

MUNIBE (Antropología - Arkeologia)	Supl. Nº 8	203-207	SAN SEBASTIAN	1992	ISSN 1132-2217
------------------------------------	------------	---------	---------------	------	----------------

El uso de la Histomorfometría ósea en Paleopatología: Determinación de la edad en restos esqueléticos (revisión bibliográfica).

The Use of Bone Histomorphometry in Paleopathology: Determination of Age in Skeletal Remains (bibliographic overview).

PALABRAS CLAVE: Antropología Forense, Anatomía, Histología.
KEY WORDS: Forensic Anthropology, Anatomy, Histology.

José Luis PRIETO *

RESUMEN

La persistencia de la matriz ósea en restos, incluso de varios siglos de antigüedad, permite la identificación de ciertas estructuras microanatómicas susceptibles de medición por medio de técnicas histomorfométricas.

Los autores consultados han establecido ciertos parámetros medibles, fundamentalmente el área osteonal y el cociente área cortical/área total, que permiten determinar con un elevado grado de aproximación la edad del individuo en el momento de la muerte.

Se incide sobre la posibilidad de aplicación de parámetros trabeculares, estandarizados en la clínica, en el cálculo de la edad en restos esqueléticos.

SUMMARY

The presence of bony matrix in skeletal remains, including those of several centuries antiquity, allows the identification of certain microanatomic structures, measurable by histomorphometric techniques.

Certain mathematical relationships have been established between some of the measurable parameters, fundamentally the coefficient obtained by dividing the cortical area by the total area, which has allowed the determination of the age of the individual at death with a high approximation.

LABURPENA

Aurkitutako hondakinetan, baita duela hainbat mendetakoetan ere, hezur-matriza agertzeak zenbait egitura mikroanatomikoren identifikazioa ahalbidetzen du, hauek teknika histomorfometrikoen bitartez neurtu daitezkeelarik.

Parametro neurgarrien artean hainbat erlazio matematiko finkatu dira, batez ere kortex-azalera/azalera osoa koizientea, zeinei esker doitasun maila handi batez zehaz baitaitekeen gizabanakoaren adina heriotzaren ulean.

La determinación de la edad de la muerte, sobre todo en esqueletos de personas mayores de 50 años, ha planteado problemas a antropólogos físicos, forenses y arqueólogos. Los métodos morfológicos tales como el estado de la sínfisis del pubis, cierre de las suturas craneales, o el grado de osteoartritis son frecuentemente inexactos y no suelen ser apropiados para sujetos de edad superior a los 50 años. Los métodos histológicos de estimación de edad, superando muchos de los criterios subjetivos asociados a los métodos morfológicos, están recibiendo

cada día una mayor atención por su capacidad de estimar con cierta aproximación la edad en esqueletos desde el nacimiento a la vejez (THOMPSON, 1979).

Desde que, en 1691, HAVERS publicó su "*Osteologia Nova*" las mayores contribuciones al estudio de la histología ósea las debemos a nombres como ALBINUS, HALLER, HUNTER, WINSLOW, BICHAT o PAGET, por citar algunos de ellos (BULLOUGH *et al*, 1990), pero cuando el estudio del tejido óseo ha dado el salto más espectacular ha sido durante las décadas de los '60 y '70.

Antes de 1960, los histólogos y patólogos examinaban el hueso esporádicamente en comparación

* Médico Forense del Juzgado de Primera Instancia e Instrucción n. 2 y 4 de Alcobendas. Madrid.

con el resto de los tejidos, ya que el primer paso para la preparación del tejido tras su fijación era la eliminación de su principal componente, el mineral (RECKER, 1983), por medio de soluciones ácidas. Además, debido a la resistente naturaleza del tejido, era difícil preparar secciones de suficiente buena calidad para mantener las relaciones tisulares (MALLUCHE & FAUGERE, 1986). Esto dificultaba el rigor en el estudio microanatómico de las estructuras óseas y hacía prácticamente imposible apreciar los procesos dinámicos que de manera continua se producen *in vivo*, sin hablar de la posibilidad de medirlos.

Numerosos métodos de procesado y tinción del hueso no descalcificado han sido descritos en los últimos 25 o 30 años, mediante los cuales ha sido posible salvar las dificultades habidas al examinar el hueso sin su mineral (RECKER, 1983). La técnica de embebimiento en plásticos no solamente permite el corte de las secciones histológicas de hueso sin descalcificar, sino que supone la considerable ventaja de preservar dichas relaciones tisulares (MALLUCHE & FAUGERE, 1986). Numerosas investigaciones posteriores lograron importantes descubrimientos sobre la biología del hueso, tales como su crecimiento, estructura y renovación llevados a cabo por las células óseas (RECKER, 1983).

Desde hace relativamente pocos años, la histomorfometría viene siendo aplicada al estudio del hueso y sus alteraciones. Utilizando secciones de hueso sin descalcificar podemos medir tanto características tisulares como celulares, aunque la técnica presenta algunas particularidades que hemos de tener en cuenta. Por un lado, la objetividad de la evaluación morfológica depende del previo reconocimiento morfológico de las estructuras a medir, en otras palabras, la validez de las medidas histomorfométricas depende de la destreza y pericia del morfometrista como morfológico (BOLLOUGH *et al.*, 1990). Por otra parte, la histomorfometría utiliza delgadas secciones bidimensionales para estudiar tejidos tridimensionales por lo que son de la mayor importancia los principios de la estereología, ciencia estrechamente unida con la estadística y que requiere la adopción de orientaciones aleatorias de los objetos o rasgos a medir, condición que no se cumple estrictamente en el hueso ya que las trabéculas se ordenan según líneas de fuerza mecánicas o eléctricas. Aun con todo ello, hay esencialmente dos razones para aplicar la práctica de la histomorfometría al hueso: primera, para cuantificar las características que reflejan la actividad de los complicados sistemas de control celular del tejido óseo normal y patológico, y, segunda, para estudiar la estructura del hueso como un sistema mecánico bajo condiciones normales y anormales (MALLUCHE & FAUGERE, 1986).

La posibilidad de cuantificar mediante estudios histomorfométricos determinados parámetros propios de la estructura mineral del hueso, única que persiste en el hueso arqueológico (los estudios del hueso calcificado han demostrado que, por peso seco, 76 a 77 % de la sustancia ósea es inorgánica y el resto orgánica) (HERRING, 1964), gracias a las técnicas histológicas de hueso no descalcificado, ha sido investigada por numerosos autores, buscando su aplicación para el cálculo de la edad en restos esqueléticos.

La base común sobre la que se asientan todos estos estudios es el hecho ampliamente demostrado de que los humanos pierden una sustanciosa cantidad de hueso a partir de la edad adulta (THOMPSON, 1980). Esta pérdida de hueso tendrá su reflejo tanto a nivel cortical como trabecular.

El patrón de pérdida de hueso cortical relacionado con la edad, implica el adelgazamiento del espesor de la cortical, con un incremento del diámetro medular. La pérdida neta de grosor de la cortical se consigue a pesar de un gradual incremento del diámetro perióstico en los huesos largos. Estos parámetros han sido constatados mediante técnicas radiométricas y absorciométricas en la población viva y mediante métodos de medida directa de muestras en esqueletos (THOMPSON, 1980).

A esta pérdida de grosor de la cortical acompaña la pérdida de hueso intracortical. Por ello los huesos largos se hacen, no solamente más finos, con la edad avanzada, sino también más porosos. Hay un aumento en el diámetro de los canales Haversianos, que contribuye al incremento de la porosidad, tanto en lo relativo al incremento de su diámetro, como del número de canales (THOMPSON, 1980).

Los estudios de THOMPSON realizados sobre los fémures derechos de 90 cadáveres USA, de los que se excluyeron aquéllos que habían sufrido enfermedades que pudieran alterar la remodelación del hueso cortical, demostraron la existencia de un incremento regular, estadísticamente significativo del *summed Haversian canal area* (área proporcional de una sección que contiene canales de Havers, en mm²/campo) y del área media de los canales de Havers (dividiendo el *summed Haversian canal area* en mm² por el número de canales de cada sección), en ambos sexos, en relación con el aumento de la edad, demostrando que la pérdida de hueso se produce principalmente como consecuencia del adelgazamiento de la cortical y de un mucho menos extenso incremento de la porosidad intracortical (THOMPSON, 1980).

El estudio más importante quizá, sobre los cambios histológicos del hueso debidos a la edad, y su aplicación para el cálculo de la edad en esqueletos

de adultos, es el realizado por KERLEY en 1965 (KERLEY, 1965; STOUT, 1986), quien desarrolló un método basado en el análisis microscópico de la cortical de los huesos largos. En este trabajo estableció y valoró cuatro componentes corticales en la zona más externa del hueso: osteonas completas, osteonas fragmentadas, hueso lamelar circunferencial y canales no Haversianos, en fémur, tibia y peroné, bien de forma independiente o en combinación, en ambos sexos. La diferencia de edad estimada y edad real variaba en un rango de 5 años por arriba o abajo en hombres, y de 5 años por arriba a 1 año por abajo en mujeres.

Pero el método de KERLEY contenía ciertos inconvenientes tales como que sólo se aplica a huesos largos de extremidades inferiores precisando la sección completa del hueso y cuenta con numerosas variables subjetivas que afectan la estimación de los parámetros a medir tales como la dificultad de distinguir osteonas fragmentadas e intactas y de estimar el porcentaje de hueso lamelar en un campo visual circunferencial, como pusieron de manifiesto AHLQVIST y DAMSTEN (KROGMAN, 1972), aunque el método propuesto por ellos, modificación del método de KERLEY, dio inferiores resultados.

THOMPSON desarrolló un método presentado al Congreso Anual de la Academia Americana de Ciencias Forenses, que trataba de evitar estos inconvenientes.

Sobre una muestra de 116 cadáveres (64 masculinos y 52 femeninos), cuya edad, conocida, oscilaba entre los 30 y los 97 años, obtuvo una serie de cilindros de hueso cortical de 0,4 cm. de diámetro, de fémur, tibia, húmero y cúbito, evaluando 19 variables en cada cilindro.

El análisis microscópico de las secciones se efectuó mediante procedimientos estereológicos de morfometría. Las 19 variables derivadas de cada núcleo (cilindro) se examinaron mediante análisis de regresión lineal, con el fin de seleccionar la variable o combinación de variables, con un error estándar menor y el más alto coeficiente de determinación.

De este estudio surgieron una serie de ecuaciones de regresión que ponían de manifiesto que el área de hueso cortical que contiene osteonas (área osteonal), es el mejor elemento individual para predecir la edad de la muerte en restos esqueléticos (THOMPSON, 1979).

El mismo THOMPSON estudió con posterioridad una muestra de 54 individuos en un rango de edad de 17 a 78 años, aplicando el método descrito. Los resultados muestran una gran seguridad de esta técnica en la estimación de la edad, y de las distintas localizaciones de las muestras, el fémur produce la estimación más segura (THOMPSON, 1981).

El factor de mayor contribución a la inexactitud de la estimación de la edad en secciones de tibia era la variabilidad en el tamaño de las osteonas (en área y perímetro), sobre todo en individuos menores de 35 años. Estas diferencias respecto de la localización de la muestra indujeron a THOMPSON a efectuar un nuevo estudio, sobre 53 esqueletos de individuos de edad comprendida entre 17 a 53 años, la mayoría de ellos hombres, en el que se evidenció que el análisis del número de osteonas secundarias proporcionaba una diferencia media de edad real/edad estimada similar a la que se obtiene mediante la valoración a través de muestras de fémur (THOMPSON & GALVIN, 1983).

Las aportaciones de THOMPSON han permitido realizar cálculos bastante aproximados de la edad en restos esqueléticos, a partir de muestras de fémur y tibia, mediante técnicas histomorfométricas.

En el año 1985, STOUT emplea el análisis histomorfométrico en la investigación de los restos de Francisco Pizarro, en hueso cortical de una costilla, utilizando un método propio de estimación de la edad, derivado del método de Wu, descrito en 1970 (Wu *et al.*, 1970), constituyendo el primer estudio que ha utilizado el análisis histomorfométrico para la resolución de un caso histórico. De los parámetros evaluados en la muestra, aquél que se mostró más significativo para el cálculo de la edad, fue el cociente Área cortical/Área total (Área de hueso entre periostio y endostio/Área contenida dentro de la envoltura perióstica).

Por otra parte, utilizando los datos de Wu relativos a parámetros dinámicos (Wu *et al.*, 1970), el propio STOUT determina el *Mean annual Haversian bone formation rate*, que representa una medida del grado de formación ósea, un proceso metabólico dinámico, en los restos de un individuo que murió 440 años antes, permitiendo adentrarnos en el terreno de lo que denomina Paleofisiología (STOUT, 1986).

Aunque todas las investigaciones examinadas sobre la determinación de la edad en restos esqueléticos se han llevado a cabo sobre hueso cortical, las más recientes investigaciones en materia de histomorfometría ósea se realizan sobre hueso trabecular.

Desde finales de los años '50 se ha dispuesto de técnicas que permitían medir el turnover óseo en el hueso compacto. Esto no era aplicable al hueso trabecular debido a un número de problemas metodológicos existentes (RECKER, 1983).

Soluciones recientes a algunos de los problemas que envuelven el análisis del hueso trabecular han permitido la medida directa de estos parámetros, ofreciendo mejores resultados que el estudio del hueso cortical debido a la mayor sensibilidad del tejido trabecular para reflejar los continuos cambios di-

námicos sufridos por el hueso (MALLUCHE & FAUGERE, 1986).

El lugar considerado óptimo para el estudio morfohistométrico del hueso trabecular es la cresta ilíaca (AARON, MAKINS & SAGEIYA, 1987; MALLUCHE & FAUGERE, 1986), pues ofrece una mejor accesibilidad, tanto en clínica como en procedimientos de autopsia, y tiene un mayor contenido en hueso trabecular que otras muestras utilizadas inicialmente, como las de costilla. Por otra parte, la influencia de factores locales en el turnover óseo, tales como la directa relación con el peso o fuerzas de tensión ejercidas por los músculos, se minimizan a nivel de la cresta ilíaca anterior por lo que es el lugar normalizado para evaluación de los parámetros a estudiar en el hueso trabecular (PARFIT *et al.*, 1987).

La cantidad de hueso trabecular depende, en gran manera, de la localización de la muestra examinada (MELSEN, MELSEN & MOSEKILDE, 1978), pudiendo existir diferencias en los valores absolutos del volumen óseo o del grado de aposición mineral, en muestras obtenidas de diversos lugares esqueléticos, aunque se observa una buena correlación entre cresta ilíaca y vértebra y tibia o fémur, por lo que es del mayor interés la elección del lugar y forma de tomar la muestra con objeto de evitar la variación de los parámetros a medir (MALLUCHE & FAUGERE, 1986).

La pérdida de hueso con la edad es un fenómeno universal en los humanos (AARON *et al.*, 1987; COMPSTON *et al.*, 1987; ERIKSEN *et al.*, 1985; MALLUCHE & FAUGERE, 1986; RECKER, 1983). A partir de diversas investigaciones basadas en el estudio histomorfométrico, se ha demostrado que el hueso trabecular, como ocurría con el cortical, se va perdiendo con la edad, lo que se pone de manifiesto a este nivel por reducción de la fracción de espacio medular ocupado por el hueso, o volumen óseo trabecular. Mientras que el comienzo de este fenómeno es materia de debate, es fácilmente detectable en los hombres a partir de los 50 y algo más pronto en mujeres, que muestran una aceleración de la pérdida de hueso en torno a la menopausia, llegando a estimarse, por década, una pérdida superior a un 10 % del valor, en la madurez.

De los parámetros que se modifican con la edad a nivel del hueso trabecular el que lo hace de manera más significativa, según los autores consultados, es el volumen óseo trabecular, en ambos sexos (AARON *et al.*, 1987; COMPSTON *et al.*, 1987; ERIKSEN *et al.*, 1985; GARRAHAN *et al.*, 1987; LIPS *et al.*, 1978; MALLUCHE & FAUGERE, 1986; MELSEN *et al.*, 1978), encontrándose en las mujeres jóvenes un mayor porcentaje de hueso que en los hombres, y una pérdida más pronunciada de volumen óseo trabecular (MELSEN *et al.*, 1978) a partir de los 30-35 años (ERIKSEN) o de los 50

años (RECKER). Esta pérdida de hueso fue atribuida a un incremento, con la edad, de la porosidad en las mujeres, al igual que vimos que ocurría en la cortical, en las que la disminución del volumen óseo se acompaña de pérdida de la superficie trabecular total (AARON, MAKINS & SAGEIYA, 1987), en marcado contraste con los escasos cambios encontrados en el hombre, donde, a pesar de la disminución del volumen óseo, la superficie trabecular total se mantiene (MELSEN *et al.*, 1978. En la mujer de edad hay, por tanto, una auténtica pérdida de hueso trabecular, manifestación de un aumento de la reabsorción, mientras que en el hombre el grosor trabecular disminuye como resultado de una disminución en la formación (AARON, MAKINS & SAGEIYA, 1987).

La posibilidad, ya apuntada, de efectuar mediciones de estructuras óseas trabeculares en huesos arqueológicos, mediante técnicas histomorfométricas estandarizadas (PARFIT *et al.*, 1987), es evidente, y puesto que es un hecho constatado el reflejo a nivel trabecular de la pérdida de hueso debida a la edad, creemos posible desarrollar un método de determinación de la edad en restos esqueléticos a partir del análisis histomorfométrico en hueso trabecular, con las ventajas que esta técnica supone al ser la más utilizada en la clínica actualmente y estar perfectamente estandarizada en cuanto al lugar de toma de muestra, estandarización de los parámetros a medir, etc...

Pero para poder valorar los resultados obtenidos es preciso el conocimiento de los valores normales de referencia para la población a estudiar, lo que nos ha llevado a realizar un estudio en este sentido en la población de Cantabria, estudio que se está desarrollando en este momento y cuyos resultados verán la luz en un futuro.

CONCLUSIONES

1. Mientras que la determinación de la edad en esqueletos de personas menores de 50 años puede realizarse por un investigador experimentado utilizando métodos morfológicos, la estimación por encima de los 50 años requiere el uso de métodos histológicos (Histomorfométricos).

2. La pérdida de hueso debida a la edad y su reflejo en estructuras microanatómicas susceptibles de medición, es el fundamento de aplicación de las técnicas histomorfométricas en la determinación de la edad de la muerte en esqueletos.

3. Los métodos desarrollados hasta la actualidad, que se llevan a cabo a nivel de hueso cortical, demuestran que los miembros superiores proporcionan un índice de error en la estimación de la edad sensiblemente superior al de miembros inferiores, y, en-

tre ellos, la medida del área osteonal en el fémur es el que ha mostrado mayor exactitud en los resultados.

4. El mayor problema que muestra este tipo de procedimientos es la falta de uniformidad en cuanto a los parámetros estimados y presentación de los datos.

5. La posibilidad de cuantificar, en estructuras de hueso trabecular, parámetros que reflejan la pérdida de hueso determinada por la edad, tiene la ventaja de utilizar un método de uso común en la clínica y, por lo tanto, con una uniformidad en sus criterios de aplicación y presentación estandarizada de sus resultados.

6. La mayor dificultad que muestran los estudios histomorfométricos, a la hora de ser aplicados al estudio de restos esqueléticos, es la imposibilidad de diferenciar el resultado de huesos con algunas patologías siempre que se mantenga en rangos normales, aunque puede ayudar el volumen de las lagunas osteoclásticas y la proporción de hueso lamelar-Bovenoides. No obstante, la histomorfometría no debe ser más que un método complementario, auxiliar del estudio morfoantropométrico.

BIBLIOGRAFIA

- AARON, J.E., MAKINS, N.B. & SAGEIYA, K.
1987 The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clinic. Orthop. and Related Diss.* 275, 260-271.
- BULLOUGH, P.G., BANSAL, M. & CARLO, E.F. DI
1990 The tissue diagnosis of metabolic bone disease. Role of Histomorphometry. *Orthopedic Clinics of North. Am.* 27, 65-79.
- COMPSTON, J.E., MELLISH, R.W.E. & GARRAHAN, N.J.
1987 Age-related changes in iliac crest trabecular microanatomic bone structure in man. *Bone* 8, 289-292.
- ERIKSEN, E.F., MOSEKILDE, L. & MELSEN, F.
1985 Trabecular bone resorption depth decreases with age: differences between normal males and females. *Bone* 6, 141-146.
- GARRAHAN, N.J., MELLISH, R.W.E., VEDI, S. & COMPSTON, J.E.
1987 Measurement of mean trabecular plate thickness by a new computerized method. *Bone* 8, 227-230.
- KERLEY, E.
1965 The microscopic determination of age in human bone. *Am. Jour. of Phisic. Anthropol.* 23, 149-164.
- KROGMAN, W.M.
1972 *The human skeleton in forensic medicine.* Charles C. Thomas, Springfield, Illinois (2ª ed.).
- HERRING, G.M.
1964r Chemistry of the bone matrix. *Clin. Orthop.* 36, 169.
- LIPS, P., COUPRON, P. & MEUNIER, P.J.
1978 Mean Wall Thickness of trabecular bone packets in the human iliac crest: changes with age. *Calcified Tiss. Int.* 26, 13-17.
- MALLUCHE, H.H. & FAUGERE, M.C.
1986 *Atlas of mineralized bone histology.* Karger (1ª ed.).
- MELSEN, F., MELSEN, B. & MOSEKILDE, L.
1978 An evaluation of the quantitative parameters applied in bone histology. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 86, 70-81.
- MELSEN, F., MELSEN, B., MOSEKILDE, L. & BERGMAN, S.
1978 Histomorphometric analysis of normal bone from the iliac crest. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 86, 70-81.
- PARFITT, A.M., DREZNE, M.K., GLORIEUX, F.H., KANIS, J.A., MALLUCHE, H., MEUNIER, P.J., OTT, S.M. & RECKER, R.R.
1987 Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner Res., Dec.* 2(6), 595-610.
- PARFITT, A.M., MATHEWS, C.H., VILLANUEVA, A.R. & KLEERKOPER, M.
1983 Relationships between surface, volume, and Thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. *Journal Clinical Invest.* 72, 1396-1409.
- RECKER, R.R.
1983 *Bone histomorphometry: Techniques and interpretation.* CRC Press.
- STOUT, S.
1986 The use of bone histomorphometry in skeletal identification: The case of Francisco Pizarro. *Journal Forensic Sciences* 31, 296-300.
- THOMPSON, D.D.
1979 The core technique in the determination of age at death in skeletons. *Journal of Forensic Sciences* 24, 902-915.
1980 Age changes in bone mineralization, cortical Thickness, and Haversian Canal area. *Calcif. Tiss. Int.* 31, 5-11.
1981 Microscopic determination of age at death in an autopsy series. *Journal of Forensic Sciences* 26, 470-475.
- THOMPSON, D.D. & GALVIN, C.A.
1983 Estimation of age at death by tibial osteon remodeling in an autopsy series. *Forensic Science Int.* 22, 203-211.
- WU, K., SCHUBECK, K.E., FROST, H.M. & VILLANUEVA, A.
1979 Haversian bone formation rates determined by a new method in a mastadon, and in human Diabetes Mellitus and Osteoporosis. *Calcif. Tiss. Researc.* 6, 204-219.