



---

**ESTIMACIÓN DE LA EDAD HISTOLÓGICA EN INDIVIDUOS SUBADULTOS  
DE UNA MUESTRA OSTEOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA.**

**NATALIA ANDREA RESTREPO HERNÁNDEZ**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS SOCIALES Y HUMANAS**

**DEPARTAMENTO DE ANTROPOLOGÍA**

**MEDELLÍN, COLOMBIA**

**2017**

**ESTIMACIÓN DE LA EDAD HISTOLÓGICA EN INDIVIDUOS SUBADULTOS  
DE UNA MUESTRA OSTEOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA.**

**NATALIA ANDREA RESTREPO HERNÁNDEZ**

**Trabajo de investigación para optar al título de Maestra en Antropología en la línea  
de investigación Osteología y Antropología Forense**

**DIRECTORA DE TESIS**

**TIMISAY MONSALVE VARGAS, PhD.**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS SOCIALES Y HUMANAS**

**MEDELLÍN, COLOMBIA**

**2017**

A mi familia por su infinito apoyo

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de grado no hubiera sido posible sin el apoyo de mi asesora Timisay Monsalve, a ella le agradezco por no desampararme, por enseñarme que puedo conseguir lo que me proponga si me empeño en ello. A ella que me ha acompañado durante mi vida académica, con quien aprendí a amar la antropología biológica le doy mil gracias por sus enseñanzas, sus críticas, por ser una guía constante, por su confianza y sobre todo por su amistad, gracias Timi!!!

Igualmente agradezco al área de antropología biológica del departamento de antropología por haberme brindado un espacio para continuar mi camino en la docencia, que bien ha sido una oportunidad para transmitir mi pasión por la antropología biológica a los estudiantes.

A la Facultad de derecho y ciencias forenses de la institución universitaria Tecnológico de Antioquia por tenerme en cuenta en sus proyectos, a pesar de que en estos años durante la maestría no he podido estar acompañándolos como quisiera. A mis estudiantes del semillero de Estudios antropológicos -SEA- del TdeA, gracias por su paciencia, los quiero mucho.

A los profesores Fabio Vargas y Esperanza López Gómez de la Facultad de Ingeniería por su desinteresada colaboración con el préstamo de las herramientas necesarias para el trabajo de investigación, en especial al ingeniero Edwin Cardona quien me ayudó en la

preparación de las muestras y el corte respectivo y al ingeniero Daniel Zuluaga quien me colaboró con las micrografías en el microscopio de luz polarizada y en el de luz transmitida, sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. Al profesor Carlos Mejía de la facultad de Medicina quien se encargó de la deshidratación de la muestra. A mi gran colega y amiga Liliana Bernal por su ayuda en el análisis estadístico. A la profesional en Criminalística Natali Lezcano que me apoyó en el corte de las muestras en la Facultad de Medicina y con otros proyectos que iba a abandonar por el trabajo de grado, pero que ella me ayudo a finalizar, Naty, gracias por tu apoyo y a mis “hermanitas” Dani y Cami por ayudarme a desgastar las muestras, nunca abandonen sus sueños.

Por último, agradezco a los seres más importantes de mi vida, mi familia. A mis padres Lucía y Víctor y a mi hermano Felipe por preocuparse y estar a mi lado en cada peldaño que escalo. A mi hijo Miguel y a mi esposo Edwin por apoyarme constantemente, por ser pacientes y motivarme todos los días a lograr mis objetivos, por hacerme ver que en familia todo es más sencillo, gracias mis grandes amores...

## **RESUMEN**

La estimación de la edad histológica con fines de identificación -ya sea empleando la técnica microscópica de conteo de osteonas, o la técnica histomorfológica sobre la descripción de las características visibles microscópicamente del hueso-, es uno de los métodos de mayor aceptación a nivel académico y científico en el mundo, en especial en el contexto forense.

En Colombia es un método sin explorar, a pesar de la necesidad generada por la violación a los Derechos Humanos y al Derecho Internacional Humanitario dentro del conflicto armado interno que ha dejado como resultado una gran cantidad de fosas comunes con individuos incompletos, descuartizados, desmembrados lo que hace difícil una labor de identificación, resaltando que la mayoría de estas víctimas son individuos subadultos, niños y jóvenes reclutados por grupos armados muertos en combate o ejecutados extrajudicialmente.

En este trabajo investigativo se aplicó el método histológico de cuatro fases en sexta costilla, empleando la técnica de análisis microscópico propuesto por Streeter et. al. (2010) sobre una muestra de individuos subadultos pertenecientes a la colección de referencia osteológica de la Universidad de Antioquia, donde se encontró que el método es efectivo y lo más práctico es que no requiere del individuo esquelético completo, ni de la pieza ósea

intacta para su aplicación y resultados veraces; teniendo presente que los métodos existentes se deben aplicar en huesos específicos, como el fémur, clavícula, entre otros.

**Palabras clave:** Estimación de edad, método histológico, microscopía de luz polarizada, conteo de osteonas, individuos esqueletizados, subadultos, sexta costilla, antropología osteológica y forense.

## **ABSTRACT**

The estimation of histological age with identification purposes -whether using the microscopic osteon counting technique or the histomorphological technique on the description of the microscopically visible features of bone- is one of the most accepted methods at the academic and Scientist in the world, especially in the forensic context.

In Colombia, it is an unexplored method, despite the need generated by the violation of Human Rights and International Humanitarian Law within the internal armed conflict that has resulted in many mass graves with incomplete individuals, dismembered, which makes the identification difficult, noting that most of these victims are subadult individuals, children and youths recruited by armed groups killed in combat or extrajudicially executed.

In this research, the histological method of four phases in sixth rib was applied, using the technique of microscopic analysis proposed by Streeter et.al. (2010) on a sample of subadult individuals belonging to the osteological reference collection of the University of Antioquia, where it was found that the method is effective and the most practical is that it does not require the complete skeletized individual or the intact bone piece to Its application

and truthful results; Bearing in mind that existing methods should be applied to specific bones, Like the femur, clavicle, and others.

**Key words:** Age estimation, histological method, polarized light microscopy, osteon counts, skeletonized individuals, subadults, sixth rib, osteological and forensic anthropology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hueso cortical y esponjoso .....	<a href="#">35</a>
Figura 2. Sistema de Havers .....	<a href="#">39</a>
Figura 3. Modelado de la deriva de la costilla humana .....	<a href="#">51</a>
Figura 4. Corte transversal de costilla .....	<a href="#">52</a>
Figura 5. Fase I. hueso entretejido, costilla de individuo de 3 años. Luz Polarizada (Streeter, 2010) .....	<a href="#">53</a>
Figura 6. Fase II hueso entretejido, costilla de individuo de 6 años. Luz Polarizada (Streeter, 2010) .....	<a href="#">54</a>
Figura 7. Fase III hueso primario con remodelado, costilla de individuo de 17 años. Luz Polarizada (Streeter, 2010) .....	<a href="#">54</a>
Figura 8. Fase IV Osteona Tipo I en costilla de individuo de 21 años. Luz Polarizada (Streeter, 2010) .....	<a href="#">55</a>

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1. Fragmentos de sexta costilla .....	<a href="#">60</a>
Foto 2. Implementos para embebido: Resina, catalizador y jeringa dosificadora .....	<a href="#">61</a>
Foto 3. Preparación de los moldes con resina epóxica .....	<a href="#">62</a>
Foto 4. Bloques de resina desmoldados, con muestras debidamente rotuladas .....	<a href="#">62</a>
Foto 5 y 6. Cortadora ISOMET 1000 calibrada para cortes de 1,5 mm .....	<a href="#">63</a>
Foto 7. Cortes de 1,5 mm de grosor listos para pulir .....	<a href="#">63</a>
Foto 8. Rótulo para pieza ósea .....	<a href="#">97</a>
Foto 9. Instrucciones preparado resina .....	<a href="#">97</a>
Foto 10. Cortes de costillas en los moldes listos para embebido .....	<a href="#">98</a>
Fotomicrografía 1. Línea de Cemento y hueso entretrejido microscopio fotónico con aditamentos para luz polarizada .....	<a href="#">99</a>
Fotomicrografía 2. Línea de Cemento y hueso entretrejido microscopio fotónico .....	<a href="#">99</a>
Fotomicrografía 3. Canal vascular primario .....	<a href="#">99</a>
Fotomicrografía 4. Formación lamelar concéntrica y conducto de Volkmann.....	<a href="#">101</a>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Modelo histomorfológico propuesto por Streeter .....	<a href="#">55</a>
Tabla 2. Operacionalización de las variables.....	<a href="#">67</a>
Tabla 3. Adaptación cuantitativa del método histológico de cuatro fases en costillas de Streeter (2010) en la muestra de estudio.....	<a href="#">68</a>
Tabla 4. Aplicación prueba de Kolmogorov-Smirnov .....	<a href="#">69</a>
Tabla 5. Estadísticas de grupo .....	<a href="#">69</a>
Tabla 6. Igualdad de Medias.....	<a href="#">72</a>
Tabla 7. Resumen de variable entradas y eliminadas .....	<a href="#">73</a>
Tabla 8. Variables en el análisis .....	<a href="#">73</a>
Tabla 9. Variables que no están en el análisis .....	<a href="#">74</a>
Tabla 10. correlación canónica próxima a uno .....	<a href="#">74</a>
Tabla 11. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizadas .....	<a href="#">75</a>
Tabla 12. Coeficientes de función discriminante canónica .....	<a href="#">75</a>
Tabla 13. Funciones en centroides de grupo .....	<a href="#">75</a>
Tabla 14. Resultados de clasificación. Validación cruzada .....	<a href="#">77</a>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ADN: Ácido desoxiribonucleico

DDHH: Derecho Humanos

DIH: Derecho Internacional humanitario

DIC: Contraste Diferencial Interferencial

OMC: Observatorio de Memoria y Conflicto

OPD: Densidad Poblacional de Osteonas

## **ABREVIATURAS DE UNIDADES DE MEDIDA**

cm: Centímetro

ml: Mililitro

mm: Milímetro

µm: Micrómetro

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b><u>3</u></b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b><u>4</u></b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b><u>6</u></b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b><u>8</u></b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b><u>10</u></b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b><u>11</u></b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b><u>12</u></b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b><u>16</u></b>
<b>ANTECEDENTES O ESTADO DEL ARTE</b> .....	<b><u>21</u></b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b><u>24</u></b>
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b><u>26</u></b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b><u>28</u></b>
<b>CAPÍTULO TEÓRICO</b> .....	<b><u>31</u></b>
<b>APLICACIÓN OSTEOLÓGICA</b> .....	<b><u>31</u></b>
Edad cronológica vs edad biológica .....	<b><u>32</u></b>
Composición del tejido óseo.....	<b><u>34</u></b>
Clases de huesos según su formación.....	<b><u>38</u></b>
Estructura de orden jerárquico del hueso.....	<b><u>40</u></b>
Crecimiento y maduración.....	<b><u>41</u></b>
Método histológico para estimación de edad biológica.....	<b><u>43</u></b>
Métodos para estimación de edad biológica más empleados a nivel mundial .....	<b><u>45</u></b>
Las costillas.....	<b><u>49</u></b>
Método histomorfométrico de Margaret Streeter (2010) .....	<b><u>53</u></b>
Conteos selectivos histológicos .....	<b><u>56</u></b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b><u>58</u></b>
Proceso metodológico .....	<u>59</u>
Criterios de inclusión y exclusión.....	<u>59</u>
Obtención de las muestras .....	<u>60</u>
Registro fotográfico de las muestras .....	<u>65</u>
Análisis estadístico.....	<u>66</u>
Operacionalización de Variables.....	<u>66</u>
Cuadro estadísticas de grupo.....	<u>69</u>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b><u>71</u></b>
Clasificación .....	<u>76</u>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b><u>80</u></b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b><u>85</u></b>
<b>Anexos.....</b>	<b><u>97</u></b>

## INTRODUCCIÓN

“Nada en la vida debe ser temido, solamente  
comprendido. Ahora es el momento  
de comprender más, para temer menos”  
Marie Curie

Para lograr la identificación a nivel antropológico forense, es necesario establecer ciertas características biológicas y demográficas que contiene el hueso, ya que este es un reflejo de la vida de la persona que deja huella en su esqueleto (Cattaneo, 2007). Algunos de los datos que se analizan constantemente en antropología forense son la edad, el sexo, la estatura, filiación poblacional o ascendencia, patologías, traumas *antemortem*, características individualizantes, marcas de estrés ocupacional que pueden ser determinadas a través del uso de técnicas macroscópicas y microscópicas (Keough et al., 2009; Schmeling, et al., 2007).

El método histológico aplicado en el estudio de los huesos ha sido empleado en investigaciones con diversos objetivos como lo es la estimación del sexo y la estimación de la edad a partir de los datos que una pieza ósea pueda brindar a nivel microscópico (como el fémur, el húmero, la clavícula, la costilla) (Willows, 1991). La estimación de edad biológica es uno de los datos más importantes a la hora de identificar y de cotejar (Franklin, 2010).

La estimación de la edad del esqueleto por medio de métodos antropológicos consiste en el establecimiento de la edad biológica -tiempo de intervalo transcurrido desde el momento de la concepción hasta el momento de realizar el estudio-, para posteriormente, tratar de relacionarla con la edad cronológica a la hora de la muerte -tiempo de intervalo

transcurrido desde el momento del nacimiento hasta el momento de realizar el estudio- (Katzenberg y Saunders, 2008; Baccino y Schmitt, 2006).

La estimación de la edad por medio de técnicas histológicas con fines de identificación -ya sea empleando la técnica microscópica de conteo de osteonas, o la técnica histomorfológica sobre la descripción de las características visibles microscópicamente del hueso-, es uno de los métodos de mayor aceptación a nivel académico y científico en el mundo, en especial en el contexto forense (Bednarek, 2008). En esta investigación se propone aplicar sobre una muestra de individuos subadultos (niños y jóvenes entre 3 y 19 años) de la colección de referencia osteológica de la Universidad de Antioquia, el método histológico de cuatro fases en costilla propuesta por Streeter (2010).

Este estudio experimental deja a un lado los métodos más empleados para la reconstrucción de la edad biológica basados en la descripción morfológica o macroscópica (Kerley y Ubelaker, 1978). Si estos métodos macroscópicos para estimar edad se van a aplicar en individuos subadultos, Keough y colaboradores (2009) plantean que puede hacerse con mayor precisión, toda vez se tenga el esqueleto completo para el respectivo análisis, sin embargo, en esqueletos incompletos y/o mal conservados plantean los autores que se evidencia un problema en el establecimiento del rango de edad exacto debido a que no se podrán obtener las piezas óseas requeridas para realizar una estimación de edad biológica con exactitud (Jans y Kars, 2002).

El problema se acrecienta cuando se trabajan poblaciones como la colombiana, caracterizada por tener una marcada poligenia, diversidad cultural y por tanto una disparidad

en términos de características físicas. A esto se le suma las violaciones a los Derechos Humanos (DDHH) y al Derecho Internacional Humanitario (DIH) a las que son sometidos sus habitantes, como la desaparición forzada, las ejecuciones extrajudiciales, los crímenes de guerra, entre otras situaciones que a la hora de investigar hacen difícil el acceso a individuos esqueletizados completos. Estas situaciones comprometen tanto a población adulta como a niños o subadultos (Haugaar, et al., 2010). Las principales investigaciones realizadas sobre este tema se basan en los adultos, sin embargo, son los niños, niñas, jóvenes y adolescentes quienes resultan víctimas de reclutamientos forzados, desapariciones, entre otros, se vuelven un factor clave dentro de la guerra (Fajardo, 2014).

Debido a esta situación problemática que se genera dentro de la identificación antropológica, se han desarrollado diversas técnicas en conjunto con otras ciencias, con el objetivo de hacer estimaciones más precisas. Entre estas técnicas se encuentra el método microscópico referente a la histología (Tiesler, et al., 2006). El análisis histológico provee la técnica histomorfométrica encargada de observar y analizar las estructuras microscópicas y traducirlas en datos cuantitativos (Stout, et al., 1992).

Es por esta razón que se desarrolla el presente trabajo, el cual se encuentra dividido en secciones. La primera sección contiene los datos principales del proyecto aprobado y desarrollado en este escrito, como los antecedentes, el planteamiento del problema, los objetivos, la hipótesis y la justificación. Luego se encuentra el capítulo teórico, en él se plantea la importancia de la aplicación osteológica en diferentes campos, en especial la antropología forense, siendo indispensables las colecciones de referencia osteológica, tanto arqueológicas como contemporáneas para la creación de estándares propios para población

local. Este capítulo también abarca uno de los datos del perfil biológico ineludibles al momento de las identificaciones de individuos esqueletizados y es la estimación de la edad biológica. Pero para entender este proceso, es necesario conocer el hueso en todos sus niveles, su composición microestructural, sus clasificaciones, hasta el proceso de formación, crecimiento y desarrollo de este. Una vez comprendida la estructura ósea, se explican los métodos microscópicos para la estimación de edad, el histomorfométrico y el histomorfológico, haciendo énfasis en este último. Igualmente se analiza la composición de la costilla, pieza ósea empleada para la aplicación del método de Streeter (2010).

El segundo capítulo es el de materiales y métodos, en él se plasman inicialmente los materiales que se emplearon para la investigación, incluyendo los datos de la colección de referencia de donde salió la muestra trabajada, la cantidad de individuos empleados, los límites de edad trabajados, los criterios de inclusión y exclusión y se explica en qué consiste el método histomorfológico en hueso no descalcificado. Posteriormente, se desarrolla paso a paso el procedimiento en laboratorio, pasando por los cortes de las secciones hasta la observación y el análisis de las estructuras microscópicas que permitieron realizar la estimación de edad histológica según la observación de corteza pleural, corteza cutánea, hueso lamelar primario, hueso entretejido y remodelado. Se plantea el análisis estadístico y su descripción, se le indica al lector los programas empleados para el análisis de los datos obtenidos y por qué se vio la necesidad de cuantificar los datos cualitativos arrojados por el método de cuatro fases en costilla de Streeter (2010). El desarrollo del análisis estadístico se da bajo un modelo discriminante multivariante, para ello se muestran las variables categóricas y discriminantes empleadas.

El apartado de los resultados y la discusión sobre el proyecto se muestran las estadísticas por casos, es decir, los valores arrojados, la función discriminante, se indicarán el grupo al que pertenecen y el grupo en el que fueron clasificados según el modelo discriminante y su nivel de confianza en la aplicación. Además, se plantea la necesidad de mejorar el método de cuatro fases en costilla de Streeter (2010). Luego se encontrarán las conclusiones del trabajo y las referencias bibliográficas correspondientes y al final están ubicados los anexos del trabajo como fotografías, tablas, entre otros.

## ANTECEDENTES O ESTADO DEL ARTE

La idea de estudiar el hueso en todos sus aspectos y de ir más allá del análisis morfoscóptico, ha hecho que los antropólogos interesados en la osteología se adentren en los métodos y técnicas histomorfológicas e histomorfométricas. La primera de las aplicaciones en esta área fue la de Ellis Kerley, quien en 1965 utilizó un método basado en el análisis microscópico de la cortical de huesos largos para realizar un conteo de osteonas completas, fragmentadas, hueso circunferencial, laminar y canales haversianos y algo que llamó la atención fue el hecho de no encontrar diferencias significativas entre hombres y mujeres, pese a que tomó edades que recorrían todo el ciclo vital. (Desántolo, 2012).

Basados en este método de Kerley, Ahlqvist y Damsten en 1969 implementaron el método para conteo de osteonas completas y fragmentarias, es decir el porcentaje de campo microscópico que ocupa el hueso remodelado, pero no pudieron hacerlo con la misma facilidad como lo planteó Kerley, por lo que hicieron modificaciones a su método, pero sus resultados fueron menos precisos que los obtenidos por Kerley. El modelo propuesto por Singh y Gunberg está cimentado en el modelo de Kerley, pero tuvo un problema, y es que su muestra se componía de mayor número de hombres que de mujeres, por tanto, su observación se basó en lo analizado en la muestra de los hombres (Desántolo, 2012).

Stout y Paine (1992) proponen trabajar sobre huesos como la clavícula y las costillas por lo que desarrollaron ecuaciones predictivas a partir de la cuantificación de características

como el área cortical, la densidad de osteonas completas, la densidad de osteonas fragmentarias y densidad total de osteonas visibles. En su aplicación no encontraron diferencias significativas entre las medias de las edades conocidas y las estimadas. Por lo que se tornó un método fiable.

Los estudios más recientes se encuentran en América latina, puntualmente en Argentina donde en el 2012, Desántolo empleó la técnica de histomorfometría propuesta por Stout y Paine (1992) aplicada en fémur con el fin de observar número total de osteonas completas, número de osteonas fragmentarias, diámetro promedio de los conductos de Havers, porcentaje de osteonas fragmentarias y la densidad poblacional osteonal.

Desde entonces muchas investigaciones han utilizado diferentes huesos, incluyendo una gran cantidad de variables, probando el método en otras poblaciones, etc.; pero, en general el método requiere de tiempo y conocimiento para ser aplicado en el tema, en características básicas como la identificación de los elementos estructurales. Según Robling y Stout (2008), otro de los grandes inconvenientes que se encuentran al comparar los diversos métodos es el planteamiento de que diversas características pueden cambiar con la edad; por ejemplo, algunos investigadores reportaron el tamaño del canal de Havers aumentando con la edad y otros encontraron que disminuían, como el caso de Singh y Gunberg, 1970, y a eso se le suma los investigadores que reportaron no hubo cambios en el tamaño de los canales de Havers.

Es de aclarar que en la mayoría de los textos y artículos que estudian el tema de la osteología humana, explicitan que se requiere de investigaciones puntuales sobre poblaciones

locales y por ende la elaboración de atlas histológicos para huesos específicos, tal como lo recomendó Frost (1987), al igual que la extracción de tasas de remodelación ósea, el planteamiento de la variación interpoblacional como lo señala Burr en 1990; o la elaboración de métodos y el ajuste de los existentes a la variación biológica de poblaciones modernas (Stout y Paine, 1992); o la necesidad de desarrollar ecuaciones para poblaciones específicas en los temas de estimación de edad histológica en individuos esqueletizados (Yoshino et al., 1993) y lo más importante, la recomendación de evaluar la variabilidad y variación poblacional en cuanto a crecimiento (Bogin, 1999), modelado y tasas de remodelado alcanzado; ya que la dinámica del crecimiento del tejido óseo ha sido poco estudiada, tal como lo afirmó Fonseca y otros en el año 2009.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro del proceso de individualización e identificación antropológico, es recurrente el empleo de métodos y técnicas macroscópicas o morfológicas que requieren de alguna estructura ósea específica (Krogman, 1986) (Zioupou, et.al, 2014). Cuando no se encuentra la pieza ósea requerida no es posible generar un rango de edad biológico, aún más si se trata de restos óseos de individuos subadultos que tienden a conservarse poco, sobre todo en contextos arqueológicos (Keough et al., 2009).

Ante tales sucesos, el antropólogo se ve obligado a aplicar otros métodos a nivel microscópico o histológico (Tiesler, et al., 2006), los cuales requieren de técnicas y equipos especializados. Estos métodos histológicos constan de una marcada complejidad y sistematicidad en su aplicación, debido a que demuestran un alto grado de confiabilidad y precisión al ser aplicados sobre grupos poblacionales donde existe una homogeneidad manifiesta como las poblaciones europeas, que a la hora del estudio osteoantropológico se caracterizan por su consistencia en cuanto a características morfológicas (Vitek, 2012), contrario a la población colombiana donde actualmente existe una marcada poligenia, diversidad cultural y por tanto una disparidad en términos de características físicas, resulta inapropiado aplicar métodos y técnicas diseñados desde y para poblaciones homogéneas.

En Colombia, la información en investigación biológica básica poblacional en histología ósea es escasa. Las pocas investigaciones existentes se centran en enfermedades

de tipo metabólico observables en piezas óseas (Quintana, et al 2004), pero no se han realizado investigaciones que abarquen todo el ciclo vital humano para la búsqueda de los patrones de cambios óseos concernientes a la edad biológica en población colombiana.

A partir de estas situaciones, surge el cuestionamiento que se pretende responder al desarrollar este proyecto de investigación: ¿Cuál es la precisión del método histomorfológico en costilla en la estimación de la edad aplicado a una muestra de individuos subadultos de la colección osteológica de la Universidad de Antioquia?

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **Objetivo general**

Estimar la edad aplicando el método histomorfológico en costilla de Streeter (2010), en restos óseos de individuos entre 3 y 19 años de edad, pertenecientes a la colección de referencia del Laboratorio de Antropología Osteológica y Forense de la Universidad de Antioquia.

### **Objetivos específicos**

- Analizar los cambios microscópicos del tejido óseo de la costilla para realizar el estudio histomorfológico.
- Comparar los resultados obtenidos de la edad biológica con la información de la edad documentada o cronológica de los individuos subadultos esqueletizados de la Colección de referencia.
- Determinar el nivel de confianza del método histomorfológico de cuatro fases en costillas de Margaret Streeter (2010).

Las hipótesis que se trabajarán en el posterior análisis estadístico serán:

**HIPÓTESIS NULA:** La modelación y remodelación en el hueso lamelar primario, hueso entretejido, grosor de la corteza pleural y cutánea permanece igual a medida que el individuo avanza en edad.

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA:** La modelación y remodelación en el hueso lamelar primario, hueso entretejido, grosor de la corteza pleural y cutánea varían dependiendo de la edad del individuo.

## JUSTIFICACIÓN

Desde la antropología biológica y la bioarqueología es necesaria la exploración y aplicación de métodos que permitan el estudio de los restos óseos sin importar su contexto histórico. En el contexto arqueológico, los investigadores se enfrentan a restos óseos que pocas veces se conservan (Baker, et. al., 2005), generalmente se encuentran depositados en vasijas y cuando son recuperados luego de las exhumaciones tienden a fragmentarse (Brothwell, 1987) haciéndose difícil realizar el adecuado perfil biológico u osteobiografía del individuo esqueletizado por medio de métodos morfológicos o macroscópicos.

En el contexto de la antropología biológica, concretamente desde la antropología osteológica y forense se presenta un problema similar al planteado con la bioarqueología y se da debido a las situaciones de conflicto social que afectan a la población; como la cantidad de individuos sin identificar producto del conflicto armado, de las violaciones a los derechos humanos y al derecho internacional humanitario, que han hecho que la labor de los antropólogos a la hora de individualizar e identificar sea aún más ardua (Rodríguez, 2011).

En poblaciones como la colombiana, donde existe una marcada poligenia, diversidad cultural y por tanto una disparidad en términos de características físicas; donde debido a las graves violaciones a los Derechos Humanos (DDHH) y al Derecho Internacional Humanitario (DIH), como las 45.854 víctimas de desaparición forzada registradas hasta la fecha de marzo de 2016 por el Registro Único de Víctimas; las ejecuciones extrajudiciales, los crímenes de guerra, entre otros fenómenos de violencia que hacen difícil el acceso a individuos esqueletizados completos (Haugaar, et. al., 2010). Las principales investigaciones

realizadas sobre este tema se basan en los adultos, sin embargo, según el Observatorio de Memoria y Conflicto (OMC) del Centro Nacional de Memoria Histórica, la población más vulnerable ante estas situaciones son los niños, niñas, jóvenes y adolescentes reclutados de manera forzada como estrategia militar y política:

(...) el reclutamiento y la utilización han impactado directamente la vida de, al menos, 16.879 niños, niñas y adolescentes en Colombia. Sus edades van de entre seis y dieciocho años, han sido mujeres y hombres entre los que se cuentan indígenas y afrodescendientes los que se han visto expuestos a diferentes formas de actuación y control de los grupos armados. El colegio, el barrio, la familia, la vereda, los parques y las amistades han sido transformados por escenarios, espacios y relaciones trazadas por las vivencias en las filas de las organizaciones armadas o al servicio de estas (Centro de Memoria Histórica, 2017, p. 310).

A pesar de los esfuerzos por registrar el número de niños, niñas, jóvenes y adolescentes, quienes resultan víctimas de reclutamientos forzados, desapariciones, entre otros (Fajardo, 2014), la OMC reconoce la existencia de un subregistro específicamente entre los paramilitares, que al someterse a la Ley 975 de 2005 reportaron 1.459 niños, niñas y adolescentes que fueron entregados al Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF). La OMC considera que quedaron por fuera del registro aquellos que se entregaron directamente a los familiares y aquellos muertos en combate (Centro de Memoria Histórica, 2017).

Debido a esta situación problemática que se genera dentro de la identificación antropológica, se emplean para el estudio y reconstrucción de la edad en individuos esqueletizados métodos como los morfológicos o macroscópicos que se realizan mediante una observación detallada, estos son cambios morfológicos de sínfisis púbica, variaciones en faceta auricular o en el extremo esternal de la cuarta costilla, incluso el grado de obliteración

de centros secundarios de osificación en huesos largos (Krogman e Iscan, 1986). Estos resultan ser imprecisos debido a las grandes variaciones que tienen los individuos en vida, características reflejadas en sus huesos que ocasionan desgastes que nada tienen que ver con la edad del individuo, sino que se asocian a su actividad ocupacional (Thompson, 1979; Zioupos, et. al., 2014). En cuanto a la estimación de edad de restos pertenecientes a individuos subadultos, puede hacerse con relativa precisión, siempre y cuando el esqueleto esté completo; sin embargo, en esqueletos incompletos y/o mal conservados, se plantea un problema en el establecimiento de un rango de edad exacto (Keough et. al., 2009), pues no se contaría con las piezas óseas necesarias para realizar una estimación de edad con certitud (Jowsey, 1960).

De igual manera se han desarrollado diversas técnicas en conjunto con otras ciencias, con el objetivo de hacer estimaciones más precisas. Entre las técnicas más empleadas, se encuentra el método microscópico referente a la histología, la cual es definida como la ciencia que estudia la anatomía microscópica de los tejidos orgánicos (Tiesler, et. al., 2006). Es así como el análisis microscópico del tejido óseo ha tenido gran acogida dentro del quehacer de la antropología con fines de identificación. Cabe aclarar que la histología emplea el estudio histomorfológico del tejido óseo, el cual constituye una herramienta de gran importancia analítica que, junto con la radiografía, la tomografía, la microscopía electrónica, incluso con el estudio del ADN, va más allá del análisis de la antropología osteológica tradicional (Tiesler, et. al., 2006). Igualmente, la histología se apoya en la técnica histomorfométrica, la cual evidencia que los huesos tienen una propiedad única de generar un registro vivo y dinámico de los eventos metabólicos codificados en su microestructura (Stout, 1988; Stout, et. al., 1992).

## **CAPÍTULO TEÓRICO**

### **Aplicación de la osteología**

La osteología es considerada una parte fundamental dentro del conocimiento de la antropología biológica, específicamente en su aplicación en el campo forense. Antes de tornarse indispensable en el quehacer de la antropología forense, se observó su aplicación en el campo arqueológico, lo que dio lugar a una disciplina conocida como bioarqueología. El interés de este trabajo es profundizar en la aplicación que se le da a la osteología en la antropología forense con el objetivo de identificar individuos esqueletizados, en avanzado estado de descomposición, carbonizados y/o incinerados (White y Folkens, 2005; Ubelaker, 2008). Sin importar el campo de investigación, la información obtenida de los restos óseos deja ver particularidades relacionadas con la vida del individuo, su nutrición, actividades ocupacionales, características sobre su perfil biológico, permitiendo más adelante realizar perfiles demográficos (Buikstra y Ubelaker, 1994; Ubelaker, 2008).

La necesidad de obtener un estudio preciso sobre el hueso conllevó a que se hayan realizado múltiples investigaciones en todos los niveles, inicialmente a nivel macroscópico para luego introducirse en estudios más minuciosos, el nivel histológico. El fin de incursionar en este nivel consistió en conocer características que no eran visibles por medio de los métodos morfológicos o macroscópicos tradicionales. Entre estas características se encuentran algunas que son requerimientos principales para la identificación de un individuo

a nivel antropológico, como el establecimiento de ciertos rasgos biológicos y demográficos, tales como la edad, el sexo, la estatura, filiación poblacional o ascendencia, patologías, traumas *antemortem*, características individualizantes que pueden ser determinadas a través del uso de técnicas macroscópicas y microscópicas (Keough et. al., 2009).

En Colombia, la información en investigación biológica básica poblacional relacionada con histología ósea es escasa. Las pocas investigaciones existentes se centran en enfermedades de tipo metabólico observables en piezas óseas (Quintana, et. al., 2004), pero no se han realizado investigaciones que abarquen todo el ciclo vital humano para la búsqueda de los patrones de cambios óseos concernientes a la edad biológica en población colombiana.

### **Edad cronológica vs. Edad biológica**

Dentro de las características más importantes, pertenecientes al perfil biológico de un individuo, se encuentra la edad. Es común encontrar múltiples investigaciones centradas en la obtención de datos que permiten la determinación de la edad de muerte derivada de restos óseos humanos, debido a que la estimación de esta es uno de los datos más importantes a la hora de identificar y fácil de cotejar (Willows, 1991). La estimación de la edad del esqueleto por medio de métodos antropológicos consiste en el establecimiento de la edad biológica para, posteriormente, tratar de relacionarla con la edad cronológica a la hora de la muerte (Katzenberg y Saunders, 2008). Esto es el cotejo de los resultados de análisis en laboratorios de antropología y los datos *antemortem* del individuo esquelético.

La importancia que adquiere la estimación de la edad como uno de los aspectos para la identificación en antropología forense, está relacionada con la estructura de la pieza ósea, ya que es un elemento resistente y está en continuo cambio, como el crecimiento y desarrollo individual, la actividad física, condicionantes culturales, entre otros (Rodríguez, 2004). De esta manera se convierte en una estructura resistente a los cambios que se producen durante la vida del individuo (Restelli, 1997).

Cuando se habla de edad biológica se hace referencia al tiempo de desarrollo de un individuo que va desde su concepción hasta el momento de realizarle un estudio y la edad cronológica o absoluta hace referencia al lapso que va desde el nacimiento hasta el momento de someter al individuo al estudio de estimación de edad. La relación entre la edad biológica y cronológica no siempre coincide, dado que los cambios biológicos no son uniformes y están influenciados por diversos factores como el sexo, la ascendencia, la actividad ocupacional, la alimentación y nutrición, las patologías, entre otros factores que hacen se genere una variabilidad poblacional, que conlleva a que la estimación de la edad biológica no coincida con la cronológica (Işcan y Kennedy, 1989).

Un aspecto que permite obtener un dato confiable relativo a la estimación de edad de aplicación a nivel poblacional está relacionado con una muestra significativa de un grupo poblacional específico, por ello la importancia de recurrir a las colecciones de referencia (Schmitt, et al., 2002), en este caso, la colección de referencia empleada fue la del Laboratorio de antropología osteológica de la Universidad de Antioquia.

## **Composición del Tejido óseo**

El material óseo es un tejido que se encuentra en un cambio frecuente, es decir, dependiendo de su estado de desarrollo o de vida, está en continua transformación debido a su crecimiento y desarrollo, a esto sumado las características individuales que influyen en el hueso, los cambios relacionados con el estrés ocupacional y el entorno social (Rodríguez, 2004). Estos datos se observan como una evidencia de los cambios que se producen en el individuo durante su existencia y que se reflejan en sus huesos (White y Folkens 2005).

Para entender todos estos procesos de transformación a nivel osteológico, es necesario entender cuáles son las funciones principales del sistema óseo, como la locomoción y sostén del cuerpo, la protección de los órganos vitales, su función de reserva mineral, homeostática y hematopoyética. Este último proceso está enfocado en los huesos largos, allí se dispone la médula ósea conformada por varias células, como las sanguíneas, linfáticas, mesenquimales, tanto de origen precursor hematopoyético como óseo (White, et al. 2005).

Las piezas óseas están conformadas macroscópicamente, por dos estructuras óseas que le permiten al hueso tener una resistencia tanto en su estructura interna como externa. A pesar de esta resistencia y dureza, el hueso está diseñado para permitir el paso de vasos sanguíneos y procesos metabólicos del mismo. Este conjunto de materiales que componen la estructura ósea son el tejido laminar que compone la cortical del hueso y el tejido trabecular que se caracteriza por formar un entramado para facilitar proceso hematopoyético del hueso (White, et al., 2012; Ross y Pawlina 2007).

El tejido trabecular se encuentra en las epífisis de los huesos largos (extremos), en huesos cortos como las vértebras y en el diploe de los huesos planos. La estructura cortical se localiza en la diáfisis de los huesos largos (como el fémur, la tibia, el húmero, entre otros, protegiendo la médula ósea y cubriendo la parte externa de los huesos planos como los coxales, el cráneo, etc.) (Figura 1). Estos tejidos están recubiertos a su vez por una delgada capa llamada periostio, que como explica Kerley (1965), es un tejido fibroso, vascular y conectivo que consta de externa de una capa celular interna que incluye células osteoprogenitoras u osteogénicas y que se encuentra unida al hueso por fuertes fibras de colágeno llamadas fibras de Sharpey. La cavidad central del hueso también está recubierta con una capa interna llamada endostio. Este es un tejido conectivo laxo, delgado y especializado, compuesto de una cubierta que contiene células osteoprogenitoras y osteoblastos.

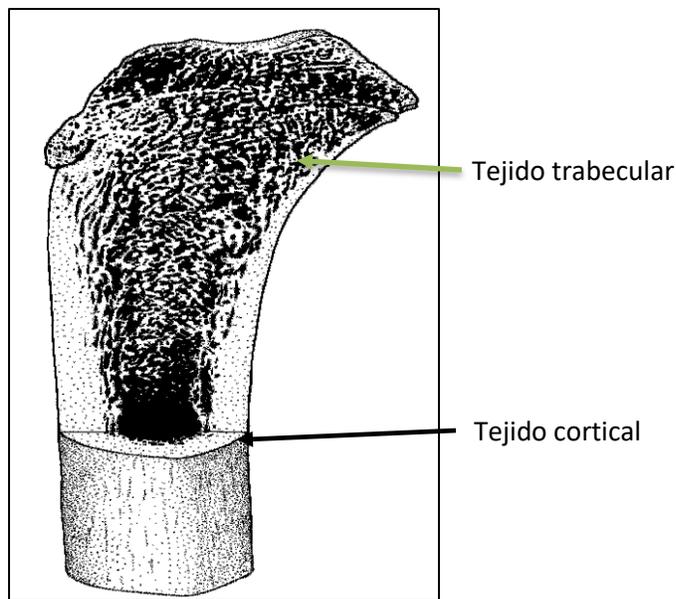


Figura 1. Hueso cortical y esponjoso (White, Black y Folkens 2012)

## **Composición microestructural**

Dimitriou y colaboradores (2005), definen el hueso como un “tejido conectivo especializado cuya matriz extracelular está calcificada e incluye las células que lo secretan (...)”. En otras palabras, el tejido óseo está integrado por una matriz orgánica, minerales inorgánicos y agua. Aproximadamente, el 95% del material orgánico está compuesto por proteínas y colágenos, especialmente de colágeno tipo I que conforma el 90% del contenido orgánico del hueso. El colágeno es una proteína constituyente de los tejidos conjuntivos, como la piel, los tendones y el hueso, es la proteína más abundante del organismo. Está conformado por fibras que se disponen principalmente de manera longitudinal, esto depende de la función biomecánica que se genere en el hueso (Royce, et. al., 1993). El componente inorgánico de la matriz ósea está compuesto por cristales de hidroxapatita que se encuentran alojados en las fibras de colágeno, a esto se le suma la presencia de calcio y agua que se encuentra en las estructuras porosas del hueso, esta última se reduce a medida que se da el proceso de mineralización de la matriz orgánica (White y Folkens, 2000).

## **Células óseas**

Microestructuralmente, el tejido óseo está compuesto por células óseas que se diferencian según su función o procesos ya sean de deposición o resorción. Estas células son las osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Las células osteoprogenitoras se producen por células mesenquimatosas primitivas que constituyen la capa más profunda del periostio y del endostio, al igual que las paredes de los conductos de Havers -unidad

básica estructural o multicelular UBM- que son los canales que llevan al interior del hueso los vasos sanguíneos para el intercambio de oxígeno y nutrientes y de esta manera eliminar los desechos (Tiesler, 2006). Estas a su vez se diferencian en osteoblastos que son las células mononucleadas de origen periostal que sintetizan los componentes de la matriz ósea.

Los osteoblastos depositan matriz ósea, es decir, su función es la de modelar y remodelar hasta el punto de quedar rodeadas por la misma matriz producida, quedando atrapados en las lagunas concéntricas de las osteonas, perdiendo sus capacidades para seguir cumpliendo las funciones de osteoblastos y es por esto por lo que se les llama osteocitos. Los osteocitos no segregan materiales de la matriz ósea y su función es la de mantener las actividades celulares del tejido óseo como el intercambio de nutrientes y productos de desecho. Los osteocitos se dividen en osteocito tipo I o activo y osteocito tipo II o inactivo, el primero se encuentra próximo al final de su ciclo de modelación más no de su vida media. Tienen como objetivo ayudar a la construcción de lo que será un canal de Havers.

Los osteocitos dan lugar a una estructura cristalina de calcio concéntrica, queda encerrado en lo que se conoce como fosa o laguna de osteocito u osteoplasto. También se divide en osteocito tipo II o inactivo; este está más cercano al final de su vida media, ya está totalmente encerrado en su laguna de Howship, que se encuentra en un extremo de remodelación del canal de Havers y al morir deja su espacio vacío, lo que conformará más adelante una osteona secundaria. (Tiesler et al. 2006).

En los huesos también se encuentran las células óseas llamadas osteoclastos que son células multinucleadas, macrófagas, que se encuentran en la superficie del hueso y cuya

función es la resorción ósea que se da debido a la actividad de las enzimas lisosómicas que permiten el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación normales del hueso (Stout y Crowder, 2012).

### **Clases de huesos según la formación**

Existen dos tipos de tejido óseo que se deben diferenciar según su período de desarrollo en el individuo. Uno de estos tejidos es el hueso inmaduro o *woven bone*, hueso entretejido al que se le da este nombre por estar compuesto de fibras de colágeno que no obedecen a ningún patrón y se distribuyen de manera aleatoria. Una de sus principales características es que está compuesto casi en su mayoría por tejido orgánico, representado en colágeno tipo I, el cual es el primero que se forma durante el desarrollo fetal (Fazekas y Kosa, 1978; (Kosa, 1989) y en la reparación ósea es el primero en actuar, por lo que el contenido mineral que existe en este hueso primario es mucho menor que el del desarrollo del hueso maduro del adulto (Tiesler, 2006).

En el hueso del adulto se apreciará en situaciones que impliquen estados de crecimiento rápido, reposición o alto recambio óseo, circunstancias reparadoras o patológicas (Scheuer, & Black, 2000). El hueso maduro, laminar o secundario, consta de láminas o placas óseas superpuestas por el proceso de crecimiento. En resumen, el tejido óseo secundario compuesto de láminas paralelas o concéntricas que contiene laminillas intersticiales, en otras palabras, es el hueso maduro (Streeter, 2010).

Las fibras de colágeno en el hueso adulto se organizan formando laminillas óseas de manera organizada, pueden ser paralelas o concéntricas. Los osteocitos se ubican en los osteoplastos, ya sea entre las láminas concéntricas o dentro de ellas. No quedan aislados, por el contrario, se caracterizan por mantener una comunicación basada en prolongaciones citoplasmáticas, también conocidas como canalículos. Los sistemas de Havers miden aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las unidades se presentan en forma de láminas concéntricas alrededor del canal de Havers (su centro vascularizado) y se comunican o conectan con otros canales como el canal o conducto de Volkmann que perforan el periostio. Se pueden apreciar, además, los sistemas circunferenciales internos y externos que se componen de laminillas paralelas dispuestas debajo del periostio y del endostio. (Figura 2). Las laminillas intersticiales se sitúan entre los sistemas circunferenciales y las osteonas. (Desántolo, 2012)

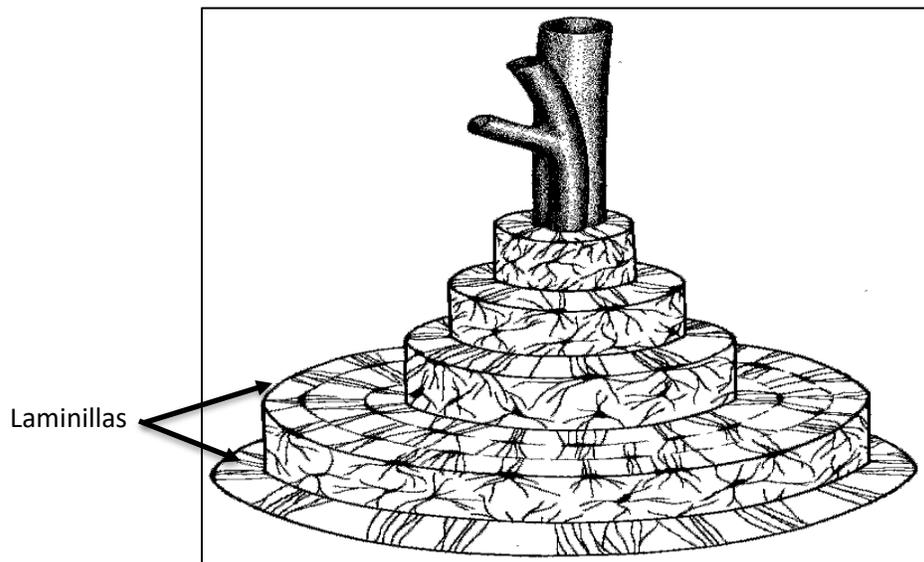


Figura 2. Sistema de Havers (White, Black y Folkens 2012)

Lo anterior es consecuente con el proceso conocido como osteogénesis o formación del hueso. Este proceso se produce de forma distinta dependiendo del hueso que se considere, así, existen dos tipos de osificación intramembranosa y endocondral. La intramembranosa se observa en el proceso de formación de los huesos planos y tiene lugar directamente a partir de la mesénquima, mientras que la endocondral se caracteriza porque la formación del hueso está precedida de la aparición de un molde de tejido cartilaginoso (Ericksen, 1991).

Según Desántolo (2012) la formación intramembranosa del hueso se da por medio del tejido mesenquimatoso. Un ejemplo de esta situación es el desarrollo los huesos planos que se genera por formación intramembranosa de tejido óseo en tejido mesenquimatoso vascularizado. Por el contrario, la formación endocondral del hueso necesita de la presencia de un molde cartilaginoso que sirve como un modelo estructural para el desarrollo óseo, se reabsorbe y luego se reemplaza por hueso, hasta pasar a una fase de calcificación del hueso que se da debido a los depósitos de fosfato de calcio en las fibrillas de colágeno. Este tipo de formación se aprecia en huesos largos y en la mayoría de los huesos cortos. (White, et al., 2012)

### **Estructuras de orden jerárquico del hueso**

El hueso, al igual que otros materiales biológicos, posee una estructura jerárquica, que está compuesta por diferentes niveles a medida que se varíe la escala de observación. El primer nivel es el macroscópico, en este nivel se puede observar el hueso cortical y el tejido trabecular. El siguiente nivel es el microestructural (10-500  $\mu\text{m}$ ) se pueden observar osteonas y trabéculas, el tercer nivel es el submicroestructural (1-10  $\mu\text{m}$ ), en este nivel se pueden

apreciar las lamelas. Luego está el nivel nanoestructural (nanómetros – 1  $\mu\text{m}$ ) en el que se observan fibras de colágeno, hidroxiapatita y por último está el nivel molecular en el que se observan nanocristales de hidroxiapatita y tropocolágeno (Rho et al., 1998).

### **Crecimiento y maduración**

El crecimiento es un término usado para describir cambios progresivos en tamaño y morfología, durante el desarrollo de un individuo, en este caso su desarrollo óseo a nivel histológico (Scheuer y Black, 2004). Algunos de los cambios que se generan en los diversos períodos del crecimiento, se observan unos que están directamente vinculados al aumento del tamaño del organismo y otros que expresan la evolución morfológica y fisiológica proyectada a la madurez (Hall, 2005). Esto es, un cambio progresivo relacionado con la forma y el tamaño de un individuo a lo largo de su vida, el cual es un proceso cuantificable y por tanto verificable (Scheuer y Black 2004).

Simultáneamente se da el desarrollo del individuo, el cual es también un cambio progresivo tanto medible como observable, que conlleva un paso de un estado inmaduro a uno organizado, especializado y maduro (Bogin 1999). Se debe dejar claro que, aunque el crecimiento y el desarrollo se presentan de manera simultánea, son dos procesos que tienen desarrollos biológicos que difieren. Los dos procesos tienen un componente tanto genético como ambiental (White, et al., 2005). Entre esos cambios se encuentra la maduración ósea, que consiste en la transformación gradual que se pueden observar en los modelos fibrosos o cartilaginosos primarios en tejido calcificado que está relacionado con el aumento del tamaño de las piezas óseas (Scheuer y Black, 2000). Estos procesos son independientes y se regulan

por mecanismos distintos. Por eso, para analizarlo y comprenderlo no sirven las medidas absolutas del tamaño de los huesos, se deben emplear criterios morfológicos; lo que Todd denominó indicadores de madurez (Todd, 1937). Desarrollado bajo una técnica adecuada, el estudio de la maduración ósea se puede tornar el método más útil para estimar la edad biológica (Huda y Bowman. 1995).

El modelado hace referencia a los cambios de tamaño y forma del hueso. Es decir, son activaciones de formación y reabsorción de hueso de manera independiente en la superficie del hueso, provocando un cambio en su forma y tamaño (Scheuer y Black, 2004), este proceso puede observarse fácilmente durante el proceso de crecimiento y desarrollo en la infancia.

En síntesis, el crecimiento y el modelado son procesos que se dan a la par en el individuo durante su infancia y adolescencia, esto es, el crecimiento genera un incremento en la masa ósea, mientras el modelado modifica tanto el tamaño y la forma del hueso (Stout y Crowder, 2012), teniendo en cuenta que la estructura interna y la forma del hueso se adecúa a la función y requerimientos biomecánicos del cuerpo (Frost, 1985).

### **Método histológico para estimación de edad biológica**

Los métodos microscópicos para la estimación de edad incluyen la histomorfología o histología cualitativa y la histomorfometría también conocida como histología cuantitativa (Bekaert, 2004). Esta última caracterizada por emplear mediciones microestructurales del tejido óseo, incluyendo cantidad de estructuras, tamaño de áreas, entre otros (Robling y Stout

2008). Este método permite estimaciones más precisas y efectivas para individuos esqueletizados, pues no se centra en el aspecto morfológico o macroscópico y para su aplicación no se requiere de la pieza ósea completa (Bouvier y Ubelaker, 1977; Ubelaker, 1996).

Para aplicar cualquier método histológico es indispensable conocer la estructura ósea y tener clara su composición a nivel microscópico, como las células que lo componen, las sustancias minerales, entre otros, de este modo se podrá entender cómo la forma, la estructura interna de un hueso y las unidades que lo componen se adaptan a la función y a las necesidades biomecánicas generadas dentro de su ciclo vital humano (Stout y Crowder 2012).

El tejido óseo sufre cambios en su estructura micro y macroscópica a través de la vida del individuo. Estos cambios involucran acciones fundamentales como el remodelado, acción ejercida por los osteoclastos -célula ósea macrófaga-, que se encargan de generar los espacios de resorción y por los osteoblastos -célula ósea reparadora- que tienen la función de reestablecer los espacios formando unidades definidas y cuantificables microscópicamente, por ejemplo, la osteona secundaria o unidad estructural básica.

El sistema de Havers u osteona se puede definir como el conjunto de microestructuras encargadas de la remodelación ósea por aposición y del intercambio de nutrientes con el torrente sanguíneo para mantener el tejido y las células que lo componen (Tiesler et al., 2006). Estructuralmente, el sistema haversiano se encuentra compuesto por vasos sanguíneos, sistema nervioso, lagunas, canalículos, láminas y cada sistema está conformado

por láminas dispuestas de concéntricamente alrededor de un espacio vascular llamado canal haversiano (Currey,1964; Yoshino et al., 1994).

De esta estructura fundamental del tejido óseo se pueden distinguir varios tipos de osteonas, las osteonas tipo I también conocidas como osteonas secundarias son las más comunes (Frost, 1987). Estas se encuentran en individuos adultos debido a que son el resultado de la remodelación intracortical (Pfeiffer et al.,1995). También se encuentran las osteonas tipo II, se caracterizan por contar con una línea de cemento, laminillas concéntricas observables dentro de una osteona preexistente, es decir como producto de la remodelación al interior de la osteona en respuesta a la necesidad de homeostasis mineral. Estas osteonas tipo II son conocidas como sistemas haversianos formados (Tiesler et al., 2006).

Las osteonas fragmentarias son unidades remanentes de antiguas osteonas que han sido parcialmente reabsorbidas mientras se forma una nueva osteona por lo que su canal de Havers es casi nulo. Las osteonas doble zona son unidades que presentan una hipercalcificación en uno de sus anillos concéntricos, lo que representa una recuperación y reanudación del crecimiento después de un estrés marcado (Stout y Crowder, 2012). En el hueso cortical las unidades microscópicas están caracterizadas por las osteonas secundarias. Estas últimas se diferencian de las primarias, porque poseen una línea de cemento que la delimita, dejando ver procesos de resorción y deposición (Stout y Crowder, 2012).

La etapa de formación continua de la osteona es lo que se conoce como remodelación ósea, esto es un proceso que incluye una deposición y mineralización de laminillas concéntricas que tienen efecto en el espacio de remodelación que a su vez se contrae. Se debe

entender que la remodelación es un proceso continuo, es decir estará presente durante todos los ciclos de la vida, desde el nacimiento hasta la muerte. Este proceso de remodelación hace posible analizar la relación entre la cantidad de las osteonas presentes y la edad del individuo que se estudia, o como lo plantean Stout y Crowder (2012) establece el punto de partida de los métodos histológicos sobre la estimación de edad biológica empleando tejido óseo.

### **Métodos para estimación de edad biológica más empleados a nivel mundial**

A partir de estas pautas propuestas para trabajar el hueso microscópicamente, a nivel internacional son varios los estudios que se realizaron mediante análisis histológico, con el fin de conocer características que no son visibles con los métodos morfológicos o macroscópicos tradicionales. El primero de ellos y más emblemático y controvertido por ser una de las primeras aplicación fue el de Ellis Kerley (1965) quien utilizó un método basado en el análisis microscópico de la cortical de huesos largos para realizar un conteo de osteonas completas, fragmentadas, hueso circunferencial, laminar y canales haversianos y algo que llamo la atención fue el hecho de no encontrar diferencias significativas entre hombres y mujeres, pese a emplear edades que recorrían todo el ciclo vital (Desántolo, 2012).

Ahlqvist y Damsten en 1969 basados en el método de Kerley (1965), implementaron el método para conteo de osteonas completas y fragmentarias, es decir el porcentaje de campo microscópico que ocupa el hueso remodelado, pero no pudieron hacerlo con la misma facilidad, por lo que hicieron modificaciones a su método, pero sus resultados fueron menos precisos que los obtenidos por Kerley (1965). El modelo propuesto por Singh y Gunberg (1970) está cimentado en el mismo modelo, pero tuvo un problema y es que su muestra se

componía de mayor número de hombres que de mujeres, por tanto, su observación se basó en lo analizado en la muestra de los hombres (Desántolo, 2012).

Stout y Paine (1992) proponen trabajar sobre huesos como la clavícula y las costillas por lo que desarrollaron ecuaciones predictivas a partir de la cuantificación de características como el área cortical, la densidad de osteonas completas, la densidad de osteonas fragmentarias y densidad total de osteonas visibles. En su aplicación no encontraron diferencias significativas entre las medias de las edades conocidas y las estimadas. Por lo que se tornó un método fiable.

Streeter (2010), plantea un método de cuantificación de características o variables microestructurales observadas en secciones delgadas de hueso, como el número de osteonas completas y fragmentarias, procesos de modelado y remodelado, presencia de hueso entretejido, hueso lamelar primario, diámetro de conductos de Havers, corteza pleural y cutánea, pero en individuos subadultos. Este es el método aplicado en el presente trabajo de investigación.

Los estudios más recientes se encuentran en América latina, donde en el 2012, Desántolo empleó la técnica de histomorfometría propuesta por Stout y Paine (1992) aplicada en fémur con el fin de observar número total de osteonas completas, número de osteonas fragmentarias, diámetro promedio de los conductos de Havers, porcentaje de osteonas fragmentarias y la densidad poblacional osteonal.

Desde entonces muchas investigaciones han utilizado diferentes huesos, incluyendo una gran cantidad de variables, probando el método en otras poblaciones, etc.; pero, en general el método requiere de tiempo y conocimiento para ser aplicado en el tema, en características básicas como la identificación de los elementos estructurales. Según Robling y Stout (2008) otro de los grandes inconvenientes que se encuentran al comparar los diversos métodos es el planteamiento de que diversas características pueden cambiar con la edad. Por ejemplo, algunos investigadores reportaron el tamaño del canal de Havers aumentando con la edad y otros encontraron que disminuían como en el caso de Singh y Gunberg (1970). A eso se le suma los investigadores que reportaron no hubo cambios en el tamaño de los canales de Havers.

Es de aclarar que en la mayoría de los textos y artículos que estudian el tema de la osteología humana, explicitan que se requiere de investigaciones puntuales sobre poblaciones locales y por ende la elaboración de atlas histológicos para huesos específicos, tal como lo recomendó Frost (1987), al igual que la extracción de tasas de remodelación ósea, el planteamiento de la variación interpoblacional como lo señala Burr (1990); o la elaboración de métodos y el ajuste de los existentes a la variación biológica de poblaciones modernas (Stout y Paine, 1992); e incluso la necesidad de desarrollar ecuaciones para poblaciones específicas en los temas de estimación de edad histológica (Yoshino et al., 1993) y lo más importante, la recomendación de evaluar la variabilidad y variación poblacional en cuanto a crecimiento, modelado y tasas de remodelado alcanzado, ya que la dinámica del crecimiento del tejido óseo ha sido poco estudiada, tal como lo afirmó Fonseca y otros en el año 2009.

Las nuevas ideas que se plantean a nivel académico e investigativo han generado diversos métodos y técnicas para el acercamiento al conocimiento de las identidades de los individuos esqueléticos hallados tanto en contextos arqueológicos como forenses. Estas perspectivas incluyen la estimación de la edad en restos humanos, dando lugar a diversas investigaciones osteoantropológicas, donde convergen necesariamente otras disciplinas. (Suzuki, et al., 2013)

Como producto de lo anterior, los investigadores han generado una serie de métodos y técnicas basadas en procedimientos multifactoriales, bajo el empleo de herramientas estadísticas. Al desarrollar estos métodos cuantitativos, se espera sirvan de complemento a los métodos tradicionales macroscópicos, sobre todo cuando no se encuentran las piezas óseas recomendadas o necesarias para estos métodos o se encuentran individuos esqueléticos con mayor fragmentación ósea (Willows, 1991; Ferrante y Cameriere, 2009).

El fundamento fisiológico de la mayoría de todas las técnicas histomorfométricas se encuentra en el desarrollo y aumento de microestructuras conocidas como osteonas. Las osteonas son estructuras tridimensionales que se observan en el tejido óseo, las cuales se pueden considerar como evidencia de un proceso de remodelación ósea. La remodelación ósea es una actividad fisiológica multicelular que remueve la matriz ósea innecesaria o en exceso y deposita una nueva matriz para producir un equilibrio en el hueso, procesos conocidos como deposición y reabsorción (Stout y Crowder, 2012).

Dado que este proceso ocurre en el transcurso de toda la vida para garantizar mantenimiento de la calidad ósea y también para el equilibrio del calcio, hay una correlación

numérica y logarítmica que se establece entre la cantidad de las osteonas presentes en una pieza ósea y la edad cronológica del individuo, lo que conllevará a la estimación histológica de la edad (Stout y Crowder, 2012; Streeter, 2010).

## **Las costillas**

El presente trabajo histológico para la estimación de la edad, se decide trabajarlo con las costillas. Las costillas son huesos largos, elásticos, que junto a la columna vertebral y el esternón forman el tórax. En total, las costillas son 24 (doce pares), forman las paredes laterales del tórax, así como la mayor parte de su pared anterior y posterior, pero puede haber excepciones, es decir, un individuo puede ser supernumerario y presentar más costillas de las habituales.

Las costillas constan de cinco partes en general: 1. Cabeza o extremo proximal, presenta dos carillas articulares separadas por una cresta, destinadas a articular con las vértebras correspondientes. 2. El cuello de la costilla es un adelgazamiento que se encuentra entre la cabeza y la tuberosidad. 3. La tuberosidad es una saliente ósea, la cual presenta una carilla lisa destinada a articular con la carilla de la apófisis transversa de la vértebra correspondiente. 4. El cuerpo es una estructura aplanada en sentido transversal y alargado. Determina una larga convexidad posterior, lateral y luego anterior. Su dirección general es oblicua, hacia abajo y adelante. 5. El extremo esternal da inserción al cartílago costal por una superficie ovalada más o menos deprimida (White y Folkens, 2005).

La cabeza de cada costilla se articula con uno o dos cuerpos vertebrales de las vértebras dorsales que le corresponden, en tanto la tuberosidad lo hace con la apófisis transversa de la vértebra con que se relaciona. De esta unión vertebral, cada costilla se curva hacia fuera y luego hacia delante y abajo, esta posición es importante en el acto mecánico para la respiración.

En su posición anterior, hay costillas que relacionan directamente con el esternón y otras que no, de allí sus denominaciones como Costillas verdaderas que son las numeradas de la 1 a la 7, sus cartílagos costales se articulan directa e individualmente con el esternón; igualmente están las costillas falsas, van de la 8 a la 10. Estas se articulan indirectamente con el esternón. Lo hacen uniéndose con el cartílago de la costilla número 7; y por último encontramos las costillas flotantes que corresponden a la numeración de la 11 y la 12. Estas en ningún momento se articulan con el esternón (Scheuer y Black, 2004).

Las costillas comienzan su crecimiento a nivel endocondral desde su centro primario de osificación durante el segundo mes de vida intrauterina. Al nacer, las costillas del neonato tienen la morfología básica que se encuentra en los adultos. Sin embargo, la curvatura de las costillas en los infantes está orientada horizontalmente, y en la infancia temprana, la torsión del eje del tórax hace que la porción ventral de las costillas se dirija hacia abajo como en el tórax adulto. Este es un reflejo de la función diafragmática para que se dé un papel más activo del tórax en la respiración (Scheuer y Black, 2004).

Durante el crecimiento durante la infancia, la caja torácica se va expandiendo para tomar luego proporciones adultas a través de la deriva cortical (Figura 3). La deriva cortical

mueve la corteza lejos de la cavidad pleural y hacia afuera hacia la superficie cortical. Debido a este mecanismo, el hueso más antiguo se reabsorbe sobre la superficie plural periosteal y la superficie cutánea endosteal, mientras que el hueso se deposita sobre la superficie pleural endosteal y cutánea periosteal de las costillas (Frost, 1963).

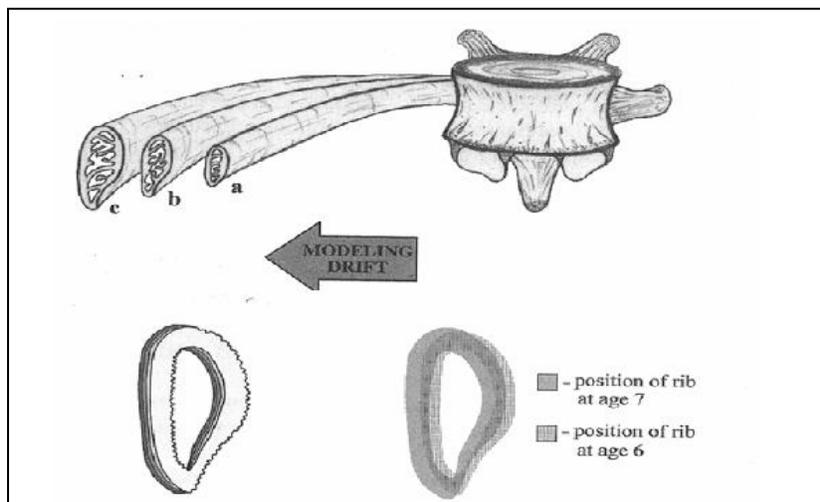


Figura 3. Modelado de la deriva de la costilla humana (Robling y Stout 2008)

Todos los huesos, incluyendo las costillas están recubiertos por el periostio. El periostio está conectado al hueso por fibras colágenas llamadas fibras de Sharpey. Dentro de la capa fibrosa se encuentran el tejido nervioso y los vasos sanguíneos. Es también donde los músculos se adhieren al hueso. La capa osteogénica se encuentra junto al hueso y contienen células progenitoras que tienen la capacidad de desarrollarse en osteoblastos (Todd, 1937).

Las costillas se componen de hueso cortical y trabecular. Hueso cortical o compacto está densamente organizado y da a la costilla su forma y estructura total. Dentro de la cavidad medular se encuentra el hueso esponjoso o trabecular (Figure 4). El hueso trabecular tiene

una superficie mucho mayor que el hueso cortical y es muy vascular. Es dentro del hueso trabecular que se encuentra la médula ósea y se produce la hematopoyesis o producción de glóbulos rojos (White, et al., 2012).

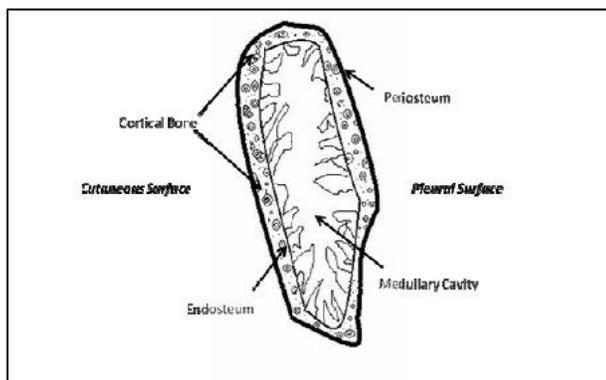


Figura 4. Corte transversal de costilla (Robling y Stout 2008)

La fórmula de regresión de Stout y Paine (1992) fue el primer método histológico para estimación de edad que se aplicó empleando costillas. Tiesler et al., (2006) considera que el empleo de costillas es menos invasivo, ya que no destruye los huesos largos como el fémur y la tibia. Esto permite que estos huesos queden intactos para estimación de otras características biológicas necesarias para la identificación de individuos esqueletizados.

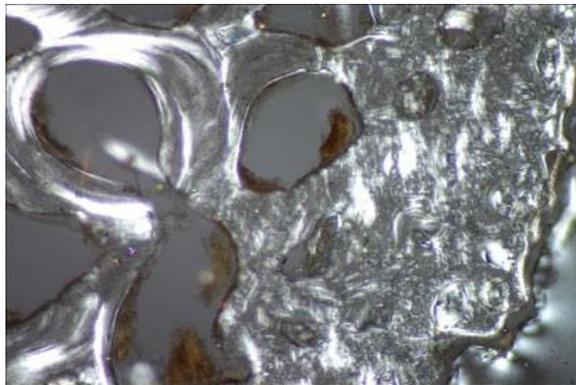
Otra de las razones para emplear las costillas es que hacen parte del esqueleto axial, por lo tanto, son menos influenciadas por los factores biomecánicos independientes de la edad que sí afectan a los huesos largos directamente.

## MÉTODO HISTOMORFOLÓGICO DE STREETER (2010)

El método histomorfológico aplicado en el presente trabajo fue el método de Streeter (2010) que consistió en la observación de la distribución y cantidad de hueso entretejido o woven bone, hueso lamelar primario y remodelación en las cortezas pleural y cutánea.

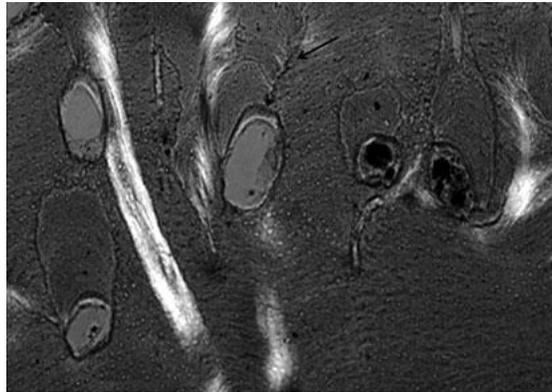
Después de esta correlación, se categorizó a los individuos esqueletizados en alguna de las 4 fases propuesta por la autora (Streeter, 2010).

Fase I. < 5 años: la costilla está formada en su mayoría por hueso entretejido, no es corriente que exista hueso lamelar o remodelación de hueso, aunque el lamelar puede aparecer en la zona endosteal del córtex pleural. El córtex pleural es mucho más grueso y denso que el cutáneo (Figura 5).



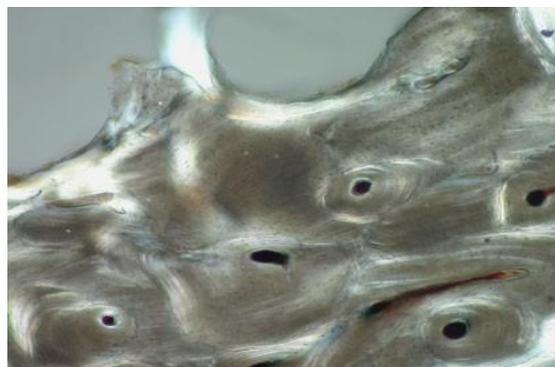
*Figura 5.* Fase I. hueso entretejido, costilla de individuo de 3 años. Luz Polarizada (Streeter, 2010)

Fase II. Entre 5 y 9 años. Comienza la remodelación de hueso en el centro de la zona periosteal del córtex pleural, con grandes osteonas de deriva. El córtex pleural es en su mayoría hueso lamelar con canales de Volkmann, y el córtex cutáneo está constituido por hueso entretejido, con menos canales vasculares que en la fase I (Figura 6).



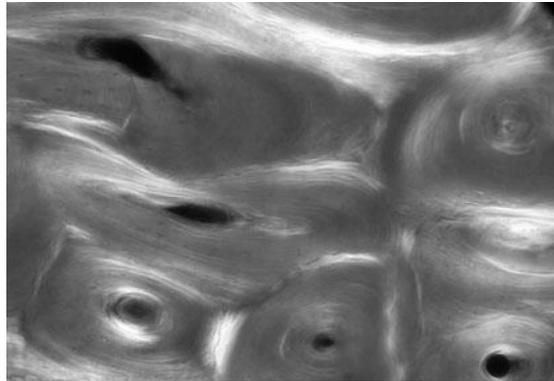
**Figura 6.** Fase II hueso entretejido, costilla de individuo de 6 años. Luz Polarizada (Streeter, 2010)

Fase III. De 10 y 17 años. Se observa mucha remodelación sobre gran cantidad de hueso lamelar. La remodelación es más intensa en el pleural. El cutáneo presenta grandes zonas de reabsorción, con hueso lamelar en la zona periosteal y una característica corteza de hueso entretejido por fuera de esta (Figura 7).



**Figura 7.** Fase III hueso primario con remodelado, costilla de individuo de 17 años. Luz Polarizada (Streeter, 2010)

Fase IV. Entre 18 y 21 años. Anillo de hueso lamelar a lo largo de todo el córtex. La remodelación es muy densa, observándose muchas osteonas fragmentarias y más cantidad de osteonas tipo I (Figura 8).



**Figura 8.** Fase IV Osteona Tipo I en costilla de individuo de 21 años. Luz Polarizada (Streeter, 2010)

**Tabla 1.** Modelo histomorfológico propuesto por Streeter (2010)

MÉTODO HISTOLÓGICO DE CUATRO FASES EN COSTILLA (STREETER, 2010)					
FASES EDAD CRONOLÓGICA	Hueso lamelar primario	Remodelado	Hueso entretejido	Corteza cutánea	Corteza pleural
I (< 5 años)	Escaso	Escaso	En ambas cortezas está presente	Se presenta más delgada, hay presencia de tejido oseoso desordenado. Presenta muchos canales vasculares primarios	Se presenta más gruesa, hay mayor hueso entretejido en ella, El tejido lamelar primario se empieza a formar inicialmente en el área endosteal

II (5-9 años)	Se encuentra en la corteza pleural	Grandes osteones de deriva inician en la corteza pleural originándose en el periostio	Se presenta en algunas áreas de la corteza cutánea y muy pocas en la corteza pleural	Es más delgada principalmente intracortical Hueso tejido, menos Canales vasculares	Es más gruesa, hay principalmente hueso lamelar primario. Hay pocas Osteonas de deriva y bastantes canales de Volkmann
III (10-17 años)	Se encuentra en ambas cortezas Intracortical y periostealmente	Se presentan osteonas de deriva en ambas cortezas	Corteza fina en superficie periosteal cutánea	Más delgada, hay mayor hueso lamelar con presencia de algún remodelado. Presenta poco hueso entretrejido y grandes zonas aisladas de resorción (osteones de deriva)	Presenta remodelación más gruesa y más densa. Presenta algunas áreas con hueso lamelar primario.
IV (18-21 años)	Ambas cortezas lo presentan a nivel periosteal	Ambas cortezas presentan menos Osteonas de deriva y más Osteonas tipo I	Escaso	Presenta remodelación, es más delgada y densa, Puede presentar de 2 a 3 filas de Osteonas profundas	Presenta remodelación más gruesa y densa, Presenta de 3 a 4 filas de Osteonas profundas. Escases de áreas con hueso lamelar primario

Como se puede observar, el método no trata de calcular una edad numérica sino asignar una fase a través de los criterios cualitativos presentados por Margaret Streeter (2010) (Tabla 1).

### **Conteos selectivos histológicos**

En la práctica del análisis histomorfométrico, especialmente en costillas, se emplea un sistema de análisis llamado “patrón de ajedrez” usualmente constituye el procedimiento base del protocolo que emplearon Stout y Paine (1992). El patrón consiste en cuantificar campos microscópicos, los cuales se definen por una retícula que se introduce en el lente

ocular. Con este sistema se lee toda el área de la sección dos veces. Este método fue desarrollado para casos forenses en Estados Unidos y ha resultado de gran valor, pero en muestras arqueológicas no, debido a que no siempre presentan el estado de conservación necesario para aplicarlo posiblemente por daños tafonómicos (Behrensmeier, 1978).

En la práctica, esta limitante ha resultado en la imposibilidad de contar secciones que no se encuentran preservadas en su totalidad. En atención a este problema, se generó y probó el concepto de los “conteos selectivos” como alternativa y consiste en contabilizar solamente campos conservados sin seguir el sistema de “patrón de ajedrez”. Siguiendo este procedimiento en el presente estudio, se ubicaron 4 campos con la menor presencia de daños tafonómicos para cada muestra y se observan las características propuestas por Streeter.

En resumen, la técnica empleada es la cuantificación de características de estructuras microscópicas observadas en secciones delgadas de tejido óseo, esto es, procesos de modelado y remodelado, número de osteonas completas, fragmentarias, presencia de hueso entretejido, lamelar primario, diámetro de conductos de Havers, corteza pleural y cutánea, entre otros (Streeter, 2010), que se traducirán en valores cuantitativos para comprender el nivel de confianza del método de cuatro fases en costilla de individuos subadultos como se desarrollará en el capítulo de materiales y métodos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para esta investigación se recurrió a la colección de referencia de la Universidad de Antioquia compuesta en el momento por 510 individuos esqueletizados y de estos 36 individuos subadultos integrados por fetos, neonatos, infantiles, niños y jóvenes hasta los 25 años. Esta colección se destaca por tener hombres y mujeres que abarcan todo el ciclo vital humano y por contar con la documentación *antemortem* necesaria para el cotejo de resultados, lo que posibilita realizar investigaciones de índole académico que aporten al conocimiento sobre la variabilidad de la población antioqueña.

La investigación se desarrolló bajo un estudio transversal que recorrió el ciclo vital humano de individuos con edades entre 3 a 19 años. Se debe aclarar que este estudio se perfila por tener un carácter exploratorio y descriptivo, razón por la cual se tomaron inicialmente 16 individuos subadultos esqueletizados de los cuales basados en los criterios de inclusión y exclusión que se desarrollarán más adelante, se redujo a una muestra de 10 individuos subadultos esqueletizados representativos de las fases propuestas por Streeter (2010) y de cada fragmento de costilla se extrajeron 3 muestras.

El trabajo se basó en el método cualitativo propuesto por Streeter (2010) y se complementó dándole unos valores para realizar el análisis cuantitativo correspondiente. El método consistió en la cuantificación de características o variables microestructurales observadas en secciones delgadas de hueso, como los procesos de modelado y remodelado, presencia de hueso entretejido, hueso lamelar primario, corteza pleural y cutánea, entre otros (Streeter, 2010), que se tradujeron en valores cuantitativos para comprender el nivel de

confianza del método de cuatro fases en costilla de individuos subadultos de la muestra seleccionada.

### **Proceso Metodológico**

Para esta investigación se realizó un estudio histomorfológico en hueso no descalcificado, el cual constituye una técnica microscópica especializada que examina secciones delgadas de muestras óseas (Cano, et al., 2005). Como la descalcificación no es necesaria, es apta para examinar materiales óseos diagenéticamente alterados de forma moderada en contextos forenses y arqueológicos donde habría dificultad para aplicar los métodos macroscópicos diseñados para huesos en buen estado de conservación. (Suzuki, et al., 2013)

### **Criterios de inclusión y criterios de exclusión**

Para la obtención de la muestra se realizó el reporte sobre el sexo, edad cronológica y demás características que resultaron en variables para los resultados. Se seleccionaron individuos esqueletizados entre 3 y 19 años según lo registrado en la base de datos de la colección de referencia osteológica del laboratorio de antropología osteológica de la Universidad de Antioquia. Este dato se procedió a verificar con la documentación existente de los individuos que igualmente reposa en los archivos del laboratorio.

Luego de este procedimiento, se descartaron los individuos esqueletizados que no registraban sexo conocido, igualmente aquellos que presentaban patologías óseas o daños

tafonómicos en sexta costilla, esto para evitar que en el proceso de microscopía se registraran alteraciones en la formación del tejido óseo, especialmente en su cortical, lo que conllevaría a la imposibilidad de observar las características histomorfológicas necesarias para aplicar el método de Streeter (2010) y por último que no estuvieran en la edad de estudio de 3 a 19 años.

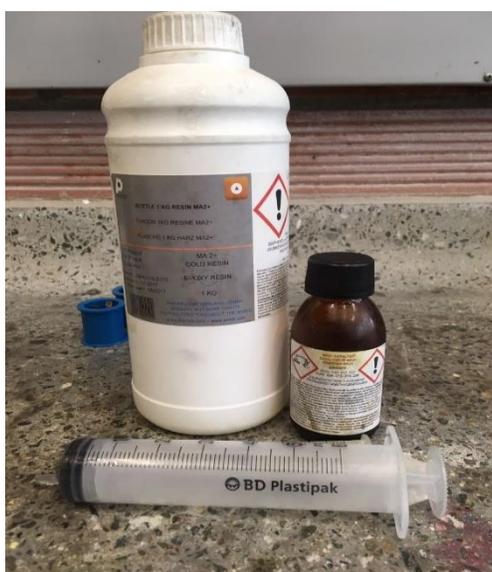
### **Obtención de las muestras de costillas**

Los segmentos cortados de las costillas midieron 2,5 cm de largo (Ver foto 1). Se empleó una sierra vertical con motor facilitada por el laboratorio de morfología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Se tuvo especial cuidado con las muestras frágiles para evitar fragmentación, estas se cortaron a mayor longitud para mantener su integridad estructural, sin sobrepasar los 3 cm. Para ello se utilizó una cinta métrica con la cual se marcaban los sitios de corte con lápiz número 2. Posteriormente se incluyó una marca de referencia con lápiz para identificar las superficies anterior, posterior, medial y lateral. Además, se tuvo presente una marca de identificación en las muestras para diferenciar la etapa de la preparación en la que se encontraban y el número correspondiente al individuo que se tenía (Cho, 2012).



**Foto 1. Fragmentos de sexta costilla para la obtención de muestras. Fotografía tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Morfología Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.**

Luego se procedió a realizar la infiltración o embebido que consistió en sumergir la muestra en un molde con una mezcla de resina epóxica y un catalizador. Como se trataba de hueso seco, este proceso tuvo particular énfasis en mantener su integridad estructural durante el proceso de corte y pulido, razón por la cual se buscó que el medio de embebido coincidiera en dureza con la muestra, tal como lo expone Jones (2013). Es por esta razón que se empleó una resina epóxica, una cantidad de 50 ml de la resina Mecaprex MA2 por 5 ml de catalizador (Foto 2) y se mezcló por 2 minutos para formar una mezcla homogénea, teniendo precaución de no generar burbujas en el proceso y así poder realizar el embebido.



**Foto 2. Implementos para embebido: Resina, catalizador y jeringa dosificadora. Fotografía tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.**

La mezcla se dispuso en los moldes cilíndricos propios de la cortadora Isomet y se dejaron endureciendo con las muestras dentro, previamente marcadas en la parte inferior del cilindro para que luego en el desmolde siguieran rotuladas. El tiempo de desmolde tomó 24 horas (Foto 3).



**Foto 3. Preparación de los moldes con resina epóxica. Fotografía tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.**

Al tener las muestras embebidas (Foto 4), se procedió a la obtención de los cortes para la muestra. Por ser un hueso sin descalcificar no era posible cortar con el micrótopo convencional, es por esta razón que se recurrió (según el método para corte de huesos no descalcificados) al empleo de la cortadora Isomet 1000, que consta de un disco con hoja de diamante incrustada, usada para cortar láminas de 1,5 mm o más de grosor a partir de los bloques de hueso preparados (Foto 5 y 6).



**Foto 4. Bloques de resina desmoldados, con muestras debidamente rotuladas. Fotografía tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.**



Foto 5 y 6. Cortadora Isomet 1000. Fotografía tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.

Para nuestra muestra se empleó el corte mínimo de 1,5 mm de grosor. Las muestras deben estar adecuadamente ubicadas según lo que se desee ver, en este caso lo que interesó fue observar las características expuestas microscópicamente en la corteza de la costilla. Es por esta razón que el corte fue transversal. Se hizo necesario cortar lentamente y con la lubricación adecuada, en este caso la misma cortadora impregna con agua el bloque mientras realiza el corte. Se realizan 3 cortes por cada bloque, para un total de 3 muestras por individuo, teniendo en cuenta se eligió una muestra representativa de cada fase propuesta por Streeter (2010) (Foto 7).



Foto 7. Cortes de 1,5 mm de grosor listos para pulir. Fotografía tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.

El siguiente paso fue el pulido y montaje de secciones. Al obtener los cortes de 1,5 mm se procede a montarlos en los portaobjetos empleando la misma resina epóxica. Una vez se realiza el montaje, se procede al método de pulido manual, en el que se emplearon lijas de agua de diferentes calibres: 100, 300, 600, 1200 y 2000. El grosor final de las láminas estuvo alrededor de 50-100  $\mu\text{m}$ , lo suficientemente gruesas para permitir la penetración de la luz. Las secciones delgadas de costillas fueron examinadas empleando una caracterización mediante microscopía óptica de luz transmitida y polarizada, en ambos métodos se pudo apreciar los cambios en el tejido óseo (Ross y Pawlina, 2007; Quesnel, 1971).

En la presente investigación se empleó un microscopio fotónico con aditamentos para luz polarizada de referencia Olympus BX41 con polarizadores U-P03 y U-T530. Este se caracteriza porque la luz pasa a través de un filtro de polarización, transmitiendo luz solo en una dirección. Este microscopio emplea las características del material biológico que compone al hueso, específicamente su matriz de colágeno y por consiguiente actúa como un polaroid natural por lo que el hueso se ve fuertemente birrefringente (Ortner, 2003). La forma en la cual los materiales interactúan con la luz polarizada brindó información acerca de su estructura y composición.

Igualmente se empleó el microscopio fotónico *Olympus CH30* equipado con CDI - Contraste Diferencial Interferencial- con cámara adaptable *Digital Sight DS-2Mv*, facilitado por la Facultad de Ingeniería de Materiales de la Universidad de Antioquia. El método CDI con luz fotónica es un procedimiento de contraste alternativo a la polarización y permite la representación de detalles transparentes de los preparados con contrastes fuertes y en relieve,

el objetivo era demostrar si este método puede ayudar en caso de no contar con un microscopio fotónico con aditamentos para luz polarizada. Los resultados fueron satisfactorios.

### **Registro fotográfico de las muestras**

Para la calibración del microscopio para la toma de fotografías de las imágenes histológicas se empleó la barra de calibración. Las fotografías obtenidas se trabajaron con el programa IrfanView para realizar la edición y se manejó el formato RAW en un tamaño de 3200 x 2400 pixeles, luego se midieron las estructuras histológicas de interés para extrapolar el número de pixeles obtenidos. Para cada aumento de los objetivos se calculó su respectivo factor: Valor del objetivo por el número de pixeles por 1.000  $\mu\text{m}$ . Al tener listos los archivos, se realizó una barra en el borde inferior derecho o izquierdo indicada en  $\mu\text{m}$ , teniendo presente la proporción de la imagen.

Para las fotografías en el microscopio fotónico equipado con los aditamentos para luz polarizada *Olympus BX41*, se empleó la cámara electrónica *Axiom cam ERc 5s* y para las fotografías con microscopio fotónico *Olympus CH30* se empleó la cámara electrónica adaptable *Digital Sight DS-2Mv*.

## **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se empleó el método histomorfológico de Streeter (2010) de cuatro fases en costilla para individuos subadultos. La base de datos resultado de las observaciones microscópicas se realizó en Microsoft Excel 2010 para Windows® con licencia para la Universidad de Antioquia. Los datos fueron procesados y analizados estadísticamente con el paquete SPSS v. 24 de IBM para Windows®, con licencia para la Universidad de Antioquia. Todas las tablas presentadas en este apartado son extraídas de los resultados arrojados en el programa estadístico SPSS v. 24.

## **VARIABLES EMPLEADAS**

- Variable categórica o de grupo: en este caso es la edad planteada en las IV fases de Streeter (2010), esta variable siempre debe ser cualitativa. Esta es la que define los grupos que se van a comparar.
- Variable discriminante o de clasificación: estas variables siempre deben ser continuas, cuantitativas o numéricas, para este modelo serán:
  1. Hueso lamelar primario
  2. Remodelado
  3. Hueso entretejido
  4. Grosor corteza cutánea
  5. Grosor corteza pleural

Las variables serán operacionalizadas en la tabla 2., teniendo en cuenta su definición conceptual.

Tabla 2. Operacionalización de las variables.

<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>		<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>ESCALA</b>	<b>NATURALEZA</b>
<b>Característica histomorfológica Streeter (2010)</b>	<b>INDICADOR</b>		De razón	Cuantitativas continuas
Hueso lamelar primario	<b>1</b>	Alto		
Remodelado	<b>2</b>	Intermedio		
Hueso entretrejido				
Grosor corteza cutánea	<b>3</b>	Bajo		
Grosos corteza pleural	<b>4</b>	Ausente		
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>	FASE I	< 5 AÑOS	Nominal	Cualitativa
	FASE II	5 – 9 AÑOS		
	FASE III	10 – 17 AÑOS		
Edad	FASE IV	18 – 21 AÑOS		

El método que se aplicó fue el histomorfológico de cuatro fases en costillas de Streeter para individuos esqueléticos subadultos. Este método al ser histomorfológico se basó en los patrones de cambio observados de acuerdo con su fase de edad cronológica. Para poder analizarlo estadísticamente, a la tabla con las características histomorfológicas se le designaron unos valores cuantificables y de este modo fue posible realizar un análisis discriminante (Tabla 3).

Tabla 3. Adaptación cuantitativa del método histológico de cuatro fases en costillas de Streeter (2010) en la muestra de estudio.

cuantificación método histológico Streeter (2010)								
Código individuo	edad cronológica	Sexo	Fase Streeter	Hueso lamelar primario	Remodelado	Hueso entretrejido	Grosor corteza cutánea	Grosor corteza pleural
CSP498	19	Hombre	Fase IV	1	1	4	1	1
CSP244	11	Hombre	Fase III	2	2	4	2	2
CSP352	15	Hombre	Fase III	2	1	4	2	1
CSP292	3	Hombre	Fase I	4	4	1	3	3
CSP281	16	Hombre	Fase III	2	1	4	1	1
CSP466	17	Hombre	Fase III	1	1	4	1	1
CSP271	16	Hombre	Fase III	2	1	4	1	1
CSP350	7	Mujer	Fase II	3	2	3	3	2
CSP506	7	Hombre	Fase II	3	2	3	3	2
CU044	18	Mujer	Fase IV	1	1	4	1	1
Valores: 1: Alto, 2: Intermedio, 3: Bajo, 4: ausente								

### Supuesto del modelo

El supuesto sobre el que se trabajó durante este análisis estadístico estuvo basado en que cada grupo debe ser una muestra de una población normal multivariada. Para determinarlo se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 4).

Para esta prueba de normalidad la prueba de hipótesis es:

Hipótesis nula -  $H_0$ : la variable sigue una distribución normal

Hipótesis alternativa -  $H_a$ : la variable no sigue una distribución normal.

Tabla 4. Aplicación prueba de Kolmogorov-Smirnov

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra						
		Hueso lamelar primario	Remodelado	Hueso entreteji do	Grosor corteza cutánea	Grosor corteza pleural
N		10	10	10	10	10
Parámetros normales	Media	2,10	1,60	3,50	1,80	1,50
	Desviación estándar	,994	,966	,972	,919	,707
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,240	,333	,397	,308	,360
	Positivo	,240	,333	,303	,308	,360
	Negativo	-,160	-,267	-,397	-,204	-,240
Estadístico de prueba		,240	,333	,397	,308	,360
Sig. asintótica (bilateral)		,107	,002	,000	,008	,001

Si p (Significancia asintótica) es menor a 0.05 se debe rechazar la hipótesis nula. Solo la variable hueso lamelar primario tiene un valor mayor de 0.05 por tanto se acepta la hipótesis nula (esto indica que la variable sigue una distribución normal). Para las demás variables se rechaza hipótesis nula, ya que no sigue una distribución normal.

Con esta información, se continúa con la aplicación del método de Streeter (2010) ya que estadísticamente el método no es muy sensible a la desviación de la normalidad y presenta un nivel de confianza del 95%.

### Cuadro de estadísticos de grupo

Estos son los estadísticos descriptivos que se deben analizar antes de continuar con cualquier otro método estadístico (Tabla 5).

Tabla 5. Estadísticas de grupo. Se observa la cantidad de casos válidos en cada uno de los grupos

Estadísticas de grupo					
Fase Streeter		Media	Desviación estándar	N válido (por lista)	
				No ponderados	Ponderados
Fase I	Hueso lamelar primario	4,0	. <sup>a</sup>	1	1,0
	Remodelado	4,0	. <sup>a</sup>	1	1,0

	Hueso entretejido	1,0	. <sup>a</sup>	1	1,0
	Grosor corteza cutánea	3,0	. <sup>a</sup>	1	1,0
	Grosor corteza pleural	3,0	. <sup>a</sup>	1	1,0
Fase II	Hueso lamelar primario	3,0	,000	2	2,0
	Remodelado	2,0	,000	2	2,0
	Hueso entretejido	3,0	,000	2	2,0
	Grosor corteza cutánea	3,0	,000	2	2,0
	Grosor corteza pleural	2,0	,000	2	2,0
Fase III	Hueso lamelar primario	1,8	,447	5	5,0
	Remodelado	1,2	,447	5	5,0
	Hueso entretejido	4,0	,000	5	5,0
	Grosor corteza cutánea	1,4	,548	5	5,0
	Grosor corteza pleural	1,2	,447	5	5,0
Fase IV	Hueso lamelar primario	1,0	,000	2	2,0
	Remodelado	1,0	,000	2	2,0
	Hueso entretejido	4,0	,000	2	2,0
	Grosor corteza cutánea	1,0	,000	2	2,0
	Grosor corteza pleural	1,0	,000	2	2,0
Total	Hueso lamelar primario	2,1	,994	10	10,0
	Remodelado	1,6	,966	10	10,0
	Hueso entretejido	3,5	,972	10	10,0
	Grosor corteza cutánea	1,8	,919	10	10,0
	Grosor corteza pleural	1,5	,707	10	10,0
a. No hay datos suficientes					

Se observa que en las medias de los grupos en cada variable son muy notorias las diferencias. Un ejemplo de ello son las medias para “hueso lamelar primario” en cada fase.

Con estas diferencias, se pudo continuar con el análisis estadístico, ya que el contraste univariante muestra que sí hay separación en los grupos, no por eso quiere decir que las funciones discriminantes serán representativas, pero si hay diferencia a nivel univariante y es probable que se pueda dar a nivel multivariante. En conclusión, es viable continuar con el análisis discriminante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se observará el análisis discriminante y los resultados arrojados por el mismo, además de las discusiones que se generan a partir de los resultados.

Se recuerda que el análisis discriminante se basó en las siguientes variables:

- Variable de agrupación: Las cuatro fases propuestas por Streeter (2010) según cualificación por edades.
- Variables independientes: Hueso lamelar primario, remodelado, hueso entretejido, grosor corteza cutánea, grosor corteza pleural.

Para realizar el respectivo análisis, se utilizó el método de inclusión por pasos, debido a que este permitió obtener información sobre la significancia individual de cada variable en la función discriminante. Con este método las variables se fueron incorporando una a una a la función y de esta manera se construyó la función sólo con las variables que realmente resultaron útiles, es decir, en las que su discriminación fue mayor.

El estadístico utilizado como método de selección de variables fue el de Lambda de Wilks. Este estadístico evaluó la variable que entró al modelo con un estadístico F. En otras palabras, calculó el estadístico a cada variable y luego procedió a incorporar al modelo la

variable que le correspondió mayor valor F o lo que es lo mismo, la que produjo mayor cambio en Lambda.

Al ser el criterio de entrada la probabilidad de F, una variable pasó a formar parte de la función cuando el nivel crítico obtenido fue menor a 0,05 y fue expulsada de la función cuando su nivel crítico fue mayor a 0,1 (tabla 6).

Tabla 6. Igualdad de medias de grupos

Prueba de igualdad de medias de grupos					
	Lambda de Wilks	F	df1	df2	Sig.
Hueso lamelar primario	,090	20,250	3	6	,002
Remodelado	,095	19,000	3	6	,002
Hueso entretejido					
Grosor corteza cutánea	,158	10,667	3	6	,008
Grosor corteza pleural	,178	9,250	3	6	,011
a. No se puede calcular porque esta variable es una constante en cada grupo.					

Los valores señalados mostraron que las variables hueso lamelar primario y remodelado tienen significancia estadística en la prueba de igualdad de medias, es decir son significativamente diferentes. Y los valores de Lambda de Wilks resaltados muestran valores cercanos a cero como resultado de su variabilidad por diferencia entre medias de grupo.

Para realizar la clasificación se calculó el tamaño de los grupos, ya que en la muestra hubo una marcada diferencia en el tamaño de los grupos (más hombres que mujeres). Se pidió resultados para cada caso y su respectiva tabla de resumen. Igualmente se solicitó al programa SPSS v.24 con licencia para la Universidad de Antioquia, una matriz de covarianza intragrupos, es decir, que la probabilidad a posteriori de un caso en un grupo determinado se calculó a partir de matriz de varianza-covarianza combinada, por tanto, se obvió diversidad en la variabilidad de las puntuaciones discriminantes dentro de cada grupo.

Y por último se le pidió al programa una validación cruzada, es decir, la clasificación dejando una variable por fuera (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de variable entradas y eliminadas

Variables entradas/eliminadas <sup>a,b,c,d</sup>									
Escalón	Especificado	Lambda de Wilks							
		Estadístico	df1	df2	df3	F exacta			
						Estadístico	df1	df2	Sig.
1	Hueso lamelar primario	,090	1	3	6,000	20,250	3	6,000	,002
a. El número máximo de pasos es 10.									
b. La significación máxima de F para entrar es .05									
c. La significación mínima de F para eliminar es .10									
d. El nivel F, la tolerancia o VIN no suficiente para un cálculo adicional.									

En cada paso, se entra la variable que minimiza la lambda de Wilks global. Se presenta la tabla con mayor relevancia para el presente trabajo ya que la variable hueso lamelar primario presenta mayor significancia estadística.

En cada uno de los pasos de cómo se fueron integrando las variables una a una al modelo, se observa la tolerancia para saber qué tan correlacionadas están las variables (Tabla 8 y 9).

Tabla 8. Variables en el análisis

Variables en el análisis			
Escalón		Tolerancia	Sig. de F para eliminar
1	Hueso lamelar primario	1,000	,002

La primera variable tiene una tolerancia de 1.0, pues al estar sola no hay variables que pueden explicar nada de ella, se aclara que, como solo se realizó un paso la tolerancia de la variable no bajó.

Tabla 9. Variables que no están en el análisis

Variables no en el análisis					
Escalón		Tolerancia	Tolerancia mín.	Sig. de F para entrar	Lambda de Wilks
0	Hueso lamelar primario	1,000	1,000	,002	,090
	Remodelado	1,000	1,000	,002	,095
	Hueso entretejido	,000	,000	.	.
	Grosor corteza cutánea	1,000	1,000	,008	,158
	Grosor corteza pleural	1,000	1,000	,011	,178
1	Remodelado	,938	,938	,114	,030
	Hueso entretejido	,000	,000	.	.
	Grosor corteza cutánea	,833	,833	,373	,051
	Grosor corteza pleural	,938	,938	,554	,061

Muestra todas las variables que pueden ser incluidas en cada paso. La columna de tolerancia es la que tendría cada variable si entrara al modelo en el siguiente paso, la tolerancia mínima es la tolerancia que tendría la variable por la incorporación de una nueva variable.

Igualmente se realizó la interpretación del autovalor. Este es el cociente entre la variación debida a la diferencia entre los grupos y la variación que se da dentro de cada grupo, este estadístico es difícilmente interpretable por sí solo, por esta razón se utiliza estadístico Lambda de Wilks (Tablas 10).

Tabla 10. correlación canónica próxima a uno

Autovalores				
Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	10,125 <sup>a</sup>	100,0	100,0	,954
a. Se utilizaron las primeras 1 funciones discriminantes canónicas en el análisis.				

La correlación canónica es alta (muy próxima a 1,0) por tanto está indicando que las variables discriminantes permiten diferenciar entre los grupos. El estadístico lambda de Wilks mostró la variabilidad total no debida a las diferencias entre los grupos, valores próximos a uno indican gran parecido entre grupos, valores más próximos a cero indican gran diferencia, aquí está más cerca a cero por tanto nos indica que si hay diferencia.

Con los coeficientes estandarizados (Tabla 11 y 12) se puede observar cuál de las variables tiene más peso al momento de discriminar en los grupos de variables propuestos por Streeter (2010) en este caso “hueso lamelar primario”.

**Tabla 11. Coeficientes de función discriminante canónica estandarizadas**

<b>Coeficientes de función discriminante canónica estandarizadas</b>	
	Función
	1
Hueso lamelar primario	1,000

**Tabla 12. Coeficientes de función discriminante canónica**

<b>Coeficientes de la función discriminante canónica</b>	
	Función
	1
Hueso lamelar primario	2,739
(Constante)	-5,751
Coeficientes no estandarizados	

La variable de hueso lamelar primario tiene gran valor, ya que es la única variable utilizada en el modelo por ser la variable que mejor discrimina, la de mayor importancia a la hora de predecir el grupo de pertenencia.

Para interpretar los signos de los coeficientes es importante mirar los centroides (Tabla 13), en este caso podemos ver que el grupo de fase III y fase IV tiende a obtener puntuaciones negativas y fase I y fase II puntuaciones positivas en la función discriminante, sabido esto, podemos decir que la función discriminante nos indica que una disminución en el valor de las variables independientes (por debajo de la media) hará que el individuo obtenga puntuación negativa y con ello se ajuste al patrón de los individuos de fase III y IV.

**Tabla 13. Funciones en centroides de grupo**

<b>Funciones en centroides de grupo</b>	
Fase Streeter	Función 1
Fase I	5,203
Fase II	2,465
Fase III	-,822
Fase IV	-3,012

Las funciones discriminantes canónicas sin estandarizar se han evaluado en medias de grupos

Los coeficientes no estandarizados son los que se utilizan para calcular las puntuaciones discriminantes y la ubicación de los centroides de los grupos. Para ver el centroide de cada grupo es necesario tener la media del grupo en la variable discriminante y con los coeficientes no estandarizados y obtener los centroides de la función discriminante, así:

$d1 = b0 + b1x1 + b2x2 \dots$  dónde:

d1: es el centroide del primer grupo

b0: es la constante

b1x1: es el coeficiente de la primera variable, multiplicado por la media de la primera variable.

Esta es la fórmula para hallar el centroide de la fase I que fue la más representativa:

$$= -5,751 + 2,739 * 4,00$$

$$= 5,205$$

Como se puede observar, el valor resultante 5,205 coincide con el resultado del centroide que calculó el programa estadístico SPSS v.24 con licencia para la Universidad de Antioquia, el cual dio como resultado 5,203 (Ver Tabla 13, Función 1 para la Fase I).

## **Clasificación**

En este apartado se presentarán las estadísticas por casos, es decir, lo que se observará será el valor que da la función discriminante, aparecerá el grupo al que pertenece y el grupo en el que fue clasificado según el modelo discriminante (Tabla 14). Se podrá observar la capacidad predictiva de la función discriminante, donde el 90,0 % de los individuos fueron clasificados correctamente. Además, muestra la validación cruzada, es decir, la clasificación

de cada caso tras dejarlo fuera del cálculo de la función discriminante, lo que resultó en un 80,0%, semejándose al porcentaje anterior.

Tabla 14. Clasificación según modelo discriminante

Resultados de clasificación <sup>a,c</sup>							
		Fase Streeter	Pertenenencia a grupos pronosticada				Total
			Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	
Original	Recuento	Fase I	1	0	0	0	1
		Fase II	0	2	0	0	2
		Fase III	0	0	4	1	5
		Fase IV	0	0	0	2	2
	%	Fase I	100,0	,0	,0	,0	100,0
		Fase II	,0	100,0	,0	,0	100,0
		Fase III	,0	,0	80,0	20,0	100,0
		Fase IV	,0	,0	,0	100,0	100,0
Validación cruzada <sup>b</sup>	Recuento	Fase I	0	1	0	0	1
		Fase II	0	2	0	0	2
		Fase III	1	0	4	0	5
		Fase IV	0	0	0	2	2
	%	Fase I	,0	100,0	,0	,0	100,0
		Fase II	,0	100,0	,0	,0	100,0
		Fase III	20,0	,0	80,0	,0	100,0
		Fase IV	,0	,0	,0	100,0	100,0

a. 90,0% de casos agrupados originales clasificados correctamente. b. La validación cruzada se ha realizado sólo para aquellos casos del análisis. En la validación cruzada, cada caso se clasifica mediante las funciones derivadas de todos los casos distintos a dicho caso. c. 80,0% de casos agrupados validados de forma cruzada clasificados correctamente.

## DISCUSIÓN

El análisis discriminante se realizó empleando variables de agrupación correspondientes a las cuatro fases en costillas de individuos subadultos propuestas por Streeter (2010) y las variables independientes las características histomorfológicas observadas, esto es, Hueso lamelar primario, Remodelado, Hueso entretejido, Grosor corteza

cutánea, Grosor corteza pleural. Este método de cuatro fases en costilla de Streeter (2010) puede ser mejorado ampliando las fases, pues luego del análisis, se considera que las características observadas se pueden describir con mayor precisión, aunque estadísticamente se muestra confiable, dichos datos caracterizados pueden ser cuantificables, la sola cualificación hace que el método se torne amplio y permisivo, dejando vacíos categóricos que se aprecian durante el análisis de las muestras.

Para aplicar el método, Streeter (2010) emplea el microscopio fotónico equipado con los aditamentos para luz polarizada. Este tipo de microscopio se usa para poder identificar de manera efectiva sustancias cristalinas, fibrosas (como el citoesqueleto), cristales de hidroxiapatita, osteonas, líneas de cemento, entre otros. Pero al llegar al laboratorio de ingeniería de materiales de la Universidad de Antioquia, por motivos internos, los primeros días no pudieron prestarnos el microscopio fotónico equipado con complementos para luz polarizada, pero si nos permitieron el acceso al microscopio fotónico y lo que se obtuvo fueron tomas favorables para la observación de la corteza pleural, cutánea, la modelación y remodelación del hueso lamelar primario y presencia de hueso entretejido. Luego de dos semanas se pudo realizar la observación también con el microscopio fotónico con los accesorios para luz polarizada, en esta la observación fue un poco más detallada, pero en sí los resultados que se requerían se pudieron obtener con ambas técnicas microscópicas.

En una aplicación posterior, se sugiere hacer una comparación detallada entre las dos técnicas microscópicas, ya que este no era el objetivo del trabajo de grado y por ello no se pudo ahondar en las diferenciaciones y/o similitudes, en lo que se precisó fue en si era o no posible la observación de las variables.

Luego del análisis estadístico se prevé conveniente aplicar el método a una cantidad elevada de individuos subadultos para generar un análisis estadístico que permita obtener ecuaciones de regresión lineal aplicables a población local, ya que el análisis discriminante así lo permite.

El método histomorfológico se torna un método eficaz para la estimación de edad en subadultos, pues sólo requiere de zonas específicas del hueso, en este caso la sexta costilla, y en la misma muestra se pueden elegir campos selectivos para la observación y análisis de las estructuras a estudiar. A pesar de esto, se complica el método cuando se procede a realizar el pulido manual de las muestras, pues si no se tiene especial cuidado, se pueden deteriorar y presentar desgarros en la totalidad de la muestra, haciéndola inservible. Algunos autores, como Tiesler (2006) propone una fase de lijado con un polichador, pero teniendo el mismo cuidado de no rasgar la muestra, aunque más adelante en su texto, recomienda el pulido manual.

## CONCLUSIONES

El cuerpo humano está sujeto a cambios durante toda su vida y el esqueleto no es ajeno a dichos cambios. Estos se dan tanto a nivel macroscópico como microscópico, permitiendo observar niveles del crecimiento y desarrollo. Se debe dejar claro que, aunque el crecimiento y el desarrollo se presentan de manera simultánea, son dos procesos que tienen desarrollos biológicos que difieren. Los dos procesos tienen un componente tanto genético como ambiental. Ahora bien, el crecimiento siempre va acompañado del modelado, son procesos que se dan a la par en el individuo durante su infancia y adolescencia. El crecimiento genera un incremento en la masa ósea, mientras el modelado modifica tanto el tamaño y la forma del hueso, teniendo en cuenta que la estructura interna y la forma del hueso se adaptan a las funciones biomecánicas a las que lo someta el individuo.

Las modificaciones que se dan paulatinamente en los individuos debido al crecimiento y desarrollo son reflejadas en la estructura ósea a través de procesos de remodelación ósea. A partir de estos análisis de los cambios microscópicos es posible obtener estudios que permitan establecer la edad biológica en grupos poblacionales que mantengan relaciones de homogeneidad biológica y ambiental.

En Colombia existe una marcada poligenia, diversidad cultural y por tanto una disparidad en términos de características físicas, por esta razón se requiere de investigaciones propias para poblaciones locales donde se analice la variación interpoblacional, donde se

puedan generar métodos para la misma población. En este caso, se habla de la necesidad de desarrollar ecuaciones para poblaciones como la colombiana en los temas de estimación de edad, al igual que estudios sobre la variabilidad y variación poblacional en cuanto a crecimiento, modelado y tasas de remodelado que abarquen todo el ciclo vital humano para entender los patrones de cambios óseos concernientes a la edad biológica en población colombiana.

Para avanzar en estos estudios sobre la variabilidad y variación poblacional en osteología, es necesario recurrir a métodos no tan explorados como los métodos microscópicos. Estos métodos permiten estimaciones más precisas y efectivas para individuos esqueléticos, pues no se centran en el aspecto morfológico o macroscópico del mismo y para su aplicación no se requiere de la pieza ósea completa. Bajo este modelo de análisis microscópico, se encuentra el estudio histomorfológico en hueso no descalcificado, el cual constituye una técnica microscópica especializada que examina secciones delgadas de muestras óseas. La descalcificación no es necesaria para esta técnica, por lo que es apta para examinar materiales óseos diagenéticamente alterados de forma moderada, en contextos forenses y arqueológicos.

Fue por esa razón que se analizó la validez del método histomorfológico propuesto por Margaret Streeter, publicado en 2010, en sexta costilla en una muestra poblacional de 10 individuos subadultos, pertenecientes a la colección de referencia osteológica de la Universidad de Antioquia. Se decide trabajar costillas por que hacen parte del esqueleto axial, por lo tanto, son menos influenciadas por los factores biomecánicos independientes de la edad que sí afectan a los huesos largos directamente.

El objetivo de este trabajo investigativo de carácter exploratorio fue aplicar el método histomorfológico y determinar el nivel de confianza observando las transformaciones dadas en las estructuras óseas a nivel microscópico generadas en el proceso de crecimiento y desarrollo, que incluían procesos de modelación y remodelación en el hueso lamelar primario, hueso entretelado, grosor de la corteza pleural y la cutánea en el tejido cortical de la sexta costilla en individuos subadultos. El objetivo se logró, se pudo comprobar estadísticamente que hay un nivel de confianza del 95% en la aplicación del método y en un 90% en la clasificación de los n. Los resultados de la edad arrojados por el método coincidieron con los de la edad cronológica de los individuos subadultos esqueletizados.

A pesar de que el método de Streeter (2010) plantea trabajar las muestras sólo con microscopía fotónica con aditamentos para luz polarizada, en este trabajo investigativo se decidió trabajar la caracterización tanto con microscopía fotónica tradicional y con aditamentos para luz polarizada. Lo que permitió un análisis efectivo fue la técnica de campos selectivos, de los cuales se obtuvieron 4 campos de observación, en los que se tuvo presente características como zonas con un pulido óptimo y mayor transparencia. Se aclara que fueron descartados los campos que no presentaban claridad en la observación.

En cuanto a la obtención de las muestras, el trabajo de pulido fue el más arduo y el que conllevó mayor tiempo de trabajo, pues el excederse en el pulido ocasionaba desgarros en la muestra y microfracturas, daños que hacían la muestra inservible y no pulir lo suficiente hacía que no se transmitiera la luz en los microscopios.

En el análisis estadístico se realizó el análisis discriminante con las siguientes especificaciones: variable de agrupación: cuatro fases en costillas de individuos subadultos

propuestas por Streeter (2010) y las variables independientes: Hueso lamelar primario, Remodelado, Hueso entretejido, Grosor corteza cutánea, Grosor corteza pleural.

Igualmente se utilizó el método de inclusión por pasos, ya que este permitió obtener información sobre la significancia individual de cada variable en la función discriminante. El estadístico utilizado como método de selección de variables fue el de *Lambda de Wilks*, este estadístico evaluó la variable que entra al modelo con un estadístico F. Es decir, se calculó el estadístico a cada variable y luego procedió a incorporar al modelo a la variable que le corresponde mayor valor F, o lo que es lo mismo, la que produjo mayor cambio en Lambda. El criterio de entrada que se utilizó fue probabilidad de F. Esto quiere decir que una variable pasa a formar parte de la función, si el nivel crítico es menor que 0,05 y es expulsada de la función si su nivel crítico es mayor que 0,1.

En resumen, la técnica empleada para el desarrollo del presente trabajo investigativo de carácter exploratorio, no es más que la cuantificación de características de estructuras microscópicas observadas en secciones delgadas de tejido óseo, esto es, procesos de modelado y remodelado, número de osteonas completas, fragmentarias, presencia de hueso entretejido, lamelar primario, diámetro de conductos de Havers, corteza pleural y cutánea, entre otros planteados por Streeter (2010), que se tradujeron en valores cuantitativos para comprender el nivel de confianza del método de cuatro fases en costilla de individuos subadultos en una muestra poblacional.

La cantidad de individuos con los que se trabajó debido al carácter exploratorio del trabajo de grado se seleccionó por ser una muestra estadísticamente representativa para las edades y acorde a la muestra total según el método de Streeter que presentó un nivel de

confianza del 95% en su aplicación. Esta validación se da debido a la asignación de valores que se les otorgó a las características observadas, esto hizo que el rango de clasificación estadístico arrojara un porcentaje altamente favorable del 90% para el método empleado.

En otras palabras, en el proceso estadístico se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa propuesta en el modelo de investigación, la cual consistía en determinar si la modelación y remodelación en el hueso lamelar primario, hueso entretejido, grosor de la corteza pleural y cutánea variaban dependiendo de la edad del individuo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlqvist J, Damsten O. (1969). A modification of Kerley's method for the microscopic determination of age in human bone. *Journal Forensic Science*. 14:205-212.
- Baccino E, Schmitt A. (2006). Determination of adult age at death in the forensic context. En: Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J. (Eds.) *Forensic Anthropology and Medicine*, Humana Press, New York.
- Bednarek J. (2008). Methods of age at death estimation based on compact bone histomorphometry. *Arch Med Sad Krym*. 58 (4): 197-204.
- Beherensmeyer A. (1978). Taphonomic and ecological information from bone weathering. *Paleobiology* 4: 150-162.
- Bekaert B. (2004). Comparison of Two Histomorphometric Methods to Determine Age at Death. B.Sci. Dissertation, University of Central Lancashire, Preston, UK. En: Katzenberg MA, Saunders SR (Eds.) 2008. *Biological anthropology of the human skeleton*. Cap. V: 149-182. New York: Willey Liss. Inc.

- Bogin B. (1999). Patterns of human growth. Second. Edition. Cambridge University Press.
- Bouvier M, Ubelaker DH. (1977). A comparison of two methods for the microscopic determination of age at death. American Journal Physical Anthropology. 46 (3):391-394
- Brothwell, D. (1987). Desenterrando huesos. La excavación, tratamiento y estudio de restos del esqueleto humano. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
- Buikstra J., Ubelaker D. (1994). Standards for Data Collection from Human Skeletal Remains. Arkansas Archeological Survey Research Serie N° 44.
- Cano Sánchez J, Campo-Trapero J, Gonzalo Lafuente JC, Moreno López LA, Bascones-Martínez A. (2005). Muestras de hueso sin descalcificar: descripción de técnicas y utilidad basada en la literatura. Medina Oral Patología Oral Cirugía Bucal. 10: 74-87.
- Cardoso H. (2006). The collection of identified human skeletons housed at the Bocage Museum (National Museum of Natural History), Lisbon, Portugal. American Journal Physical Anthropology. 129 (2):173-176.
- Cattaneo C. (2007). Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millenium. Forensic Science International. 165: 185-193.
- Centro Nacional de Memoria Histórica (2017), Una guerra sin edad. Informe nacional de

reclutamiento y utilización de niños, niñas y adolescentes en el conflicto armado colombiano, CNMH, Bogotá.

Currey J. (1964). Some effects of ageing in human Haversian systems. *Journal Anatomy*. 98 (1): 69-75.

Cho, H. (2012) *The Histology Laboratory and Principles of Microscope Instrumentation*. En: Crowder, C. & Stout, S. (eds) *Bone Histology: An Anthropological Perspective*. Taylor & Francis Group, LLC. NewYork, USA.

Desántolo, B. (2012) *Validación metodológica para la estimación de edad en restos óseos humanos adultos: análisis histomorfométrico*. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina

Dimitriou, R., Tsiridis, E., & Giannoudis, P. V. (2005). Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury, Int. J. Care Injured*, Elsevier; 36(12), 1392-1404.

Ericksen, M.F. (1991). Histologic estimation of age at death using the anterior cortex of the femur. En: *American Journal Physical Anthropology*. 84. pp. 171-179.

Fajardo, L. A. (2014). *Reclutamiento de niñas y niños como crimen internacional de las FARC en Colombia*. Grupo de Investigación en DDHH y DIH “De las Casas”. Universidad Sergio Arboleda. Colección Derecho y Conflicto. Bogotá: Editorial Planeta Colombiana S.A.

- Fazekas I., Kosa F. (1978). *Forensic Fetal Osteology*. Budapest: Akadémiai Kiadó.
- Ferrante L, Cameriere R. (2009). Statistical methods to assess the reliability of measurements in the procedures for forensic age estimations. *International Journal Legal Medicine*. 123: 277-283.
- Franklin, D. (2010). Forensic age estimation in human skeletal remains: current concepts and future directions. *Legal Medicine* 12: 1-7.
- Frost, H. (1958). Preparation of thin, undecalcified bone sections by a rapid manual method. *Stain technology* 33: 272-276. En: Stout SD. (1989) *Histomorphometric analysis of human skeletal remains*. En Işcan MY y Kennedy KR (Eds.) *Reconstruction of life from the Skeleton*. New York: Alan R. Liss, Inc. pp 41-52.
- Frost, H. (1985). The “New Bone”: Some Anthropological Potentials. *Yearbook of physical anthropology*. Colorado, USA. Vol. 28.
- Frost, H. (1987). Secondary osteon population densities: an algorithm for estimating the missing osteons. *American Journal Physical Anthropoloy*. 30 (58): 239-254.
- Gartner, L., Hiatt, J. (2001). *Texto Atlas de Histología*. 2da. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México.

Hall, B. (2005). *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*. Elsevier Academic Press. USA.

Haugaar, L. y Nicholls, K. (2010). *Rompiendo el silencio. En la búsqueda de los desaparecidos en Colombia*. Washington: Grupo de Trabajo sobre Asuntos Latinoamericanos y la Oficina de los Estados Unidos sobre Colombia. Fecha de consulta: 27 de abril de 2015. Consultado en:  
<http://lawg.org/storage/documents/Colombia/RompiendoElSilencio.pdf>.

Huda, T. y J. Bowman. (1995) Age determination from dental microstructure in juveniles. *American Journal Physical Anthropoloy*. 97:135-50.

Işcan, M. y Kennedy, K. (1989). (Eds.) *Reconstruction of life from the Skeleton*. New York: Alan R. Liss, Inc. pp 41-52.

Jans, M. y Kars, H. (2002) *In situ preservation of archaeological Bone: a histological study within a multidisciplinary approach*. *Archaeometry* 44 (3): 343–352.

Jones, W. (2013). Capítulo 6: Tissue processing. En: Suavarn, S. Layton, C. & Bancroft, J. (Eds.). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Seventh Edition. Elsevier.

Jowsey, J. (1960) Age changes in human bone. *Clinical Orthopedic Related Research*. 14: 590- 597.

- Katzenberg, M. A. y Saunders, S. (2008). (Editores). Biological anthropology of the human skeleton. New York: Willey Liss. Inc. pp. 149-182.
- Kemkes-Grottenthaler A. (2002). Aging through the ages: historical perspectives on age indicators methods. En Hoppa RD y Vaupel JW. (Eds.). Paleodemography: Age distributions from skeletal sample. Cambridge University Press. Pp. 48-72.
- Keough, N; L' Abbé, E.; Steyn M. (2009). The evaluation of age-related histomorphometric variables in cadaver sample of lower socioeconomic status: implications for estimating age at death. En: Forensic Sciences International. 191. pp.114-119.
- Kerley, E. (1965). The microscopic determination of age in human bone. En: American Journal Physical Anthropology. 23 (2). pp.149-164.
- Kerley, E. Ubelaker, D. (1978). Revisions in the microscopic method of estimating age at death in human cortical bone. American Journal Physical Anthropology. 49 (4): 545-546.
- Krenzer, U. (2006). Compendio de métodos antropológico forenses para la reconstrucción del perfil osteo-biológico. Colombia: Centro de análisis forenses y ciencias aplicadas (CAFCA).

- Kosa, F. (1989). Age estimation from the fetal skeleton. En: Iscan, M. (Ed.). Age markers in the human skeleton. Springfield, Illinois: CC. Thomas, Pub. pp 21-54.
- Krogman, W., Işcan, M. (1986). The human skeleton in forensic medicine. Springfield: Charles C. Thomas.
- Ortner, D. J. (2003). Identification of pathological conditions in human skeletal remains. USA: Elsevier
- Pfeiffer S, Lazenby R, Chiang J. (1995). Brief communication: cortical remodeling data are affected by sampling location. American Journal Physical Anthropology. 96: 89-92.
- Quesnel, L. (1971) Chapter 1: Microscopy and Micrometry. En: Norris, J. & Ribbons, D. (Ed). Methods in microbiology. Volumen 5A. Elsevier
- Quintana, G.; Fernández, A.; Restrepo, J. F.; Rojas, A.; Calvo, E.; Rondón, F.; Sánchez, A.; Forero, E.; Iglesias, A. (2004). Osteomesopcnosis asociada a litiasis renal. Informe de un caso. Diagnóstico diferencial de las enfermedades osteoesclerosantes axiales. En: Revista Colombiana de Reumatología. 11 (4). pp. 341-346. Diciembre 2004.
- Restelli, M.A.; Batista, S.L.; Vasallo, M.L.; Maliandi, N.E.; Méndez, M.G.; Salceda, S.A. (1997). Aportes de las técnicas micro y ultraestructurales sobre restos esqueléticos a la bioantropología. Actas de las II Jornadas Chivilcoyanas en Ciencias Sociales y Naturales de Chivilcoy. pp 123-128.

Robling AG, Stout SD. (2008). Histomorphometry of human cortical bone: applications to age estimation. En Katzenberg MA y Saunders SR (Eds.). Biological anthropology of the human Skeleton. pp 149-182. New York: Willey Liss. Inc.

Rodríguez Cuenca, J. V. (2004). La antropología forense en la identificación humana. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Consultado en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1418/#sthash.CqRu7Hyo.dpuf>

Rodríguez Cuenca, J. V. (2011). La identificación humana en Colombia. Avances y perspectivas. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Centro Editorial Facultad de Ciencias Humanas Universidad Nacional de Colombia.

Ross M., Pawlina W. (2007). Histología. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Royce, P. M. y Steinmann, B. (1993) Connective tissue and its heritable disorders, Nueva York: Willey-Liss. Inc.

Scheuer, L., Black, S. (2000). Developmental juvenile osteology. Elsevier Academic Press. California, USA

Scheuer, L., Black, S. (2004). The Juvenile skeleton. Elsevier Academic Press. California, USA.

Schmeling, G.; Reinsinger, W.; Olze, A. (2007). Age estimation. *Forensic Science International*. 165 (2-3): 178-18.

Schmitt A, Murail P, Cunha E, Rongé E. (2002). Variability of the pattern of aging on the human skeleton: evidence from bone indicators and implications age at death estimation. *Journal Forensic Science*. 47 (6). pp. 1203-1209.

Singh, I., Gunberg, D. (1970). Estimation of age at death in the human males from quantitative histology of bone fragment. *American Journal Physical Anthropology*. 33 (3):373-392.

Stout, S. (1988) The use histomorphology to estimate age. *Journal Forensic Science*. 33 (1): 121-125.

Stout, S.D., Paine, R.R. (1992). Brief communication: histological age estimation using rib and clavicle. En: *American Journal Physical Anthropology*. 87 (1). pp. 111-115.

Stout S.D., Crowder C. (2012). Bone remodeling, histomorphology and histomorphometry. En: Crowder C, Stout S. (Eds.) *Bone Histology: An Anthropological Perspective*. CRC Press.

Streeter, M. (2010). A Four-Stage Method of Age at Death Estimation for Use in the Subadult Rib Cortex. En: *Journal of Forensic Science*, July 2010. 55 (4). pp. 1019-1024

Suzuki, S., Tiesler, V., Nakamura, S. (2013). Nueva estrategia en la estimación de la edad a la muerte: aplicación histomorfológica en la arqueología de las Tierras Bajas Mayas y un estudio de caso del sitio arqueológico de Copán, Honduras. En: Revista Estudios de Antropología Biológica UNAM. Vol. 16, Número 1.

Tiesler, V., Cucina, A. y Streeter, M. (2006). Manual de Histomorfológica en hueso no descalcificado. Serie de manuales. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida.

Thompson, D. (1979). The core technique in the determination of age at death of skeletons. En: Journal Forensic Science. 24. pp. 902-915.

Thompson, D. (1981). Microscopic determination of age at death in an autopsy series. En: Journal Forensic Science. 36.pp. 470-475.

Todd, T. (1937). Atlas of skeletal maturation (Hand). CV Mosby Co, St. Louis.

Ubelaker, D. (1996). Skeletons Testify: Anthropology in Forensic Science AAPA Luncheon Address: April 12, 1996. En: Yearbook of Physical Anthropology. 39.pp.229-244.

Ubelaker, D. (2005). Estimating age at death. En Rich J, Dean DE, Power RH (Eds.). Forensic medicine of the lower extremity: Human identification and trauma analysis of the thigh leg and foot. Human Press Inc.

- Ubelaker, D. (2008) Forensic Anthropology: methodology and diversity of applications. En Katzenberg MA y Saunders SR. (Eds.). Biological anthropology of the human skeleton. (2 da. Edición). New York: Willey Liss. Inc. pp. 41-69.
- Vitek, C. (2012) A Critical Analysis of the Use of Non-Metric Traits for Ancestry Estimation among Two North American Population Samples. Tesis de Maestría. Tennessee: University of Tennessee. Fecha de consulta: 15 de abril de 2015. Tomado de: [http://trace.tennessee.edu/utk\\_gradthes/1218](http://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/1218)
- Walker, R. (1992). Human variation, cortical bone histology, and determination of skeletal age at death. *Am J Phys Anthropol Suppl.* 14: 169.
- White T., Folkens, P. (2005). The Human bone manual. Elsevier Academic Press. United States
- White, T., Black, M., Folkens, P. (2012). Human Osteology. Third Edition. Elsevier Academic Press. New York.
- Willows, ND. (1991). A comparison of two methods for estimating age at death from bone microstructure. M.A. Thesis, University of Calgary, Alberta, Canada. En Katzenberg MA, Saunders SR (Eds.) 2008. Biological anthropology of the human skeleton. New York: Willey Liss. Inc. pp.149-182

Yoshino, M; Kazuhiko, I; Sachio, M; Sueshige, S. (1994). Histological estimation of age at death using microradiographs of humeral compact bone. *Forensic Science International*. 64 (2-3). pp. 191-198.

Zioupos, P; Williams, A.; Christodoulou, G.; Giles, R. (2014). Determining 'age of death' of forensic purposes using human bone by a laboratory-based biomechanical analytical method. En: *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*.

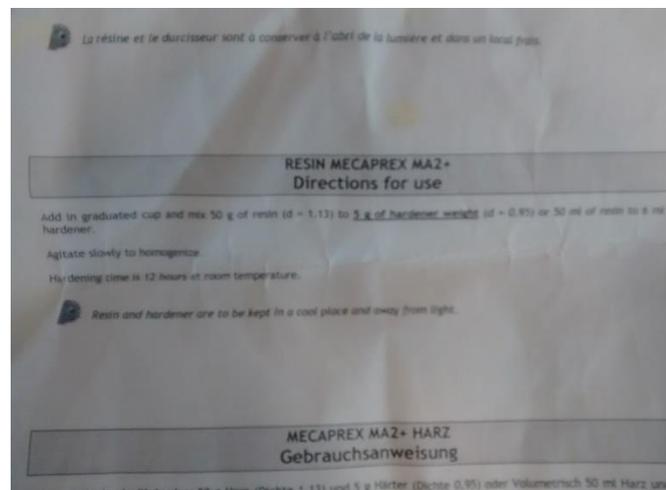
## ANEXOS

### 1. Rótulo de las piezas óseas antes de empotrarlas



Anexo 1. Rotulo para pieza ósea. Fotografía tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Morfología Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

### 2. Instrucciones para el preparado de la resina



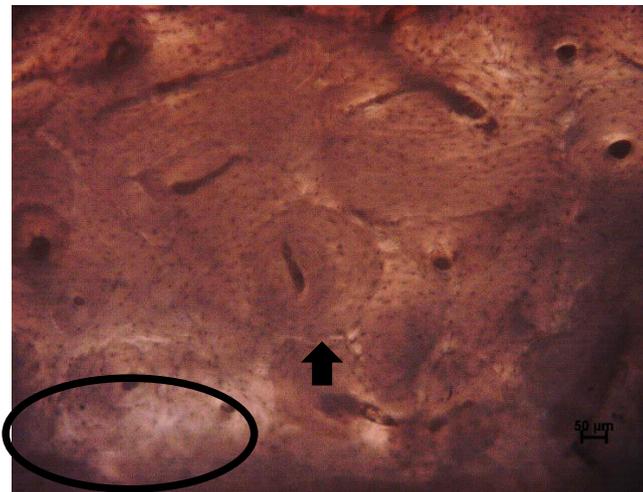
Anexo 2. Instrucciones para resina. Fotografía tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de materiales, Universidad de Antioquia.

### 3. Ubicación de los cortes de 2,5 cm de las costillas en los moldes de preparado



Anexo 3. Cortes de costillas en los moldes listos para embebido. Fotografía tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.

### 4. Fotomicrografías con microscopio fotónico y con aditamentos para luz polarizada con objetivos 20 X, de la muestra CSP244, selección del campo 4



Anexo 4. Fotomicrografía con microscopio fotónico con aditamentos para luz polarizada con objetivos 20 X Muestra CSP 244. Señala línea de cemento. Encierra hueso entretrejido. Tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.

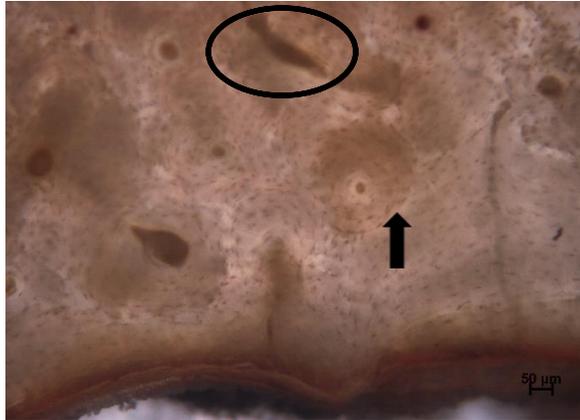


Anexo 4.1 Fotomicrografía con microscopio fotónico con objetivo 20 X Muestra CSP 244. Señala línea de cemento. Encierra hueso entretrejido. tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.

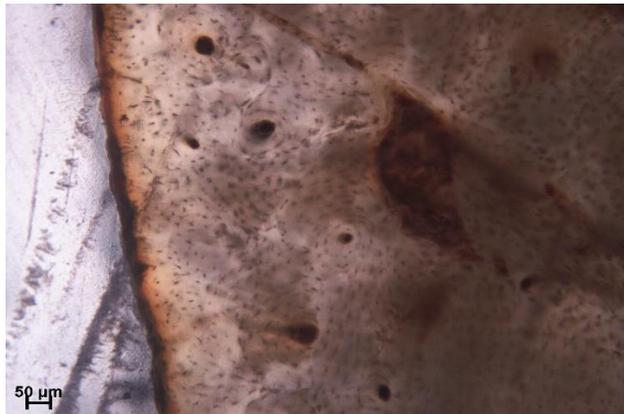
## 5. Algunas Fotomicrografías con microscopio fotónico con objetivos 20 X



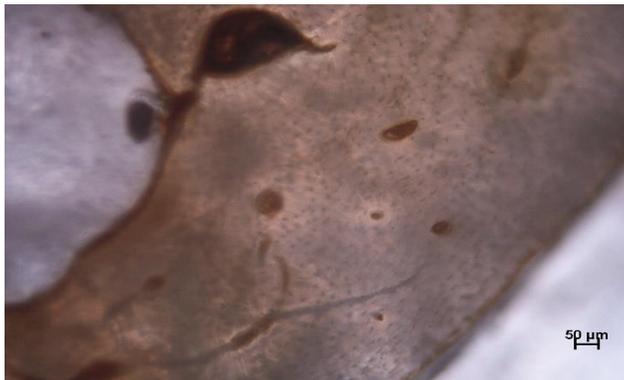
Fotomicrografía con microscopio fotónico con objetivo 20 X Muestra CSP 352. Selección campo 2. Canal vascular primario tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.



Fotomicrografía con luz transmitida con objetivo 20 X Muestra CSP 281 Selección campo 1. Señala Formación lamelar concéntrica y encierra conducto de Volkmann. tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.



Fotomicrografía con luz transmitida con objetivo 20 X Muestra CSP 506 Selección campo 2. tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.



Fotomicrografía con luz transmitida con objetivo 20 X Muestra CSP 498. Selección campo 3. tomada por Natalia Restrepo. Laboratorio de Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia.

**6. Tabla de comparación de la edad cronológica de los individuos y la edad arrojada con la aplicación del método de cuatro fases propuesto por Streeter (2010).**

<b>Correspondencia de edad cronológica con edad proporcionada por el método de Streeter</b>				
<b>Código individuo</b>	<b>edad cronológica</b>	<b>Sexo</b>	<b>Fase Streeter</b>	<b>Edad correspondiente a la fase</b>
CSP498	19	Hombre	Fase IV	18 - 21 años
CSP244	11	Hombre	Fase III	10 - 17 años
CSP352	15	Hombre	Fase III	10 - 17 años
CSP292	3	Hombre	Fase I	< 5 años
CSP281	16	Hombre	Fase III	10 - 17 años
CSP466	17	Hombre	Fase III	10 - 17 años
CSP271	16	Hombre	Fase III	10 - 17 años
CSP350	7	Mujer	Fase II	5 - 9 años
CSP506	7	Hombre	Fase II	5 - 9 años
CU044	18	Mujer	Fase IV	18 - 21 años