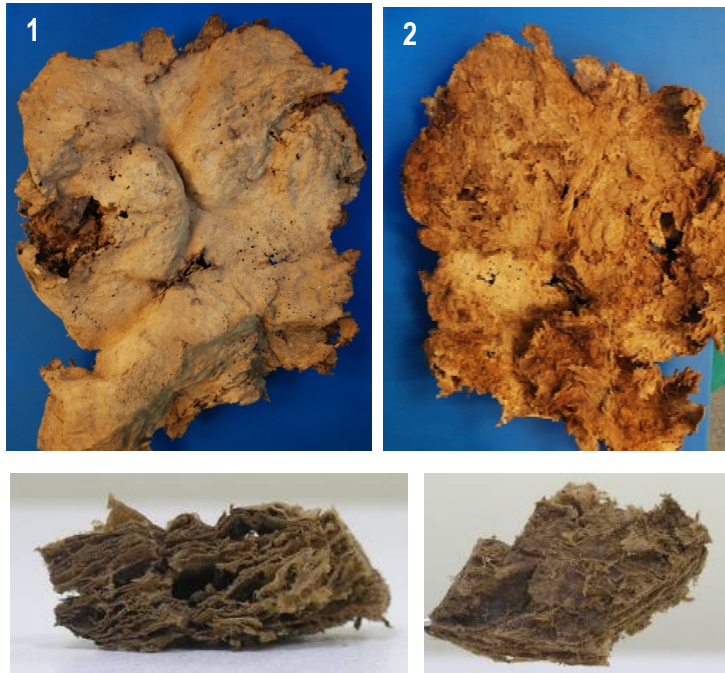


Fig. 16. Imagen macroscópica de las mamas (Blanca de Anjou s. XIV). 1. Cara externa. 2. Cara interna. 3. Sección perpendicular de la región mamaria con aspecto esponjoso, blando e internamente en forma de panal de abeja

El análisis histológico muestra dos tipos de tejido (Fig. 17). Por una parte una abundante proporción de tejido conectivo laxo de soporte con una coloración eosinófila y con cierta desestructuración, y por otra zonas con vestigios de tejido epitelial que se tiñen de color basófilo (Fig. 17.1). También se pueden observar restos de tejido adiposo con una coloración pálida y con forma de panal de abejas (Fig. 17.2).

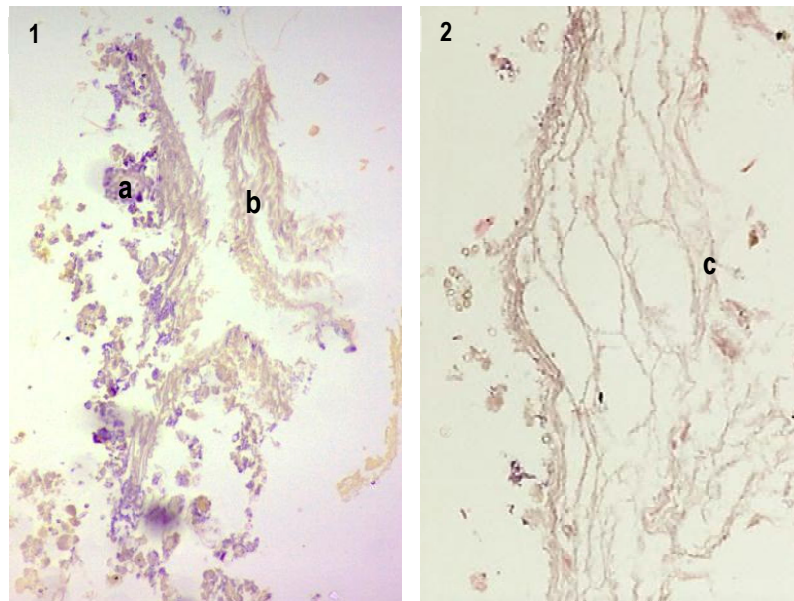


Fig. 17. Microfotografías del tejido mamario (Blanca de Anjou s. XIV). 1. Se aprecian dos tipos de tejidos, vestigios de tejido epitelial con una coloración más basófila (a) y tejido conectivo de soporte (b) (H-E 200x). 2. Se observa el tejido adiposo en forma de panal de abejas (c) con una coloración pálida

Intestino grueso

Macroscópicamente el intestino grueso se reconoce como una lámina fibrosa muy fina (Fig. 18). En las preparaciones histológicas se reconocen las diferentes capas que constituyen el intestino grueso. Se aprecian los vestigios de la capa epitelial que con una coloración más basófila típica de las mucosas. Inmediatamente por debajo se observa la lámina de muscular de la mucosa que se presenta como una capa eosinofílica, incluso en ocasiones se pueden ver haces longitudinales. Las capas inmediatamente inferiores están más desestructuradas, pero aun así se puede reconocer el tejido conjuntivo laxo que forma la submucosa y la túnica muscular externa. (Fig. 19).



Fig. 18. Sección del intestino grueso (Blanca de Anjou s. XIV). Se observa una lámina fibrosa y muy fina

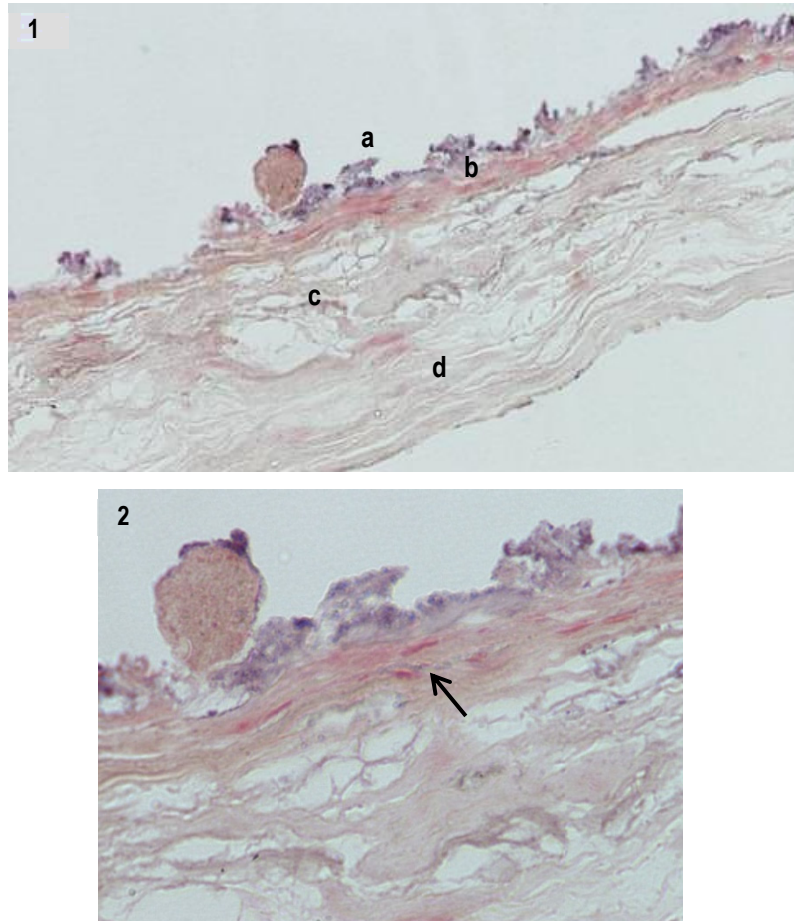


Fig. 19. Microfotografía del tejido intestinal (Blanca de Anjou s. XIV). 1. Se observan las distintas capas a) vestigios de la mucosa; b) muscular de la mucosa; c) submucosa d) posible musculatura externa (H-E 200x) **2.** Detalle de los restos de tejido epitelial, la flecha muestra los haces de la capa muscular (H-E 400x)

Útero

El estudio macroscópico del útero muestra un tejido muy duro y con un grosor considerable. Está formado por multicapas, presentando la externa y la interna un grosor mayor que el resto (Fig. 20).



Fig. 20. Imagen macroscópica del útero (Blanca de Anjou s. XIV). 2. Detalle del tejido uterino en el que se observa un entramado de varias capas compactadas y de una gran dureza

La histología muestra un que se trata de un tejido muscular liso (Fig. 21.1) con distintas zonas; la zona más externa presenta unas fibras más laxas o con espacios entre ellas, a diferencia de la interna que

presenta más compactación. Si se observa en detalle la zona más laxa (Fig. 21.3) se aprecia que la musculatura presenta espacios dispersos por la malla llenos de una sustancia que tiene afinidad por la hematoxilina y que en la tinción de Masson adquiere una coloración típica de tejido conjuntivo.

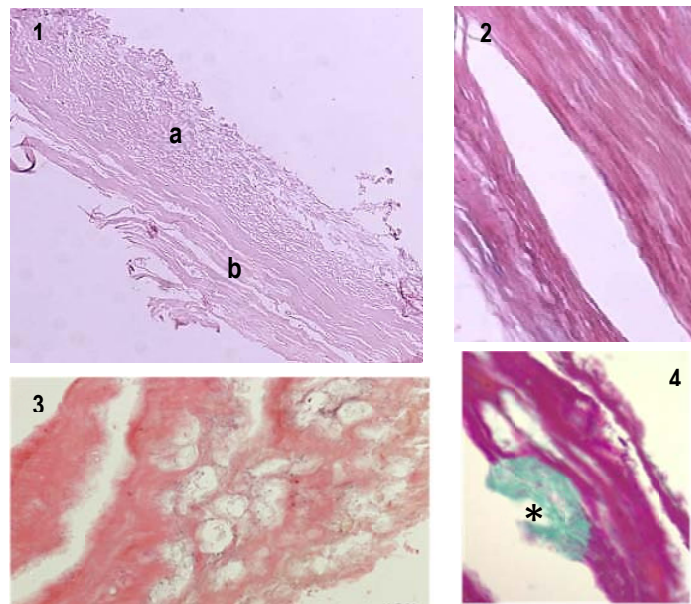


Fig. 21. Microfotografías del miometrio (Blanca de Anjou s. XIV). 1. Se aprecia una zona más irregular (a) y otra más compacta (b) (H-E 40x). 2. Detalle de la zona compacta donde se aprecia la morfología típica del tejido muscular liso (H-E 400x). 3. Detalle de la zona irregular que muestra los espacios rellenos de restos de colágeno (H-E 200x). 4. Detalle de los espacios rellenos de con colágeno (TR 400x)

Pulmón

Macroscópicamente el pulmón se presenta como una masa amorfa y gruesa debido al colapso. Además se pueden diferenciar las capas externas, con una coloración más pálida respecto de la interna que es densa y oscura. La textura es quebradiza esponjosa y frágil (Fig. 22).

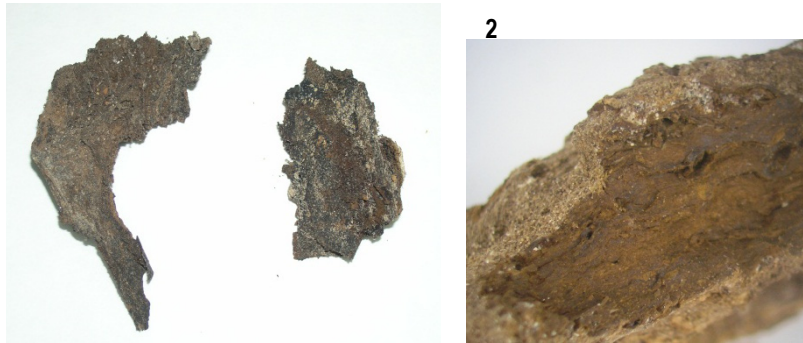


Fig. 22. Imagen macroscópica del pulmón. 1. El pulmón es amorfo y con una coloración oscura (Pedro III s. XIII). 2. Se observa el grosor y que se pueden diferenciar las partes internas de las exteriores (Individuo 2 Cova des Pas 900-8000 cal BC)

Histológicamente se observa como una estructura circular con una pared delgada (Fig. 23). Las paredes presentan una coloración eosinófila y a toda la muestra presenta abundantes depósitos negros en el interior de las paredes correspondientes a partículas de carbón

(antracosis). Si observamos en detalle se pueden apreciar restos de estructuras alveolares con unas paredes finas de tejido conectivo un espacio colapsado en mayor o menor grado.

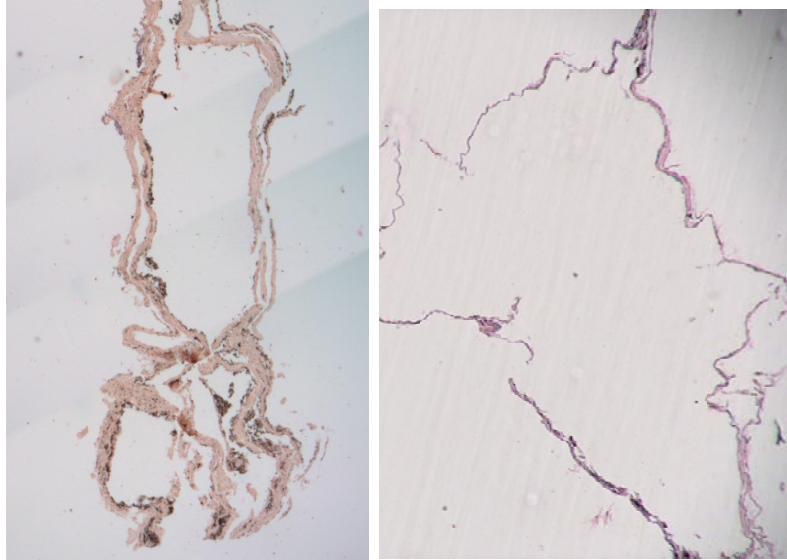


Fig. 23. Micrografía del pulmón (Pedro III s. XIII). El pulmón se presenta como una estructura circular con las paredes más o menos finas



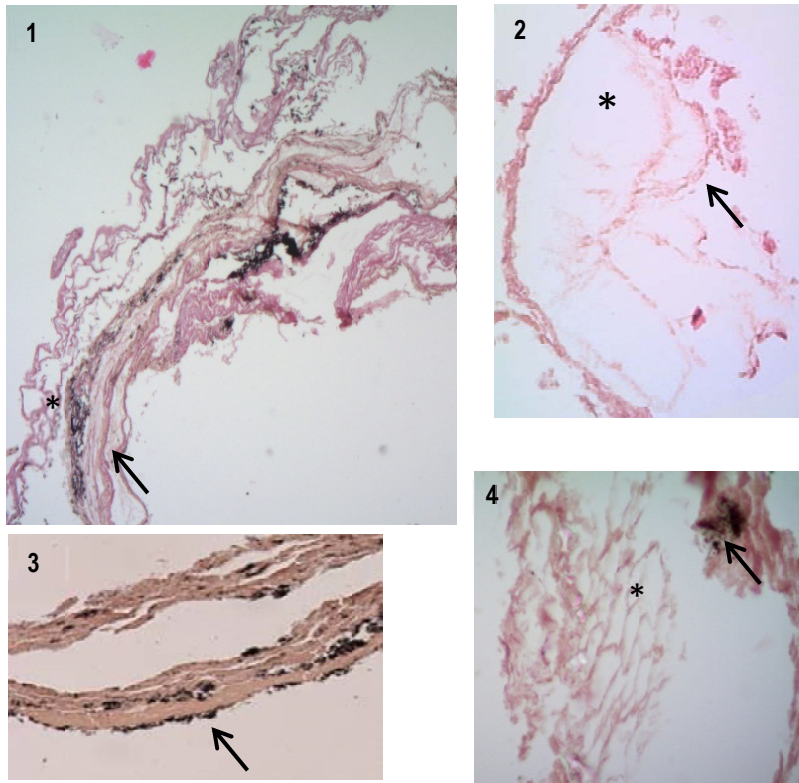


Fig. 24. Micrografía del pulmón. 1. Aspecto general del pulmón con las fibras de tejido conectivo que se disponen paralelamente (flecha) (H-E 100x) (Momia Qarara s. IV-VIII). 2. Se aprecia la pared alveolar (flecha) y el espacio alveolar (*) (H-E 400x) exteriores (Individuo 2 Cova des Pas 900-8000 cal BC) 3. Se observan las fibras de tejido conectivo que se disponen en paralelo y los depósitos de carbón (antracosis) (H-E 400x) exteriores (Individuo 2 Cova des Pas 900-8000 cal BC). 4. Se aprecia el espacio alveolar (*) y antracosis (flecha) H-E 200x) exteriores (Individuo 2 Cova des Pas 900-8000 cal BC)

Hígado

Macroscópicamente presenta un aspecto homogéneo, endurecido y pesado de coloración negruzca (Fig. 25.1). Se pueden diferenciar las zonas exteriores de las interiores; las capas externas son duras y finas, en cambio la capa interna se disgrega fácilmente y es más gruesa (Fig. 25.2).



Fig. 25. Imagen macroscópica del hígado (Pedro III s. XIII) 1. Hígado con la típica forma de media luna y con una estructura compacta y muy endurecida. **2.** Se observa la diferencia entre las capas externas, finas y duras y las internas, más gruesas y que se disgregan con facilidad

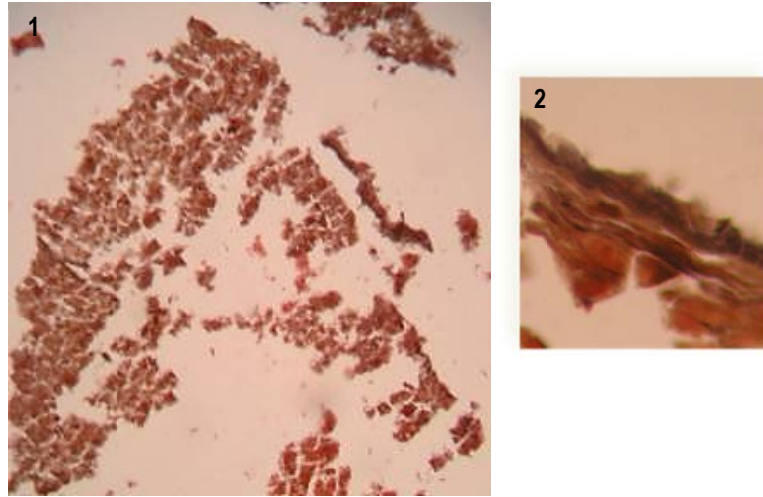


Fig. 26. Microfotografía del hígado (Pedro III s. XIII). 1. Es un tejido muy desestructurado con coloración verdosa con de luz rasante (H-E 40x). 2. Lámina fibrosa que podría corresponder a la cápsula de Glisson (H-E 400x)

Histológicamente se presenta una arquitectura tisular muy degradada, fácilmente artefactuada por el corte, con una coloración marrón pero que con luz rasante presenta adquiere una tonalidad verdosa. En algunas zonas se aprecia una lámina de tejido conjuntivo con una coloración más oscura compatible con la capsula de Glisson (Fig 26).

Músculo

Macroscópicamente se observa una pequeña vaina de color claro y muy fina que recubre las los filamentos musculares, las cuales son los filamentos oscuros, apergaminados, fibrosis y quebradizos adyacentes al hueso.



Fig. 26. Imagen macroscópica de fibras musculares (Blanca de Anjou s. XIV).

En la imagen histológica se aprecia diversas estructuras. En primer lugar se observa el epimiso que es la vaina de tejido conjuntivo que envuelve las fibras musculares por completo. Este tejido conjuntivo también penetra en el interior del músculo formando el perimiso que corresponde a los tabiques estrechos que envuelven los haces de fibras

musculares. A partir del perimiso se genera el endomiso que es tejido conjuntivo que envuelve cada fibra muscular pero que en este caso no se aprecia (Fig. 27).

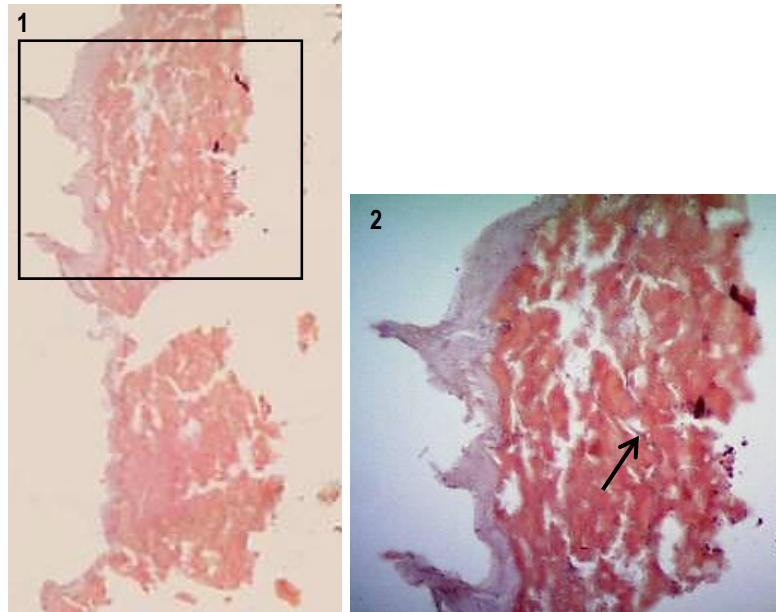


Fig. 26. Microfotografía de las fibras musculares desde L4 a L5 (Blanca de Anjou s. XIV). 1. Se aprecia el epimiso (a) rodeando por cimpleo el tejido muscular (b) (H-E 50x). 2. Detalle donde se puede apreciar restos del perimiso rodeando haces musculares (flecha) (H-E 200x)

La histología revela que la estructura típica de musculatura estriada. El músculo estriado presenta una estructura muy organizada y sus células son multinucleadas. La preparación histológica muestra múltiples

espacios redondeados que indican las posiciones de los núcleos de las células estriadas (Fig. 28.1). El detalle de la imagen muestra áreas más claras que delimitan áreas oscuras, correspondientes a vestigios de sarcómeros de la célula muscular (Fig. 28.2).

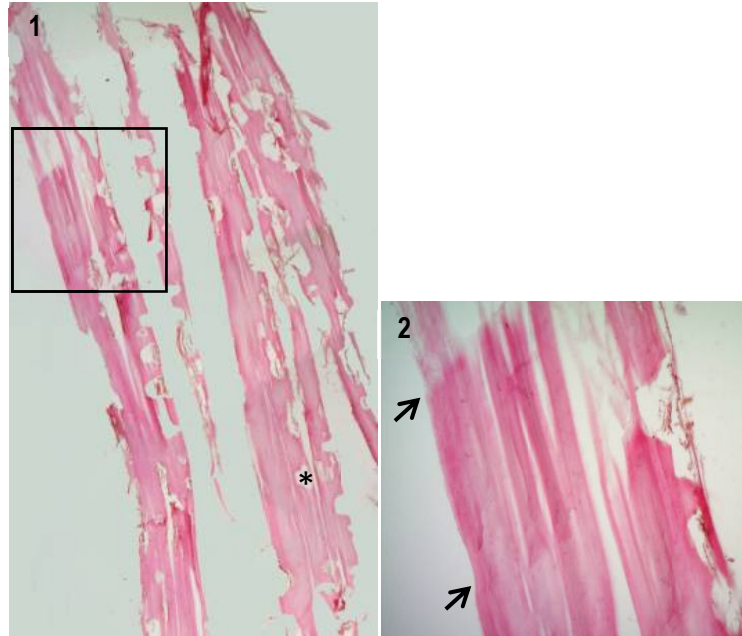


Fig. 28. Microfotografía de músculo estriado del masetero (Blanca de Anjou s. XIV). 1. Se observa la estructura de músculo estriado con una estructura organizada y espacios vacíos que probablemente corresponden a la posición donde se encontraban los núcleos (*) (H-E 50x). **2.** Ampliación del músculo estriado donde las flechas indican el límite del sarcómero (H-E 200x)

