

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria

TESIS DOCTORAL

**PARAMETROS HISTOMORFOMETRICOS OSEOS NORMALES EN
UNA
POBLACION INFANTOJUVENIL ESPAÑOLA**

Director: José M.Reverte Coma

Codirector: José F.Val Bernal

Autor: José Luis Prieto Carrero

Madrid, noviembre de 1.993

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La presente es el volumen definitivo de la tesis titulada "Parámetros
 fisiológicos de adaptación al calor en una población indio-juvenil
 de la zona de la sierra de Guis Prieto durante la adaptación al
 calor, realizada en la dirección, que se conforme con su
 presentación.

Vº Bº
 EL TUTOR (2)

(Firma y sello del tutor)
 (Firma del tutor)

Fdo.: _____

(fecha y firma)

D.N.I.: _____

El Director de la Tesis

Fdo.: _____

(fecha y firma)

D.N.I.: 1.476.815

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Reunido el Consejo de Departamento en la fecha
 abajo indicada se examinó la tesis de D. José
 Luis Prieto Carrero que lleva por título "Parámetros
 fisiológicos de adaptación al calor en una población
 indio-juvenil española", y se acordó dar el
 visto bueno para su defensa ante el Tribunal.

Fecha reunión
 Consejo Departamento

22-2-74

El Director del Departamento

(Firma y sello del Director del Departamento)

Fdo.: J. M. RUIZ de la Cuesta

(fecha y firma)

Tesis remitida por José Luis Prieto Carrero para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid.

**A mis padres, a quienes debo cuanto soy,
con todo mi cariño.**

INDICE

	Página
Sumario	8
Preámbulo	12
1. Introducción	17
1.1 Microanatomía y Fisiología ósea	
1.1.1 Organización funcional y estructural del hueso	18
1.1.2 Matriz ósea	20
1.1.3 Células óseas	23
1.1.4 Hueso laminar y Plexiforme	26
1.1.5 Modelado y remodelado óseo	28
1.2 Metodología de la histología de hueso mineralizado	41
1.2.1 Biopsia ósea	43
1.2.2 Técnica de procesado	48
1.2.3 Evaluación	58

1.3	Histomorfometría ósea	
1.3.1	Bases estereológicas	63
1.3.2	Medidas de áreas, perímetros y distancias	64
1.3.3	Significado de los datos histomorfométricos	65
1.4	Aplicación de los métodos histomorfométricos a la Antropología Forense	67
2.	Objetivos y justificación	
2.1	Justificación de los objetivos clínicos	74
2.2	Justificación de los objetivos médico-forenses	77
3.	Material y Métodos	
3.1	Material	80
3.2	Métodos	
3.2.1	Obtención de las muestras	86
3.2.2	Procesado	86
3.2.3	Evaluación Histomorfométrica	90
3.2.4	Método estadístico	97

4. Resultados	101
5. Discusión	
5.1 Del Material y Métodos	182
5.2 De los Resultados	193
6. Conclusiones	214
7. Bibliografía	218
8. Apéndice	244

SUMARIO

SUMARIO

Se ha llevado a cabo la cuantificación de una serie de parámetros histomorfométricos relativos a la estructura, formación y reabsorción ósea, a partir de secciones no descalcificadas de un área estandarizada de la cresta iliaca derecha.

Las muestras se obtuvieron de autopsias judiciales, en un plazo máximo de 24 horas después de la muerte, en un total de 60 individuos españoles normales, muertos a consecuencia de muerte súbita o violenta, de edad comprendida entre el nacimiento y los 20 años.

Tras su procesado mediante fijación en alcohol absoluto, inclusión en metilmetacrilato, corte y tinción, se procedió a la evaluación cuantitativa por métodos semiautomáticos.

Los resultados demuestran, de manera global, un aumento de la formación ósea que tiene lugar en los períodos de crecimiento (el

primero durante los dos primeros años y el segundo sobre los 10-11 años en las hembras y los 12-13 años en varones), coincidiendo con las curvas de velocidad de crecimiento para la población infantojuvenil española. Dicho incremento tiene lugar de manera paralela a la disminución de la reabsorción, por lo que se produce un aumento significativo del Volumen trabecular y del Índice de espesor trabecular, es decir una ganancia neta de hueso, mientras que las trabéculas, pequeñas y numerosas en los primeros años de la vida, se van uniendo reduciendo su superficie y aumentando en grosor. Una vez que ha tenido lugar el período de desarrollo puberal, los varones continúan presentando muestras de actividad hasta los 20 años, mientras las hembras mantienen una situación constante.

Se obtuvieron dos ecuaciones mediante la aplicación de la regresión lineal múltiple que nos han permitido estimar la variable dependiente "EDAD", a partir de las variables independientes V (Volumen Trabecular), Sv (Superficie Específica de Hueso Trabecular), TTI (Índice de Espesor Trabecular) y MWT (Índice Espesor Medio de las Unidades Estructurales Trabeculares).

Aunque las dos ecuaciones tienen un coeficiente de correlación similar (0,94016 y 0,9413), la mayor facilidad y sencillez, con el consiguiente ahorro de tiempo, de aquélla en la que intervienen V y MWT, hacen de ésta la de elección a la hora de su aplicación con el fin de determinar la edad de un cadáver por métodos histomorfométricos.

Este trabajo aporta la mayor serie mundial en número de casos y es el único específico, para la población de estudio. No obstante, somos conscientes de que, desde un estricto punto de vista estadístico, el tamaño muestral con el que hemos contado para su realización no permite aplicar los resultados al total de la población de estudio como herramienta para el diagnóstico de la enfermedad metabólica ósea, por lo que los resultados obtenidos no deben ser interpretados de manera concluyente y definitiva, sino como una primera aportación que permita orientar las implicaciones histomorfométricas de la fisiología ósea en la etapa de crecimiento, y la posibilidad de su aplicación en la clínica y en la Medicina Forense, abriendo así un camino, que pueda irse ampliando en el futuro con nuevas aportaciones.

PREAMBULO

PREAMBULO

Diversas razones pueden ser aducidas a la hora de justificar la elección del tema elegido. Detrás de cada una de ellas subyace la curiosidad, motor de todo proyecto de investigación, que se ha ido acrecentando conforme avanzaba por los entresijos de la estructura ósea, aparentemente tan inerte y, en la realidad, tan en continua renovación como ningún otro tejido del organismo.

En primer lugar, la necesidad de establecer unos parámetros de referencia, hasta ahora no elaborados para la población de estudio, con la consiguiente trascendencia clínica que conlleva, en cuanto al diagnóstico de las enfermedades metabólicas del hueso.

Por otro lado, el propio hecho de ser Médico Forense, y mi apasionamiento por la Antropología Forense, que debo a mi Maestro, y director de este proyecto, Prof.D.JOSE MANUEL REVERTE COMA, encierra la atracción por aplicar los conocimientos derivados de otras disciplinas médicas a la resolución de los problemas planteados en el quehacer médico legal diario y, por ende, a una

mejor administración de la Justicia.

Han sido muchas las dificultades con las que me he tropezado durante la elaboración de este trabajo, y por tanto resulta obligado constatar los múltiples motivos de agradecimiento a quienes hicieron posible que el propósito inicial llegara a su fin.

En primer lugar al Prof.D.JOSE FERNANDO VAL BERNAL, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Marqués de Valdecilla de Santander y codirector de este proyecto, quien sugirió la materia de investigación y puso a mi disposición los medios personales y materiales necesarios.

De manera muy especial al Prof. D. LUIS BUELTA CARRILLO, Profesor Titular del departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad de Cantabria, gracias al cual descubrí los secretos de la histomorfometría ósea, quien jamás regateó su competente asesoramiento ni dudó en transmitirme su experiencia.

A MONSE FERNANDEZ, que con grandes dosis de paciencia me enseñó las técnicas de laboratorio, y en numerosas ocasiones realizó el procesamiento de las muestras, haciendo posible obtener el rendimiento idóneo del material recogido.

Al Prof.D.JOSE ANTONIO SANCHEZ, Profesor Titular del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina de la UCM, que me cedió los medios técnicos necesarios

para la realización de las mediciones, y sin cuyo inestimable interés, no hubiera sido posible finalizar este trabajo.

Al Dr.D.DAVID MARTINEZ HERNANDEZ, Jefe del Servicio de Medicina Preventiva y Bioestadística del Hospital Universitario del Aire, que volcó su sabiduría estadística en la resolución de los problemas que en esta materia se plantearon.

Uno de los mayores problemas planteados a la hora de realizar este trabajo fue, sin duda, la escasez de autopsias judiciales infantiles, motivo por el que se precisaron algo más de tres años para recoger un número de muestras suficiente. Es por ello que desde aquí, quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos Médicos Forenses que desde sus Juzgados y depósitos de cadáveres se acordaron de la existencia de este estudio, en particular a los compañeros del Instituto Anatómico Forense de Madrid que se encargaron de recoger un gran número de ellas, y especialmente al Dr.D.CARLOS TORTOSA LASO, compañero y amigo sin cuya ayuda probablemente hubiera desistido en mi labor.

Sería injusto no recordar la labor de constante apoyo y comprensión de mi esposa, SONIA, que durante los últimos cinco años, ha compartido conmigo los momentos de esperanza y abatimiento que, cíclicamente se han ido presentando.

Es inacabable la nómina de compañeros y personas a las que debo gratitud, que de alguna forma han colaborado activamente o han

"soportado" las diversas etapas del desarrollo del trabajo, algunos de los cuales hoy me honran con su amistad. Es más que probable que los resultados obtenidos sean inferiores a lo que cabría desear con tan estimables ayudas, aunque no es menos cierto que el empeño y el tesón puesto en este trabajo compensen probablemente otras limitaciones.

1 - INTRODUCCION

INTRODUCCION

El hueso, al igual que otros tejidos conectivos, se compone de células, fibras y sustancia amorfa pero, a diferencia de ellos, sus componentes extracelulares están calcificados, otorgándole una consistencia dura,⁷⁰ ideal para las funciones de soporte del cuerpo e inserción de músculos y tendones esenciales para la locomoción; protección de órganos vitales de las cavidades torácica y craneal, y la formación de elementos sanguíneos de la médula ósea. Además de estas funciones mecánicas, juega un valioso papel metabólico como depósito movilizable de calcio, necesario para la regulación homeostática de la concentración de calcio y fósforo en la sangre y otros fluidos del organismo.⁸⁰ Por último, también actúa sobre el mantenimiento del balance ácido-base, proporcionando tampones adicionales, tras la respuesta respiratoria y renal.¹⁹⁹

1.1. MICROANATOMÍA Y FISIOLOGÍA ÓSEA

1.1.1. Organización funcional y estructural del hueso

El esqueleto presenta una estructura heterogénea. Como sabemos, el hueso maduro adulto está compuesto de una capa externa o **hueso cortical** recubierta por el periostio, que se encuentra en mayor proporción en la diáfisis de los huesos largos y superficie de los planos, y una cavidad medular interna que contiene proporciones variables de **hueso trabecular** y médula ósea,²⁷ limitado a la región metafisaria de los huesos largos y sobre todo entre ambas corticales de los huesos planos y cortos.

El 80 % de la masa ósea, corresponde a hueso compacto o cortical, y el 20 % restante, corresponde a hueso esponjoso o trabecular.¹⁶² Además de las diferencias obvias de su apariencia macroscópica, existen otras muchas particularidades que distinguen uno de otro debido fundamentalmente a encontrarse bajo diferentes influencias fisiológicas.

El **hueso cortical** está compuesto en su mayor parte por sustancia intersticial mineralizada o matriz ósea, formando unidades cilíndricas denominadas osteonas o sistemas haversianos que aparecen en las secciones transversales como anillos concéntricos con un orificio

central de unos 30 a 70 μm de diámetro que contiene un vaso sanguíneo y tejido conectivo, y en secciones longitudinales como bandas paralelas al canal vascular.¹⁹⁹

Los canales haversianos se hallan conectados unos a otros y comunicados con la superficie libre y la cavidad medular mediante conductos que adoptan una dirección transversal u oblicua, denominados canales de Volkmann.³⁸ En la superficie de estos canales centrales (Superficie Haversiana) pueden visualizarse células destructoras y formadoras de hueso, indicando la actividad de formación o reabsorción dentro de la unidad, realizándose su remodelación internamente.⁸³

A partir de los 6 meses de edad,²⁷ estos canales centrales se encuentran rodeados por láminas organizadas concéntricamente de hueso lamelar de 3 a 7 μm de espesor⁷⁰ que contienen osteocitos organizados regularmente en sentido coaxial. Estos osteocitos se localizan dentro de cavidades lenticulares o lagunas, rodeados de matriz ósea, total o parcialmente calcificada, encontrándose unidos a través de procesos citoplasmáticos, a todos los niveles de la osteona,¹¹⁰ a través de los canalículos que forman un sistema continuo de cavidades interconectadas, asegurando la nutrición esencial de las células óseas. Entre los sistemas haversianos hay fragmentos de hueso laminar de tamaño variable y forma irregular,³⁸ el hueso laminar

intersticial, que representa restos de osteonas incompletamente reabsorbidas con anterioridad, interpuestas entre osteonas histológicamente intactas.

El **hueso trabecular**, por su parte, está envuelto en grasa y tejido medular y compuesto de láminas denominadas trabéculas, cuya orientación viene determinada por las cargas aplicadas al hueso.¹⁹⁴ Cada trabécula, cuyo grosor medio suele ser menor de 0,2 mm., está compuesta por un grupo de segmentos angulares, cada uno de los cuales está formado por bandas paralelas de hueso laminar, constituyendo los paquetes trabeculares u osteonas trabeculares, funcionalmente análogas a las osteonas corticales.¹⁹⁹ Son remodeladas esencialmente por su superficie y no suelen verse atravesadas por vasos sanguíneos.^{186,70} En un corte de hueso trabecular, las osteonas abiertas muestran su superficie endosteal con células formadoras y reabsortivas de hueso y su producto, las bandas de osteoide y lagunas de reabsorción.^{110,164}

1.1.2. Matriz ósea

La sustancia intersticial del hueso posee dos componentes mayoritarios, matriz orgánica y sales inorgánicas, cada una de las cuales comprende aproximadamente el 50% de su peso seco⁷⁰ (durante

el crecimiento la cantidad de material orgánico por unidad de volumen permanece relativamente constante, pero la cantidad de agua disminuye y la proporción de hueso mineral aumenta, llegando a un máximo aproximado de un 65 % del peso seco magro del tejido en los adultos).¹⁹⁹

La **matriz orgánica** está compuesta en un 95 % de fibras colágenas⁷⁰ embebidas por sustancia fundamental de carácter protéico, que contribuye a la adhesión de las fibras colágenas, formada por proteínas entre las que se encuentran la **osteonectina**,^{171,172} y la **osteocalcina**,¹⁴⁸ de extraordinario interés en la mineralización ósea.

Su principal componente, el **colágeno óseo**, es predominantemente de tipo I, con dos bandas α_1 y una α_2 , que le hace diferente del colágeno del cartílago, o de la piel,⁸³ en forma de fibras estriadas transversalmente de 50 a 70 nm de diámetro.¹²⁹ Uno de sus principales aminoácidos componentes es la hidroxiprolina, que al liberarse del hueso no es reutilizada, motivo por el que se considera un marcador biológico específico de destrucción ósea.⁶⁰

Diferentes estudios realizados sobre la composición química de la sustancia extracelular han demostrado la presencia, así mismo, de **glucosaminoglicanos**, identificando al menos tres aminoazúcares:

condroitín sulfato, queratín sulfato y ácido hialurónico.⁷⁰

La **materia inorgánica** consiste en depósitos submicroscópicos de una forma de sulfato cálcico muy similar, pero no idéntica, a la hidroxiapatita mineral. El mineral óseo es probablemente depositado inicialmente como fosfato cálcico amorfo y posteriormente reconvertido en **hidroxiapatita** cristalina. En su fase final el fosfato cálcico adopta la forma de delgadas placas cristalinas de 1.5 a 3 nm de espesor y unos 40 nm de longitud, situadas sobre y dentro de las fibras colágenas de la matriz, que se hallan regularmente depositados a intervalos de 60 a 70 nm a lo largo de las fibras.⁷⁰

El hueso mineral contiene además cantidades significativas de ión citrato y carbonato, magnesio y sodio.¹³³

Si el hueso es expuesto a soluciones ácidas o agentes quelantes, las sales inorgánicas se eliminan. El hueso desmineralizado pierde su dureza pero es aún muy resistente y flexible, conservando su morfología macroscópica y una apariencia cercana a la normalidad microscópica. Por otro lado, si se extraen los constituyentes orgánicos del hueso, el sustrato inorgánico conserva la morfología macroscópica y, en cierta manera, su topografía microscópica, pero es tan frágil como la porcelana. Por tanto, queda claro que la dureza del hueso depende de sus constituyentes inorgánicos, mientras su gran

resistencia y elasticidad, reside en su matriz orgánica, particularmente en el colágeno.⁷⁰

1.1.3.- Células Oseas

Podemos diferenciar cinco tipos celulares diferentes: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células de revestimiento óseo, de los cuales, los cuatro primeros pueden encontrarse durante la fase activa de crecimiento.

Células osteoprogenitoras.- Al igual que otros tejidos conectivos, el hueso se deriva del mesénquima embrionario.¹⁰⁵ Tras el nacimiento se mantiene una población de células relativamente indiferenciadas con capacidad de mitosis y de desarrollar una especialización estructural y funcional.

Poseen una coloración pálida, núcleo oval o alargado y citoplasma ligeramente acidófilo o débilmente basófilo. Se encuentran a nivel de las tres superficies óseas: en el endostio, en la capa más interna del periostio, tapizando los canales haversianos y sobre las trabéculas de matriz cartilaginosa en las metáfisis de los huesos en crecimiento.

Existen dos tipos de células osteoprogenitoras,¹⁹⁹ las aplicadas a la formación de células productoras de hueso (**preosteoblastos**), derivadas de células del estroma medular, o de células reabsortivas (**preosteoclastos**) del sistema mononuclear fagocítico,⁸ circunstancia ésta discutida, como veremos con posterioridad.

Osteoblastos.- Los osteoblastos son células con un solo núcleo y citoplasma basófilo.¹⁶² Principales células productoras de hueso, tienen capacidad de sintetizar todos los constituyentes del colágeno óseo y de la sustancia fundamental,¹⁵⁶ conectados unos a otros por pequeños y delgados procesos citoplasmáticos, existiendo una cierta correlación entre el momento de formación ósea, incluyendo la mineralización, y los cambios morfológicos sufridos por los osteoblastos, adoptando éstos una morfología cúbica o globulosa durante la fase de actividad y delgada durante el reposo.¹⁵⁰

Osteocitos.- Cuando los osteoblastos han concluido el depósito de la matriz, aproximadamente el 10% de ellos se ven atrapados por el frente de avance del hueso y se rodean, al principio parcialmente y más tarde de forma completa, por la matriz, convirtiéndose en osteocitos.¹³

Su cuerpo celular es delgado, delimitando el borde de la cavidad lenticular que ocupan, y tienen procesos celulares que atraviesan la

matriz por canalículos, conectando unos con otros y formando un sincitio entre ellos y con los osteoblastos de la superficie trabecular.¹¹⁴

No se conoce el preciso papel desempeñado por los osteocitos en el metabolismo esquelético. Durante un tiempo, el concepto de osteolisis osteocítica, proceso fisiológico por el cual la matriz ósea de las inmediaciones de las lagunas osteocíticas se modifica y las sales minerales son reabsorbidas, hizo pensar que los osteocitos jugaban un activo papel en el intercambio del calcio del hueso a la sangre^{14,15} participando, por tanto, en la regulación homeostática de su concentración en los fluidos del organismo.¹⁰¹ Sin embargo, este concepto no está muy aceptado hoy en día por los investigadores de este área.^{25,199} Por otra parte, algunos autores opinan que los osteocitos participan en la regulación de otros tipos celulares, y al liberarse de sus lagunas durante los períodos de reabsorción ósea, pueden retornar a células osteoprogenitoras.⁷⁰

Osteoclastos.- Los osteoclastos son células grandes, generalmente multinucleadas, con citoplasma ligeramente acidófilo y en su superficie de contacto con el hueso muestran un fruncido característico de la membrana celular, presentándose dentro, o en las proximidades, de lagunas de reabsorción o lagunas de Howship. Su origen es discutido; para algunos autores^{28,71,136} nacen por unión de monocitos sanguíneos, circunstancia discutida por Chambers,⁴⁶ mientras que

referencias bibliográficas más actuales sitúan su origen a partir de precursores pertenecientes al sistema mononuclear - fagocítico.¹⁶² Estas células son responsables de la descomposición de la matriz ósea durante los procesos de formación y remodelación ósea.

Células de revestimiento.- Son células muy planas y alargadas con núcleo fusiforme que se encuentran en la mayoría de las superficies del esqueleto adulto.

Se cree que derivan de precursores osteoblásticos u osteoclastos que han finalizado su actividad de diferenciación.¹⁶⁹

1.1.4.- Hueso Laminar y Plexiforme

Dos tipos de hueso pueden identificarse a nivel microscópico: el hueso laminar, y el plexiforme.

El **hueso laminar** representa el principal tipo de hueso en el esqueleto maduro. Está compuesto por células y bandas de colágena ordenadas paralelamente. Las lagunas osteocíticas en el hueso laminar están uniforme y regularmente distribuidas y contienen células relativamente monomórficas.

El hueso laminar usualmente se forma por aposición a una superficie existente. Para la formación del hueso laminar, los osteoblastos asumen una orientación tridimensional diferente en coordinación con los osteoblastos vecinos, y forman una banda continua de hueso en un sentido unidireccional. El depósito de colágena muestra un patrón de ordenamiento laminar con bandas circulares alternando con otras longitudinales. Este patrón es el responsable de la birrefringencia bajo la luz polarizada.¹¹⁰

En contraste, el **hueso plexiforme** se compone de bandas de colágena organizadas de forma libre y aleatoria, formado por una masa irregular y no polarizada de protocolágena elaborada por los osteoblastos que quedan sepultados en la matriz producida convirtiéndose en osteocitos.^{70,110} La matriz presenta una estructura desordenada de tejido entrelazado, careciendo de la birrefringencia típica del hueso laminar a la luz polarizada.

El hueso plexiforme se encuentra en el esqueleto embrionario y en el hueso cortical y esponjoso en estados de crecimiento rápido, reposición, o alto recambio óseo o **turnover** (volumen de hueso preexistente que es cambiado por hueso nuevo, por unidad de tiempo). Es reemplazado, en el esqueleto normal, por el hueso laminar tras la

conclusión del crecimiento. Se ve en condiciones patológicas como la Enf. de Paget,¹³² formación de callos de fractura¹⁵⁶ y osteítis fibrosa quística debida a hiperparatiroidismo primario o secundario.¹¹⁰ En adultos, el hueso plexiforme es indicativo de formación rápida incontrolada y de alto recambio de hueso debido a otros factores locales o sistémicos, no constituyendo nunca un hallazgo normal.¹⁸⁶

1.1.5.- Modelado y remodelado Oseo

Con el fin de asegurar la integridad mecánica del esqueleto el tejido óseo está sometido a una renovación constante.

Los procesos dinámicos que sufre el tejido óseo, durante esta renovación son:

Crecimiento

Modelado

Remodelado

Estos tres períodos actúan bajo diferentes controles, condicionados por diversos factores tales como el sexo,⁶⁵ la edad,^{2,26,40,44,54,57,61,143,155,174} el ejercicio físico,^{59,118,117,167} factores genéticos¹⁶⁵ o estacionales,¹⁸¹ entre otros, aunque mediados por los mismos tipos celulares,⁷⁵ y las alteraciones

sufridas en cada una de estas fases conducen a distintos síndromes clínicos.^{10,81}

El hueso siempre se origina por sustitución del tejido conectivo preexistente, reconociéndose dos modos diferentes de osteogénesis; cuando la formación ósea se produce directamente sobre el tejido conectivo (**osificación intramembranosa**), y cuando se produce sobre cartílago (**osificación endocondral**).⁷⁰

Podemos diferenciar, por tanto, dos tipos de **crecimiento** óseo, **longitudinal** y **por aposición**. El primero ocurre por osificación endocondral, finalizando al concluir el desarrollo del individuo, y es característico de los huesos de la base del cráneo, columna vertebral, pelvis, y extremidades; mientras que el segundo tiene lugar por aposición desde el periostio de nuevo hueso y reabsorción endosteal del antiguo, propio de ciertos huesos planos del cráneo como el frontal, parietal, temporal, occipital y parte de la mandíbula.⁷⁰

El **modelado** da forma al hueso en su crecimiento durante la infancia y adolescencia, hasta el cierre epifisario.⁶⁶ Mientras el crecimiento produce un incremento neto de la masa ósea, el modelado es responsable del tamaño y forma del hueso, proceso que se desarrolla con un grado de aposición de hueso nuevo bastante acelerado (entre 2 y 30 veces el normal).¹⁹⁹

En este proceso intervienen los mismos tipos celulares que durante el remodelado, reabsorbiendo y reemplazando el tejido óseo conforme a un "modelo preprogramado", que permite reconocer, en cualquier momento del desarrollo, la morfología propia de cada hueso.⁷⁵

El **remodelado** se encarga de la renovación y reparación, y comprende los procesos dinámicos del esqueleto (reabsorción seguida de síntesis de nueva matriz ósea y su consecuente mineralización)^{66,123} después del cierre de los discos de crecimiento epifisario, mediante el cual el tejido óseo envejecido es sustituido por tejido óseo joven.¹⁶² Este proceso es necesario para producir y mantener el hueso biomecánica y metabólicamente eficaz, y es continuo a lo largo de la vida adulta.

Modelado y remodelado difieren en varios aspectos fundamentales:¹³⁸

- La reabsorción y la formación actúan principalmente sobre diferentes superficies óseas sin relación espacial.
- No hay relación de acoplamiento (temporal) entre ellas.
- El modelado implica una continua actividad en la misma superficie, sin interrupción, durante un largo período de tiempo, mientras en el remodelado cada superficie está sujeta a repetidos ciclos de reabsorción, formación y reposo.
- Durante el período de crecimiento, al menos toda la superficie

perióstica y endóstica es asiento de procesos de formación o reabsorción durante todo el tiempo, mientras que durante el remodelado solamente una pequeña fracción de superficie es activa en cualquier momento.

- El modelado produce una ganancia neta de volumen y masa ósea, mientras el remodelado o no produce cambios o produce pérdida de los mismos.

Un ciclo de remodelado dura unos 4 meses, desarrollándose en tres fases:¹⁶²

Reabsorción

Reposo o Inversión

Formación

Reabsorción

Se inicia con la aparición de **osteoclastos** sobre la superficie ósea que va a ser remodelada, consecuencia de la activación de las células progenitoras, que excavan el hueso subyacente desplazándose sobre el tejido óseo, mediante un movimiento de vaivén. La superficie de reabsorción que cada osteoclasto abarca mediante estos desplazamientos se conoce con el nombre de **dominio osteoclástico**, cuya extensión es de 1,5 a 3 veces mayor que la superficie de contacto de la célula con el hueso.^{158,162}

El mecanismo exacto por el cual acoplan la degradación simultánea de la matriz orgánica y la disolución del hueso mineral parece estar mediado por la producción de hidrogeniones (H^+), favorecedora de la solubilidad de los minerales, por la acción de la anhidrasa carbónica,^{94,130} presente en los osteoclastos,¹¹³ y de collagenasas, proteoglicanasas, ácido hialurónico y otras enzimas destructoras del colágeno y la sustancia fundamental.¹⁶¹

En el hueso esponjoso, la reabsorción se limita, generalmente, a la superficie sobre un frente relativamente amplio, mientras que en el hueso cortical, progresa formando galerías tras un cono de incisión de osteoclastos.¹¹⁰

La fase de reabsorción de un ciclo es de 3 semanas y el espesor de la capa de hueso que se reabsorbe oscila entre 50 (hueso esponjoso) y 100 micras (hueso compacto).¹⁶²

El mecanismo preciso del cese de esta fase osteoclástica no es conocido, aunque recientes estudios sugieren que los osteoclastos sufren cambios morfológicos coincidentes con la reducción de actividad degradativa del hueso en presencia de un incremento de la concentración extracelular (y consecuentemente intracelular) de ión calcio.^{108,198}

Reposo o inversión

Sobreviene entonces una fase inactiva, de 1 a 2 semanas de duración,¹⁶² durante la cual se cree que los osteoclastos degeneran en una variedad de células mononucleadas dentro de las lagunas de reabsorción.¹⁹⁹

Formación

Una vez finalizada la fase de reposo, los **osteoblastos** revisten la cavidad labrada por los osteoclastos. Estas células rellenan con hueso nuevo la zona previamente excavada en una cantidad igual al volumen de hueso reabsorbido por los osteoclastos.^{122,199}

El proceso de formación ósea sigue cuatro fases fundamentales:¹⁹⁹

- Diferenciación osteoblástica a partir de las células mesenquimatosas.
- Depósito de matriz y mineralización subsiguiente.
- Formación de una red de hueso inmaduro (plexiforme) trabecular.
- Substitución del hueso inmaduro por hueso secundario, que es reabsorbido para formar médula ósea o convertido en hueso cortical primario mediante relleno de los espacios intertrabeculares.

El hueso se forma por los osteoblastos en dos etapas sucesivas: formación de la matriz u osteoide,^{182,195} seguida de mineralización,²⁷ ambas dependientes de la función osteoblástica.

Los osteoblastos activos depositan el osteoide sobre el hueso preexistente hasta formar un ribete de 8 a 10 micras de espesor medio.¹⁶² Tras la síntesis de los componentes propios de la matriz orgánica, los reservorios mitocondriales de calcio y fósforo van a salir formando parte de las vesículas extracelulares de la matriz y, debido a la riqueza en fosfolípidos de sus membranas, van a copular al calcio y fósforo para formar los **complejos de calcio-fosfolípidos-fosfatos (Ca-Pl-PO₄)** de gran importancia en la mineralización,²² requiriéndose, además de adecuadas concentraciones de calcio y fósforo, núcleos de inicio de la formación de cristales y matriz calcificable libre de sustancias inhibitorias.¹⁹⁹

En las zonas de aposición activa, el osteoide está en forma de bandas revestidas por osteoblastos activos, produciéndose la síntesis de la matriz y la mineralización en la misma proporción, por lo que el espesor de la banda de osteoide permanece constante. Este espesor disminuye en los lugares de bandas de maduración, donde los osteoblastos son progresivamente menos activos causando depresión de la mineralización precedido de una disminución de la síntesis de la matriz.¹⁴⁰

El período de tiempo que transcurre entre la formación de osteoide y la primera fase de su mineralización (mineralización primaria) se denomina "**tiempo medio de retardo de la mineralización**" o **mean mineral lag time**", y tiene una duración de 10 a 20 días.¹⁶² La **mineralización primaria** se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor. Este plano, integrado en parte por mineral amorfo, se denomina **frente de mineralización**. A medida que este frente se desplaza, va dejando, tras de sí, matriz ósea mineralizada mediante la formación de cristales de hidroxapatita. Por consiguiente, siempre que exista mineralización activa, el frente de mineralización se sitúa entre el osteoide y el hueso mineralizado. La mineralización primaria es controlada activamente por los osteoblastos. Mediante este proceso el hueso nuevo alcanza en pocos días un 70% de la máxima densidad mineral posible.¹⁶²

Una vez completada la mineralización primaria, el hueso nuevo continúa incrementando su densidad mineral, pero a una velocidad mucho menor. Este proceso se denomina **mineralización secundaria**, dura de 3 a 6 meses y finaliza cuando el hueso alcanza una densidad mineral máxima del 90 al 95% .¹⁶² La mineralización secundaria se efectúa mediante la difusión pasiva de iones minerales, desde la médula ósea hacia el hueso trabecular, o desde los canales de Havers y de Volkmann hacia el hueso cortical.

La superficie que une el hueso preexistente con el hueso nuevo se denomina **superficie de inversión**,¹⁶² puesto que indica el plano donde el proceso de reabsorción fue substituído por el de formación. Esta superficie se identifica en los cortes histológicos como una línea ondulada y ligeramente basófila que indica el límite máximo de penetración de los osteoclastos en el espesor del tejido óseo.

La formación de tejido óseo no es continúa, sino que sufre interrupciones transitorias. La superficie que indica el límite entre el hueso depositado durante un período de actividad y el hueso depositado durante el período siguiente, se denomina **superficie de parada**.¹⁶² Esta superficie se identifica en los cortes histológicos como una línea basófila lisa (la superficie de inversión da lugar a una línea ondulada). El número de superficies de parada aumenta con la edad.

Las superficies de inversión y de parada reciben el nombre genérico de **superficies de cemento**, puesto que unen entre sí elementos estructurales del hueso,¹⁶² y se corresponden con el límite más externo de los sistemas haversianos secundarios, son pobres en colágeno y no son atravesadas por canalículos.⁷⁰

La fase de formación, incluyendo los períodos de inactividad transitoria, dura unos 3 meses (hueso trabecular y cortical).¹⁶²

H.Frost^{73,76} propuso un concepto similar a la física cuántica (según la cual la energía no se transfiere de manera continua, sino en pequeños pasos o cuantos), para describir el remodelado óseo. Cada cuanto de actividad remodeladora fue denominado como **Unidad Básica Multicelular (BMU)**, y consiste en cada fragmento de hueso existente reabsorbido por osteoclastos, dentro de cuya cavidad formada es producido hueso nuevo hasta que el defecto es más o menos completamente reparado,¹³⁹ indicando a la vez la unidad básica multicelular y metabólica. Para evitar esta ambigüedad denominaremos al conjunto de osteoclastos y osteoblastos que actúan en coordinación para completar un ciclo de remodelado **Unidad de Remodelado Oseo (BRU)**. El resultado final de cada ciclo es una nueva **Unidad Estructural Osea (BSU)**.¹⁴²

En el hueso compacto o cortical, los osteoclastos, a partir de los canales de Havers, o de Volkmann, excavan túneles que después rellenarán los osteoblastos para dar lugar a nuevas BSU corticales u osteonas, de forma cilíndrica y centradas por un nuevo canal de Havers.

En el hueso esponjoso, los osteoclastos, a partir de la superficie trabecular, dan lugar a excavaciones poco profundas y de base ancha que a continuación serán rellenadas con hueso nuevo por los osteoblastos. Como resultado de este proceso se formarán nuevas BSU

trabeculares (paquetes trabeculares u osteonas trabeculares),⁸⁹ que pueden adoptar dos conformaciones diferentes. Las osteonas de clase A poseen las mismas características estructurales que las corticales, y muestran el mismo patrón de remodelamiento, en la que el tejido laminar circunferencial adopta una morfología redondeada, ovalada o serpenteante alrededor del canal. Las osteonas de clase B, consisten sobre todo en cavidades de reabsorción, no rodeadas de tejido laminar circunferencial.¹⁵⁷

Pero para que esta secuencia de remodelado tenga lugar de manera ordenada, ha de haber un **acoplamiento** entre la formación y la reabsorción, balance del que depende el crecimiento y desarrollo del esqueleto, la regulación del volumen óseo y la reparación del esqueleto tras un insulto traumático o infeccioso.

Han de elaborarse con este fin ciertos factores, bien por el hueso, bien por los propios osteoclastos, durante la fase de reabsorción, con una acción, no sólo supresora de la actividad osteoclástica, sino también estimuladora de la diferenciación y activación osteoblástica. Varios factores de crecimiento han sido descritos como potenciales agentes acoplantes,³³ probablemente liberados durante el proceso de reabsorción osteoclástica, aunque aún no han sido demostrados <<in vivo>>.¹⁹⁹

En este mismo sentido, debe existir un **acoplamiento inverso**, en el cual los osteoblastos actúan como células diana de agentes estimulantes de la reabsorción, controlando la activación osteoclástica.

Los principales agentes involucrados en este **control hormonal del remodelamiento** son:

Paratohormona (PTH).- La principal acción de la PTH es el **aumento de la resorción ósea**, por vía de los osteoblastos,^{45,46} aumentando la actividad y número de los osteoclastos (por estimulación de sus precursores).¹⁰³ Por otro lado, altas concentraciones de PTH disminuyen la actividad de los osteoblastos¹⁴² y la síntesis de colágeno óseo,¹⁹⁹ y sobre los osteocitos induce una mayor actividad.¹²⁵

Calcitonina.- Tiene una acción inhibidora específica de los osteoclastos,⁴⁶ aumenta la síntesis de proteoglicanos,¹⁹⁰ la de colágeno óseo⁹³ y otros componentes de la matriz ósea, y facilita el desarrollo de los condrocitos,⁷⁸ por lo que no sólo tiene un **efecto inhibidor de la reabsorción**, sino también **estimulador de la formación y mineralización del hueso**.

Vitamina D .- En general tiene una acción **favorecedora de la mineralización**.¹³⁵ El 1,25-(OH)₂-D₃, es considerado el metabolito más activo de la vitamina D.^{20,56} Como la PTH, parece promover la diferenciación de precursores osteoclásticos en osteoclastos activos,¹⁰³

inhibe la síntesis de colágeno óseo, indicativo de la inhibición de la actividad osteoblástica^{22,109} y **aumenta la reabsorción**⁸² probablemente en dependencia de la presencia de PTH.

Glucocorticoides.- Estimulan la reabsorción ósea <<in vivo>> y actúan sobre los osteoblastos disminuyendo la síntesis de colágeno,^{50,199} motivando una menor formación ósea,^{49,62} quizá induciendo una disminución de la absorción de calcio intestinal,¹⁷ con el incremento subsiguiente de PTH.¹⁹⁹

Hormonas gonadales.- Desde hace tiempo se sabe que los estrógenos protegen de la destrucción ósea.^{88,100,134,168,178} Tanto los estrógenos como los andrógenos parecen cumplir un importante papel en la **maduración esquelética de los individuos en crecimiento**, habiéndose demostrado la existencia de receptores con alta afinidad para ambos esteroides sexuales en los osteoblastos.^{92,98}

Factores de crecimiento y citokinas.- Existe un elevado número de factores de crecimiento y citokinas,^{31,68} secretados por las células óseas (IGF-I, IGF-II, TGF- β , FGF,,...) o por tejidos relacionados con el hueso, como el cartílago (IGF-1, TGF- β ,...), o la sangre (IL-1, TNF, Gamma Interferón,...) de los que actualmente se conocen sus efectos potenciales sobre la reabsorción y formación.^{32,34,131}

1.2.- METODOLOGÍA DE LA HISTOLOGÍA DE HUESO MINERALIZADO

El examen histológico del tejido anormal es frecuentemente esencial para precisar un diagnóstico, y de hecho la biopsia ha llegado a representar una parte integrante de la práctica médica. Mientras la biopsia ósea ha sido durante décadas un procedimiento de rutina para la identificación de lesiones óseas localizadas, en la actualidad se utiliza frecuentemente en la valoración de la enfermedad metabólica del hueso (MBD), y como herramienta de investigación, la histología ósea ha contribuido inmensamente al entendimiento de la patogénesis y al estudio de los efectos de diversas formas de terapia de la MBD.¹⁵¹

No obstante, la evaluación histológica del hueso se ha visto limitada durante muchos años debido a las formidables dificultades técnicas con que se ha encontrado. Antes de 1.960, los histólogos y patólogos examinaban el hueso esporádicamente en comparación con el resto de los tejidos, y cuando lo hacían tenían un importante inconveniente, porque normalmente el primer paso para la preparación del tejido tras su fijación era la descalcificación, o eliminación de su principal componente, el mineral (por medio de soluciones ácidas), con el fin de obtener un tejido lo suficientemente blando que, después de ser incluido en parafina, pudiera ser cortado de manera rutinaria junto a las muestras procedentes de otros órganos.

Además, debido a la resistente naturaleza del tejido óseo era difícil preparar secciones delgadas, de suficiente buena calidad para mantener las relaciones tisulares.¹¹⁰ Esto dificultaba el rigor en el estudio microanatómico de las estructuras óseas, y hacía prácticamente imposible apreciar los procesos dinámicos que de manera continua se producen in vivo, sin hablar de la posibilidad de medirlos.

De acuerdo con Serrano,¹⁶² esta técnica resulta completamente inadecuada para el estudio de la (MBD) puesto que:

- 1.- No permite distinguir el hueso mineralizado del que no lo está.
- 2.- Produce, en la mayoría de los casos, fenómenos de retracción en la interfase hueso/médula ósea, que dificultan o imposibilitan la evaluación de las células que intervienen en el remodelaje óseo.
- 3.- Imposibilita el estudio de la dinámica ósea mediante el marcaje con tetraciclinas.

Por consiguiente, para que el estudio histológico del tejido óseo nos proporcione información útil en el diagnóstico e investigación de las enfermedades generalizadas del hueso, es necesario que no haya sido descalcificado previamente.¹⁶²

1.2.1.- Biopsia ósea

Localización de la biopsia

Dado que las enfermedades metabólicas óseas son expresión de trastornos sistémicos del esqueleto, el lugar de elección de la biopsia ósea ha de proporcionar material representativo de los cambios que tienen lugar en el conjunto del esqueleto.

En este sentido, sabemos que diferentes localizaciones (columna vertebral, cresta iliaca, cuello femoral,...) proporcionan valores diferentes para los mismos parámetros histomorfométricos, e incluso diferentes áreas de la cresta iliaca pueden mostrar pronunciadas variaciones^{52,121,147} dependiendo del parámetro y diagnóstico⁴⁷ como veremos con posterioridad.

Varios factores se invocan a la hora de determinar el lugar de elección para la toma de la biopsia:¹⁵⁴

- Facilidad de acceso.
- Elección de un área donde hay recambio óseo activo.
- Adecuada cantidad de hueso trabecular.

El lugar de elección para la biopsia ósea debe contener ambas corticales y hueso esponjoso. Primero, porque la presencia de las corticales permite el adecuado reconocimiento de la cavidad medular,

utilizado como referencia para muchos de los parámetros morfométricos, y segundo, porque la actividad dentro del córtex y en la región subperióstica puede valorarse y compararse con la del hueso trabecular.²¹ Debido a ello, en el pasado,⁷⁴ e incluso actualmente en numerosos trabajos de histomorfometría aplicada a la práctica forense^{170,173} se ha venido utilizando con frecuencia, como lugar de elección, la costilla. Las piezas de costilla proporcionaban una buena muestra de hueso cortical y dado que los paquetes de remodelado estaban orientados en el eje longitudinal de la costilla se obtenía la muestra por sección transversal.

Sin embargo, ante la escasez de tejido trabecular de la costilla y mejor accesibilidad de la cresta iliaca que implica menores complicaciones, es éste último el lugar más común de obtención de biopsias óseas,^{90,104} habiendo suplantado actualmente a la biopsia costal.¹⁹ Hay menos pacientes disconformes, no se amenaza ninguna cavidad corporal, es menos peligrosa, y no requiere un cirujano experimentado. Además es una localización más adecuada por la evidencia de que su estructura y dinámica se modifican paralelamente con las del resto del esqueleto,¹⁶² unido a su escasa morbilidad.⁸⁵

Los factores locales que ejercen influencias sobre el recambio óseo, tales como la orientación, tensión y fuerzas ejercidas por los grupos musculares, son mínimas a nivel de la cresta iliaca anterior.¹¹⁰

En este sentido, estudios comparativos entre la cresta iliaca y otros lugares de muestreo, revelan diferencias en los valores absolutos para el volumen óseo y grado de aposición mineral, aunque existe una buena correlación entre algunos parámetros en la cresta iliaca y vértebras,^{3,127,191} tibia o fémur.^{58,69}

Lugar de obtención

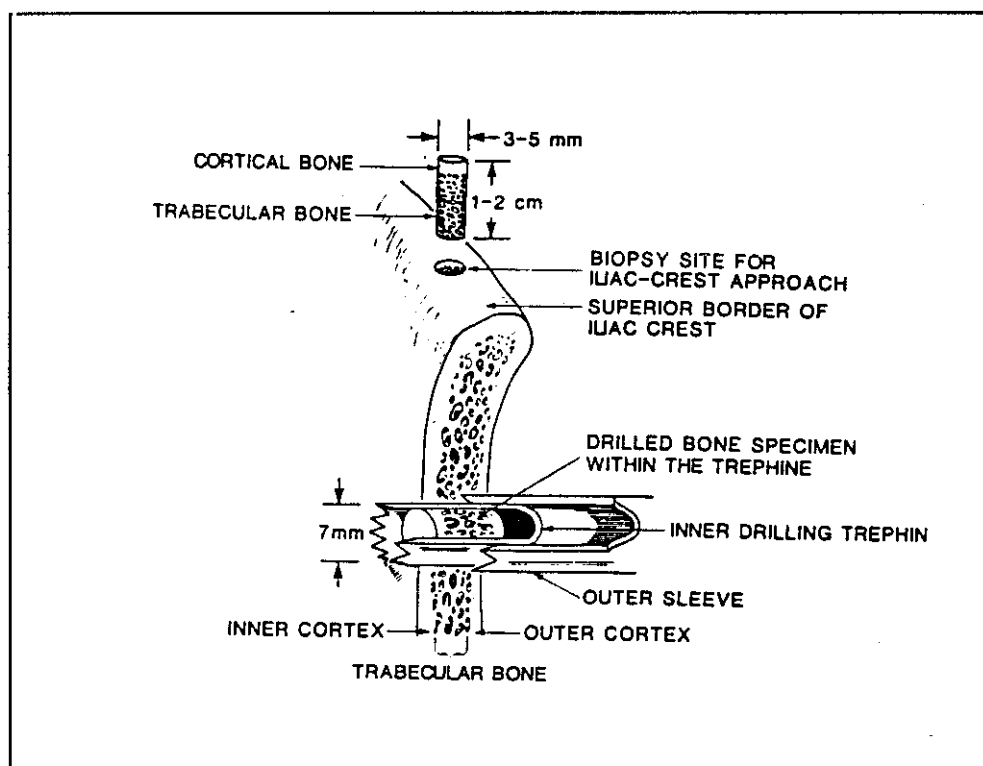


Figura 1.1.- Detalle de dos tipos de biopsia iliaca (Recker)

Las dos técnicas más recomendables para biopsiar el hueso iliaco son la **biopsia vertical** a través de la cresta iliaca y la **biopsia horizontal** de tipo transiliaco,^{110,151} siendo ésta última la preferida en la mayoría de los casos. (Figura 1.1)

Se admiten, por lo general, dos localizaciones estándar para la práctica de la biopsia transiliaca. (Figura 1.2)

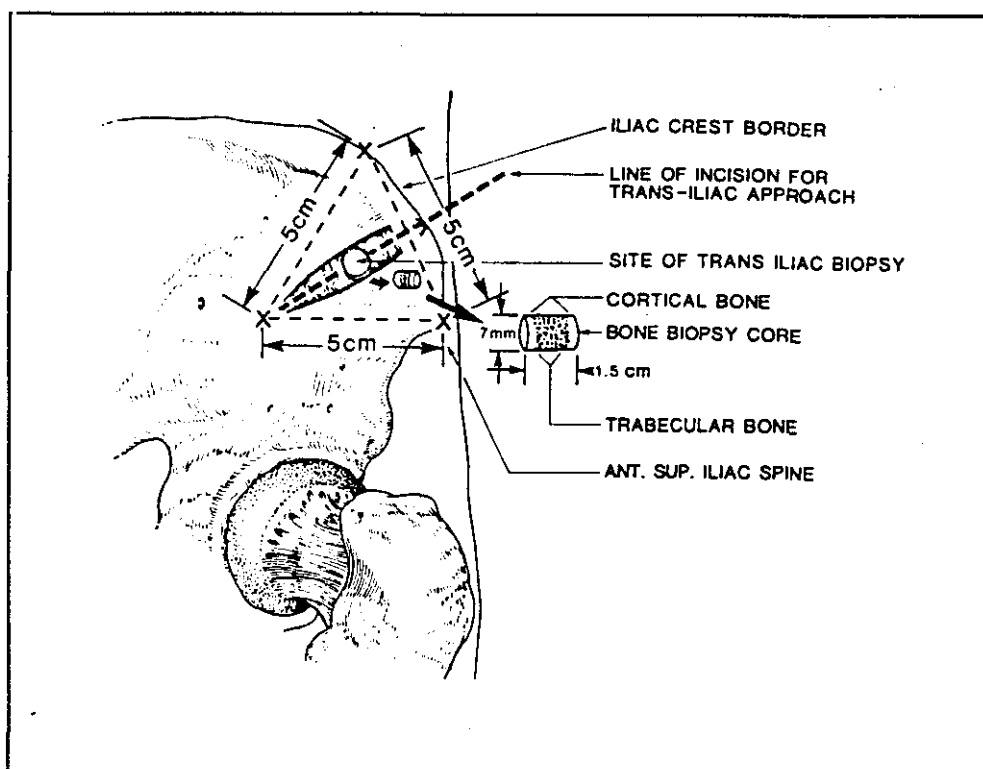


Figura 1.2.- Detalle de dos tipos de biopsia iliaca (Recker)

Estos lugares se definen como un punto situado a 2cm. por detrás de la espina iliaca anterosuperior, o el centro de un triángulo de 5cm. de lado (Triángulo de Bordier) situado en la parte anterior del ala iliaca.¹⁵¹ En este último caso, estudios llevados a cabo por Bullough,²⁷ parecen demostrar mejores resultados cuando el tamaño de dicho triángulo es proporcional a la talla del individuo, y por lo tanto, al

tamaño de la cresta iliaca, correspondiendo la longitud de sus lados a una cuarta parte de la longitud anteroposterior de la cresta iliaca.

La mayoría de los parámetros obtenidos de la valoración de **biopsias verticales**, son significativamente más altos que en las **biopsias horizontales**, salvo la masa ósea trabecular, que permanece constante, y el diámetro medio trabecular, que muestra valores inferiores. Las diferencias entre **localizaciones superiores o inferiores** ha de tenerse en cuenta cuando se trate de biopsias horizontales, tendiendo los valores de los parámetros a ser menores en las localizaciones inferiores, con diferencias significativas para el volumen osteoide, grosor de las bandas de osteoide y fracción de superficie trabecular recubierta por osteoide. No se han observado variaciones, sin embargo, en cuanto a la **localización anterior o posterior** de las biopsias verticales. No se han evidenciado variaciones tampoco, en los parámetros estructurales tales como la masa de hueso trabecular, diámetro medio trabecular, volumen de osteoide, superficie trabecular recubierta por osteoide, y grosor medio de las bandas de osteoide, en muestras obtenidas de **localizaciones contralaterales** (izquierda - derecha), de la cresta iliaca, aunque sí en los parámetros celulares tales como el índice osteoclástico o superficie de reabsorción, que son significativamente mayores en la cresta iliaca derecha.¹¹²

Tamaño de la muestra

En cuanto al tamaño de la muestra, mientras que muestras de 3mm. de diámetro son suficientes para diagnósticos cualitativos, no observándose diferencias en cuanto a la producción de artefactos tales como microfracturas, desgarros, solapamientos o arrugas con respecto a las muestras de 5mm. de diámetro,⁹ numerosos trabajos coinciden en que biopsias de 5mm. de diámetro son suficientes para cuantificar los parámetros histomorfométricos.^{112,162}

1.2.2.- Técnica de procesado

Si el primer paso importante es conseguir una buena pieza de biopsia, cada uno de los pasos siguientes referentes a la sección histológica, son de la mayor importancia.

Las razones para evitar la descalcificación son obvias y numerosas; la más importante es la conservación de las diferencias entre el hueso calcificado y no calcificado (osteóide) de cara a que sea posible diagnosticar y medir las alteraciones en el proceso de formación y/o mineralización del hueso. Así mismo, la óptima conservación de la estructura celular y la mínima reducción de la médula ósea para evitar artefactos en la unión entre hueso y médula, son también de la mayor importancia.⁹

El uso de medios duros de inclusión y de microtomos especiales, ha permitido cortar el hueso sin descalcificar y, con ello, muchos tipos de estudios que no era posible desarrollar con anterioridad. Con la introducción de derivados celulósicos plásticos como la celoidina, se inició la inclusión del hueso en estos materiales, aunque fueron necesarias posteriores modificaciones tales como la inclusión de aditivos para los monómeros plásticos, que afectaran a los procesos de endurecimiento, consiguiendo bloques de plástico de prácticamente la misma dureza que el propio hueso. Microtomos del tipo "Sledge" o "Heavy Duty" equipados con cuchillas de diamante o carbono de tungsteno, previamente utilizados con propósitos industriales en metalurgia, fueron otros de los pasos complementarios, necesarios en la investigación de técnicas de histología de hueso mineralizado.¹¹⁰

Sin embargo, la naturaleza de numerosos fijadores, agentes deshidratantes y medios de inclusión que preservan la morfología de las estructuras óseas alteran muchos de los componentes bioquímicos, por lo que actualmente se utilizan técnicas de congelación en fresco para análisis histoquímicos.^{1,35}

Desde entonces han sido descritos numerosos métodos y técnicas para el procesado y tinción del hueso no descalcificado.^{5,21,72,87,124,159,162,184,187}

No es objeto de este trabajo realizar una descripción detallada de

cada uno de ellos, aunque creo conveniente proporcionar una visión general de las características de las diferentes técnicas y productos utilizados durante el procesamiento de las muestras.

Aspectos generales de las técnicas de procesamiento^{4,9,159,162}

Fijación.

Las condiciones que un fijador ideal debe reunir son:

- No reaccionar con la fase mineral. Es decir, no provocar descalcificación del hueso ni precipitación de sales de fosfato cálcico.
- Rápida y completa penetración.
- Buena extracción de lípidos del hueso y médula ósea.¹⁵⁹

Ninguno de los siguientes fijadores reúnen todas las características anteriores, aunque producen resultados satisfactorios. Los más usados son:

Alcohol etílico. Se ha utilizado en diversas concentraciones (40 - 100%),^{11,115} debiéndose emplear a una temperatura de 4°C, con el fin de disminuir la actividad de las enzimas autolíticas. Es neutro, y extrae bien los lípidos, pero penetra lentamente. Entre sus desventajas destaca la acción de desestructuración de membranas celulares, que provoca lisis de eritrocitos.

Formaldehído. Es mejor fijador a la hora de preservar las células de la médula ósea, generalmente utilizado en mezclas con metanol¹⁸⁴ u otras sustancias,⁷⁷ pero posee la desventaja de transformarse progresivamente en ácido fórmico, que puede causar desmineralización. Para evitar esta situación suele neutralizarse con soluciones tampones (carbonatos, fosfatos,...).

Solución de Carnoy. (Alcohol, cloroformo y ácido acético en proporción 6:3:1). Penetra muy rápidamente, deshidrata y desengrasa, pero el tiempo de fijación no debe exceder de 2-3 horas, debido a la acción desmineralizante del acético.

Glutaraldehído y Paraformaldehído. Se recomiendan para exámenes combinados de microscopía óptica y electrónica.⁸⁶ El glutaraldehído preserva mejor la estructura celular, pero penetra muy lentamente, por lo que debe utilizarse sólo en muestras pequeñas.

Deshidratación.

Tiene como finalidad la eliminación completa del agua y grasa de la muestra, mediante concentraciones crecientes de alcohol⁶⁷ (generalmente etanol desde 70°-100°) o acetona. Cuando se utiliza el alcohol, ha de realizarse un aclarado con xilol o, menos frecuentemente, con cloroformo.

Inclusión.

La inclusión de la pieza después de la fijación ha de realizarse de acuerdo con los objetivos siguientes:

1. La pieza ósea se debe infiltrar y no solamente rodear por el material de inclusión; el procedimiento de inclusión debe, por tanto, realizarse lentamente para obtener mejores resultados.
2. El material de inclusión debería ser idealmente tan duro como el hueso calcificado, para evitar las fracturas durante su sección. Debería, sin embargo, ser lo suficientemente flexible para facilitar el corte y manejo de las secciones.
3. La temperatura alcanzada durante la polimerización no debe exceder los 45-50° C; por lo que se ha de moderar añadiendo una mínima cantidad de catalizador, y dejando la pieza a temperatura ambiente al comienzo del proceso de polimerización.
4. El material de inclusión ha de ser fácilmente disuelto tras el corte, con el fin de permitir el uso de cualquier técnica de tinción deseada.

Se han probado y recomendado una gran variedad de derivados plásticos para la inclusión, originalmente procedentes de métodos diseñados para microscopía electrónica. Tanto los derivados acrílicos (Metacrilato de metilo,^{16,184} como las resinas epoxi son los más

utilizados para estas aplicaciones.

Las **resinas epoxi** (Epon®) se emplean principalmente en microscopía electrónica, por su elevado grado de estabilidad al ser sometidas a alto vacío y bombardeo de electrones, mientras que su utilización en microscopía óptica es menor al no permitir una adecuada penetración de los colorantes.

Los **derivados acrílicos** más utilizados son el metilmetacrilato^{29,30} y el glicolmetacrilato.³⁹

El metacrilato puro es duro y quebradizo, por lo que suele utilizarse en mezclas con polietilenglicol, dibutilftalato, o Plastoid N®.¹⁸⁴ El uso del glicolmetacrilato ha aumentado mucho en los últimos años, aunque no parece ser capaz de reemplazar al metilmetacrilato que es en la actualidad el plástico de elección. No obstante, dado que la polimerización del glicolmetacrilato tiene lugar a -4°C, permite demostrar la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina y anhidrasa carbónica,⁸⁷ estando su uso indicado en estudios enzimáticos.

Las características ideales que debería reunir un medio de inclusión, son:

- Completa penetración.
- Endurecimiento homogéneo de los bloques y facilidad para

ser cortados.

- Consistencia estable incluso tras largos períodos de almacenamiento.
- Cortes fáciles de recoger y extender en portaobjetos.
- Buena capacidad de tinción.
- Infiltración y polimerización breve.

Obviamente, como ya hemos visto, ninguno de los medios descritos reúne todas las cualidades descritas.

La inclusión en metilmetacrilato dura aproximadamente una semana, aunque puede reducirse el tiempo utilizando el vacío, y consta de las siguientes etapas:

Infiltración: Con monómero de metilmetacrilato (metilmetacrilato con hidroquinona inhibidora de la polimerización).

Polimerización: La muestra se sumerge en polímero de metilmetacrilato sin inhibidor, añadiendo un catalizador (generalmente Peróxido de Benzoílo) controlando la temperatura, ya que durante su polimerización el metilmetacrilato desprende gas, pudiendo producirse burbujas que quedan atrapadas en el interior del bloque.

Sección.

Sumándose a la importancia crítica del medio de inclusión para obtener buenas secciones, algunos otros factores son de gran importancia.

El microtomo ha de ser lo suficientemente potente para el tamaño de la muestra. Existen dos grandes grupos de microtomos: de rotación (Polycut®) que pueden cortar bloques de metacrilato de hasta 25mm de diámetro, y de deslizamiento (microtomo K®) para piezas de gran tamaño.

La calidad de los cortes realizados va a depender de tres factores fundamentales:

- **Velocidad de corte:** ha de ser muy baja.
- **Angulo de corte:** Un ángulo de sección pequeño produce deformaciones y desgaste prematuro de la cuchilla, mientras que uno grande provoca distorsiones y fragmentaciones de la muestra de tejido óseo, por lo que las cuchillas comerciales suelen tener un ángulo de 35°-50°.

Las cuchillas pueden estar dotadas de filo d para los tipo Policut®, o HK-2 para los tipo K®, según el ángulo de inclinación de la cuchilla y forma del filo. El ángulo de las *HK-1* es demasiado pequeño,

resultando frecuentemente dañado el filo durante el corte y el ángulo de la *HK-3* es demasiado ancho, aumentando la fragmentación debido al marcado cambio de dirección que la sección ha de tomar para situarse sobre la cuchilla.

- **Espesor del corte:** Una sección entre $4-7\mu\text{m}$ da buenos resultados. Por debajo de $3\mu\text{m}$ la compresión por la cuchilla es demasiado grande y por encima de $10-12\mu\text{m}$ aumenta el peligro de producir fracturas.

Lo más importante para la calidad morfológica es la lisura de las secciones al final del procesado. Por esta razón se cubren los portaobjetos con gelatina, sobre los que se depositan los cortes que se reblandecen con etanol al 95% y estiran con ayuda de un pincel. Finalmente se cubren con una lámina de polietileno, se alisan con un rodillo de goma, y se colocan en una prensa durante 12h. en estufa, esencial para conseguir una perfecta lisura en la sección antes de su tinción.

Tinción.

Previamente a la tinción, las secciones deben ser desplastificadas e hidratadas.

La meta que uno quiere alcanzar cuando tiñe secciones de hueso no descalcificado es hacer una clara y segura distinción entre hueso

calcificado y tejido osteoide y, al mismo tiempo, conseguir tanto detalle celular como sea posible, especialmente de aquellas células que se encuentran en la superficie de unión entre hueso y médula ósea.

Indiscutiblemente, la tinción más fiable para la distinción entre osteoide y hueso calcificado es la técnica de **Von Kossa**¹⁸⁸, aunque no proporciona un detalle celular óptimo.

La técnica más comunmente utilizada en los laboratorios es la modificación de **Goldner**⁷⁹ del **Tricrómico de Masson**. Esta permite observar con nitidez las células óseas, pero tiene tendencia a sobreestimar el volumen de osteoide, especialmente cuando tiene poco espesor.

Se han recomendado otras técnicas como la **Solocromo Cianina R**¹¹⁶ que proporciona buenos resultados para el osteoide, pero no tiñe las células, o el **Osteocromo** o **Tetracromo de Villanueva**,¹⁸⁷ excelente, pero que requiere demasiado tiempo.

Por su parte, el **Azul de toluidina**⁹ se ha utilizado para identificar las líneas de cemento y los frentes de mineralización, aunque puede dar lugar a muchos errores de interpretación.

La **tinción en bloque** se lleva a cabo sumergiendo la muestra en el colorante antes de su inclusión y corte.

Las técnicas de **tinción de superficie** se utilizan para observar láminas gruesas de tejido sin desplastificar, y tan solo se tiñe el tejido en contacto con la superficie de corte, con el fin de que el resto del tejido más profundo no interfiera en la observación al realizar mediciones histomorfométricas. Así mismo, esta técnica permite estudiar la estructura tridimensional del tejido situado en profundidad.

1.2.3.- Evaluación

Las secciones de hueso mineralizado pueden evaluarse cualitativa o cuantitativamente.

La interpretación cualitativa, por un experimentado patólogo de hueso, era considerada normalmente suficiente para el diagnóstico de rutina y clasificación de ciertas enfermedades óseas, tales como osteoporosis severa, osteomalacia avanzada, hiperparatiroidismo de larga evolución, enfermedad de Paget y anormalidades óseas caracterizadas por hallazgos patognomónicos como la oxalosis, sarcoidosis, o infiltración metastásica del hueso.¹¹⁰

En la actualidad, dado que, en la mayoría de los trastornos metabólicos del hueso, el diagnóstico se basa en desviaciones cuantitativas de la normalidad de uno o varios rasgos fisiológicos, el empleo de métodos de evaluación histomorfométrica del hueso que proporcionen datos objetivos de parámetros estáticos y dinámicos de la estructura ósea⁸¹ (gracias a la rigidez del tejido óseo, que impide alteraciones significativas de las relaciones celulo-tisulares), se ha hecho necesario con el fin de sentar una base que permita distinguir el hueso normal del anormal, particularmente en los más sutiles e incipientes cambios patológicos.

Todos los métodos de evaluación histológica cuantitativa dependen del uso de técnicas de muestreo imparcial, basados en los principios de probabilidad geométrica, utilizando imágenes bidimensionales para estudiar estructuras tridimensionales, como veremos más adelante.

En la histomorfometría ósea se han venido empleando dos tipos de procedimientos: a) el muestreo aleatorio por medio de rejillas o retículas microscópicas y b) el trazado de estructuras tisulares completas, mediante el uso de dispositivos de digitalización computadorizada,¹⁹⁷ de manera semiautomática¹⁹¹ o automática,⁹¹ existiendo numerosas discusiones sobre los resultados obtenidos por unos u otros.^{48,110,137,138}

Las técnicas de rejilla, o **técnicas manuales**,^{55,119,182} emplean micrómetros y rejillas integradas en los oculares del microscopio, que son proyectadas sobre la estructura histológica a evaluar, contando el número de intersecciones o número de puntos o líneas de la retícula que se superponen o cortan la estructura a medir.¹⁸⁵ Estos métodos son los más económicos, pero también los más lentos.

Los **métodos semiautomáticos**,¹¹¹ precisan un equipo más sofisticado, generalmente integrado por los siguientes elementos:

- Microscopio con o sin cámara clara.
- Tablero digitalizador.
- Cursor, en el que el punto activo está indicado por un diodo luminoso.
- Ordenador con programa para histomorfometría.

El investigador selecciona y traza todas las estructuras histológicas a medir, mediante movimientos del cursor sobre el tablero digitalizador, visualizando el punto activo luminoso, bien sobre el mismo campo microscópico (en los equipos con cámara clara), bien sobre la pantalla del ordenador. Bajo la superficie del tablero existe una malla electrónica en la que cada punto corresponde a un valor de coordenadas en la memoria del ordenador, con lo que los valores de perímetros y áreas son transmitidos y archivados en éste. (Figura 1.3)



Figura 1.3.- Sistema semiautomático de Análisis de imagen

Los **métodos automáticos**,^{36,118,126} utilizan analizadores de imagen, proyectando la imagen sobre un monitor utilizando una videocámara, analizando un elevado número de puntos de acuerdo con una escala de grises. El operador programa inicialmente las operaciones morfométricas que desea realizar, identifica en el monitor el segmento de la escala de grises en el que se halla comprendida la estructura problema y da instrucciones al ordenador para que seleccione automáticamente dichas estructuras y realice en ellas las mediciones programadas.¹⁸²

Estas mediciones, al igual que en los otros métodos, se van realizando en los sucesivos campos microscópicos, pudiéndose automatizar completamente el procedimiento mediante la utilización de una platina motorizada.

Aunque parece evidente el ahorro de tiempo que esta técnica proporciona, existen una serie de problemas que la hacen poco efectiva en la práctica:

- Requieren unas preparaciones técnicamente perfectas, para evitar los falsos resultados derivados de roturas de las estructuras histológicas.
- Han de realizarse tinciones especiales para lograr un alto nivel de contraste entre las distintas estructuras que queremos medir.

La mayoría de estos sistemas permiten un alto grado de interacción con el observador, que puede modificar la imagen que aparece en la pantalla, obviando alguno de los inconvenientes expuestos, lo que en la práctica hace que estos equipos se utilicen como semiautomáticos.

1.3.- HISTOMORFOMETRÍA OSEA

1.3.1.- Bases estereológicas

El estudio microscópico de los tejidos requiere secciones del orden de micras de espesor, muy delgadas, por tanto, en relación con su anchura y longitud, por lo que su observación a través del microscopio produce una imagen bidimensional, en contraste a la tridimensionalidad de los órganos de los que proceden.⁶ Esta imagen se compone de perfiles que son las proyecciones de estructuras tridimensionales sobre un plano. La estereología es la ciencia que permite obtener información cuantitativa de estructuras tridimensionales, a partir de secciones bidimensionales de las mismas.^{63, 64}

El hueso cortical es anisotrópico (sus elementos están dispuestos organizadamente) debido a la orientación longitudinal de osteonas y canales haversianos.

El hueso trabecular es también muy anisotrópico, existiendo diferencias en la estructura tridimensional de diferentes localizaciones tales como costillas, esternón, cuerpos vertebrales e iliaco.¹⁹³

De los datos iniciales obtenidos de las estructuras microscópicas

medidas tales como áreas y perímetros (terreno de la microscopía cuantitativa), se derivan fórmulas que permiten extrapolar estas cuantificaciones bidimensionales a tridimensionales como volumen y área de superficie (propios de la estereología). La primera operación no se ve afectada por la anisotropía siempre que se lleve a cabo con la adecuada aleatoriedad. Por el contrario, el segundo caso puede verse gravemente afectado por esta característica.

1.3.2.- Medidas de áreas, perímetros y distancias

Las medidas se toman de los perfiles de las imágenes bidimensionales microscópicas. El área de una estructura, en un corte histológico, está en relación con su volumen, con independencia de la geometría tridimensional o de la orientación de esta estructura. Por su parte, se ha comprobado que existe una estrecha relación entre el perímetro o la longitud de una estructura en un corte histológico y el área de la superficie externa de dicha estructura en el espacio tridimensional. En este caso no es posible la transformación directa y es necesario introducir un factor de corrección que depende de la orientación tridimensional de la estructura.

Es así mismo posible deducir la distancia entre dos superficies situadas en el espacio tridimensional (espesor) a partir de la distancia

que existe entre las líneas que resultan de la sección de estas superficies mediante un plano (anchura). En este caso, tampoco es factible la transformación directa, y es necesario introducir un factor de corrección que depende de la oblicuidad y del espesor del corte.¹⁶²

1.3.3.- Significado de los datos histomorfométricos

Los parámetros histomorfométricos resultan de relacionar entre sí una serie de recuentos y mediciones efectuadas en el tejido óseo, permitiéndonos definir cuantitativamente las características estructurales y funcionales del hueso en condiciones normales, patológicas o experimentales.

Los recuentos y mediciones realizados en cortes histológicos teñidos con los métodos convencionales permiten obtener **parámetros estáticos**, y el marcaje con tetraciclinas, al introducir el factor tiempo, posibilita el cálculo de **parámetros dinámicos**. A su vez, tanto unos como otros pueden ser **primarios** o **secundarios**. Los parámetros primarios se calculan directamente a partir de los recuentos y mediciones, y los secundarios a partir de los primarios. Con el fin de evitar los inconvenientes derivados de la diferente nomenclatura y variedad de parámetros se ha propuesto una estandarización de los mismos.¹⁴¹

Los contajes, mediciones y parámetros utilizados en el presente estudio, se describen en el capítulo 4 (material y métodos).

1.4.- APLICACION DE LA HISTOMORFOMETRIA OSEA A LA ANTROPOLOGÍA FORENSE

Se han descrito numerosos métodos para la estimación de la edad mediante técnicas histomorfométricas.

El primer estudio importante sobre los cambios histológicos del hueso, y su aplicación para el cálculo de la edad en esqueletos de adultos, es el realizado por **Kerley** en 1965,⁸ quien desarrolló un método basado en el análisis microscópico de la cortical de los huesos largos. En este trabajo estableció y valoró cuatro componentes corticales en la zona más externa del hueso: osteonas completas, osteonas fragmentadas, hueso laminar circunferencial, y canales no Haversianos, en fémur, tibia y peroné, bien de forma independiente o en combinación, en ambos sexos. La diferencia entre edad estimada y edad real variaba en un rango de 5 años por arriba o abajo en hombres, y de 5 años por arriba a 1 año por abajo en mujeres.

Pero el método de Kerley contenía ciertos inconvenientes tales como que sólo se aplica a huesos largos de extremidades inferiores precisando la sección completa del hueso, y cuenta con numerosas variables subjetivas que afectan la estimación de los parámetros a medir tales como la dificultad de distinguir osteonas fragmentadas e intactas y de estimar el porcentaje de hueso laminar en un campo

visual circunferencial, como pusieron de manifiesto Ahlqvist y Damsten,¹⁰² aunque el método propuesto por ellos, modificación del método de Kerley, dio inferiores resultados.

Thompson desarrolló un método presentado al Congreso Anual de la Academia Americana de Ciencias Forenses, que trataba de evitar estos inconvenientes. Sobre una muestra de 116 cadáveres (64 masculinos y 52 femeninos), cuya edad conocida oscilaba entre los **30 y los 97 años**, obtuvo una serie de cilindros de hueso cortical de 0,4 cm. de diámetro, de fémur, tibia, húmero y cúbito, evaluando 19 variables en cada cilindro. El análisis microscópico de las secciones se efectuó mediante procedimientos estereológicos de morfometría. Las 19 variables derivadas de cada cilindro, se examinaron mediante análisis de regresión lineal, con el fin de seleccionar la variable o combinación de variables, con un error estándar menor y el más alto coeficiente de determinación. De este estudio surgieron una serie de ecuaciones de regresión que ponían de manifiesto que el área de hueso cortical que contiene osteonas (Area osteonal), es el mejor elemento individual para deducir la edad del sujeto en restos esqueléticos.¹⁷⁵

El mismo Thompson estudió con posterioridad una muestra de 54 individuos en un rango de edad de **17 a 78 años**, aplicando el método descrito. Los resultados muestran una gran seguridad de esta técnica en la estimación de la edad, y de las distintas localizaciones de las

muestras, el fémur produce la estimación más segura.¹⁷³ El factor de mayor contribución a la inexactitud de la estimación de la edad en secciones de tibia, era la variabilidad en el tamaño de las osteonas (en área y perímetro), sobre todo en individuos menores de 35 años. Estas diferencias respecto de la localización de la muestra, indujeron a Thompson a efectuar un nuevo estudio, sobre 53 esqueletos de individuos de edad comprendida entre **17 a 53 años**, la mayoría de ellos hombres, en el que se evidenció que el análisis del número de osteonas secundarias proporcionaba una diferencia media de edad real/edad estimada, similar a la que se obtiene mediante la valoración a través de muestras de fémur.¹⁷⁶

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

En el año 1985, **Stout** emplea el análisis histomorfométrico en la investigación de los restos de Francisco Pizarro, en hueso cortical de una costilla,¹⁶⁹ utilizando un método propio de estimación de la edad, derivado del método de Wu descrito en 1.970,¹⁹⁶ constituyendo el primer estudio que ha utilizado el análisis histomorfométrico para la resolución de un caso histórico. De los parámetros evaluados en la muestra, aquél que se mostró más significativo para el cálculo de la edad, fue el cociente $\text{Area cortical/Area total}$ (Area de hueso entre

periostio y endostio/Area contenida dentro de la envoltura perióstica).

Más recientemente, Stout ha propuesto un nuevo método para el cálculo de la edad utilizando muestras de costilla o clavícula,¹⁷⁰ en las que valora los siguientes parámetros:

- Area cortical: suma de las áreas de hueso cortical contenidas dentro de todos los campos microscópicos examinados.
- Densidad de osteonas completas: Número de osteonas intactas en las que, al menos, el 90% del perímetro de los canales haversianos no muestran signos de reabsorción, dividido por el área cortical.
- Densidad de osteonas incompletas: número de osteonas en remodelación, incluyendo aquéllas en las que, al menos el 10% del perímetro de los canales haversianos muestra evidencia de reabsorción, dividido por el área cortical.
- Densidad total de osteonas visibles: suma de las dos anteriores.

Utilizando este último parámetro como variable independiente, elabora una serie de ecuaciones de predicción de la edad concluyendo en la utilidad de este método cuando no se dispone de huesos largos, con un error de unos 4 años para costilla, 6 años para la clavícula y 3.8 cuando se combinan ambas.

Como vemos, todas las investigaciones examinadas sobre la determinación de la edad en restos esqueléticos, se han llevado a cabo

sobre hueso cortical, aunque las más recientes investigaciones en materia de histomorfometría ósea, se realizan sobre **hueso trabecular**.

Desde finales de los años '50 se ha dispuesto de técnicas que permitían medir el turnover óseo en el hueso compacto. Esto no era aplicable al hueso trabecular debido a un número de problemas metodológicos existentes.¹⁵³

Soluciones recientes a algunos de los problemas que envuelven el análisis del hueso trabecular han permitido la medida directa de estos parámetros, ofreciendo mejores resultados que el estudio del hueso cortical debido a la mayor sensibilidad del tejido trabecular para reflejar los continuos cambios dinámicos sufridos por el hueso.¹¹⁰

2 - OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

El presente estudio ambiciona un doble objetivo:

- Por un lado, establecer los parámetros histomorfométricos óseos normales para la población infantojuvenil española, que sirvan de referencia y de comparación con fines diagnósticos.

- Por otra parte, buscar las posibles relaciones entre el valor de los parámetros medidos y ciertas características individuales (fundamentalmente la edad), y su aplicación en el campo de la Antropología Forense.

2.1.- Justificación de los objetivos clínicos

El valor de la histomorfometría ósea en el manejo de pacientes con trastornos metabólicos, tal y como ha quedado reflejado en la introducción, es evidente.⁷

Primero, aunque podemos identificar una serie de marcadores bioquímicos relacionados con el proceso de remodelado óseo en el estudio de las enfermedades óseas metabólicas,⁵³ o utilizar otras técnicas como la radiodensitometría,^{99,106,120} la histomorfometría es un procedimiento de investigación indispensable que aporta una información única, que no puede ser obtenida por otros métodos. Por ejemplo, sólo la histología ósea puede valorar la actividad celular del hueso y cuantificar las variaciones del tejido óseo.

Segundo, en las últimas décadas, la histomorfometría ósea es un método imprescindible en el asesoramiento clínico de pacientes con patología ósea metabólica, particularmente aquéllos con osteoporosis, osteomalacia y fallo renal crónico.^{128,180}

Tercero, la información obtenida por la histomorfometría ósea aporta un indispensable marco conceptual para el entendimiento de la fisiopatología de un variado número de enfermedades metabólicas del hueso.^{144,152}

Para la evaluación cuantitativa de biopsias óseas, es de la mayor importancia ser capaz de revelar con gran certeza, incluso las desviaciones más pequeñas. Además, el diagnóstico de enfermedad metabólica de hueso depende, en gran parte, de la validez del material de referencia con el que la biopsia ósea ha sido comparada. Es por ello que se hace imprescindible determinar los valores de referencia, en individuos normales de diferente edad y sexo, pertenecientes a una población semejante a aquélla con la que más tarde se compararán los resultados. En este sentido se han descrito diferencias interraciales¹⁷ que podrían deberse a factores externos tales como la dieta en Vitamina-D, ingesta de calcio y exposición solar. Por estas razones es necesario establecer un material de referencia para una zona geográfica determinada.

Como sabemos, incluso leves variaciones de la homeostasis fósforo-calcio pueden dar lugar a cambios de los parámetros relacionados con la cantidad, estructura o remodelado óseo,¹⁸ debido a lo cual se impone una selección crítica del material de referencia.

Dado que los mecanismos de control de la homeostasis estructural y mineral del hueso no son fácilmente separables, algunos parámetros serán de mayor validez que otros, dependiendo del propósito del estudio histomorfométrico en cada caso, y por lo tanto de la entidad clínica cuyo diagnóstico persigamos.

Las indicaciones para la biopsia ósea en niños son similares a las de los adultos, siendo de gran utilidad en el diagnóstico y control del raquitismo, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis¹¹⁰ y otros trastornos óseos pediátricos (p.e. tratamientos con prostaglandinas en niños con ductus arterioso persistente,¹⁷⁹ y sobre todo en pacientes con osteodistrofia renal.¹⁶³

Su indicación, por lo tanto, en el manejo de estas enfermedades, y la inexistencia de estudios previos para la población de referencia, justifican por sí mismas, la realización de este proyecto.

2.2.- Justificación de los objetivos Médico-Forenses

La determinación de la edad del sujeto en restos esqueléticos es uno de los problemas diariamente planteados a los antropólogos forenses. Los métodos morfológicos, cuando sólo contamos con escasos fragmentos esqueléticos (p.e.: descuartizamientos, cremaciones), no suelen ofrecer buenos resultados.

Debido a ello, los métodos histológicos de estimación de la edad, superando muchos de los criterios subjetivos asociados a los métodos morfológicos, pueden aportar datos importantes en la resolución de estos problemas, por lo que están recibiendo cada día una mayor atención por su capacidad de estimar, con cierta aproximación, la edad en esqueletos desde el nacimiento a la vejez.¹⁷⁵

La posibilidad de cuantificar mediante estudios histomorfométricos determinados parámetros propios de la estructura mineral del hueso, única que persiste en el hueso seco (los estudios del hueso calcificado han demostrado que, por peso seco, 76 a 77 % de la sustancia ósea es inorgánica y el resto orgánica),⁸⁴ gracias a las técnicas histológicas de hueso no descalcificado, ha sido investigada por numerosos autores, todos ellos mediante la cuantificación de parámetros de hueso cortical.

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

La cuantificación, en estructuras de hueso trabecular, de parámetros que reflejen modificaciones determinadas por la edad, tiene la ventaja de utilizar un método de uso común en la clínica, con una uniformidad en sus criterios de aplicación,³⁸ lugar de toma de muestra, estandarización de los parámetros a medir, y presentación de resultados, debido a lo cual creo posible desarrollar un método de determinación de la edad en restos esqueléticos a partir del análisis histomorfométrico en hueso trabecular.¹⁴⁹

3 - MATERIAL y METODOS

MATERIAL y METODOS

3.1.- Material

Se obtuvieron un total de **73** muestras, a partir de autopsias de cadáveres judiciales, procedentes de Partidos Judiciales de Galicia, Cantabria, País Vasco, Madrid, Cataluña y Baleares, cuya edad no superaba los 20 años, que habían fallecido a consecuencia de muerte repentina (no estrictamente súbita) o violenta.

Del total de muestras recogidas, se desecharon **13** debido a una o varias de las siguientes causas:

- Data de la muerte superior a 24 horas. **(4)**
- Insuficiente cantidad de muestra recogida. **(3)**
- Error en el procesado de la muestra. **(1)**
- Evidencia de enfermedad que pudiera alterar el metabolismo óseo. **(2)**
- Otras. **(3)**

De las 60 muestras estudiadas, 37 corresponden a varones y 23 a hembras, tal y como se representa en la figura 3.1

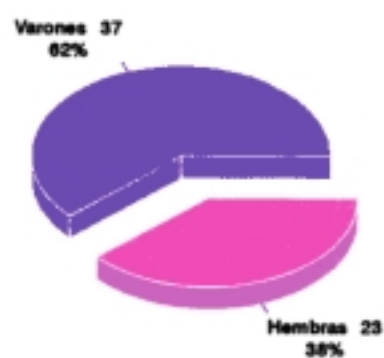


Figura 3.1.- Distribución por sexos

La distribución de la muestra por edades y sexo (Figura 3.2), se refleja en la siguiente tabla (Tabla 3.1)

Varones	7	4	2	4	2	1	1	1	0	1	0	0	1	1	2	0	2	2	0	3	3
Hembras	8	3	0	0	0	2	0	2	1	0	1	1	2	0	0	1	0	0	1	0	1
Total	15	7	2	4	2	3	1	3	1	1	1	1	3	1	2	1	2	2	1	3	4

Tabla 3.1.- Distribución por edades y sexo

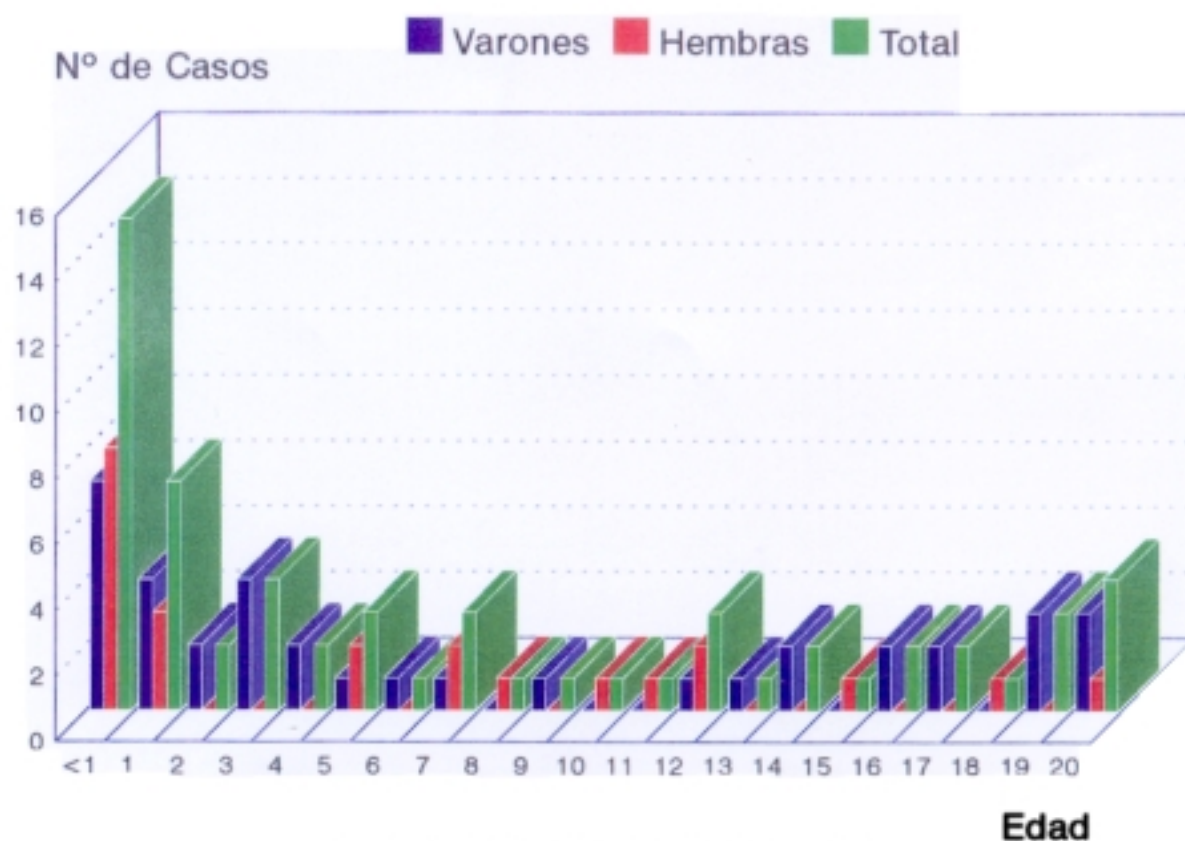


Figura 3.1 Distribución por edades y sexo

Las diferentes **causas de muerte** se han clasificado en dos grupos principales: naturales y violentas. (Figura 3.3)

Dentro de las muertes **naturales (13)** distinguimos las siguientes (Figura 3.5):

- Muerte súbita del lactante. (5)
- Cardiopatías. (2)
- De causa desconocida o idiopática. (3).
- Otras. (3)

Así mismo, dentro del grupo de muertes **violentas (47)** se han diferenciado las siguientes (Figura 3.4):

- De origen traumático (33)
 - Por accidente de tráfico. (23)
 - Por precipitación desde altura. (1)
 - Por arma de fuego. (2)
 - De origen térmico. (1)
 - Otros traumatismos. (6)
- Asfixias mecánicas (10)
 - Por sumersión. (5)
 - Por aspiración. (2)
 - Por ahorcadura. (1)
 - Otras. (2)
- Intoxicaciones (4)
 - Por monóxido de carbono. (3)
 - Derivadas del consumo de drogas. (1)

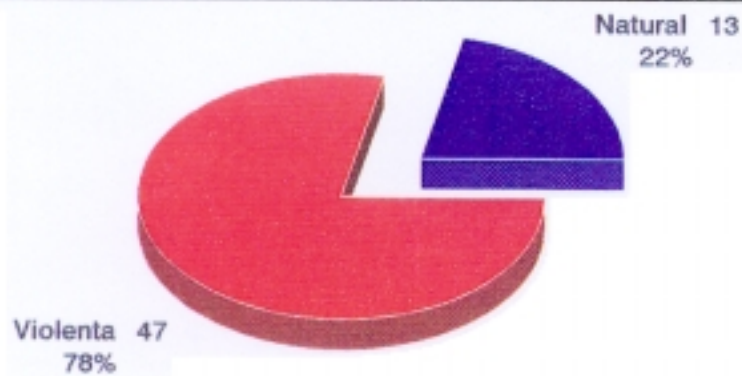


Figura 3.3.- Distribución por causas de muerte

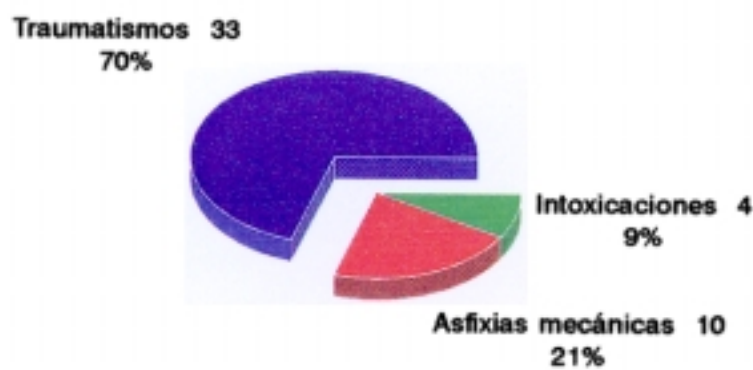


Figura 3.4.-Causas de muerte violenta

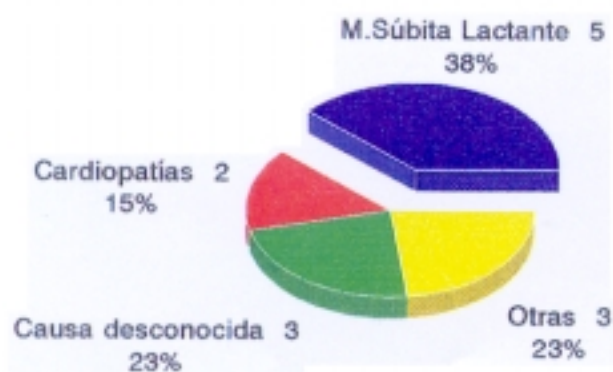


Figura 3.5.- Causas de muerte natural

Para la cuantificación de uno de los parámetros, el Índice de Espesor Medio de las Unidades Estructurales Trabeculares (MWT), se ha seleccionado una submuestra de 32 casos que permitían la medición de este parámetro en, al menos, 20 unidades estructurales (osteonas trabeculares), criterio establecido por la bibliografía consultada:¹⁰⁷

El rango de edad es de 1,5 meses a 20 años, con una media de 8.55 años y desviación típica de 6.8, e incluye 19 varones (59.37%) y 13 hembras (40.62%).

Los datos correspondientes a cada uno de los casos (edad, sexo, raza, data de la muerte y causa de la muerte), se incluyen en forma de apéndice en el capítulo nº 8.

3.2.- Métodos

3.2.1.- Obtención de las muestras

Las muestras se extrajeron de la cresta iliaca derecha mediante aserrado en cuña de una porción que interesa cortical y medular, en un plazo no superior a 24 horas después de la muerte. A partir de esta porción se obtuvo un bloque transiliaco, que se fijó inmediatamente, tras haber sido cortado en piezas de, al menos, seis milímetros de espesor.

3.2.2.- Procesado de las piezas

Fijación e inclusión

Tras fijación en alcohol absoluto, durante al menos dos días, se incluyeron en monómero de metilmetacrilato (Methyl Methacrylate Monomer; POLYSCIENCES.Inc.®) una vez eliminado el inhibidor, con arreglo a la siguiente técnica:

Se efectúa un primer lavado del monómero de metacrilato con una solución de Hidróxido Sódico al 5%, mezclando metacrilato y sosa al 50%, y dejando reposar unos minutos en embudo de decantación. Se elimina la fase decantada y el sobrenadante se somete a tres nuevos lavados con agua destilada (también en una proporción del 50%). Tras

el último lavado, se recoge el sobrenadante haciéndolo pasar por papel de filtro sobre el que se ha depositado una capa de cloruro cálcico anhidro granulado (Calciumchlorid mittelfein gekörut; MERCK®), a un matraz en cuyo fondo se ha depositado otra capa de la misma sustancia, con el fin de absorber el agua sobrante.

Las piezas incluidas en el monómero, una vez eliminado el inhibidor, sufren cinco cambios de, al menos, una hora de duración cada uno, tras el último de los cuales se someten al vacío con el fin de conseguir la mayor penetración del producto, durante 24 horas.

Con posterioridad se introducen en cápsulas de cristal conteniendo metilmetacrilato (Polymethyl Methacrylate; BDH®) parcialmente polimerizado, a temperatura ambiente, hasta su solidificación completa. La preparación del polímero de metilmetacrilato sigue el siguiente proceso:

Se toman, para 300 ml. de Metil metacrilato sin inhibidor, 3gr. de Peróxido de Benzoílo y 120gr. de Polimetil metacrilato. Añadimos el peróxido de benzoílo al monómero de metil metacrilato, agitando hasta su total disolución. A partir de ese momento vamos añadiendo el polimetil metacrilato paulatinamente, en agitador, a temperatura ambiente, hasta su total disolución.

Corte

Se ha empleado un microtomo POLICUT "S" (Reichert-Jung®), con cuchilla de carbono de tungsteno, recogiendo de cada una de las muestras, varios cortes de 3μ de espesor, mojando los cortes y la cuchilla constantemente en alcohol de 70°, dejándolos flotar en alcohol hasta que termina la sesión de corte.

Una vez extendidos los cortes sobre los portaobjetos, se cubren con una película de plástico de polietileno, y se apilan en grupos de varios cristales, que son prensados con una mordaza.

Tinción

Tras retirar la película de polietileno, se desplastifica el tejido con metilacetato (unos 30 minutos), se pasan las muestras por una batería de alcoholes (100°, 96°, 80°, 70°, 50°) hasta agua destilada, realizándose las tinciones de Von Kossa,¹⁸⁸ y Modificación de Goldner de la técnica de Masson,⁷⁹ con arreglo a las técnicas descritas a continuación:

PASO I.- (Von Kossa): Se colocan los portas sobre una batea para tinciones, sobre los que se vierte nitrato de plata al 3% a través de un papel de filtro, dejándolo actuar unos 5 minutos. A continuación se realiza un lavado con agua destilada durante 1 minuto, y un posterior lavado con soda-formol 5 minutos, concluyendo el lavado con agua

durante otros 5 minutos. Se rocían con una solución de sulfato sódico anhidro al 5% durante cinco minutos, pasando a lavar nuevamente con agua, un total de 10 minutos.

PASO I.- (Tricrómico): Se elabora una solución de Hematoxilina Férrica, mezclando 8c.c. de Solución A (1l. de alcohol de 96° + 10gr. de hematoxilina en polvo) + 4c.c. de Solución B (990ml. de agua destilada + 10ml. de ácido clorhídrico + 12gr. de cloruro férrico), rociándose los portas con la mezcla a través de papel de filtro, dejando actuar 10 minutos. Se elimina la hematoxilina posteriormente, mediante lavado con agua durante otros 10 minutos. Se pasan por alcohol ácido (alcohol de 80 con Acido Clorhídrico al 1%).

PASO II.- (Común para ambas técnicas): A través de papel de filtro se cubren los cristales con Ponceau de xilidina (2gr. de ponceau de xilidina + 1gr. de fucsina ácida + 200ml. de agua destilada + 0,4ml. de ácido acético glacial), que se deja actuar entre 45 a 60 minutos. Se pasan los portas (meter y sacar), en un coplin tipo A que contiene agua a la que se ha añadido 1ml. de Acido Acético Glacial, y de aquí se cambian a otro que contiene agua destilada que se va cambiando hasta eliminar el sobrante de tinte. Se colocan de nuevo en batea para tinciones, añadiendo Acido Fosfotungstico Orange G (2gr. de ácido fosfotúngstico + 1gr. de orange G + 200ml. de agua destilada), a través de papel de filtro, durante unos 7 minutos.

PASO III.- (Von Kossa): Se pasan los cristales de nuevo por agua más acético y agua destilada para eliminar el tinte, pasándolos por alcoholes (96°, 96°, 100°, 100°, Xilol, Xilol).

PASO III.- (Tricrómico): Se añade Verde Luz (0,4gr. de verde luz + 200ml. de agua destilada + 0,4ml. de ácido acético glacial), a través de papel de filtro, dejando actuar durante unos 15-30 minutos, terminando de la forma descrita en el PASO III para la técnica de Von Kossa.

3.2.3.- Evaluación Histomorfométrica

La cuantificación de los parámetros se realizó por procedimiento semiautomático, mediante el uso de un analizador de imágenes MOP VIDEOPLAN (Kontron®), acoplado a un fotomicroscopio binocular tipo III de Zeiss para luz transmitida, midiendo la totalidad de los campos en cada preparación, en una anchura de unos 5 mm. y entre ambas corticales, desechando el resto (bordes de la preparación).

Se ha calculado el coeficiente de variabilidad intraobservador, realizando un total de 20 mediciones de cada uno de los parámetros, sobre la misma muestra, en distintas condiciones (al principio, durante o al final de la tarea de medición), en diferentes jornadas de trabajo. Una vez obtenidos los valores correspondientes a cada una de las muestras se calculó la media de las diferencias globales, obteniendo un resultado de 4,36%.

Se evaluaron en cada preparación los siguientes parámetros:

Contajes y mediciones

Contajes

Número de osteoclastos. (Tricrómico). Sólo aquéllos que están en contacto directo con la trabécula (se descartan todos los demás).

Mediciones

Anchura

- Anchura media de los ribetes de osteoide.

Longitud

- Longitud total de osteoide: Longitud de trabécula mineralizada recubierta por osteoide.
- Longitud osteoblástica: Longitud osteoide trabecular en contacto directo con osteoblastos cúbicos.
- Longitud de reabsorción: Longitud total de lagunas de Howship con y sin osteoclastos.
- Longitud de reabsorción activa: Longitud total de lagunas de Howship con osteoclastos.

Perímetro

- Perímetro trabecular: Perímetro total de las trabéculas.

Area

- Area medular. (Von Kossa). Incluye trabéculas, tejido hematopoyético, ...
- Area trabecular. (Von Kossa). Suma de tejido óseo, calcificado o no, osteoide incluido (área y perímetro).

- Area osteoide. (Von Kossa). Sólo las zonas más espesas que el grosor del cursor.

Parametros primarios estaticos^{96,162}

Volumen Trabecular (V)

Relación entre el volumen trabecular total (matriz mineralizada más osteoide) y el volumen ocupado por las trabéculas más la médula ósea (volumen total de la biopsia una vez eliminado el hueso cortical).

$$V = \frac{\text{Area trabecular total}}{\text{Area trabecular total} + \text{Area medular}} = \text{mm}^3/\text{mm}^3$$

Volumen de Osteoide (Vos)

Es la relación entre el volumen ocupado por el osteoide trabecular y el volumen ocupado por las trabéculas más la médula ósea (volumen total de biopsia una vez eliminado el hueso cortical).

$$Vos = \frac{\text{Area total osteoide trabecular}}{\text{Area trabecular total} + \text{Area medular}} = \text{mm}^3/\text{mm}^3$$

Volumen de Osteoide (Vosf)

Es la relación entre el volumen ocupado por el osteoide trabecular y el volumen trabecular total (matriz mineralizada más osteoide). Se obtiene dividiendo el área de todos los ribetes de osteoide trabecular y el área trabecular total.

$$Vosf = \frac{\text{Area osteoide trabecular total}}{\text{Area trabecular total}} = \text{mm}^3/\text{mm}^3$$

Superficie Relativa de Formacion (Sf)

Es la relación entre la superficie trabecular recubierta por osteoide y la superficie trabecular total.

$$Sf = \frac{\text{Longitud total de osteoide}}{\text{Perímetro trabecular total}} = \text{mm}^2/\text{mm}^2$$

Superficie Osteoblastica Activa (Sfa)

Es la relación entre la superficie trabecular con osteoide recubierto por osteoblastos cúbicos y la superficie trabecular total.

$$Sfa = \frac{\text{Longitud de osteoide con osteoblastos cúbicos}}{\text{Perímetro trabecular total}} = \text{mm}^2/\text{mm}^2$$

Superficie Relativa de Osteoide con Osteoblastos Cubicos (OBOID)

Es la relación entre la superficie trabecular recubierta por osteoide con osteoblastos cúbicos y la superficie trabecular recubierta por osteoide con y sin osteoblastos cúbicos.

$$OBOID = \frac{\text{Longitud de osteoide con osteoblastos cúbicos}}{\text{Longitud total de osteoide}} = \text{mm}^2/\text{mm}^2$$

Superficie Relativa de Reabsorcion (Sr)

Es la relación entre la superficie de las lagunas de Howship trabeculares (con o sin osteoclastos) y la superficie trabecular total.

$$Sr = \frac{\text{Longitud total de lagunas de Howship}}{\text{Perímetro trabecular total}} = \text{mm}^2/\text{mm}^2$$

Superficie Relativa de Reabsorcion Activa (Sra)

Es la relación entre la superficie de las lagunas de Howship trabeculares que presentan osteoclastos y la superficie trabecular total.

$$Sra = \frac{\text{Longitud de lagunas de Howship con osteoclastos}}{\text{Longitud trabecular}} = \text{mm}^2/\text{mm}^2$$

Superficie Específica de Hueso Trabecular (Sv)

Es la relación entre la superficie trabecular total y el volumen de la biopsia una vez suprimido el hueso cortical.

$$Sv = \frac{\text{Perímetro trabecular total}}{\text{Area trabecular total} + \text{Area medular}} \times 4/\pi = \text{mm}^2/\text{mm}^3$$

Para calcular la superficie de una estructura tridimensional a partir del perímetro de su sección, es necesario multiplicar este perímetro por una constante. Esta constante (cuyo valor se ha calculado empíricamente⁶²), es igual a $4/\pi$, y permite corregir los errores que resultarían de la variable orientación espacial de las estructuras.

Indice Osteoclastico (OI)

Es la relación entre el número de osteoclastos y la fracción de perímetro trabecular con reabsorción activa. Esta relación se designa con las siglas Cra.

$$OI = \frac{\text{Número de osteoclastos}}{\text{Longitud de lagunas de Howship con osteoclastos}} = \text{n}^\circ/\text{mm}.$$

Parametros Secundarios Estaticos

Anchura Media de los Ribetes Trabeculares de Osteoide (WOS)

Es un parámetro que se define en el espacio bidimensional.

$$WOS = \frac{Vos}{Sf \times Sv} = micras(\mu)$$

Espesor Medio de los Ribetes de Osteoide (MOST)

Equivale al parámetro anterior pero expresado en el espacio tridimensional.

$$MOST = \frac{Vos}{Sf \times Sv} \times \pi/4 = \mu.$$

Indice de Espesor Trabecular (TTI)

Este parámetro nos indica el espesor medio de las trabéculas.

$$TTI = \frac{V}{\frac{1}{2} \times Sv} = \mu.$$

Índice de Espesor Medio de la Unidades Estructurales Trabeculares (MWT)

Es el espesor medio de las unidades estructurales trabeculares que han terminado su período de formación.

Para su cuantificación se han utilizado preparaciones sin teñir, midiendo la anchura de, al menos 20 osteonas trabeculares que han completado su proceso de remodelación en cuatro puntos equidistantes, empleando luz polarizada para determinar el hueso laminar y las líneas de cemento.¹⁰⁷

$$MWT = \frac{\text{Distancias superficie cemento - superficie trabecular}}{\text{Número de mediciones}} = \mu$$

3.2.4.- Método Estadístico

Se ha realizado un estudio estadístico básico de las variables medidas en cada muestra, valorando los siguientes parámetros:

Media.- Constituye una medida de "centralización", indicándonos en torno a qué valor se agrupan los datos. Se calcula como la suma de todos los valores, divididos entre el tamaño de la muestra.

Desviación típica.- Mide las fluctuaciones en las observaciones en torno al valor medio, es decir, la variabilidad inherente a un conjunto de datos experimentales. Se obtiene mediante la raíz cuadrada de la suma de las diferencias entre cada dato y la media elevadas al cuadrado dividido

por el tamaño de la muestra.

Tamaño de la muestra.- Es el número de casos sobre el que se han realizado los cálculos.

Error estándar de la media.- Permite calcular un intervalo de confianza de ésta, para un determinado nivel de probabilidad. Es decir, mide la variabilidad que cabe esperar del valor medio si se repitiese muchas veces el experimento.

Valor máximo y mínimo encontrados.

Así mismo, se han comprobado las diferencias existentes entre grupos de edad mediante contraste con la **t de Student**. El resultado se obtiene calculando la media en cada grupo y hallando su diferencia, comprobándose si ésta es estadísticamente significativa frente a los límites máximos que era presumible encontrar por puro azar. Estos límites se pueden calcular, en el caso de variables homogéneas, con la ayuda del error estándar de la diferencia de medias, cuyo valor se calcula utilizando una desviación típica media ponderada de la de las dos muestras.

Con el fin de obtener una ecuación lineal, que a partir de las variables independientes, nos permita estimar la variable dependiente "EDAD", se ha realizado una **regresión lineal múltiple**. Para establecer las variables con mayor valor de estimación se ha utilizado el método STEPWISE, determinando las que tienen peso para inferir

la edad, y sus coeficientes.

4 - RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados de los parámetros micromorfométricos de la estructura, formación y reabsorción ósea, obtenidos de los sujetos normales estudiados se muestran en la tablas 4.1 a 4.39, distribuídos por grupos de edad y sexo.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.16609	0.050146	15	0.012948	0.080995	0.2466
Vos	0.0041228	0.0027798	15	0.00071775	0.00024229	0.0094556
Vosf	0.025867	0.018387	15	0.0047476	0.0011565	0.058541
Sf	0.094316	0.055228	15	0.01426	0.0067845	0.16711
Sfa	0.024634	0.021862	15	0.0056448	0	0.06522
OBOID	0.23524	0.16633	15	0.042946	0	0.47475
Sr	0.21249	0.13714	15	0.035409	0.031948	0.5563
Sra	0.0071846	0.0063933	15	0.0016508	0.00060008	0.025151
Sv	4.5027	1.6783	15	0.43334	2.1362	7.3766
OI	28.8036	17.1188	15	4.4201	6.9633	74.8279
WOS	9.9718	3.3357	15	0.86126	5.9366	16.6451
MOST	7.8319	2.6198	15	0.67644	4.6626	13.0731
MWT	39.6467	14.8709	3	8.5857	23.94	53.51
TTI	80.4816	34.7584	15	8.9746	53.9433	186.2837

Tabla 4.1.- Parámetros morfométricos. Niños menores de 1 año.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.20543	0.064759	7	0.024476	0.10939	0.30422
Vos	0.0046616	0.0054584	7	0.0020631	0.00034465	0.016171
Vosf	0.021316	0.023388	7	0.0088398	0.0022911	0.070938
Sf	0.083457	0.075382	7	0.028492	0.015073	0.23709
Sfa	0.021924	0.013447	7	0.0050825	0.0073986	0.045245
OBOID	0.39235	0.25729	7	0.097246	0.065584	0.73948
Sr	0.16892	0.083617	7	0.031604	0.059547	0.30596
Sra	0.005885	0.0040868	7	0.0015447	0.002751	0.013763
Sv	4.5133	1.2508	7	0.47276	2.2551	5.8583
OI	29.2174	6.4897	7	2.4529	15.3604	34.9732
WOS	10.6602	4.0161	7	1.518	6.4456	16.815
MOST	8.3725	3.1543	7	1.1922	5.0623	13.2065
MWT	33.36	3.4921	3	2.0162	30.86	37.35
TTI	92.6559	22.3204	7	8.4363	64.0192	36.8418

Tabla 4.2.- Parámetros morfométricos. Edad = 1 año.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.15497	0.038523	2	0.02724	0.12773	0.18221
Vos	0.001394	0.00065695	2	0.00046453	0.00092949	0.0018586
Vosf	0.0087386	0.002067	2	0.0014616	0.0072771	0.0102
Sf	0.037691	0.0010114	2	0.00071515	0.036976	0.038406
Sfa	0.0067429	0.00080142	2	0.00056669	0.0061762	0.0073096
OBOID	0.17925	0.026073	2	0.018436	0.16081	0.19768
Sr	0.2123	0.076018	2	0.053753	0.15854	0.26605
Sra	0.0042552	0.0043885	2	0.0031031	0.0011521	0.0073583
Sv	3.8995	0.47827	2	0.33819	3.5613	4.2377
OI	27.6801	7.7915	2	5.5094	22.1706	33.1895
WOS	9.2387	3.0835	2	2.1804	7.0583	11.419
MOST	7.2561	2.4218	2	1.7125	5.5436	8.9685
MWT	39.785	10.5854	2	7.485	32.3	47.27
TTI	78.8602	10.085	2	7.1311	71.729	85.9913

Tabla 4.3.- Parámetros morfométricos. Edad = 2 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.2015	0.01336	4	0.0066799	0.18275	0.21348
Vos	0.003242	0.0022874	4	0.0011437	0.00055032	0.0061326
Vosf	0.015812	0.011253	4	0.0056264	0.0030113	0.03037
Sf	0.059624	0.033626	4	0.016813	0.023337	0.10398
Sfa	0.0062133	0.0061	4	0.00305	0.00070028	0.012217
OBOID	0.15317	0.20939	4	0.1047	0.011348	0.45917
Sr	0.11168	0.046375	4	0.023188	0.061727	0.1734
Sra	0.0022884	0.0015843	4	0.00079214	0.00026884	0.0041346
Sv	4.2399	0.80873	4	0.40437	3.4042	5.3461
OI	27.7535	5.2653	4	2.6326	24.1682	35.4736
WOS	11.4078	3.2901	4	1.6451	6.927	14.5148
MOST	8.9597	2.5841	4	1.292	5.4405	11.3999
MWT	41.0733	4.266	3	2.463	36.18	44.01
TTI	96.7182	11.7907	4	5.8954	79.8635	107.3645

Tabla 4.4.- Parámetros morfométricos. Edad = 3 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.14475	0.028932	2	0.020458	0.12429	0.16521
Vos	0.0023355	0.0022272	2	0.0015749	0.00076062	0.0039104
Vosf	0.014894	0.01241	2	0.0087749	0.0061195	0.023669
Sf	0.057616	0.039664	2	0.028047	0.029569	0.085662
Sfa	0.0071253	0.010077	2	0.0071253	0	0.014251
OBOID	0.083179	0.11763	2	0.083179	0	0.16636
Sr	0.063527	0.043294	2	0.030613	0.032913	0.09414
Sra	0.0021409	0.0030277	2	0.0021409	0	0.0042818
Sv	2.7155	1.1439	2	0.80886	1.9067	3.5244
OI	21.7448	0	1	0	21.7448	21.7448
WOS	13.2214	0.3811	2	0.26948	12.9519	13.4908
MOST	10.3841	0.29931	2	0.21165	10.1724	10.5957
MWT	51.26	7.8347	2	5.54	45.72	56.8
TTI	112.062	25.8974	2	18.3122	93.7498	130.3743

Tabla 4.5.- Parámetros morfométricos. Edad = 4 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.19357	0.065874	3	0.038032	0.12172	0.25112
Vos	0.0024638	0.00055633	3	0.0003212	0.0019761	0.0030697
Vosf	0.013667	0.0050397	3	0.0029097	0.0095065	0.019271
Sf	0.0529	0.012745	3	0.0073586	0.040123	0.065613
Sfa	0.012424	0.0078739	3	0.004546	0.0062433	0.021289
OBOID	0.22837	0.10404	3	0.06007	0.11788	0.32447
Sr	0.15715	0.087665	3	0.050613	0.06801	0.24326
Sra	0.003262	0.0049678	3	0.0028681	0	0.0089793
Sv	3.7554	0.3789	3	0.21876	3.3593	4.1144
OI	20.1991	6.7806	2	4.7946	15.4045	24.9938
WOS	12.8219	3.4057	3	1.9663	8.9648	15.4144
MOST	10.0703	2.6748	3	1.5443	7.041	12.1065
MWT	37.915	0.71418	2	0.505	37.41	38.42
TTI	103.3331	33.9129	3	19.5796	64.1859	123.7497

Tabla 4.6.- Parámetros morfométricos. Edad = 5 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.19489	0	1	0	0.19489	0.19489
Vos	0.002617	0	1	0	0.002617	0.002617
Vosf	0.013428	0	1	0	0.013428	0.013428
Sf	0.062014	0	1	0	0.062014	0.062014
Sfa	0.0064751	0	1	0	0.0064751	0.0064751
OBOID	0.10441	0	1	0	0.10441	0.10441
Sr	0.24138	0	1	0	0.24138	0.24138
Sra	0.0024854	0	1	0	0.0024854	0.0024854
Sv	4.9641	0	1	0	4.9641	4.9641
OI	27.8901	0	1	0	27.8901	27.8901
WOS	8.5009	0	1	0	8.5009	8.5009
MOST	6.6766	0	1	0	6.6766	6.6766
MWT	0	0	0	0	0	0
TTI	78.5172	0	1	0	78.5172	78.5172

Tabla 4.7.- Parámetros morfométricos. Edad = 6 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.19606	0.00479	3	0.0027655	0.1914	0.20097
Vos	0.0030312	0.0018233	3	0.0010527	0.0016931	0.0051079
Vosf	0.015347	0.0088777	3	0.0051255	0.0086468	0.025416
Sf	0.061745	0.024848	3	0.014346	0.046658	0.090424
Sfa	0.0083501	0.0063597	3	0.0036718	0.0032931	0.01549
OBOID	0.16619	0.15104	3	0.087206	0.036418	0.33199
Sr	0.21668	0.13395	3	0.077337	0.064937	0.3185
Sra	0.0024111	0.001078	3	0.0006224	0.0011922	0.003239
Sv	3.8647	0.41301	3	0.23845	3.5449	4.331
OI	21.7294	0.57202	3	0.33025	21.2359	22.3564
WOS	12.0276	1.556	3	0.89834	10.2362	13.0425
MOST	9.4465	1.2221	3	0.70556	8.0395	10.2436
MWT	53.095	9.4682	2	6.695	46.4	59.79
TTI	102.0751	8.8647	3	5.118	92.805	110.4694

Tabla 4.8.- Parámetros morfométricos. Edad = 7 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.2389	0	1	0	0.2389	0.2389
Vos	0.010025	0	1	0	0.010025	0.010025
Vosf	0.041962	0	1	0	0.041962	0.041962
Sf	0.18886	0	1	0	0.18886	0.18886
Sfa	0.012338	0	1	0	0.012338	0.012338
OBOID	0.065325	0	1	0	0.065325	0.065325
Sr	0.08142	0	1	0	0.08142	0.08142
Sra	0.0024838	0	1	0	0.0024838	0.0024838
Sv	3.544	0	1	0	3.544	3.544
OI	44.0975	0	1	0	44.0975	44.0975
WOS	14.9771	0	1	0	14.9771	14.9771
MOST	11.763	0	1	0	11.763	11.763
MWT	59.25	0	1	0	59.25	59.25
TTI	134.8183	0	1	0	134.8183	134.8183

Tabla 4.9.- Parámetros morfométricos. Edad = 8 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.19334	0	1	0	0.19334	0.19334
Vos	0.00014995	0	1	0	0.00014995	0.00014995
Vosf	0.00077557	0	1	0	0.00077557	0.00077557
Sf	0.00797	0	1	0	0.00797	0.00797
Sfa	0.0025135	0	1	0	0.0025135	0.0025135
OBOID	0.31537	0	1	0	0.31537	0.31537
Sr	0.37919	0	1	0	0.37919	0.37919
Sra	0.0017389	0	1	0	0.0017389	0.0017389
Sv	2.9624	0	1	0	2.9624	2.9624
OI	22.5708	0	1	0	22.5708	22.5708
WOS	6.3508	0	1	0	6.3508	6.3508
MOST	4.9879	0	1	0	4.9879	4.9879
MWT	0	0	0	0	0	0
TTI	130.5254	0	1	0	130.5254	130.5254

Tabla 4.10.- Parámetros morfométricos. Edad = 9 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.30788	0	1	0	0.30788	0.30788
Vos	0.025033	0	1	0	0.025033	0.025033
Vosf	0.081309	0	1	0	0.081309	0.081309
Sf	0.27805	0	1	0	0.27805	0.27805
Sfa	0.045432	0	1	0	0.045432	0.045432
OBOID	0.16339	0	1	0	0.16339	0.16339
Sr	0.11223	0	1	0	0.11223	0.11223
Sra	0.0088433	0	1	0	0.0088433	0.0088433
Sv	4.0375	0	1	0	4.0375	4.0375
OI	14.053	0	1	0	14.053	14.053
WOS	22.2983	0	1	0	22.2983	22.2983
MOST	17.5131	0	1	0	17.5131	17.5131
MWT	56.48	0	1	0	56.48	56.48
TTI	152.5079	0	1	0	152.5079	152.5079

Tabla 4.11.- Parámetros morfométricos. Edad = 10 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.17437	0	1	0	0.17437	0.17437
Vos	0.0029905	0	1	0	0.0029905	0.0029905
Vosf	0.01715	0	1	0	0.01715	0.01715
Sf	0.064674	0	1	0	0.064674	0.064674
Sfa	0.0045984	0	1	0	0.0045984	0.0045984
OBOID	0.071102	0	1	0	0.071102	0.071102
Sr	0.1105	0	1	0	0.1105	0.1105
Sra	0.0007872	0	1	0	0.0007872	0.0007872
Sv	3.6072	0	1	0	3.6072	3.6072
OI	15.0966	0	1	0	15.0966	15.0966
WOS	12.8181	0	1	0	12.8181	12.8181
MOST	10.0673	0	1	0	10.0673	10.0673
MWT	71.6	0	1	0	71.6	71.6
TTI	96.6761	0	1	0	96.6761	96.6761

Tabla 4.12.- Parámetros morfométricos. Edad = 11 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.20551	0.050185	3	0.028974	0.1748	0.26343
Vos	0.0074045	0.003696	3	0.0021339	0.0040218	0.011349
Vosf	0.037544	0.022657	3	0.013081	0.023008	0.063649
Sf	0.11815	0.057428	3	0.033156	0.079016	0.18408
Sfa	0.010067	0.0099928	3	0.0057693	0.0035449	0.021571
OBOID	0.10287	0.11573	3	0.066817	0.02762	0.23613
Sr	0.08006	0.018024	3	0.010406	0.059788	0.094276
Sra	0.0034934	0.002694	3	0.0015554	0.0003929	0.0052631
Sv	3.5318	0.88494	3	0.51092	2.8365	4.5279
OI	23.0207	5.5172	3	3.1854	19.3796	29.3686
WOS	17.8557	1.2726	3	0.73474	16.5413	19.0819
MOST	14.0239	0.9995	3	0.57706	12.9915	14.9869
MWT	59.59	10.0833	2	7.13	52.46	66.72
TTI	116.658	6.4445	3	3.7207	110.3715	123.2496

Tabla 4.13.- Parámetros morfométricos. Edad = 12 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.31491	0	1	0	0.31491	0.31491
Vos	0.0092802	0	1	0	0.0092802	0.0092802
Vosf	0.029469	0	1	0	0.029469	0.029469
Sf	0.14592	0	1	0	0.14592	0.14592
Sfa	0.025688	0	1	0	0.025688	0.025688
OBOID	0.17604	0	1	0	0.17604	0.17604
Sr	0.12175	0	1	0	0.12175	0.12175
Sra	0.0028608	0	1	0	0.0028608	0.0028608
Sv	3.5	0	1	0	3.5	3.5
OI	26.5189	0	1	0	26.5189	26.5189
WOS	18.1705	0	1	0	18.1705	18.1705
MOST	14.2711	0	1	0	14.2711	14.2711
MWT	70.39	0	1	0	70.39	70.39
TTI	179.9434	0	1	0	179.9434	179.9434

Tabla 4.14.- Parámetros morfométricos. Edad = 13 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.30543	0.016816	2	0.01189	0.29354	0.31732
Vos	0.010251	0.0022254	2	0.0015736	0.0086773	0.011824
Vosf	0.033412	0.0054465	2	0.0038512	0.029561	0.037263
Sf	0.1915	0.0044789	2	0.0031671	0.18834	0.19467
Sfa	0.034982	0.0019763	2	0.0013975	0.033584	0.036379
OBOID	0.1826	0.0060494	2	0.0042776	0.17832	0.18688
Sr	0.16557	0.095738	2	0.067697	0.097873	0.23327
Sra	0.0026331	0.0010766	2	0.0007613	0.0018718	0.0033944
Sv	4.0275	0.61256	2	0.43315	3.5943	4.4606
OI	31.3949	2.1441	2	1.5161	29.8788	32.911
WOS	13.7295	5.2851	2	3.7371	9.9924	17.4666
MOST	10.7832	4.1509	2	2.9351	7.848	13.7183
MWT	70.12	0	1	0	70.12	70.12
TTI	154.0852	31.7857	2	22.4759	131.6093	176.5611

Tabla 4.15.- Parámetros morfométricos. Edad = 14 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.19774	0	1	0	0.19774	0.19774
Vos	0.0023173	0	1	0	0.0023173	0.0023173
Vosf	0.011719	0	1	0	0.011719	0.011719
Sf	0.043184	0	1	0	0.043184	0.043184
Sfa	0.0089653	0	1	0	0.0089653	0.0089653
OBOID	0.20761	0	1	0	0.20761	0.20761
Sr	0.072222	0	1	0	0.072222	0.072222
Sra	0.00025301	0	1	0	0.00025301	0.00025301
Sv	3.2518	0	1	0	3.2518	3.2518
OI	17.4856	0	1	0	17.4856	17.4856
WOS	16.501	0	1	0	16.501	16.501
MOST	12.9599	0	1	0	12.9599	12.9599
MWT	66.31	0	1	0	66.31	66.31
TTI	121.6136	0	1	0	121.6136	121.6136

Tabla 4.16.- Parámetros morfométricos. Edad = 15 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.29626	0.083778	2	0.05924	0.23702	0.3555
Vos	0.0080779	0.0034034	2	0.0024065	0.0056714	0.010484
Vosf	0.030094	0.019998	2	0.014141	0.015953	0.044235
Sf	0.1121	0.036418	2	0.025752	0.086346	0.13785
Sfa	0.046272	0.032918	2	0.023277	0.022996	0.069549
OBOID	0.38542	0.16844	2	0.1191	0.26632	0.50453
Sr	0.16507	0.05265	2	0.037229	0.12784	0.2023
Sra	0.0073694	0.0027805	2	0.0019661	0.0054033	0.0093355
Sv	3.5235	0.69222	2	0.48947	3.034	4.013
OI	11.8027	2.3253	2	1.6442	10.1585	13.4469
WOS	20.7172	6.1522	2	4.3502	16.3669	25.0674
MOST	16.2713	4.8319	2	3.4167	12.8546	19.6879
MWT	85.35	0	1	0	85.35	85.35
TTI	166.7018	14.8026	2	10.467	156.2348	177.1688

Tabla 4.17.- Parámetros morfométricos. Edad = 16 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.30166	0.050423	2	0.035655	0.26601	0.33732
Vos	0.0061591	0.0062448	2	0.0044158	0.0017433	0.010575
Vosf	0.022461	0.024456	2	0.017293	0.0051682	0.039754
Sf	0.091651	0.072522	2	0.051281	0.04037	0.14293
Sfa	0.0094534	0.013369	2	0.0094534	0	0.018907
OBOID	0.066139	0.093535	2	0.066139	0	0.13228
Sr	0.11718	0.0096855	2	0.0068487	0.11033	0.12403
Sra	0.0018233	0.0025785	2	0.0018233	0	0.0036465
Sv	3.697	0.50562	2	0.35753	3.3395	4.0546
OI	16.9682	0	1	0	16.9682	16.9682
WOS	15.5888	3.7591	2	2.6581	12.9307	18.2469
MOST	12.2435	2.9524	2	2.0877	10.1558	14.3311
MWT	82.87	6.562	2	4.64	78.23	87.51
TTI	166.6111	50.0631	2	35.3999	131.2111	202.011

Tabla 4.18.- Parámetros morfométricos. Edad = 17 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.29015	0	1	0	0.29015	0.29015
Vos	0.0013945	0	1	0	0.0013945	0.0013945
Vosf	0.0048062	0	1	0	0.0048062	0.0048062
Sf	0.022987	0	1	0	0.022987	0.022987
Sfa	0.0020343	0	1	0	0.0020343	0.0020343
OBOID	0.088498	0	1	0	0.088498	0.088498
Sr	0.1015	0	1	0	0.1015	0.1015
Sra	0.0022677	0	1	0	0.0022677	0.0022677
Sv	4.5808	0	1	0	4.5808	4.5808
OI	20.6569	0	1	0	20.6569	20.6569
WOS	13.2431	0	1	0	13.2431	13.2431
MOST	10.4011	0	1	0	10.4011	10.4011
MWT	0	0	0	0	0	0
TTI	126.6779	0	1	0	126.6779	126.6779

Tabla 4.19.- Parámetros morfométricos. Edad = 18 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.3328	0.086066	3	0.04969	0.27037	0.43098
Vos	0.00033804	0.00037935	3	0.00021902	0.00009421	0.0007751
Vosf	0.0011733	0.0014666	3	0.00084676	0.00031718	0.0028668
Sf	0.0098267	0.01005	3	0.0058024	0.002909	0.021355
Sfa	0.00087769	0.0015202	3	0.00087769	0	0.0026331
OBOID	0.0411	0.071188	3	0.0411	0	0.1233
Sr	0.16076	0.11538	3	0.066616	0.035721	0.26312
Sra	0.0011431	0.0015131	3	0.00087359	0	0.002859
Sv	3.7472	0.9051	3	0.52256	3.1997	4.7919
OI	26.8825	9.7276	2	6.8785	20.004	33.761
WOS	9.0274	2.8499	3	1.6454	5.7925	11.1678
MOST	7.0901	2.2383	3	1.2923	4.5494	8.7712
MWT	89.71	0	1	0	89.71	89.71
TTI	177.305	9.8966	3	5.7138	166.378	185.6655

Tabla 4.20.- Parámetros morfométricos. Edad = 19 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.23293	0.081827	4	0.040914	0.12832	0.322
Vos	0.0014414	0.00068636	4	0.00034318	0.00081388	0.002067
Vosf	0.0061012	0.0014761	4	0.00073805	0.0040579	0.0075852
Sf	0.037323	0.010723	4	0.0053615	0.027626	0.050174
Sfa	0.0039641	0.0038265	4	0.0019133	0.00073808	0.0087862
OBOID	0.11834	0.13843	4	0.069213	0.024832	0.31805
Sr	0.11439	0.051114	4	0.025557	0.059047	0.18073
Sra	0.0017045	0.0013624	4	0.0006812	0.00050551	0.0032992
Sv	2.9982	0.90069	4	0.45035	2.3268	4.2767
OI	16.6509	5.5975	4	2.7988	9.3127	22.6219
WOS	12.8954	3.5221	4	1.7611	8.0272	16.4438
MOST	10.128	2.7663	4	1.3831	6.3045	12.915
MWT	91.7533	4.4523	3	2.5705	87.58	96.44
TTI	155.277	35.9032	4	17.9516	106.5705	186.8147

Tabla 4.21.- Parámetros morfométricos. Edad = 20 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.18597	0.051909	40	0.0082075	0.080995	0.30788
Vos	0.0042303	0.0046499	40	0.00073521	0.00014995	0.025033
Vosf	0.021806	0.019199	40	0.0030356	0.00077557	0.081309
Sf	0.082722	0.062474	40	0.009878	0.0067845	0.27805
Sfa	0.017616	0.017196	40	0.0027189	0	0.06522
OBOID	0.23112	0.18407	40	0.029104	0	0.73948
Sr	0.1826	0.11303	40	0.017872	0.031948	0.5563
Sra	0.005087	0.004938	40	0.00078076	0	0.025151
Sv	4.1923	1.272	40	0.20113	1.9067	7.3766
OI	27.3393	11.9818	38	1.9437	6.9633	74.8279
WOS	11.0356	3.7228	40	0.58863	5.9366	22.2983
MOST	8.6674	2.9239	40	0.46231	4.6626	17.5131
TTI	93.4282	29.7646	40	4.7062	53.9433	186.2837

Tabla 4.22.- Parámetros morfométricos. Edad > 0 y ≤ 10 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.26653	0.07328	20	0.016386	0.12832	0.43098
Vos	0.0046976	0.0042006	20	0.00093929	0.00009421	0.011824
Vosf	0.018782	0.017423	20	0.0038959	0.00031718	0.063649
Sf	0.080024	0.063477	20	0.014194	0.002909	0.19467
Sfa	0.01357	0.017584	20	0.003932	0	0.069549
OBOID	0.13584	0.12873	20	0.028785	0	0.50453
Sr	0.12408	0.059674	20	0.013343	0.035721	0.26312
Sra	0.0025274	0.0023813	20	0.00053248	0	0.0093355
Sv	3.5633	0.71593	20	0.16009	2.3268	4.7919
OI	20.6973	7.253	18	1.7095	9.3127	33.761
WOS	14.6517	4.4298	20	0.99052	5.7925	25.0674
MOST	11.5075	3.4791	20	0.77796	4.5494	19.6879
TTI	150.1352	32.2796	20	7.2179	96.6761	202.011

Tabla 4.23.- Parámetros morfométricos. Edad > 10 y ≤ 20 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.1768	0.048262	23	0.010063	0.096768	0.30422
Vos	0.003243	0.0036534	23	0.00076178	0.00014995	0.016171
Vosf	0.01737	0.017521	23	0.0036533	0.00077557	0.070938
Sf	0.063057	0.054031	23	0.011266	0.0067845	0.23709
Sfa	0.011499	0.012121	23	0.0025274	0	0.045245
OBOID	0.2095	0.20811	23	0.043394	0	0.73948
Sr	0.19103	0.11875	23	0.024761	0.032913	0.5563
Sra	0.0040247	0.0038026	23	0.00079291	0	0.013763
Sv	4.0647	1.0424	23	0.21736	1.9067	5.9883
OI	26.9846	9.0886	21	1.9833	13.7005	43.554
WOS	10.7217	3.1751	23	0.66205	6.2201	16.815
MOST	8.4208	2.4937	23	0.51998	4.8853	13.2065
TTI	90.0109	24.3977	23	5.0873	53.9433	136.8418

Tabla 4.24.- Parámetros morfométricos. Edad > 0 y ≤ 10 años. Sexo masculino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.19837	0.055509	17	0.013463	0.080995	0.30788
Vos	0.005566	0.0055725	17	0.0013515	0.00077364	0.025033
Vosf	0.027809	0.020243	17	0.0049096	0.0049939	0.081309
Sf	0.10933	0.064741	17	0.015702	0.025339	0.27805
Sfa	0.025892	0.019804	17	0.0048031	0.0032931	0.06522
OBOID	0.26037	0.14648	17	0.035526	0.026256	0.47475
Sr	0.17118	0.1073	17	0.026024	0.031948	0.38862
Sra	0.0065243	0.0059779	17	0.0014499	0.00080658	0.025151
Sv	4.3649	1.5475	17	0.37533	2.1362	7.3766
OI	27.7775	15.1118	17	3.6651	6.9633	74.8279
WOS	11.4604	4.4258	17	1.0734	5.9366	22.2983
MOST	9.001	3.476	17	0.84306	4.6626	17.5131
TTI	98.0515	36.0763	17	8.7498	59.9488	186.2837

Tabla 4.25.- Parámetros morfométricos. Edad > 0 y ≤ 10 años. Sexo femenino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.29298	0.06259	14	0.016728	0.17831	0.43098
Vos	0.0053979	0.004713	14	0.0012596	0.00009421	0.011824
Vosf	0.020474	0.020106	14	0.0053737	0.00031718	0.063649
Sf	0.089798	0.072752	14	0.019444	0.002909	0.19467
Sfa	0.016402	0.020013	14	0.0053486	0	0.069549
OBOID	0.14599	0.14443	14	0.0386	0	0.50453
Sr	0.13363	0.064579	14	0.017259	0.035721	0.26312
Sra	0.0028319	0.0026065	14	0.00069662	0	0.0093355
Sv	3.5752	0.66847	14	0.17866	2.3268	4.7919
OI	21.771	7.5813	12	2.1885	10.1585	33.761
WOS	14.8543	4.8453	14	1.295	5.7925	25.0674
MOST	11.6665	3.8055	14	1.0171	4.5494	19.6879
TTI	165.1117	25.8305	14	6.9035	110.3715	202.011

Tabla 4.26.- Parámetros morfométricos. Edad > 10 y ≤ 20 años. Sexo masculino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.2048	0.06074	6	0.024797	0.12832	0.29015
Vos	0.0030634	0.0021728	6	0.00088704	0.00081388	0.0068422
Vosf	0.014833	0.0087022	6	0.0035526	0.0048062	0.025974
Sf	0.057219	0.025663	6	0.010477	0.022987	0.091351
Sfa	0.0069599	0.007668	6	0.0031304	0.0010455	0.021571
OBOID	0.11217	0.088182	6	0.036	0.024832	0.23613
Sr	0.10181	0.042875	6	0.017504	0.059788	0.18073
Sra	0.0018167	0.0017374	6	0.00070928	0.00025301	0.0048241
Sv	3.5354	0.88576	6	0.36161	2.4081	4.5808
OI	18.55	6.6416	6	2.7114	9.3127	29.3686
WOS	14.1791	3.6255	6	1.4801	8.0272	17.944
MOST	11.1363	2.8474	6	1.1625	6.3045	14.0932
TTI	115.1901	11.4595	6	4.6783	96.6761	126.6779

Tabla 4.27.- Parámetros morfométricos. Edad > 10 y ≤ 20 años. Sexo femenino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.17926	0.051675	33	0.0089955	0.080995	0.30422
Vos	0.0037058	0.003248	33	0.00056541	0.00024229	0.016171
Vosf	0.020871	0.017324	33	0.0030157	0.0011565	0.070938
Sf	0.078387	0.054085	33	0.0094149	0.0067845	0.23709
Sfa	0.018571	0.017687	33	0.0030788	0	0.06522
OBOID	0.24538	0.19375	33	0.033727	0	0.73948
Sr	0.17696	0.11188	33	0.019476	0.031948	0.5563
Sra	0.0054756	0.0052539	33	0.00091459	0	0.025151
Sv	4.2603	1.3663	33	0.23784	1.9067	7.3766
OI	27.9063	12.5517	31	2.2544	6.9633	74.8279
WOS	10.7035	3.3463	33	0.58252	5.9366	16.815
MOST	8.4065	2.6282	33	0.45751	4.6626	13.2065
MWT	40.0107	8.7647	15	2.263	23.94	56.8
TTI	88.9252	28.8848	33	5.0282	53.9433	186.2837

Tabla 4.28.- Parámetros morfométricos. Edad > 0 y ≤ 5 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.2176	0.043101	7	0.016291	0.1914	0.30788
Vos	0.0067027	0.0086965	7	0.003287	0.00014995	0.025033
Vosf	0.026216	0.027707	7	0.010472	0.00077557	0.081309
Sf	0.10316	0.095801	7	0.036209	0.00797	0.27805
Sfa	0.013115	0.015003	7	0.0056705	0.0025135	0.045432
OBOID	0.16387	0.11679	7	0.044144	0.036418	0.33199
Sr	0.20918	0.12364	7	0.046731	0.064937	0.37919
Sra	0.003255	0.0025552	7	0.00096578	0.0011922	0.0088433
Sv	3.8717	0.64502	7	0.2438	2.9624	4.9641
OI	24.8285	9.4105	7	3.5568	14.053	44.0975
WOS	12.6014	5.1863	7	1.9602	6.3508	22.2983
MOST	9.8972	4.0733	7	1.5396	4.9879	17.5131
MWT	55.48	6.2246	4	3.11232	46.4	59.79
TTI	114.6563	25.9138	7	9.7945	78.5172	152.5079

Tabla 4.29.- Parámetros morfométricos. Edad > 5 y ≤ 10 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.2393	0.064532	8	0.022816	0.17437	0.31732
Vos	0.0071629	0.0037204	8	0.0013154	0.0023173	0.011824
Vosf	0.029724	0.015808	8	0.0055891	0.011719	0.063649
Sf	0.1239	0.06137	8	0.021697	0.043184	0.19467
Sfa	0.017427	0.013559	8	0.0047938	0.0035449	0.036379
OBOID	0.14107	0.080352	8	0.028409	0.02762	0.23613
Sr	0.10947	0.053777	8	0.019013	0.059788	0.23327
Sra	0.0024559	0.0019555	8	0.00069137	0.00025301	0.0052631
Sv	3.6262	0.59121	8	0.20902	2.8365	4.5279
OI	23.8691	6.6078	8	2.3362	15.0966	32.911
WOS	16.0645	3.0907	8	1.0927	9.9924	19.0819
MOST	12.617	2.4274	8	0.85822	7.848	14.9869
MWT	66.2667	7.087	6	2.8932	52.46	71.6
TTI	132.0472	30.3061	8	10.7148	96.6761	179.9434

Tabla 4.30.- Parámetros morfométricos. Edad > 10 y ≤ 15 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.28468	0.075677	12	0.021846	0.12832	0.43098
Vos	0.003054	0.0037819	12	0.0010917	0.00009421	0.010575
Vosf	0.011487	0.014838	12	0.0042834	0.00031718	0.044235
Sf	0.050771	0.047215	12	0.01363	0.002909	0.14293
Sfa	0.010998	0.019977	12	0.0057668	0	0.069549
OBOID	0.13236	0.15646	12	0.045167	0	0.50453
Sr	0.13382	0.063653	12	0.018375	0.035721	0.26312
Sra	0.002575	0.002712	12	0.00078289	0	0.0093355
Sv	3.5214	0.81123	12	0.23418	2.3268	4.7919
OI	18.1599	7.0221	10	2.2206	9.3127	33.761
WOS	13.7099	5.0394	12	1.4548	5.7925	25.0674
MOST	10.7677	3.958	12	1.1426	4.5494	19.6879
MWT	88.0086	5.5909	7	2.1131	78.23	96.44
TTI	162.1939	28.6132	12	8.2599	106.5705	202.011

Tabla 4.31.- Parámetros morfométricos. Edad > 15 y ≤ 20 años.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.17434	0.051456	20	0.011506	0.096768	0.30422
Vos	0.0034765	0.0038504	20	0.00086097	0.00024229	0.016171
Vosf	0.018666	0.018353	20	0.0041038	0.0011565	0.070938
Sf	0.066609	0.056529	20	0.01264	0.0067845	0.23709
Sfa	0.012461	0.012733	20	0.0028472	0	0.045245
OBOID	0.21343	0.22052	20	0.049311	0	0.73948
Sr	0.17533	0.11735	20	0.02624	0.032913	0.5563
Sra	0.0043575	0.0039755	20	0.00088895	0	0.013763
Sv	4.0922	1.0698	20	0.23922	1.9067	5.9883
OI	27.4788	9.6964	18	2.2855	13.7005	43.554
WOS	10.9471	3.1822	20	0.71156	6.2201	16.815
MOST	8.5979	2.4993	20	0.55886	4.8853	13.2065
MWT	40.7333	9.5332	9	3.1777	23.94	56.8
TTI	87.9128	24.1338	20	5.3965	53.9433	136.8418

Tabla 4.32.- Parámetros morfométricos. Edad > 0 y ≤ 5 años. Sexo masculino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.18682	0.053164	13	0.014745	0.080995	0.25365
Vos	0.0040587	0.0021063	13	0.00058417	0.00077364	0.0073991
Vosf	0.024263	0.015699	13	0.004354	0.0049939	0.057304
Sf	0.096506	0.04641	13	0.012872	0.025339	0.16711
Sfa	0.027971	0.020482	13	0.0056808	0.0040892	0.06522
OBOID	0.29455	0.13704	13	0.038009	0.026256	0.47475
Sr	0.17946	0.10755	13	0.029828	0.031948	0.38862
Sra	0.0071958	0.00658	13	0.001825	0.00080658	0.025151
Sv	4.5189	1.7454	13	0.48407	2.1362	7.3766
OI	28.4981	16.125	13	4.4723	6.9633	74.8279
WOS	10.3287	3.6847	13	1.0219	5.9366	16.6451
MOST	8.1122	2.8939	13	0.80264	4.6626	13.0731
MWT	38.9267	8.2057	6	3.35	30.86	53.51
TTI	90.4827	36.0326	13	9.9937	59.9488	186.2837

Tabla 4.33.- Parámetros morfométricos. Edad > 0 y ≤ 5 años. Sexo femenino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.19321	0.0017463	3	0.0010082	0.1914	0.19489
Vos	0.0016865	0.0013405	3	0.00077397	0.00014995	0.002617
Vosf	0.0087271	0.0069243	3	0.0039977	0.00077557	0.013428
Sf	0.039378	0.02807	3	0.016206	0.00797	0.062014
Sfa	0.0050852	0.0022296	3	0.0012872	0.0025135	0.0064751
OBOID	0.18331	0.11509	3	0.066447	0.10441	0.31537
Sr	0.29573	0.073378	3	0.042365	0.24138	0.37919
Sra	0.0018055	0.0006492	3	0.00037482	0.0011922	0.0024854
Sv	3.8816	1.0108	3	0.58358	2.9624	4.9641
OI	24.019	3.3878	3	1.9559	21.5959	27.8901
WOS	9.2186	3.286	3	1.8972	6.3508	12.8042
MOST	7.2403	2.5808	3	1.49	4.9879	10.0564
MWT	0	0	0	0	0	0
TTI	103.9978	26.0199	3	15.0226	78.5172	130.5254

Tabla 4.34.- Parámetros morfométricos. Edad > 5 y ≤ 10 años. Sexo masculino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.23589	0.051697	4	0.025848	0.19581	0.30788
Vos	0.010465	0.010297	4	0.0051484	0.0016931	0.025033
Vosf	0.039333	0.031114	4	0.015557	0.0086468	0.081309
Sf	0.151	0.10349	4	0.051747	0.046658	0.27805
Sfa	0.019138	0.018276	4	0.0091378	0.0032931	0.045432
OBOID	0.14928	0.13338	4	0.066688	0.036418	0.33199
Sr	0.14427	0.11779	4	0.058897	0.064937	0.3185
Sra	0.0043421	0.0030167	4	0.0015084	0.0024838	0.0088433
Sv	3.8643	0.38834	4	0.19417	3.544	4.331
OI	25.4357	12.9737	4	6.4869	14.053	44.0975
WOS	15.1385	5.1548	4	2.5774	10.2362	22.2983
MOST	11.8898	4.0485	4	2.0243	8.0395	17.5131
MWT	55.48	6.2246	4	3.1123	46.4	59.79
TTI	122.6502	26.3227	4	13.1614	92.805	152.5079

Tabla 4.35.- Parámetros morfométricos. Edad > 5 y ≤ 10 años. Sexo femenino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.27602	0.06601	4	0.033005	0.17831	0.31732
Vos	0.010283	0.0015381	4	0.00076904	0.0086773	0.011824
Vosf	0.039986	0.016193	4	0.0080966	0.029469	0.063649
Sf	0.17825	0.02199	4	0.010995	0.14592	0.19467
Sfa	0.025184	0.014144	4	0.007072	0.0050842	0.036379
OBOID	0.14221	0.076539	4	0.038269	0.02762	0.18688
Sr	0.13679	0.065462	4	0.032731	0.094276	0.23327
Sra	0.0033475	0.0014243	4	0.00071216	0.0018718	0.0052631
Sv	3.6965	0.53217	4	0.26608	3.231	4.4606
OI	27.4057	5.4007	4	2.7004	20.314	32.911
WOS	16.1778	4.1763	4	2.0882	9.9924	19.0819
MOST	12.7061	3.2801	4	1.64	7.848	14.9869
MWT	69.0767	2.0454	3	1.1809	66.72	70.39
TTI	149.6213	34.206	4	17.103	110.3715	179.9434

Tabla 4.36.- Parámetros morfométricos. Edad > 10 y ≤ 15 años. Sexo masculino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR.EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.20259	0.042004	4	0.021002	0.17437	0.26343
Vos	0.0040429	0.0019935	4	0.00099674	0.0023173	0.0068422
Vosf	0.019463	0.0063319	4	0.003166	0.011719	0.025974
Sf	0.069556	0.020687	4	0.010343	0.043184	0.091351
Sfa	0.0096699	0.0082739	4	0.0041369	0.0035449	0.021571
OBOID	0.13993	0.095935	4	0.047967	0.044863	0.23613
Sr	0.082157	0.021742	4	0.010871	0.059788	0.1105
Sra	0.0015643	0.0021849	4	0.0010925	0.00025301	0.0048241
Sv	3.5559	0.72054	4	0.36027	2.8365	4.5279
OI	20.3326	6.2737	4	3.1369	15.0966	29.3686
WOS	15.9511	2.1938	4	1.0969	12.8181	17.944
MOST	12.528	1.723	4	0.8615	10.0673	14.0932
MWT	63.4567	9.8839	3	5.7065	52.46	71.6
TTI	114.4731	12.224	4	6.112	96.6761	123.2496

Tabla 4.37.- Parámetros morfométricos. Edad > 10 y ≤ 15 años. Sexo femenino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.29976	0.06346	10	0.020068	0.21735	0.43098
Vos	0.003444	0.0040557	10	0.0012825	0.00009421	0.010575
Vosf	0.012669	0.016114	10	0.0050956	0.00031718	0.044235
Sf	0.054417	0.051144	10	0.016173	0.002909	0.14293
Sfa	0.01289	0.021537	10	0.0068106	0	0.069549
OBOID	0.1475	0.16783	10	0.053074	0	0.50453
Sr	0.13236	0.067744	10	0.021422	0.035721	0.26312
Sra	0.0026257	0.0029953	10	0.00094719	0	0.0093355
Sv	3.5267	0.73614	10	0.23279	2.3268	4.7919
OI	18.9537	7.1138	8	2.5151	10.1585	33.761
WOS	14.3248	5.1968	10	1.6434	5.7925	25.0674
MOST	11.2507	4.0816	10	1.2907	4.5494	19.6879
MWT	88.0086	5.5909	7	2.1131	78.23	96.44
TTI	71.3078	20.6018	10	6.5149	131.2111	202.011

Tabla 4.38.- Parámetros morfométricos. Edad > 15 y ≤ 20 años. Sexo masculino.

	MEDIA	DESV.TIP.	TAM	ERR. EST.	MINIMO	MAXIMO
V	0.20924	0.11443	2	0.080915	0.12832	0.29015
Vos	0.0011042	0.00041058	2	0.00029032	0.00081388	0.0013945
Vosf	0.0055743	0.0010863	2	0.00076816	0.0048062	0.0063425
Sf	0.032544	0.013516	2	0.0095576	0.022987	0.042102
Sfa	0.0015399	0.0006992	2	0.00049441	0.0010455	0.0020343
OBOID	0.056665	0.045019	2	0.031833	0.024832	0.088498
Sr	0.14111	0.056022	2	0.039614	0.1015	0.18073
Sra	0.0023216	0.00007615	2	0.00005384	0.0022677	0.0023754
Sv	3.4945	1.5363	2	1.0863	2.4081	4.5808
OI	14.9848	8.0215	2	5.6721	9.3127	20.6569
WOS	10.6351	3.6882	2	2.608	8.0272	13.2431
MOST	8.3528	2.8967	2	2.0483	6.3045	10.4011
MWT	0	0	0	0	0	0
TTI	116.6242	14.2181	2	10.0537	106.5705	126.6779

Tabla 4.39.- Parámetros morfométricos. Edad > 15 y ≤ 20 años. Sexo femenino.

Parámetros de la Estructura Osea

El Volumen Trabecular, representado mediante la recta de regresión, presenta una clara tendencia a elevarse con la edad (Figura 4.1), mostrando un aumento significativo ($p < 0.001$) de la primera a la segunda década de la vida (Figura 4.2), a expensas del sexo masculino, mientras que en el femenino permanece constante (Figura 4.3).

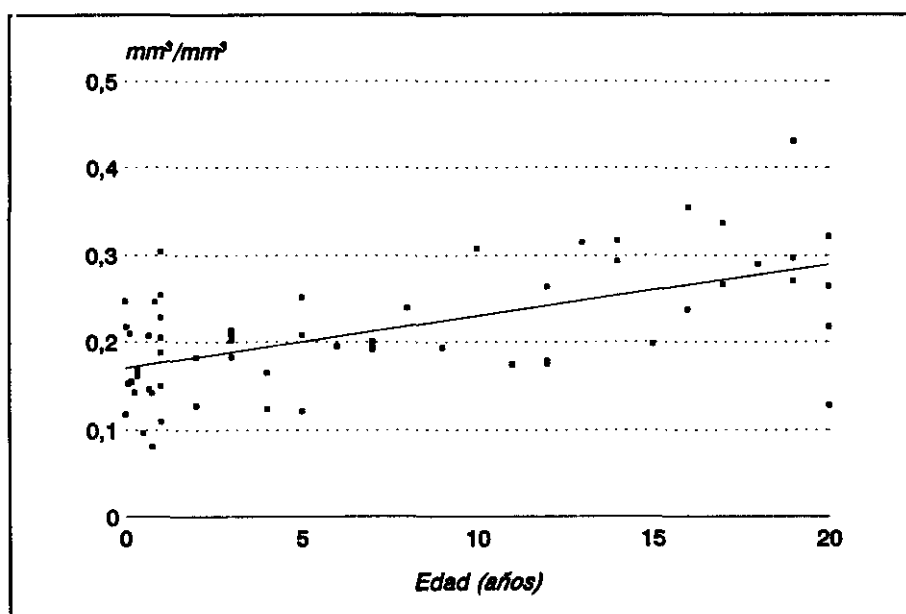


Figura 4.1.- Volumen Trabecular.(V).

En la distribución por grupos de cinco años de edad, se observan los valores máximos en el grupo de 15 a 20 años ($0.284 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$) (Figura 4.4), sin advertir diferencias aparentemente significativas^(*) entre los grupos de varones, mientras en las hembras aumenta en el grupo de 5 a 10 años, y disminuye en el de 10 a 15 para permanecer sin cambios posteriores (Figura 4.5).

^(*) No ha podido establecerse estadísticamente las diferencias existentes entre sexos para grupos de edad de 5 años, debido al pequeño tamaño de las muestras

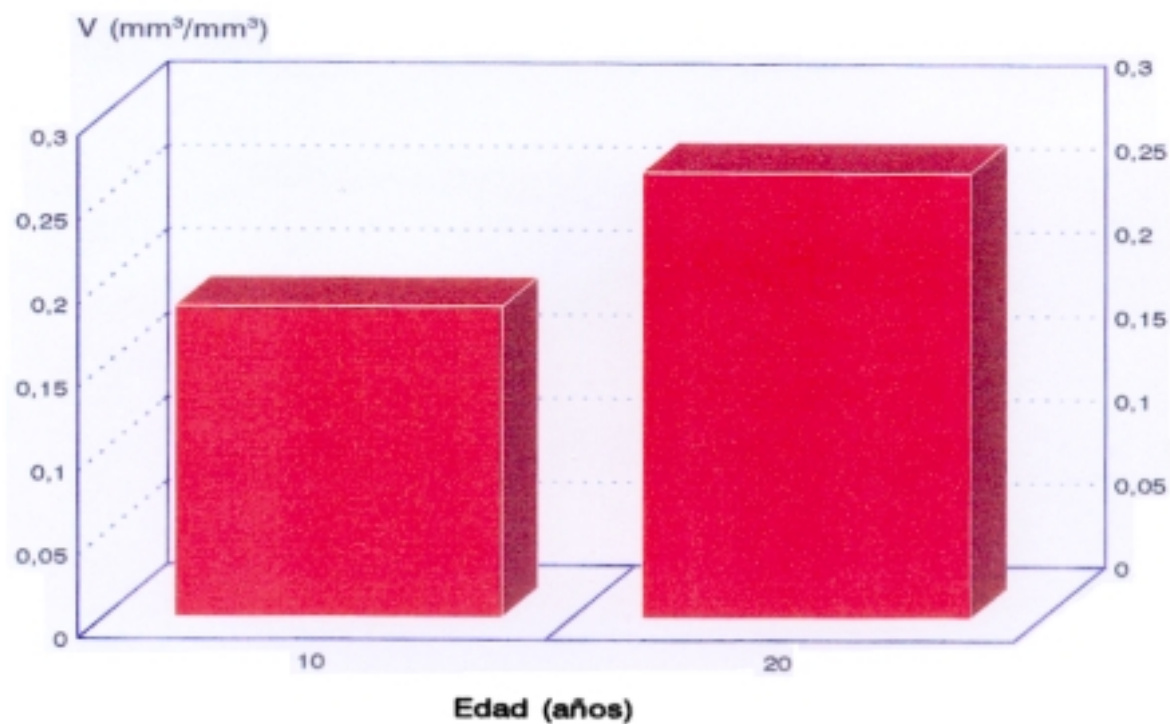


Figura 4.2.- Volumen trabecular por décadas

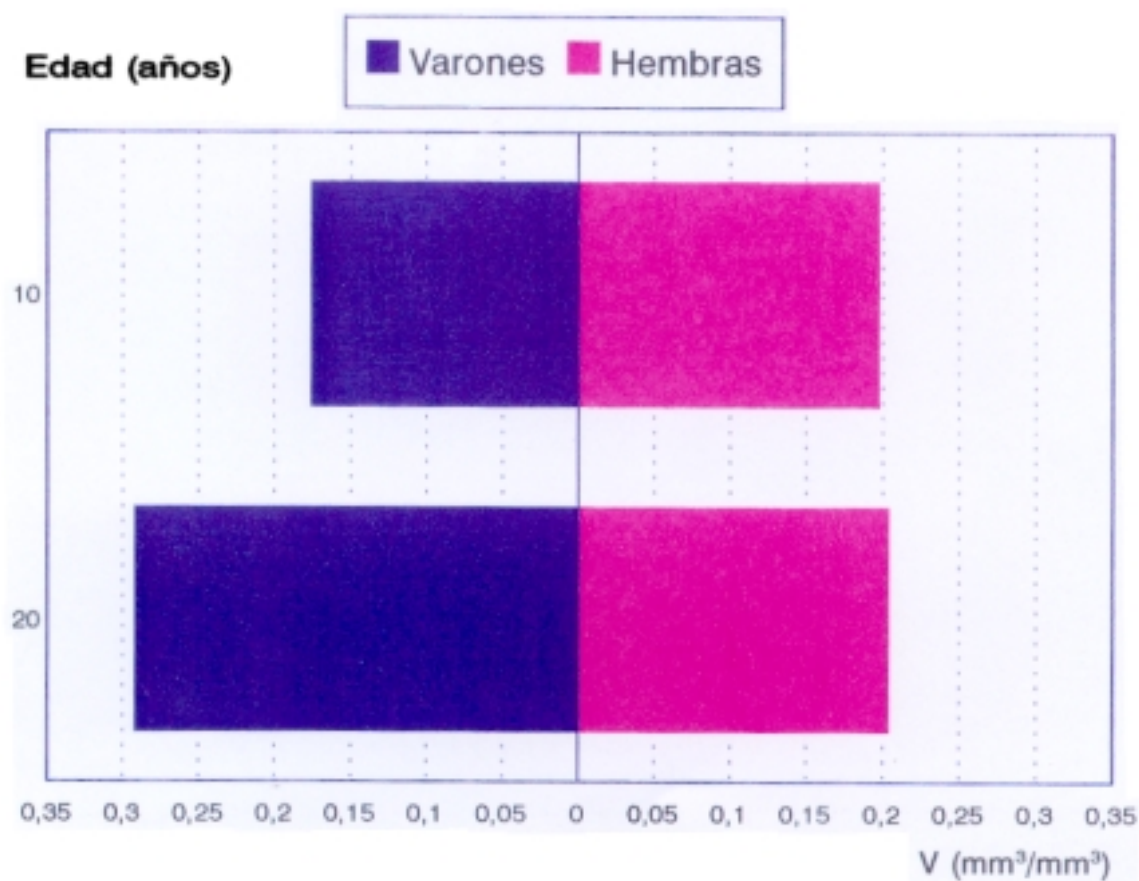


Figura 4.3.- Volumen Trabecular por décadas y sexo

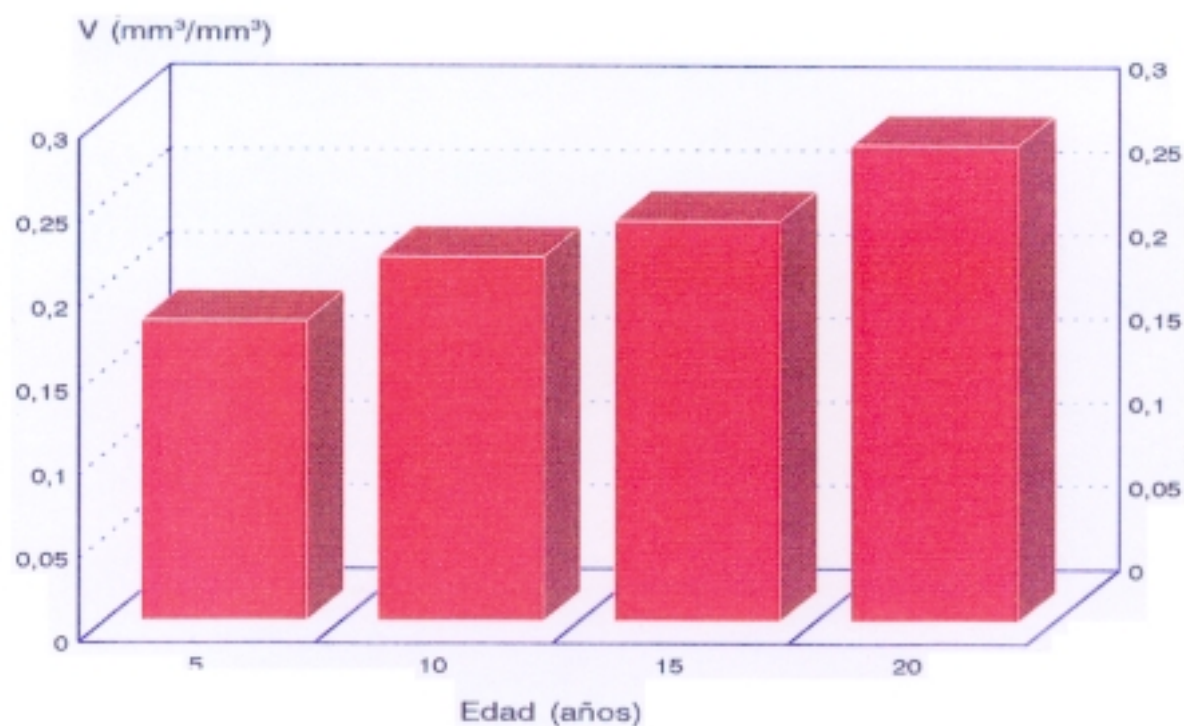


Figura 4.4.- Volumen Trabecular por grupos de 5 años

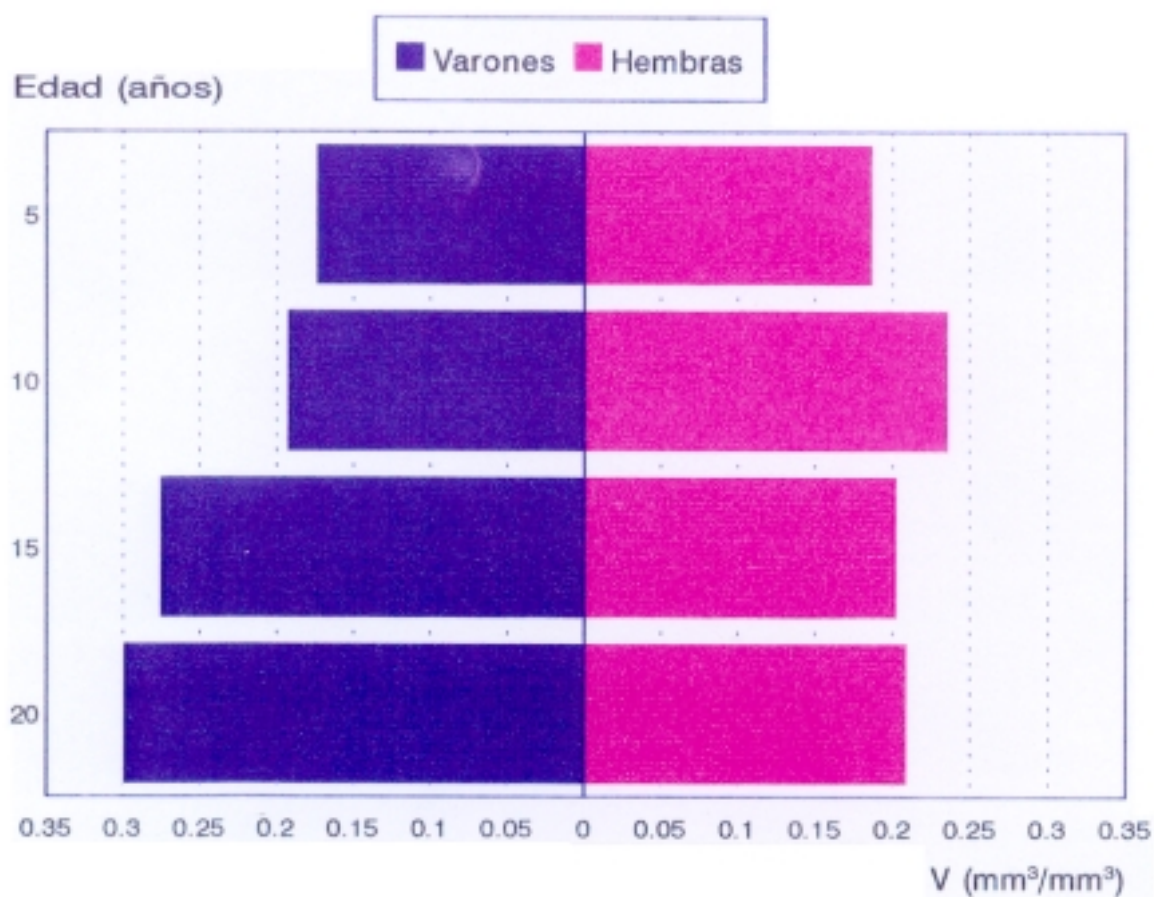


Figura 4.5.- Volumen Trabecular por grupos de 5 años y sexo

El Índice de Espesor Trabecular (TTI), representado por la recta de regresión, aumenta claramente con la edad (Figura 4.6), de manera paralela al volumen trabecular (V), aumentando significativamente de la primera a la segunda década ($p<0.001$) (Figura 4.7) a expensas de la población masculina (Figura 4.8).

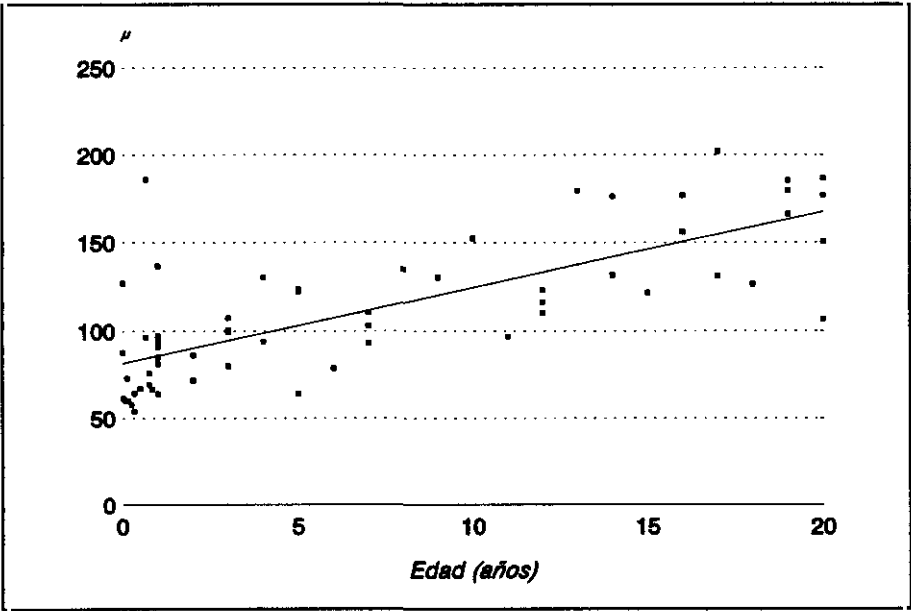


Figura 4.6.- Índice de espesor trabecular.(TTI).

Presenta un máximo en el grupo de 15 a 20 años (162μ) (Figura 4.9). En la distribución por sexos, este patrón se reproduce en el sexo masculino, en el que va aumentando con la edad, mientras en el femenino prácticamente permanece constante desde el grupo de 5 a 10 años (Figura 4.10).

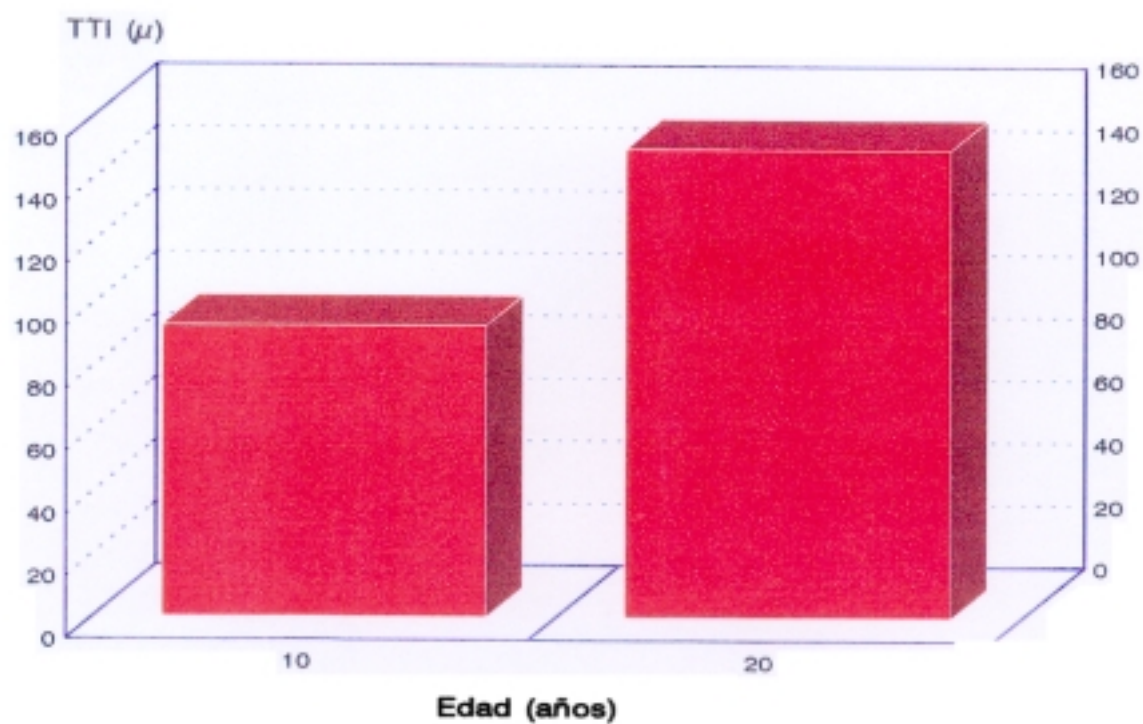


Figura 4.7.- Índice de Espesor Trabecular por décadas

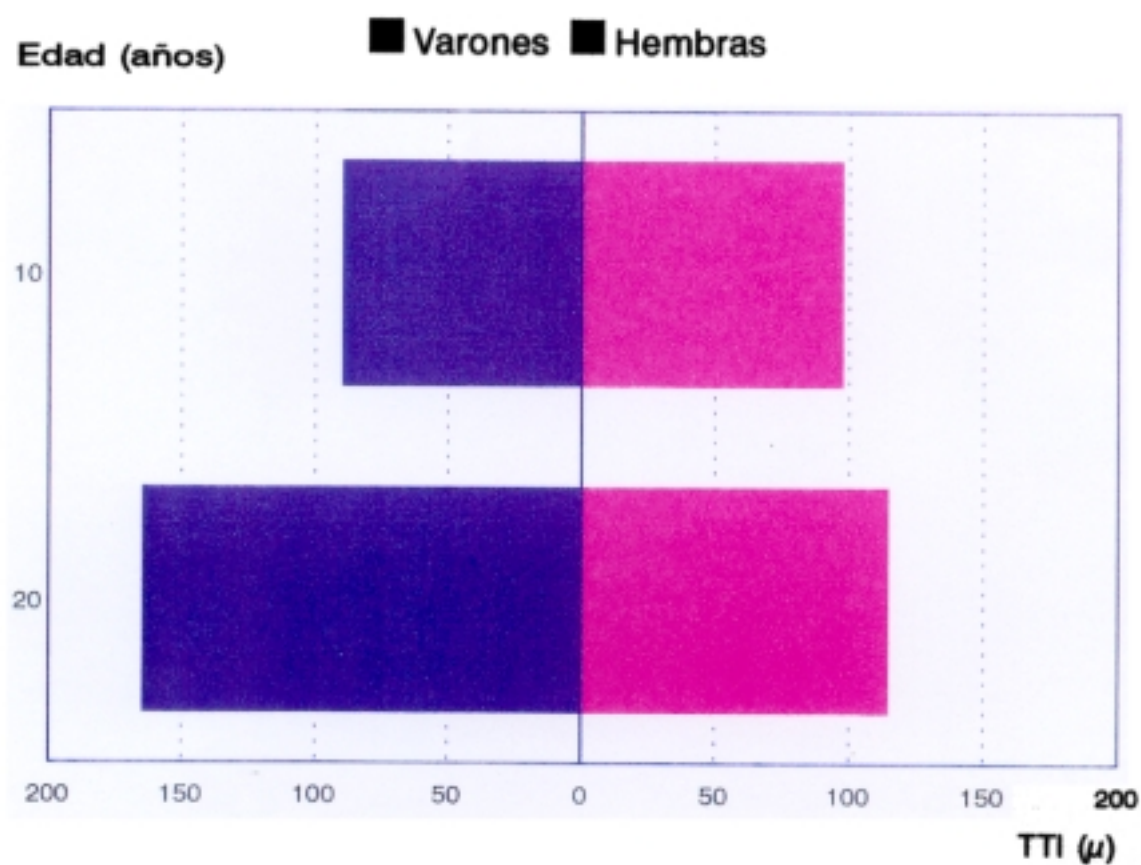


Figura 4.8.- Índice de Espesor trabecular por décadas y sexo

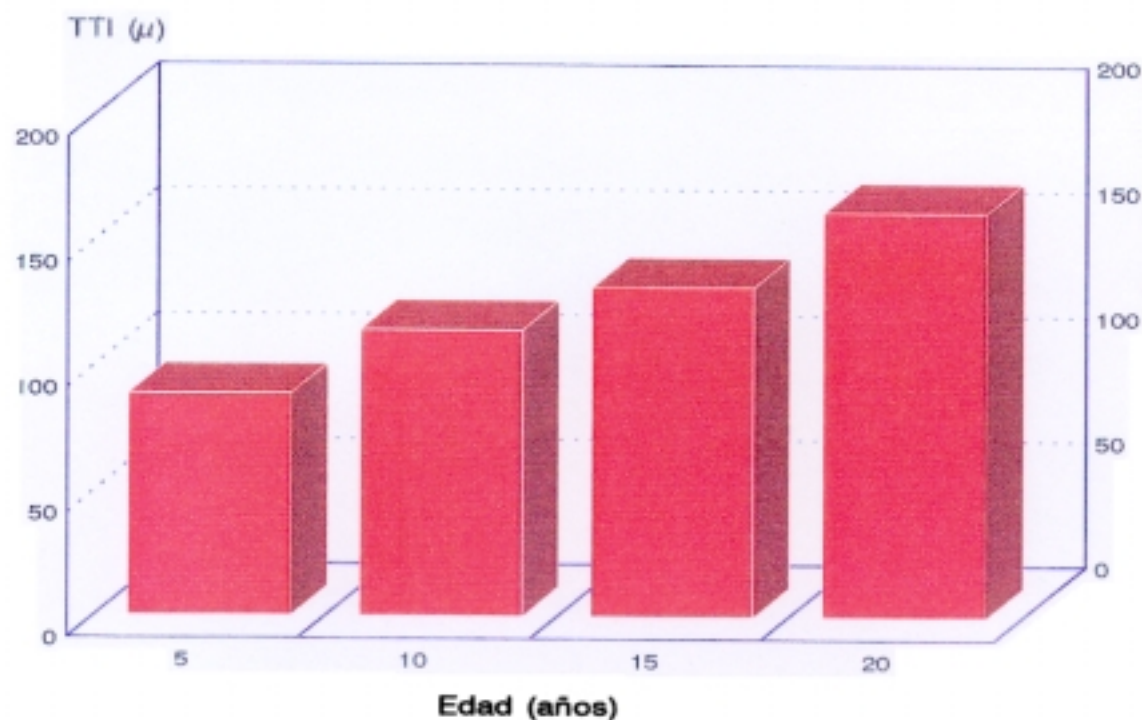


Figura 4.9.- Índice de Espesor Trabecular por grupos de 5 años

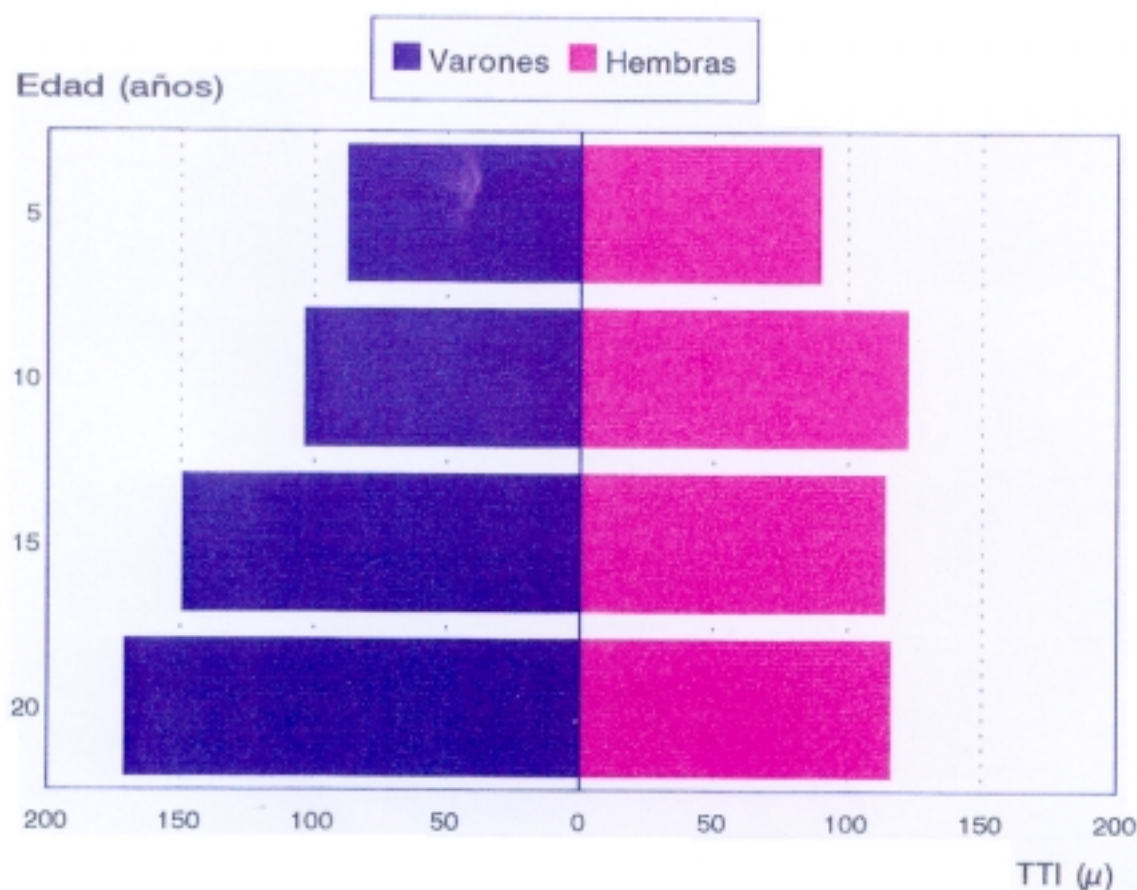


Figura 4.10.- Índice de Espesor Trabecular por grupos de 5 años y sexo

La Superficie Específica de Hueso Trabecular (Sv), muestra una tendencia, representada por la recta de regresión, a decaer de manera progresiva (Figura 4.11), disminuyendo de manera significativa ($p < 0.05$) de la primera a la segunda década (Figura 4.12), sin que se observen diferencias relacionadas con el sexo (Figura 4.13).

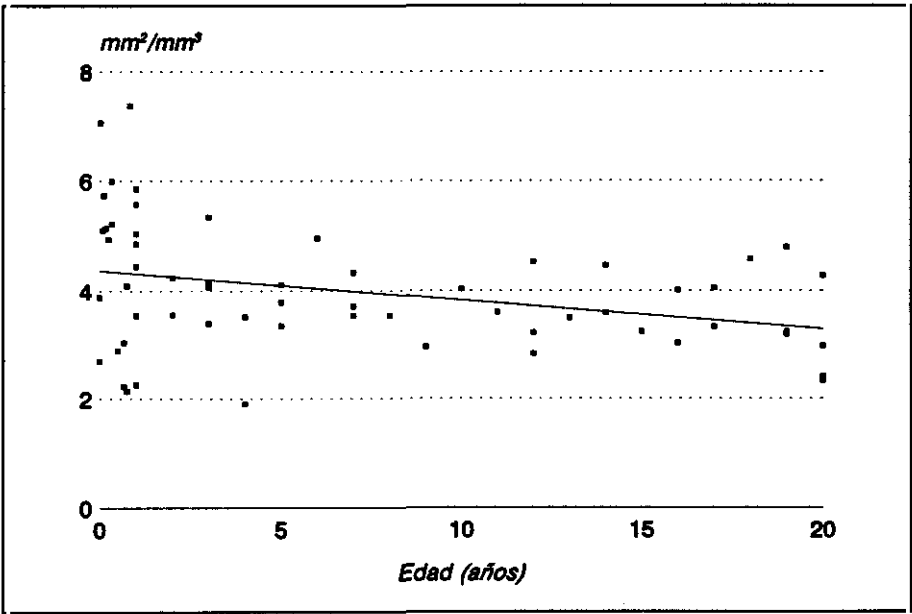


Figura 4.11.- Superficie específica de hueso trabecular.(Sv).

En la distribución por grupos de cinco años, se observa un valor máximo desde el nacimiento hasta los 5 años ($4.32 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$) (Figura 4.14), no observándose diferencias aparentemente significativas entre ambos sexos (Figura 4.15).

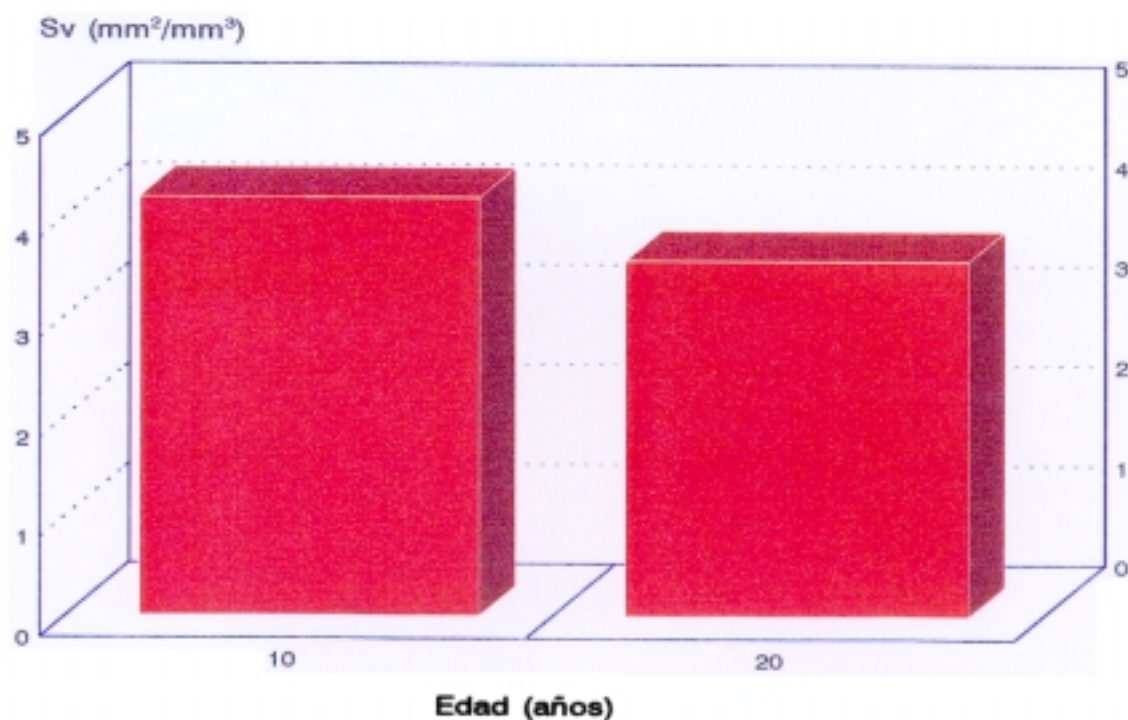


Figura 4.12.- Superficie Específica de Hueso Trabecular por décadas

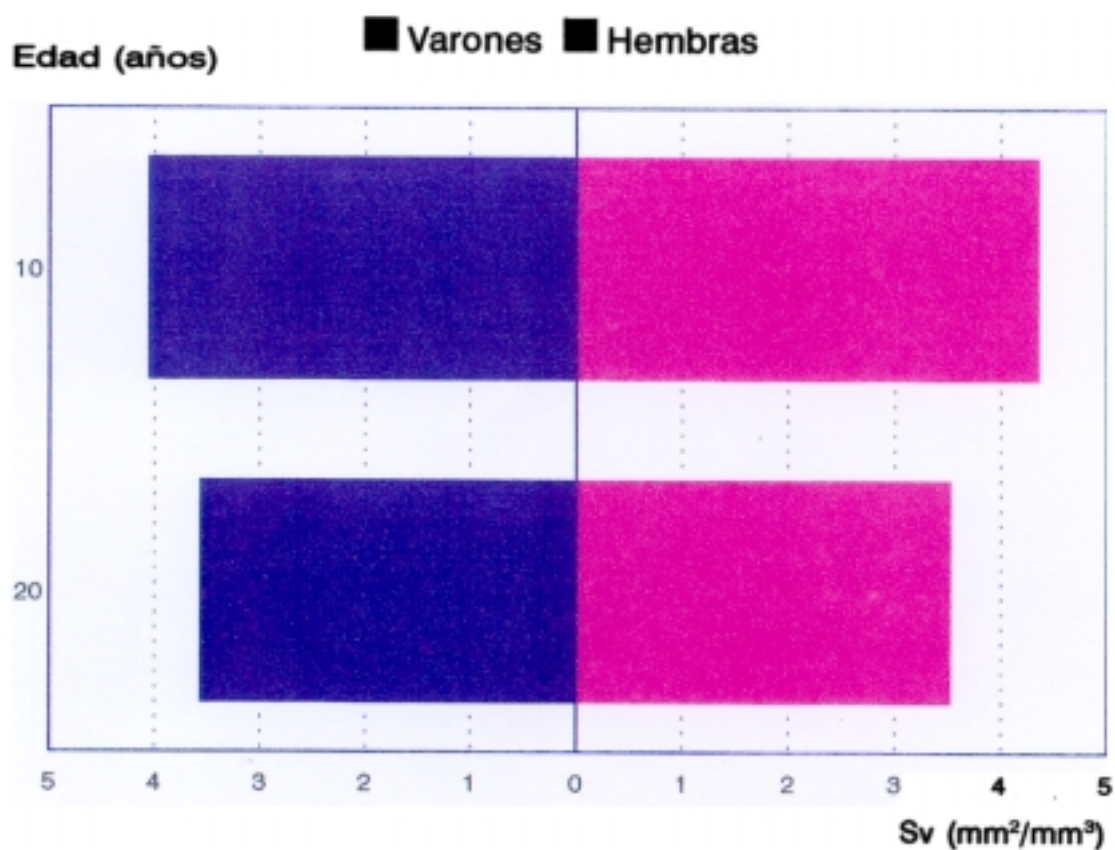


Figura 4.13.- Superficie Específica de Hueso Trabecular por décadas y sexo

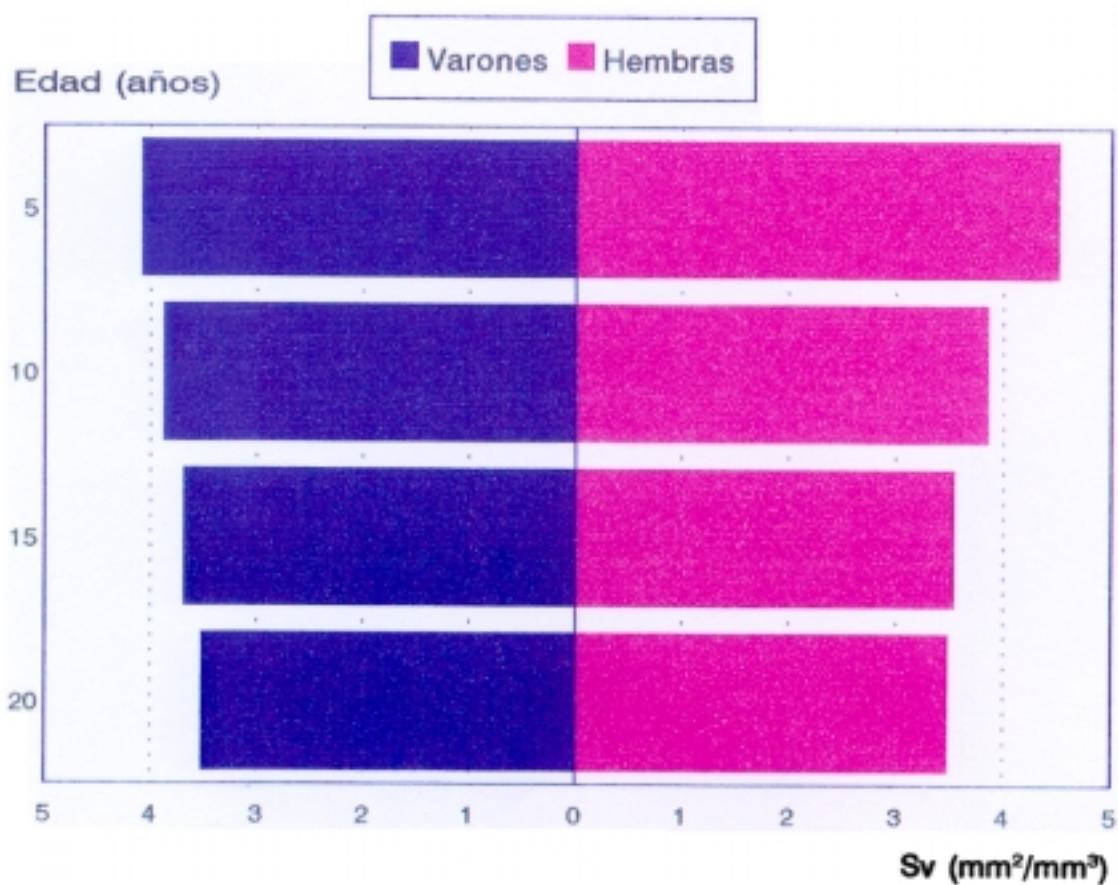
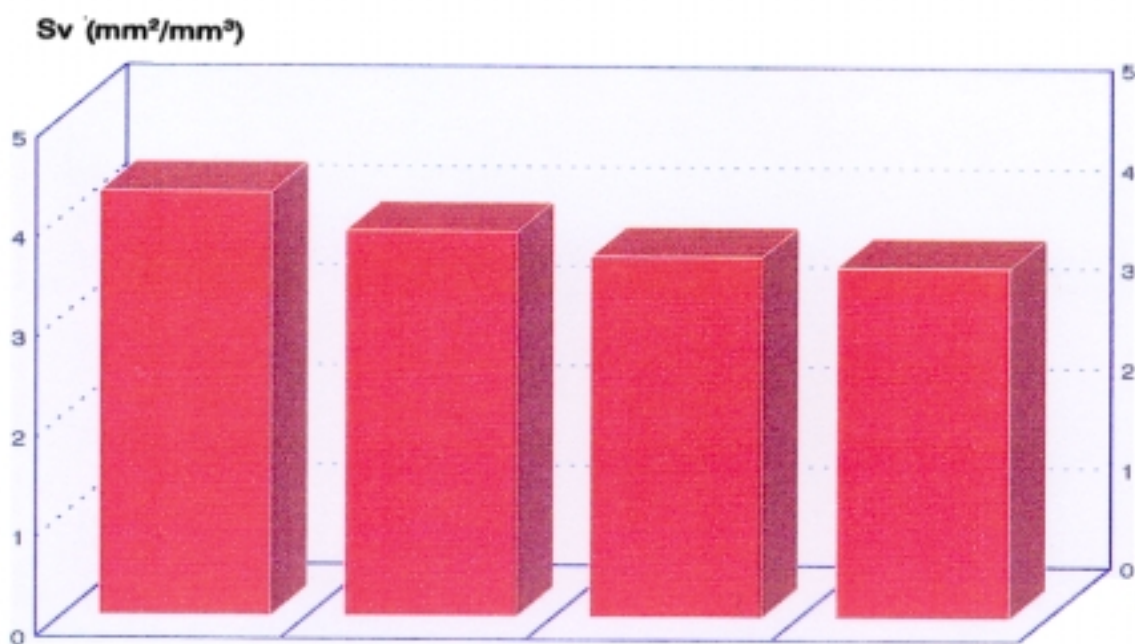


Figura 4.15.- Superficie Específica de Hueso Trabecular por grupos de 5 años y sexo

El **Espesor Medio de las Unidades Estructurales Trabeculares (MWT)**, tiende a aumentar con la edad, como puede observarse mediante la correspondiente recta de regresión (Figura 4.16), con un aumento significativo ($p < 0.001$) de la primera a la segunda década (Figura 4.17), no siendo estadísticamente significativas las diferencias entre ambos sexos (Figura 4.18).

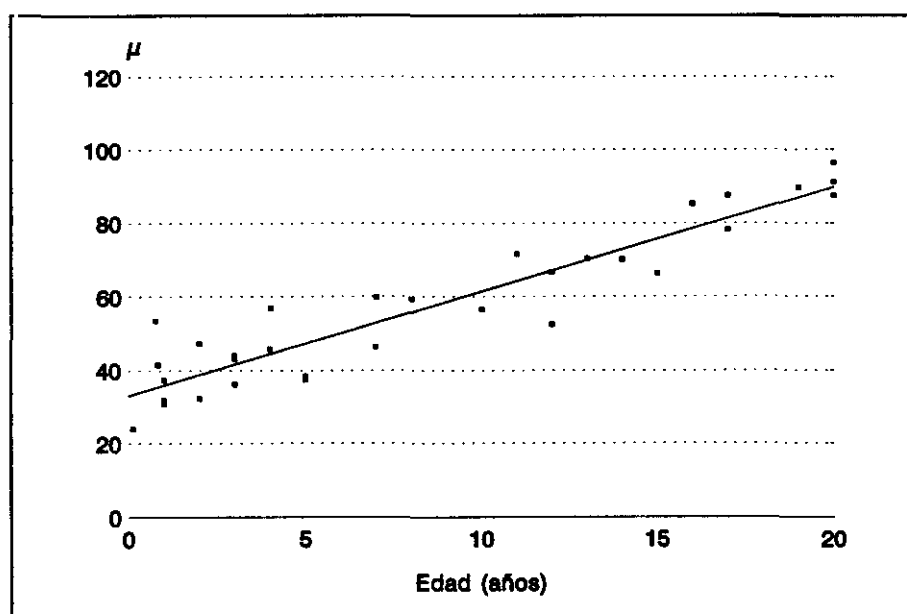


Figura 4.16.- Espesor Medio de las Unidades Estructurales Trabeculares.(MWT).

La distribución por grupos de cinco años sigue la misma tendencia ascendente, con elevaciones significativas en cada uno de los grupos de edad, sin diferencias aparentes entre ambos sexos. (Figuras 4.19 y 4.20).

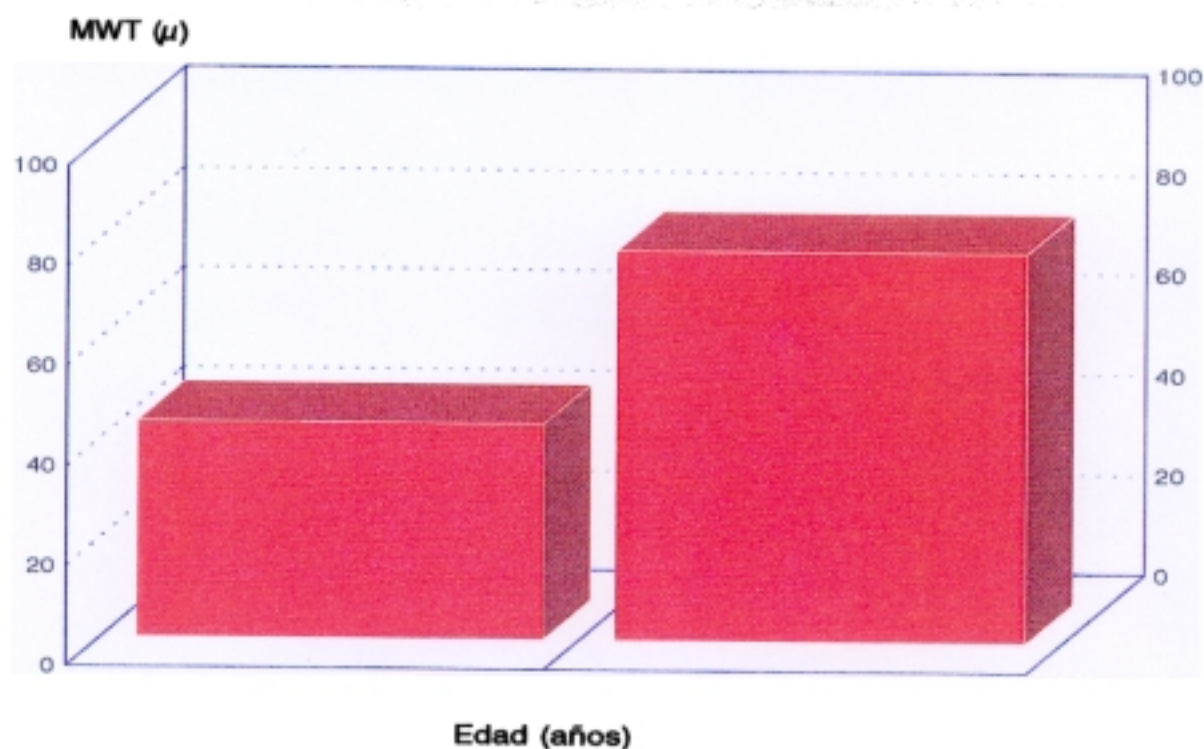


Figura 4.17.- Espesor Medio de las Unidades Estructurales Trabeculares por décadas

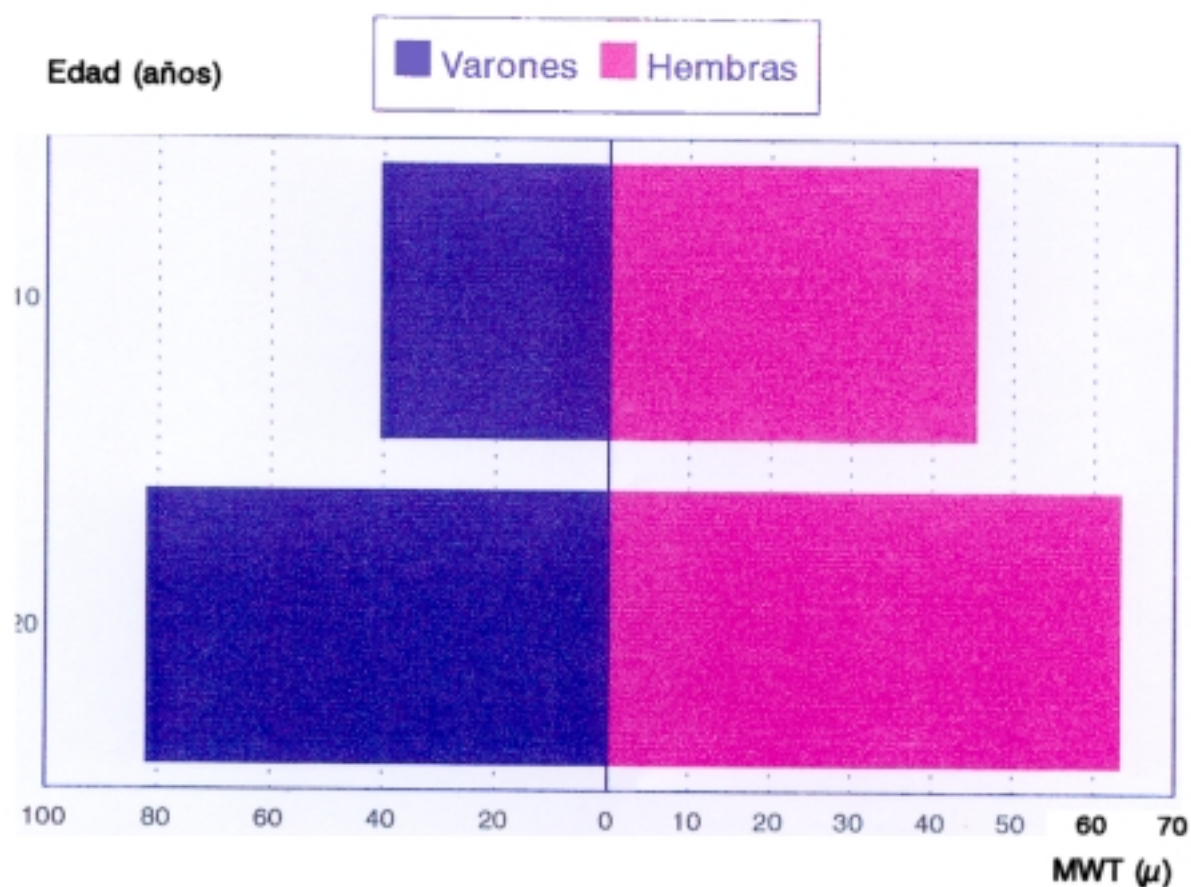


Figura 4.18.- Espesor Medio de las Unidades Estructurales Trabeculares por décadas y sexo

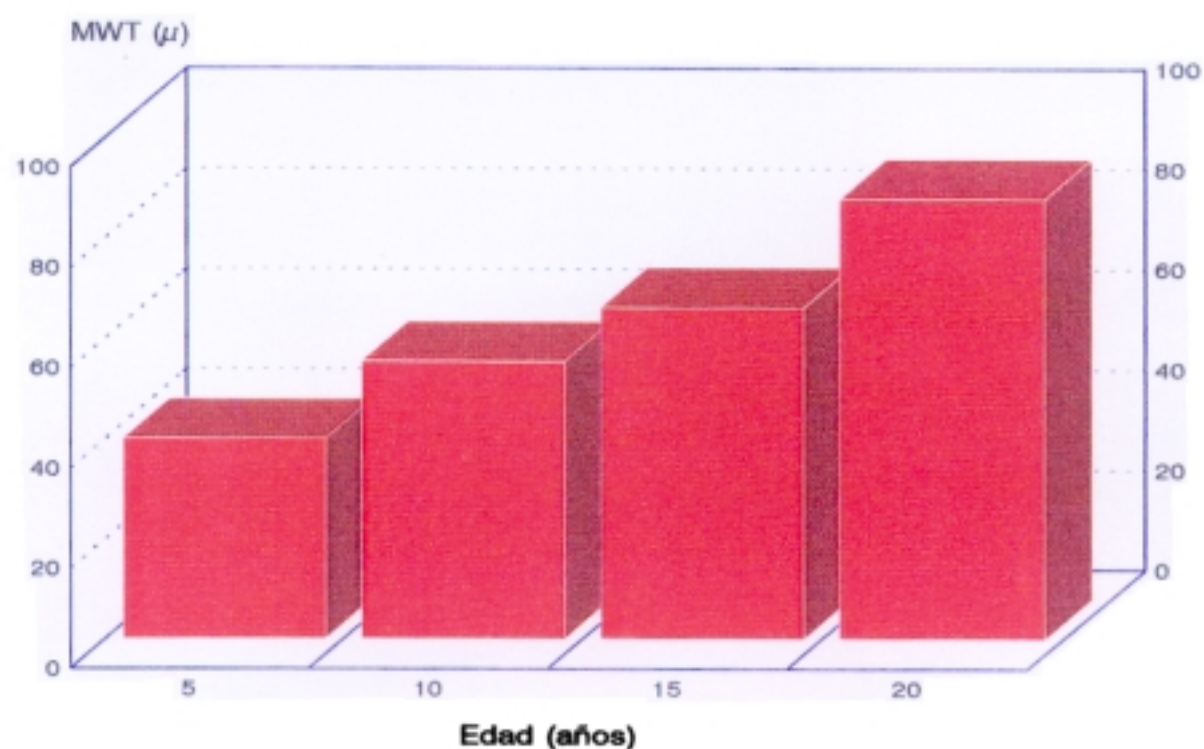


Figura 4.19.- Espesor Medio de las Unidades Estructurales Trabeculares por grupos de 5 años

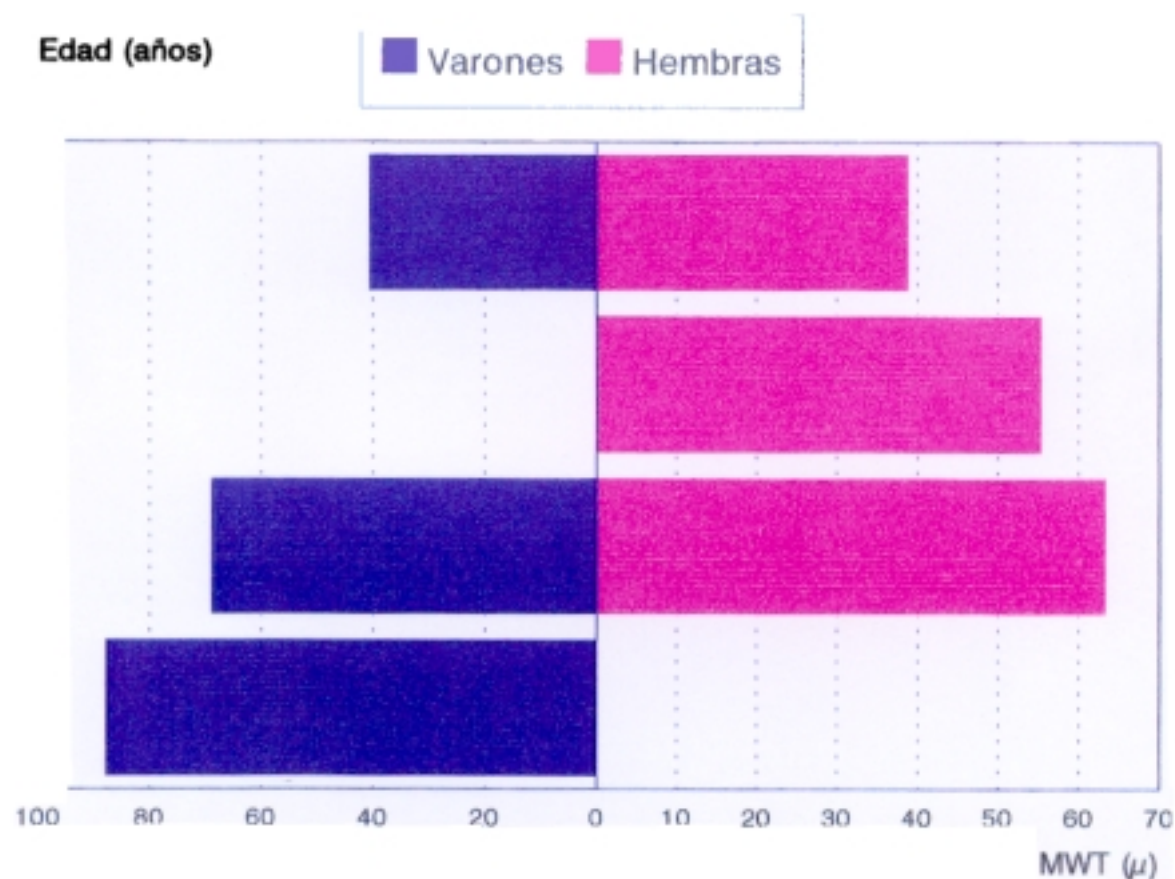


Figura 4.20.- Espesor Medio de las Unidades Estructurales Trabeculares por grupos de 5 años y sexo

Parámetros de Formación Osea

El Volumen de Osteoide (Vos), muestra una tendencia a mantenerse constante, tal y como se representa en la recta de regresión (Figura 4.21), con un aumento no significativo de la primera a la segunda década (Figura 4.22).

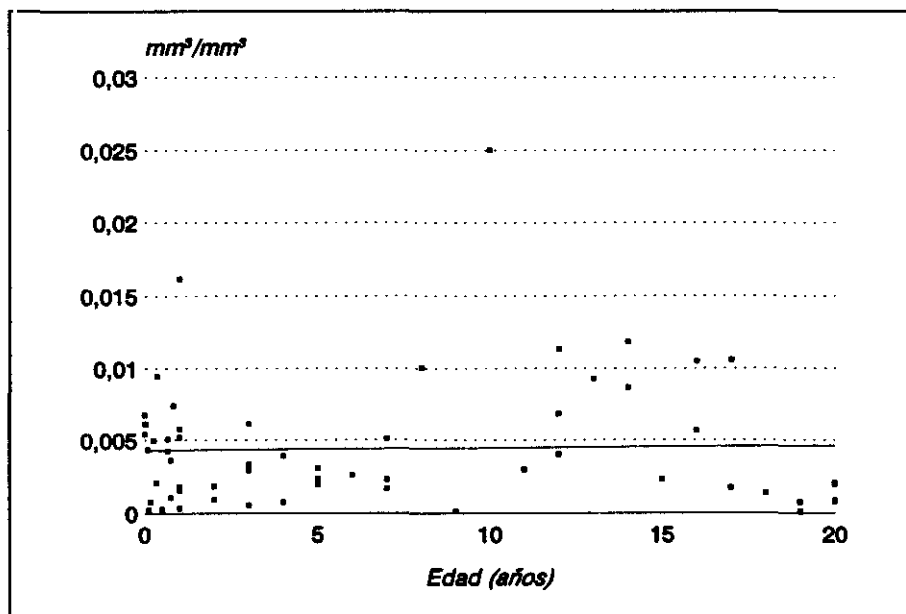


Figura 4.21.- Volumen de Osteoide.(Vos).

Este patrón no se cumple al realizar la distribución por sexos, observando que en la primera década de la vida los valores son máximos para las hembras ($0.0054 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$), descendiendo, aunque de manera no significativa en la segunda, mientras para los varones se produce un incremento no significativo de la primera a la segunda década, donde alcanza su máximo ($0.0057 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$) (Figura 4.23).

En la distribución por grupos de cinco años, se observan dos picos en los grupos de edad de 5 a 10 y 10 a 15 años ($0.0067 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$, y $0.0071 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$ respectivamente), y una caída estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el grupo de 15 a 20 años ($0.0030 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$) (Figura 4.24). El primer pico resulta de un incremento en el grupo de edad de 5 a 10 años para el sexo femenino ($0.0104 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$), y el segundo se origina a expensas del aumento en el grupo de 10 a 15 años para el masculino ($0.0102 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$) (Figura 4.25).

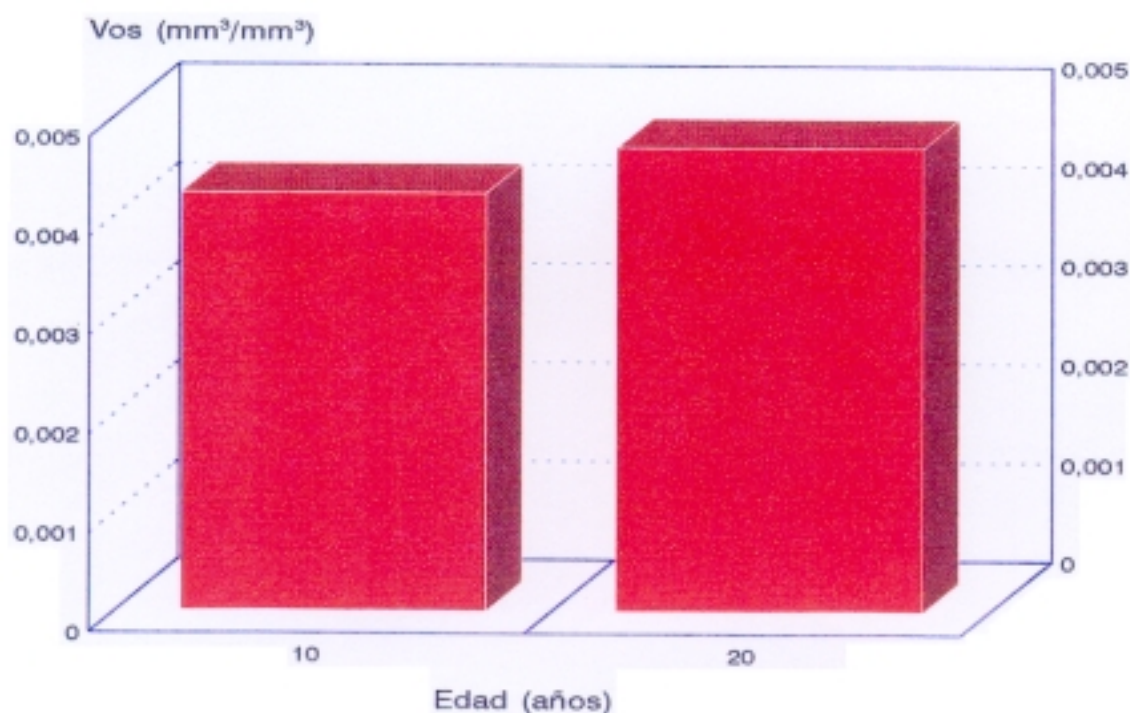


Figura 4.22.- Volumen de Osteoide (Vos) por décadas

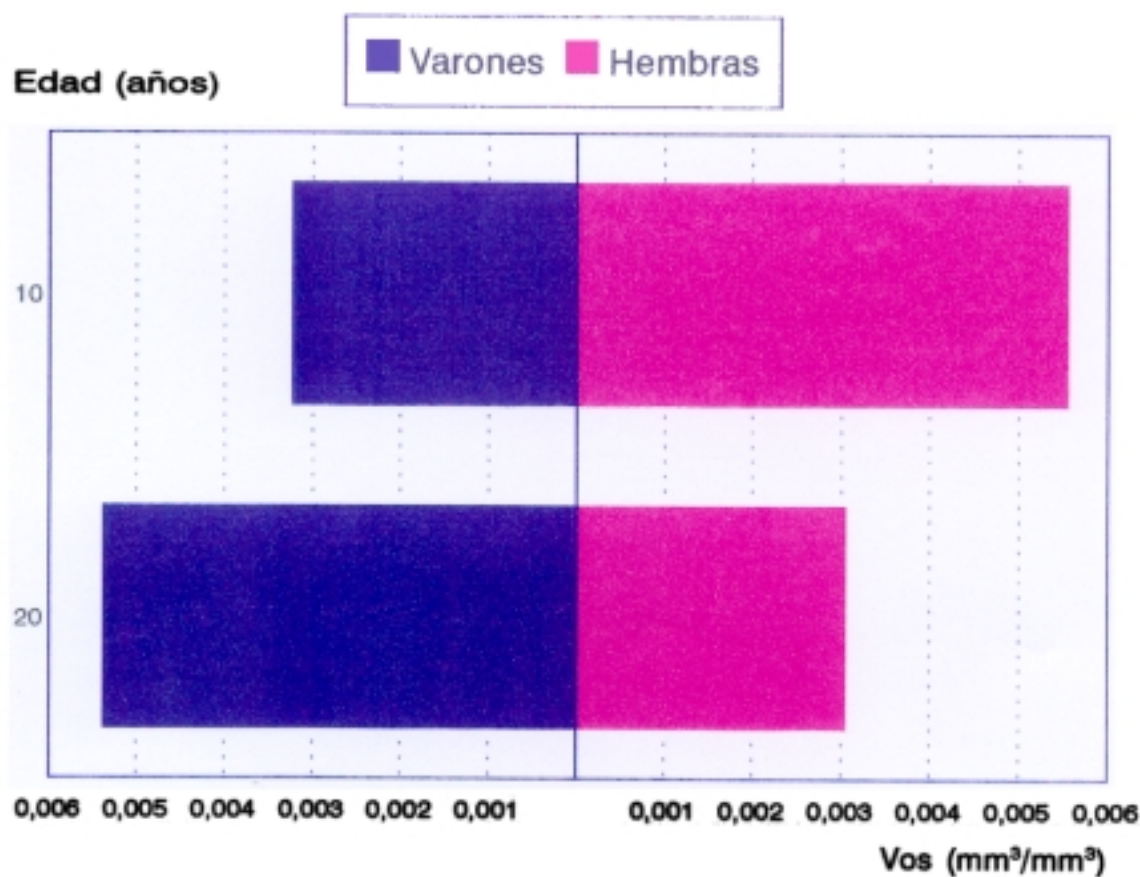


Figura 4.23.- Volumen de Osteoide (Vos) por décadas y sexo

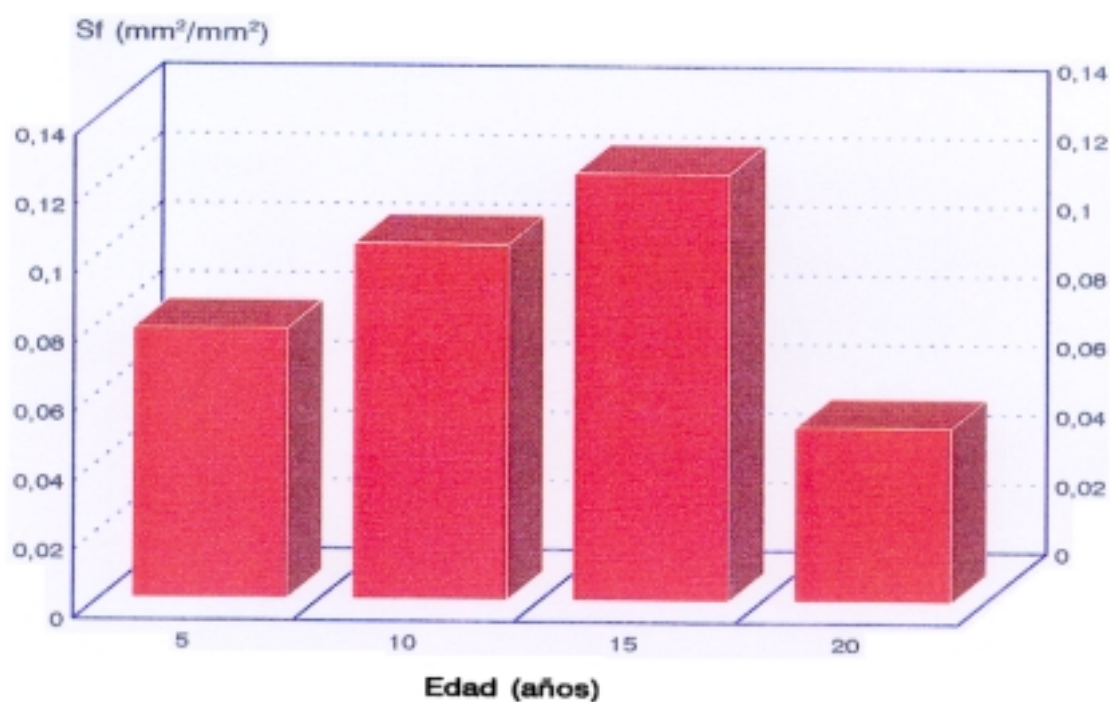


Figura 4.34.- Superficie Relativa de Formación por grupos de 5 años

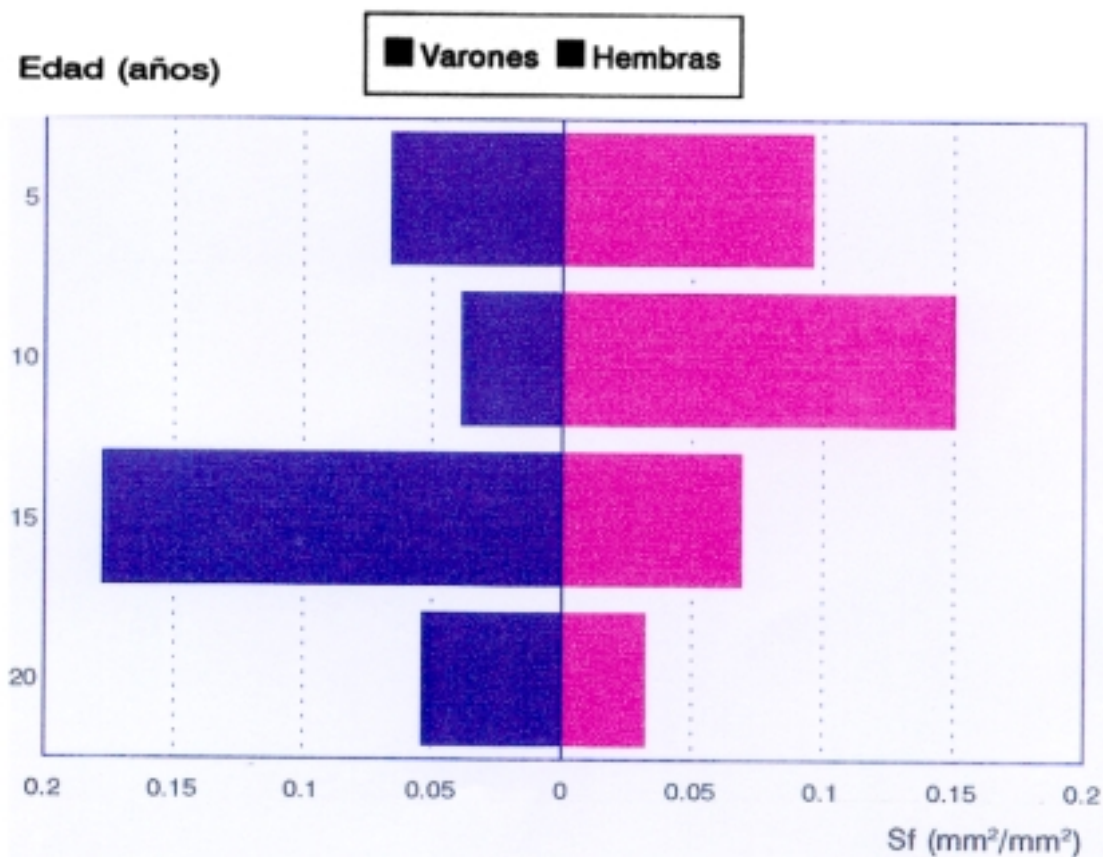


Figura 4.35.- Superficie Relativa de Formación por grupos de 5 años y sexo

El Volumen de Osteoide (Vosf), se comporta de manera similar, mostrando una tendencia a permanecer constante (Figura 4.26), descendiendo, en este caso, de manera no significativo de la primera a la segunda década (Figura 4.27), al mantenerse prácticamente constante en los varones, mientras en las hembras disminuye de manera significativa ($p < 0.05$) (Figura 4.28)

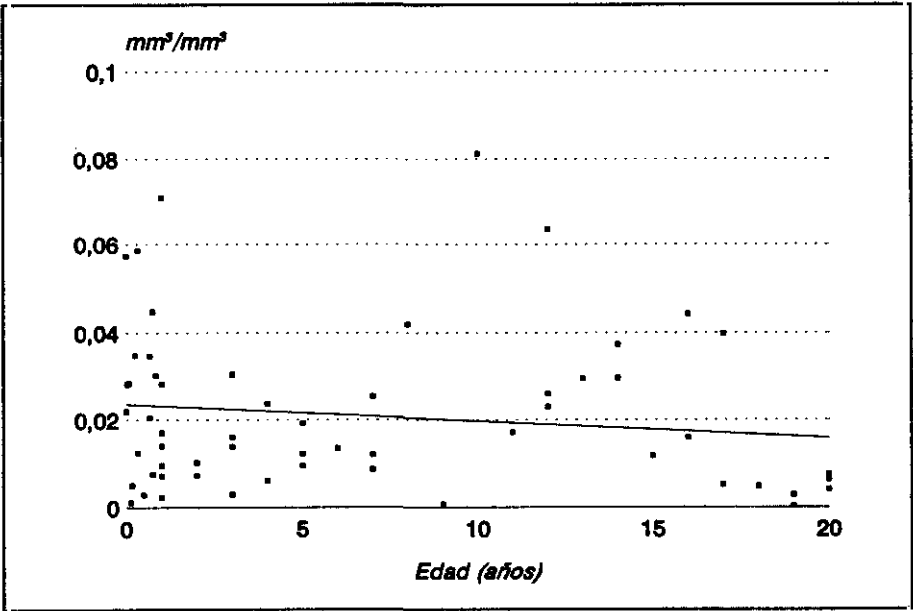


Figura 4.26.- Volumen de Osteoide.(Vosf).

En la distribución por grupos de cinco años la evolución es también similar al Vos, aunque las diferencias entre los tres primeros grupos son más progresivas (Figura 4.29), observando un comportamiento idéntico al Vos en ambos sexos (Figura 4.30).

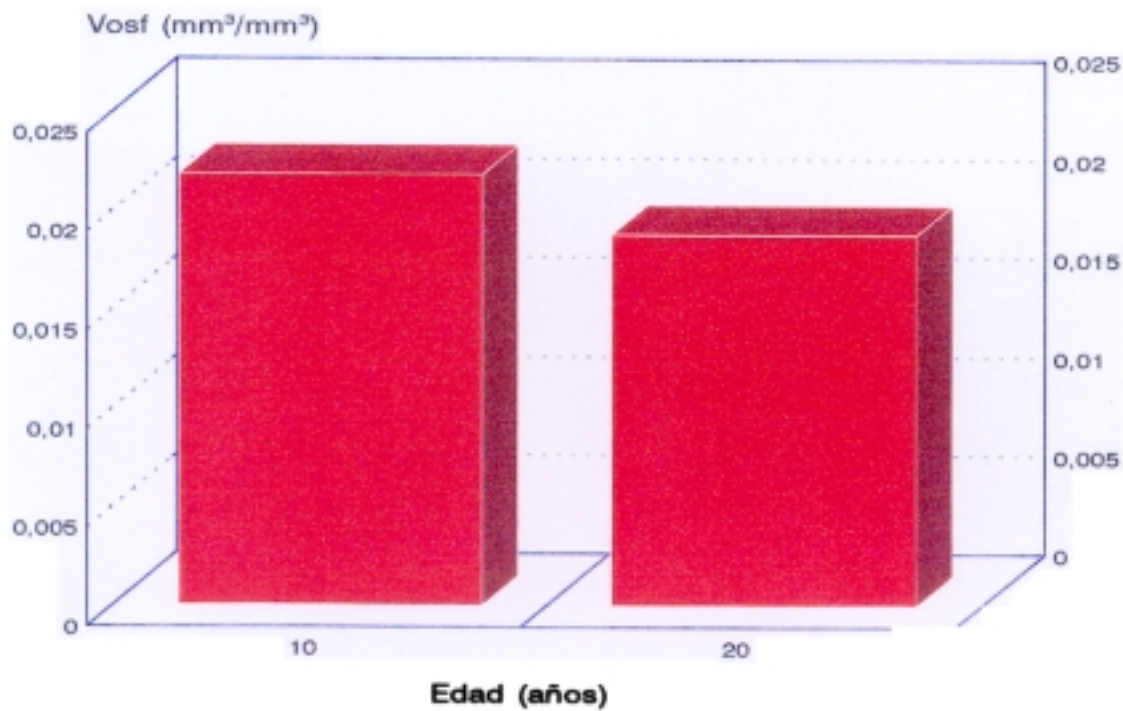


Figura 4.27.- Volumen de Osteoide (Vosf) por décadas

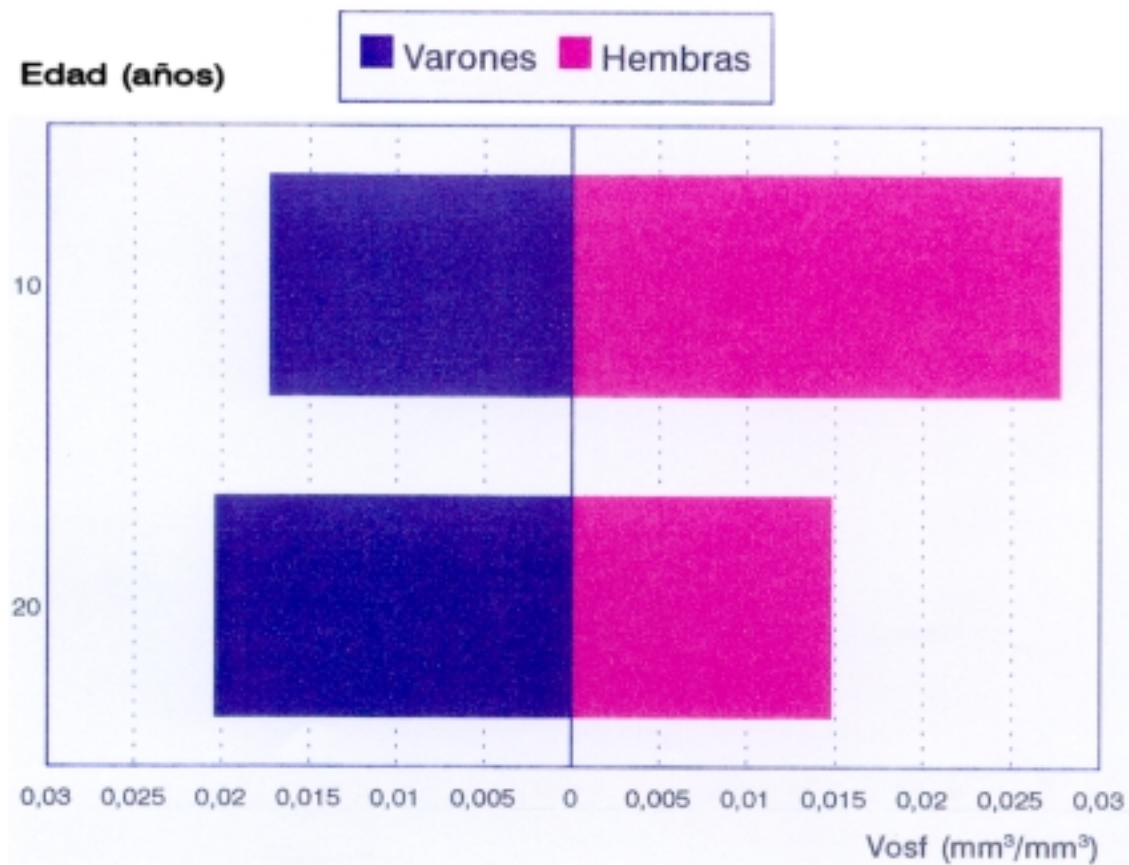


Figura 4.28.- Volumen de Osteoide (Vosf) por décadas y sexo

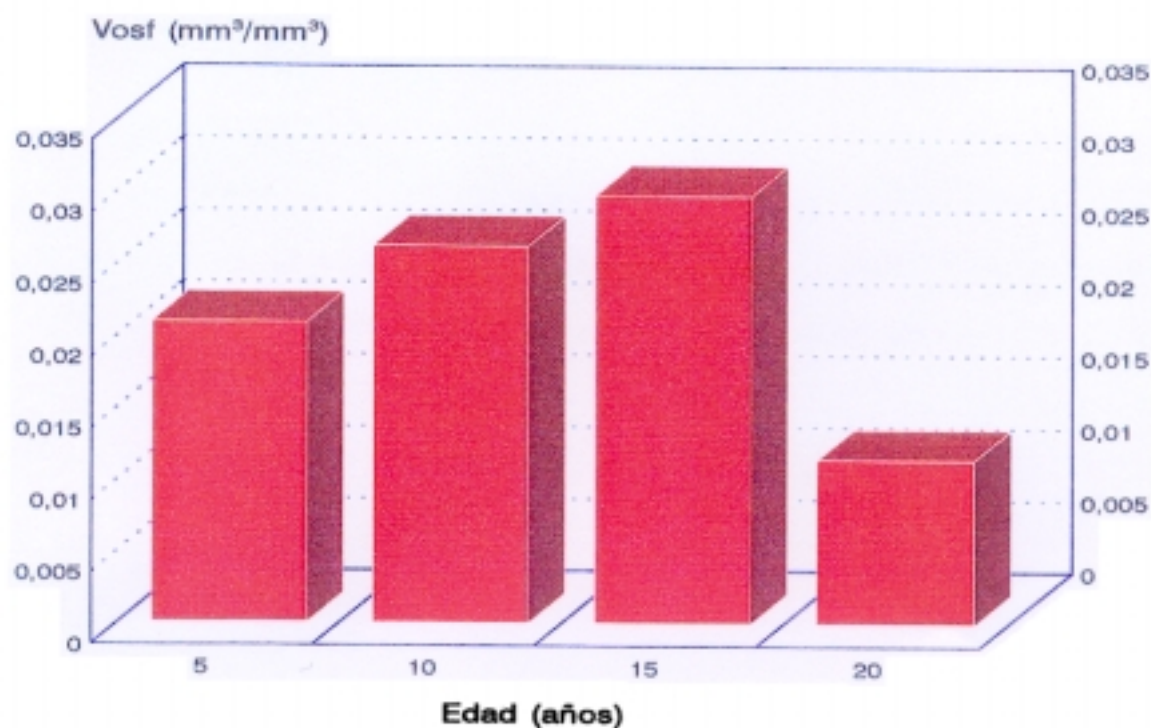


Figura 4.29.- Volumen de Osteoide (Vosf) por grupos de 5 años

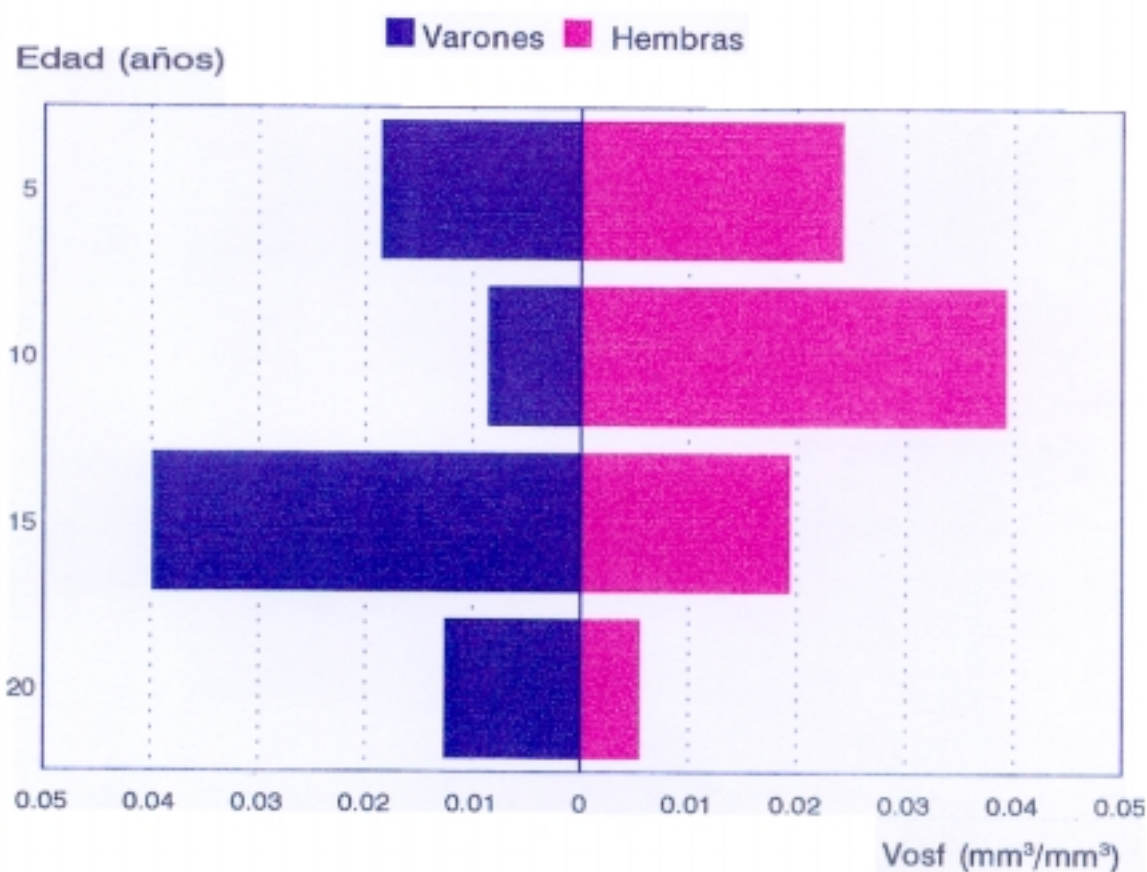


Figura 4.30.- Volumen de Osteoide (Vosf) por grupos de 5 años y sexo

La Superficie Relativa de Formación (Sf), se incrementa progresivamente, aunque de manera no significativa, en los tres primeros grupos de edad, con un pico máximo en el grupo de 10 a 15 años ($0.123 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$), y un brusco descenso en el último grupo de 15 a 20 años (Figura 4.32), por lo que la recta de regresión tiende a disminuir levemente (Figura 4.31), mientras que no se aprecian diferencias globales entre la primera y segunda década (Figura 4.33).

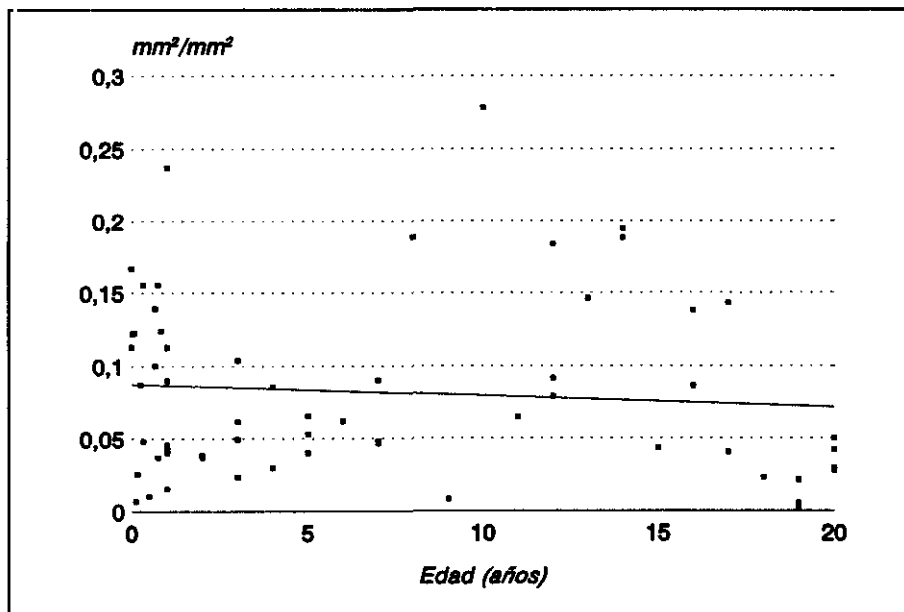


Figura 4.31.- Superficie relativa de formación.(Sf).

La distribución por sexos muestra una situación similar al volumen de osteoide (Vosf), con un valor máximo en la primera década en las hembras ($0.105 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$), y una caída significativa en la segunda década ($p < 0.05$), mientras que los varones presentan un valor máximo en la segunda década ($0.094 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$), aumentando ligeramente respecto de la primera (Figura 4.34). 4.33

En cuanto a la distribución por sexos en los grupos de edad de cinco años, los valores son en general mayores para las hembras en los dos primeros, con un incremento aparentemente significativo en el grupo de 5 a 10 años ($0.151 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$), mientras que los varones presentan un pico máximo en el grupo de 10 a 15 años ($0.178 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$) (Figura 4.35).

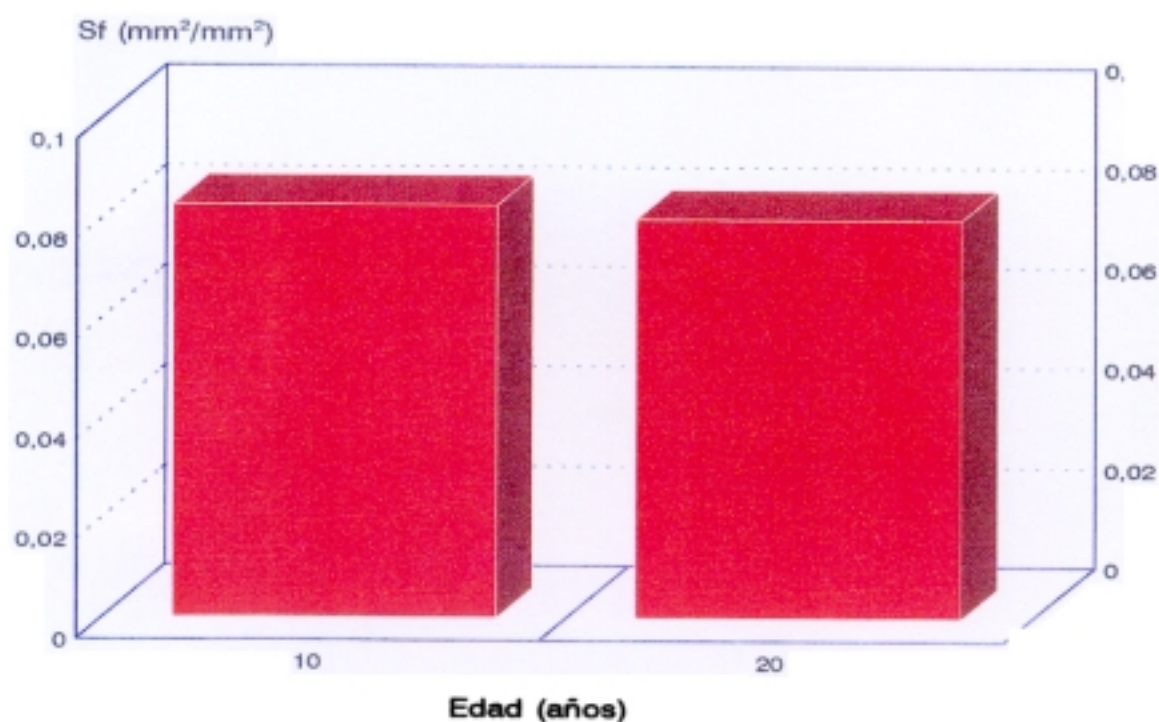


Figura 4.32.- Superficie Relativa de Formación por décadas

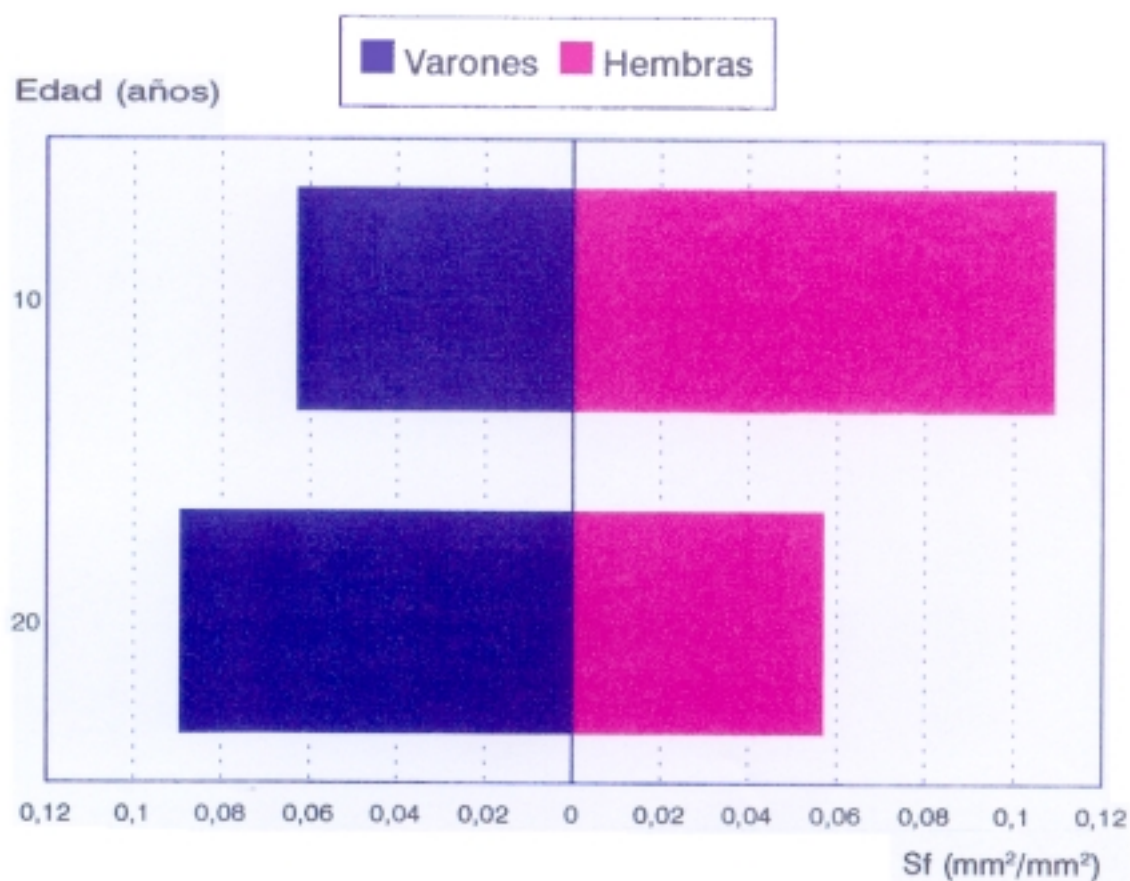


Figura 4.33.- Superficie Relativa de Formación por décadas y sexo

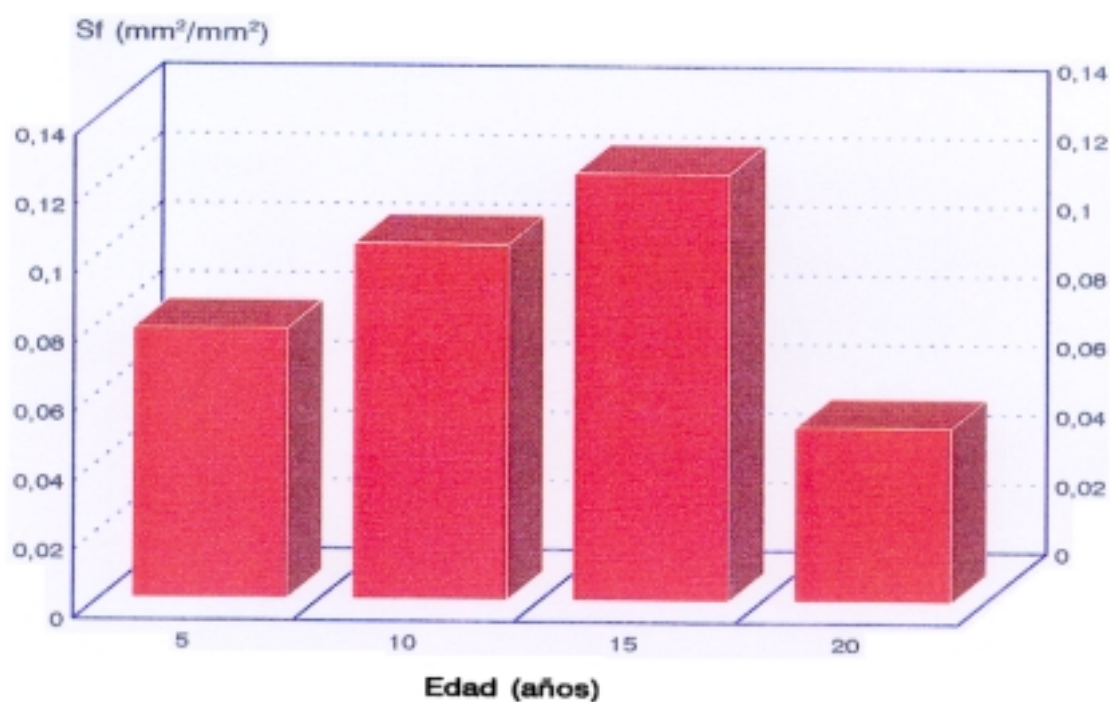


Figura 4.34.- Superficie Relativa de Formación por grupos de 5 años

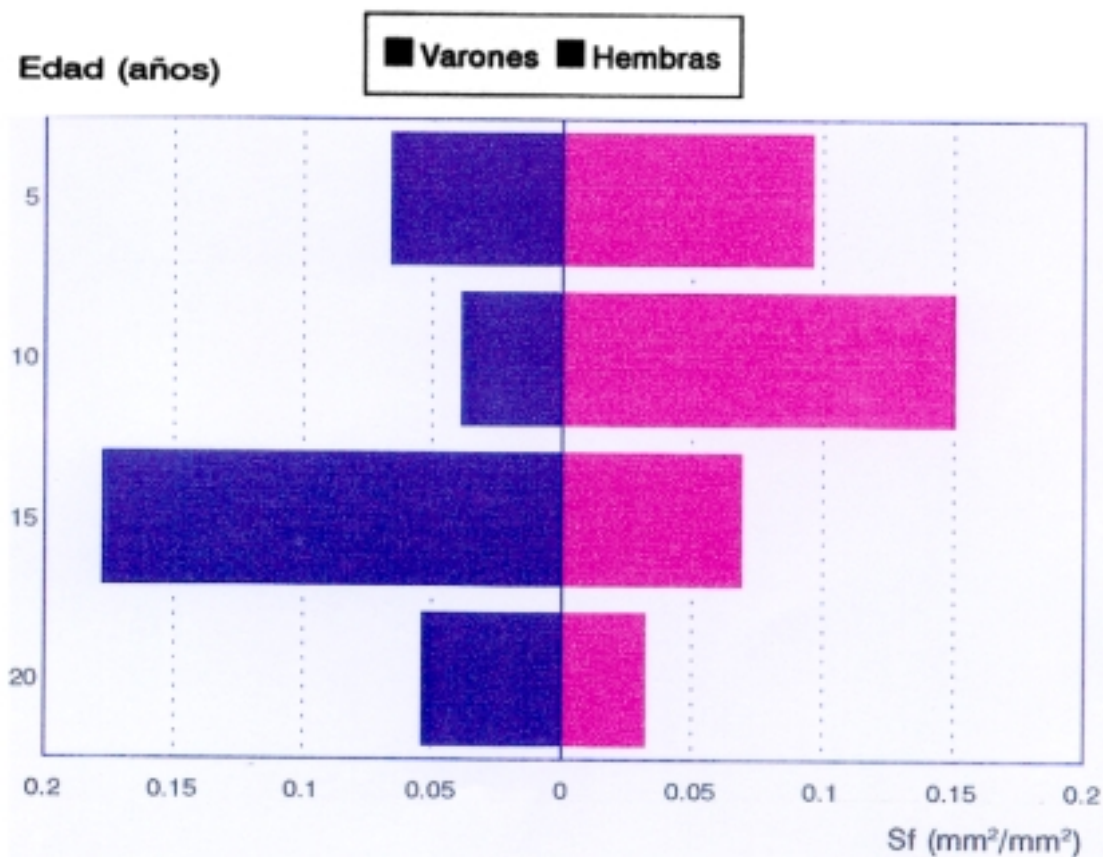


Figura 4.35.- Superficie Relativa de Formación por grupos de 5 años y sexo

La Superficie de Formación Activa (Sfa), muestra una tendencia representada por la correspondiente recta de regresión a disminuir (Figura 4.36), con un descenso de la primera a la segunda década (Figura 4.37), debido al comportamiento del grupo femenino que muestra un valor máximo en la primera década de la vida ($0.0257 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$), y desciende bruscamente y de manera significativa ($p < 0.001$) en la segunda, mientras en los varones aumenta levemente, con un valor máximo en la segunda década ($0.0169 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$) (Figura 4.38).

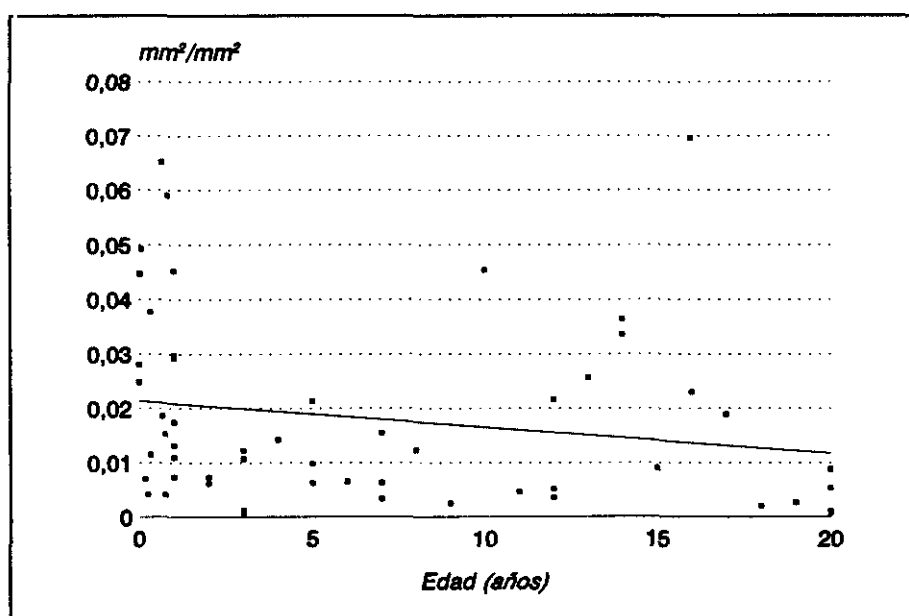


Figura 4.36.- Superficie Osteoblástica activa.(Sfa).

En la distribución por grupos de cinco años se observan dos picos máximos en el grupo de edad de 0 a 5 años ($0.027 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$) y de 10 a 15 años ($0.0096 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$) (Figura 4.39), con variaciones para los varones similares a Sf, aumentando en el grupo de edad de 10 a 15 años ($0.025 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$), mientras las hembras presentan un máximo en los primeros cinco años, para disminuir paulatinamente en el resto de los grupos (Figura 4.40).

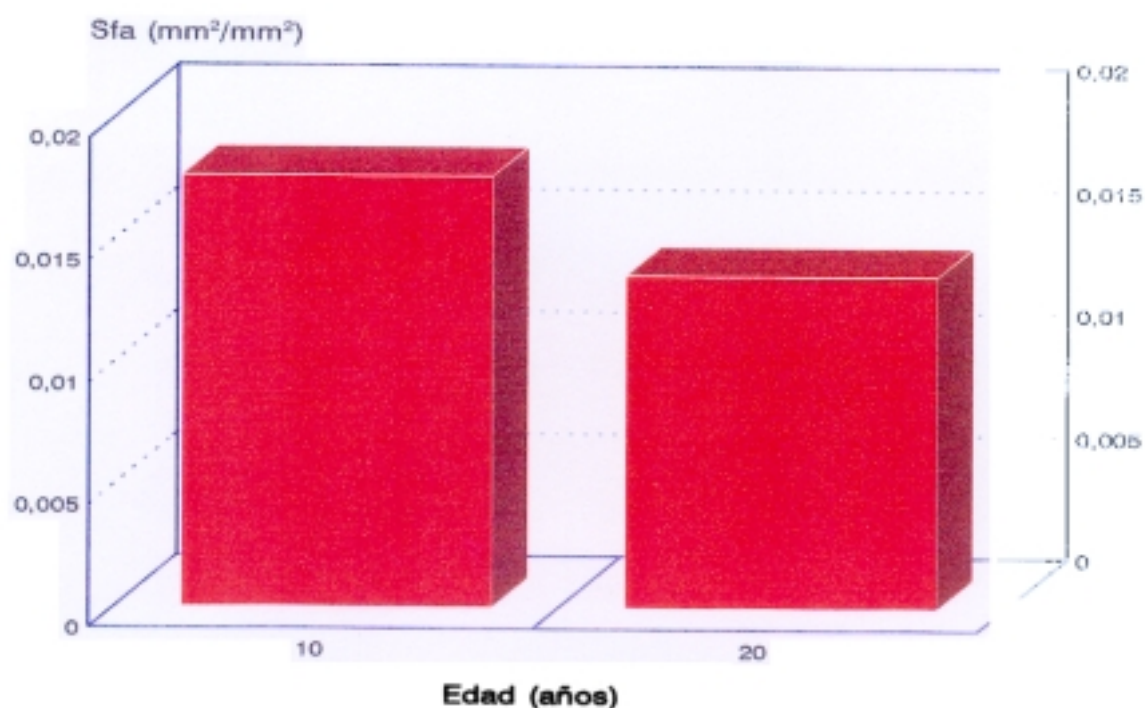


Figura 4.37.- Superficie Osteoblástica Activa por décadas

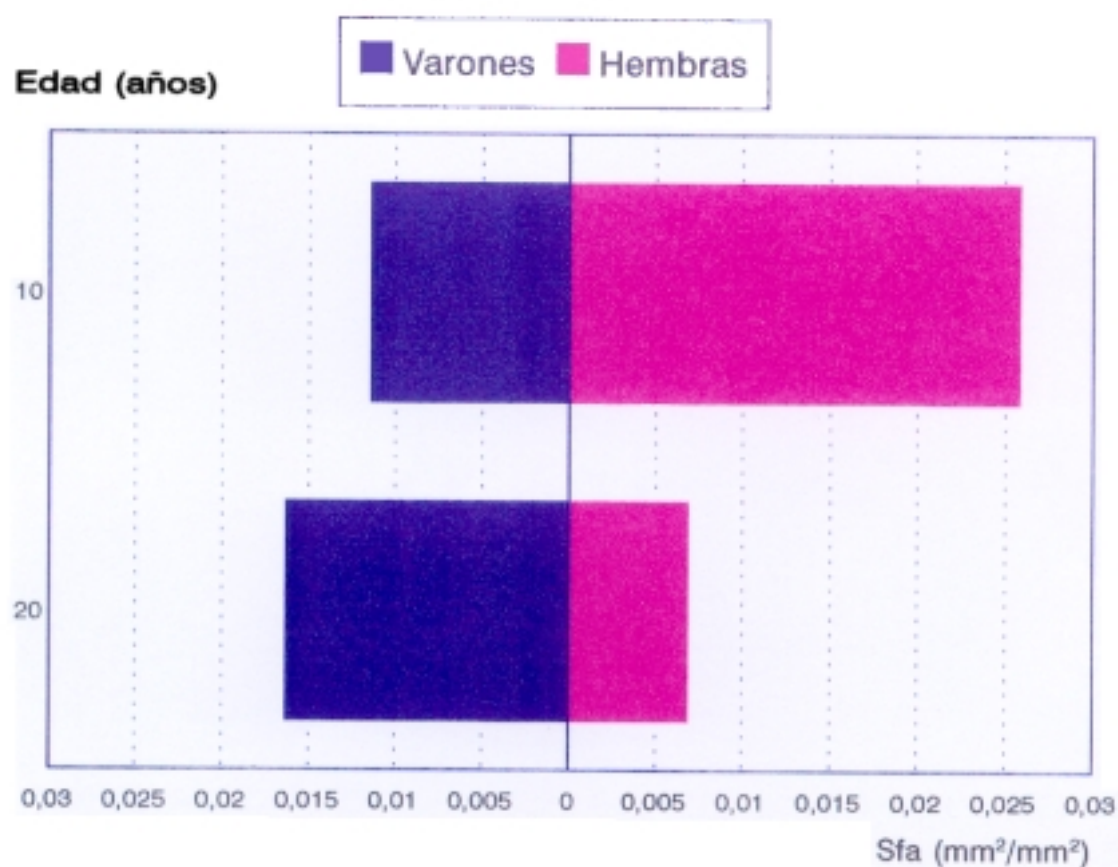


Figura 4.38.- Superficie Osteoblástica Activa por décadas y sexo

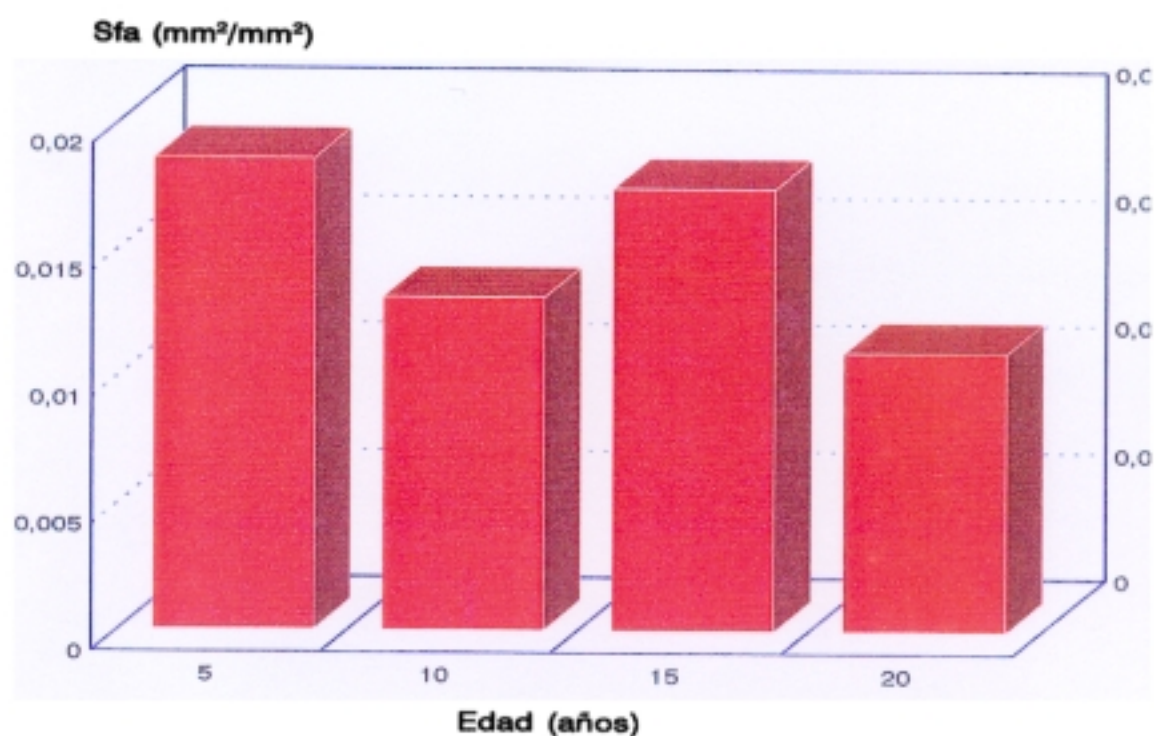


Figura 4.39.- Superficie Osteoblástica Activa por grupos de 5 años

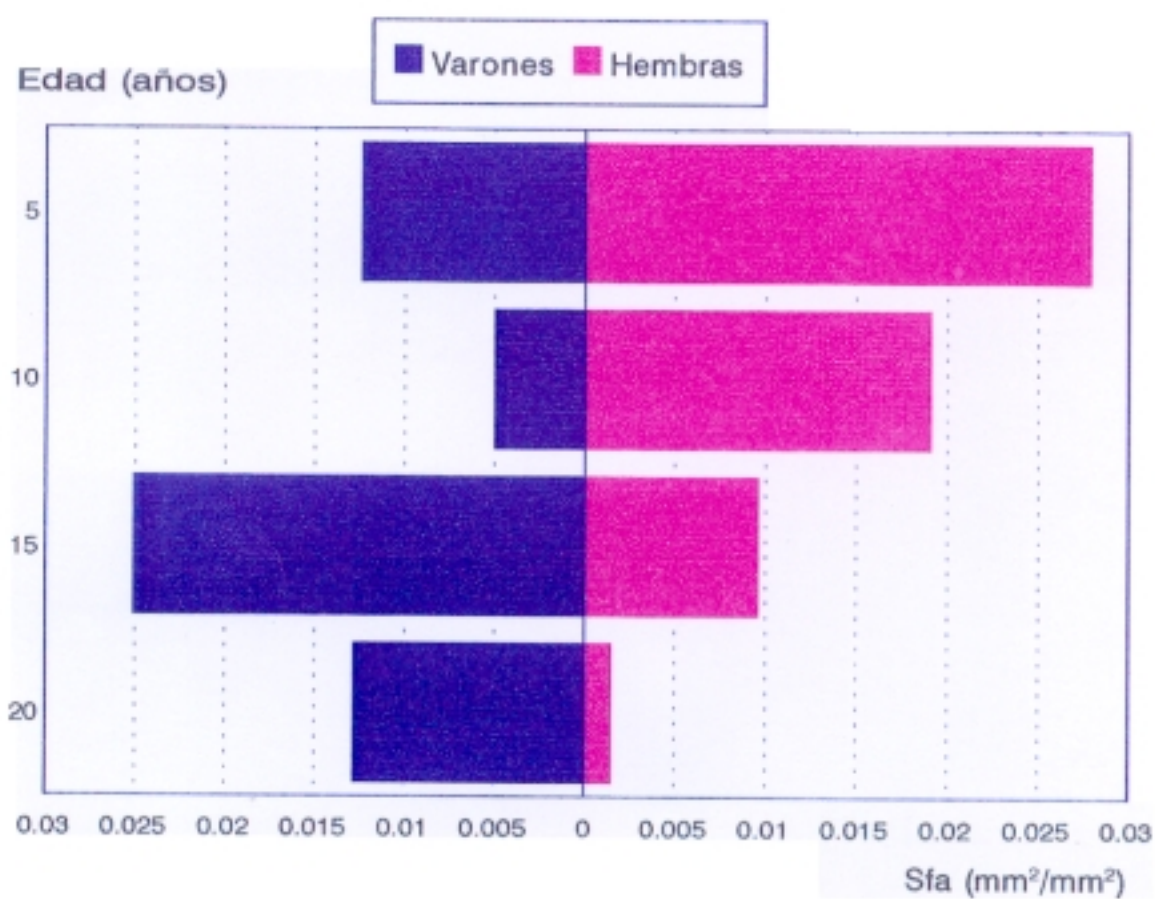


Figura 4.40.- Superficie Osteoblástica Activa por grupos de 5 años y sexo

La Superficie de Osteoide con Osteoblastos Cúbicos (OBOID), presenta una clara tendencia a disminuir (Figura 4.41), que se refleja en un descenso significativo de la primera a la segunda décadas ($p < 0.05$) (Figura 4.42), en ambos sexos, aunque con una mayor caída en las hembras (Figura 4.43).

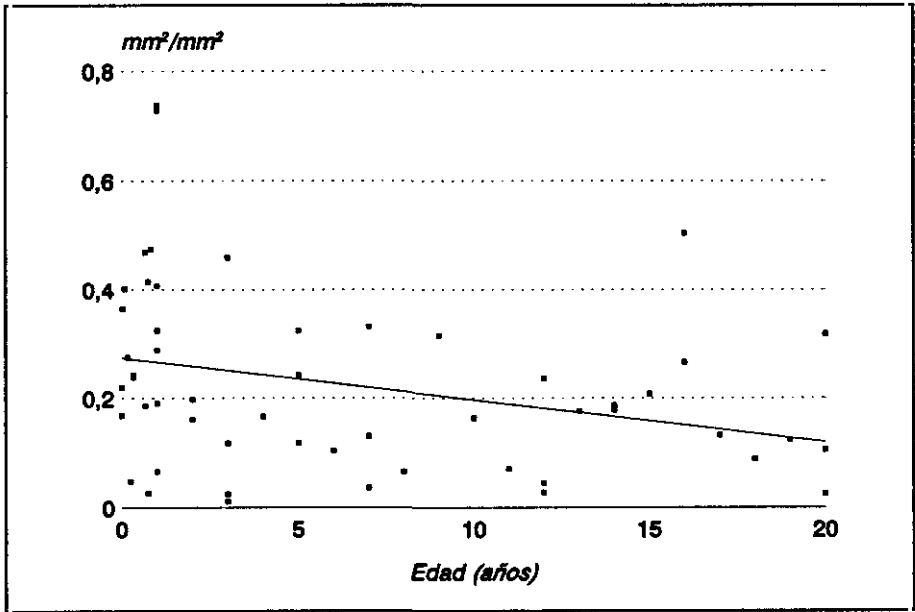


Figura 4.41.- Superficie relativa de Osteoide con Osteoblastos cúbicos.(OBOID).

Es más alta en los primeros cinco años de la vida ($0.248 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$) (Figura 4.44). En la distribución por sexos, el sexo masculino sigue una disposición similar, mientras el femenino muestra una brusca caída en el grupo de edad de 5 a 10 años ($0.149 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$), para posteriormente seguir constante y disminuir en el grupo de 15 a 20 años (Figura 4.45).

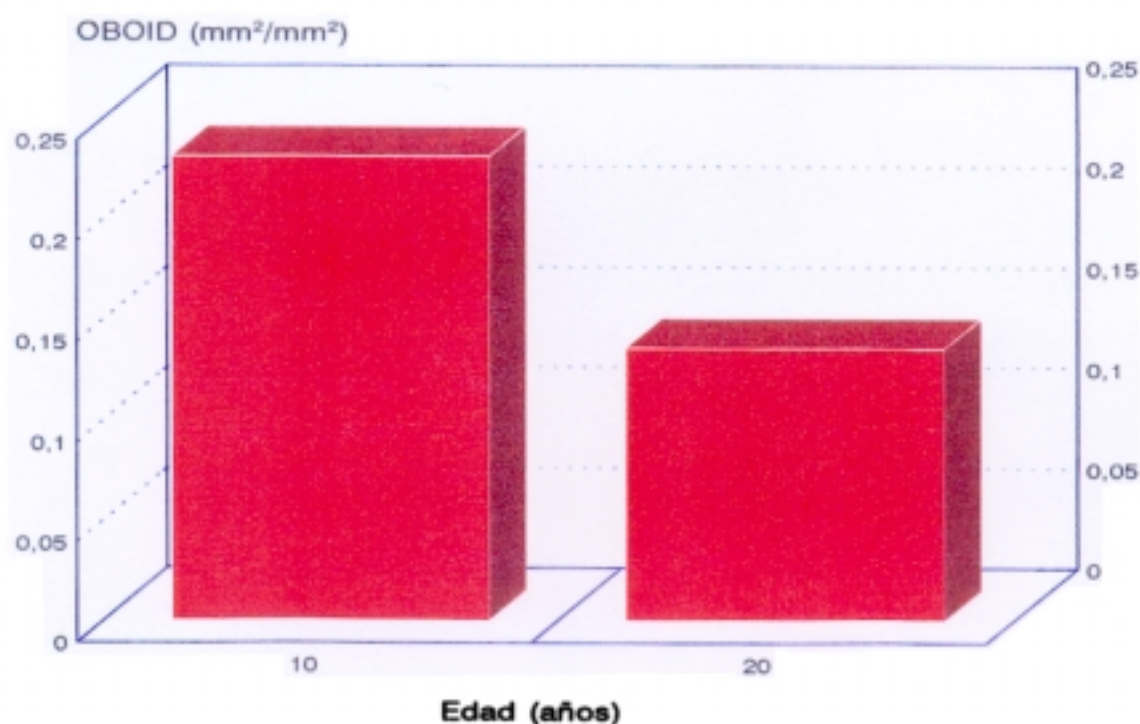


Figura 4.42.- Superficie Relativa de Osteoide con Osteoblastos Cúbicos por décadas

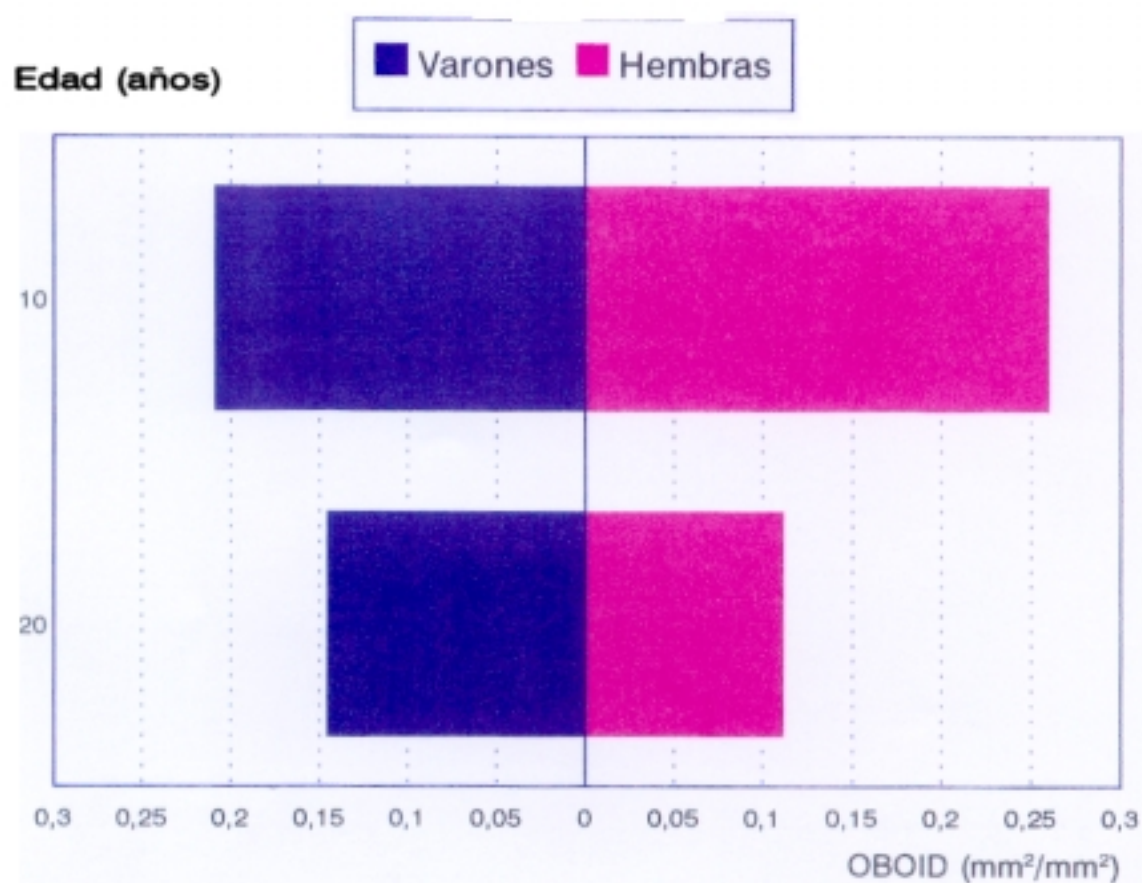


Figura 4.43.- Superficie Relativa de Osteoide con Osteoblastos Cúbicos por décadas y sexo

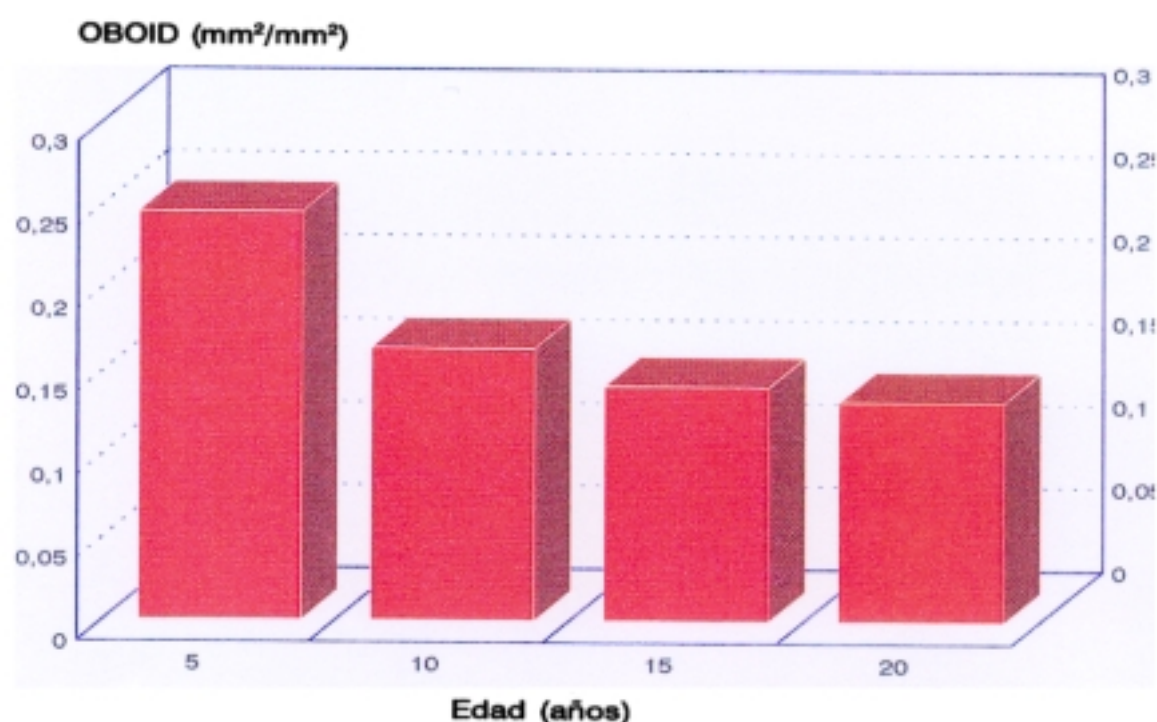


Figura 4.44.- Superficie Relativa de Osteoide con Osteoblastos Cúbicos por grupos de 5 años

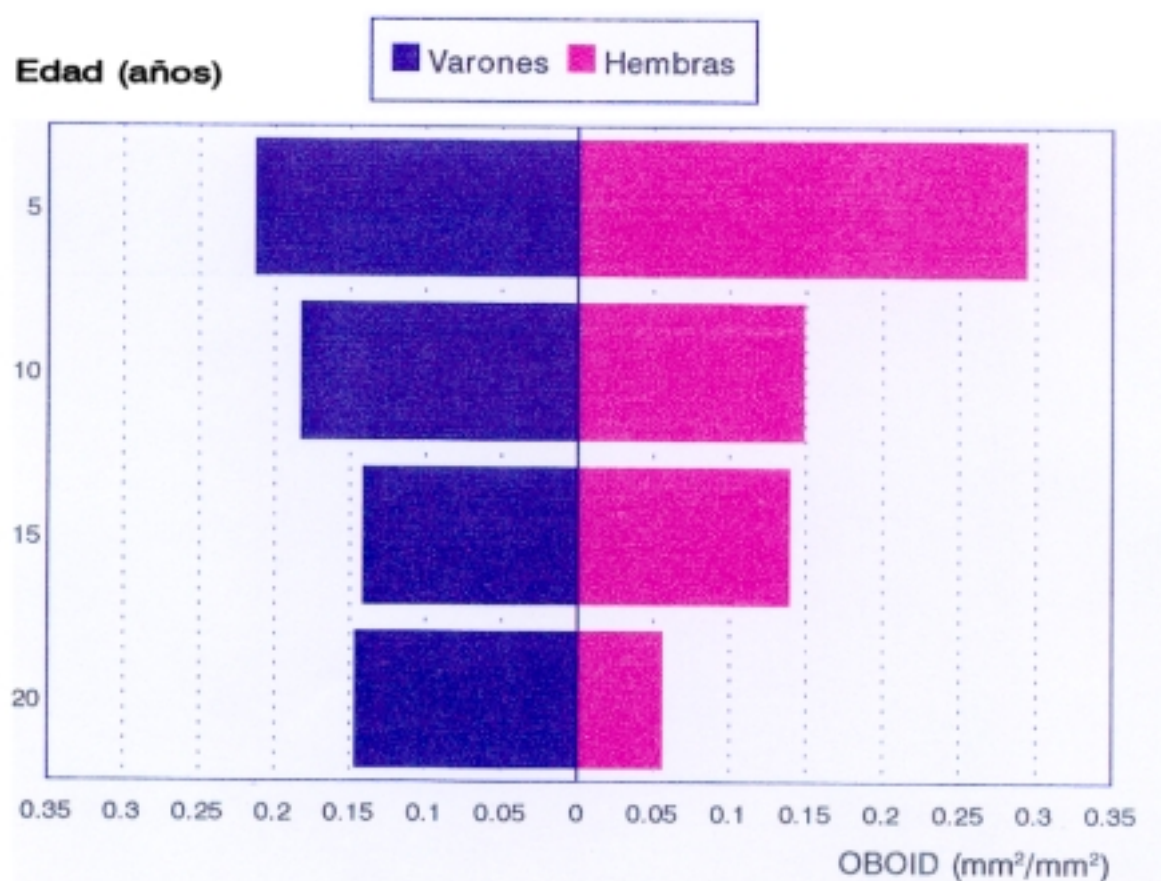


Figura 4.45.- Superficie Relativa de Osteoide con Osteoblastos Cúbicos por grupos de 5 años y sexo

La Anchura Media de los Ribetes de Osteoide (WOS), presenta una tendencia a aumentar, representada por la correspondiente recta de regresión (Figura 4.46), observándose un ligero aumento global, significativo ($p < 0.01$), de la primera a la segunda década (Figura 4.47), situación que se observa de manera similar en ambos sexos (Figura 4.48).

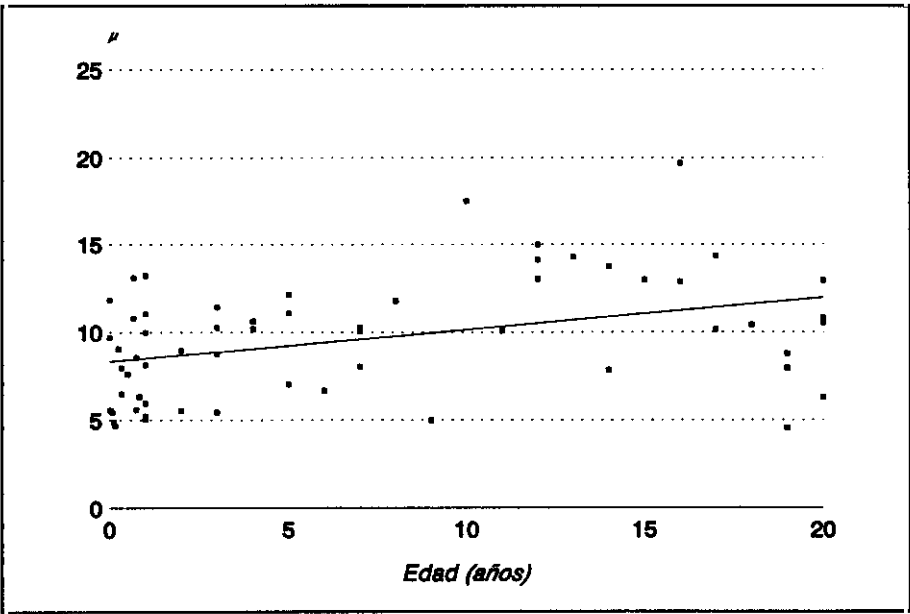


Figura 4.46.- Anchura Media de los Ribetes de Osteoide (WOS).

La distribución por grupos de cinco años revela un aumento en el grupo de 10 a 15 años (Figura 4.49), coincidiendo con el valor máximo en los varones (16.17μ). Por su parte, el sexo femenino muestra un aumento del grupo de 0 a 5 al de 5 a 10 años (15.13μ), disminuyendo nuevamente en el de 15 a 20 años (Figura 4.50).

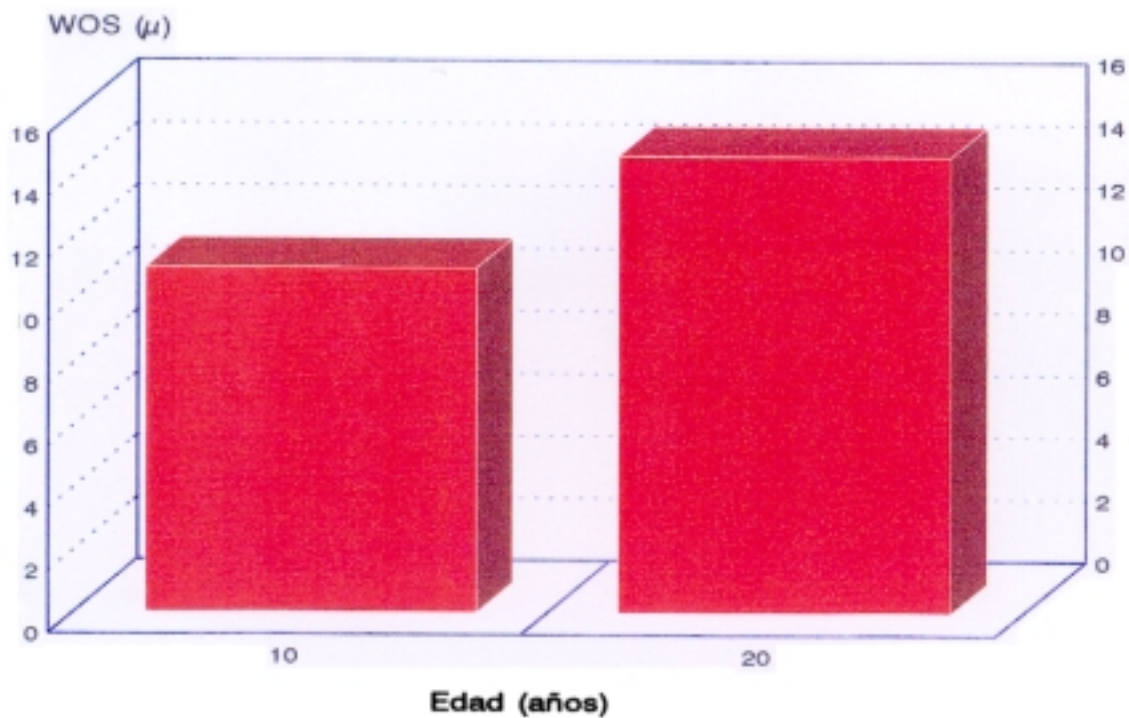


Figura 4.47.- Anchura Media de los Ribetes de Osteoide por décadas

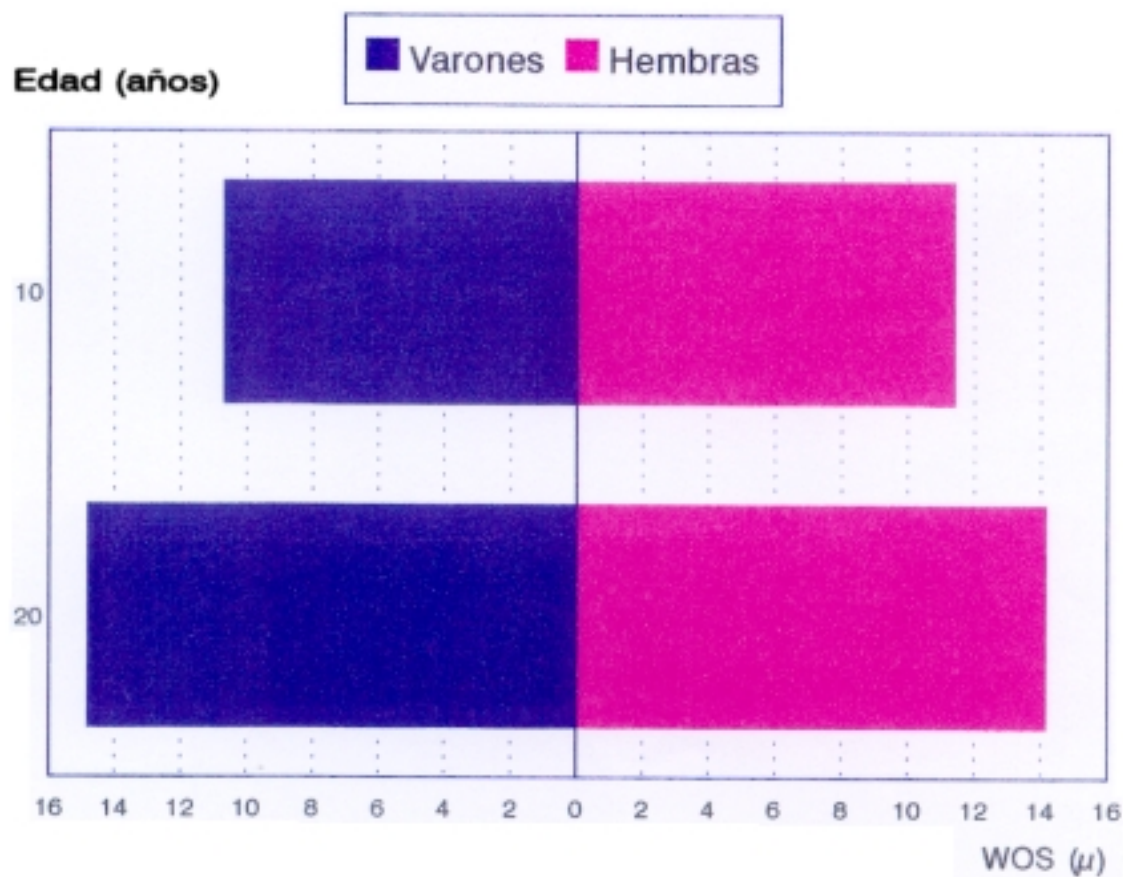


Figura 4.48.- Anchura Media de los Ribetes de Osteoide por décadas y sexo

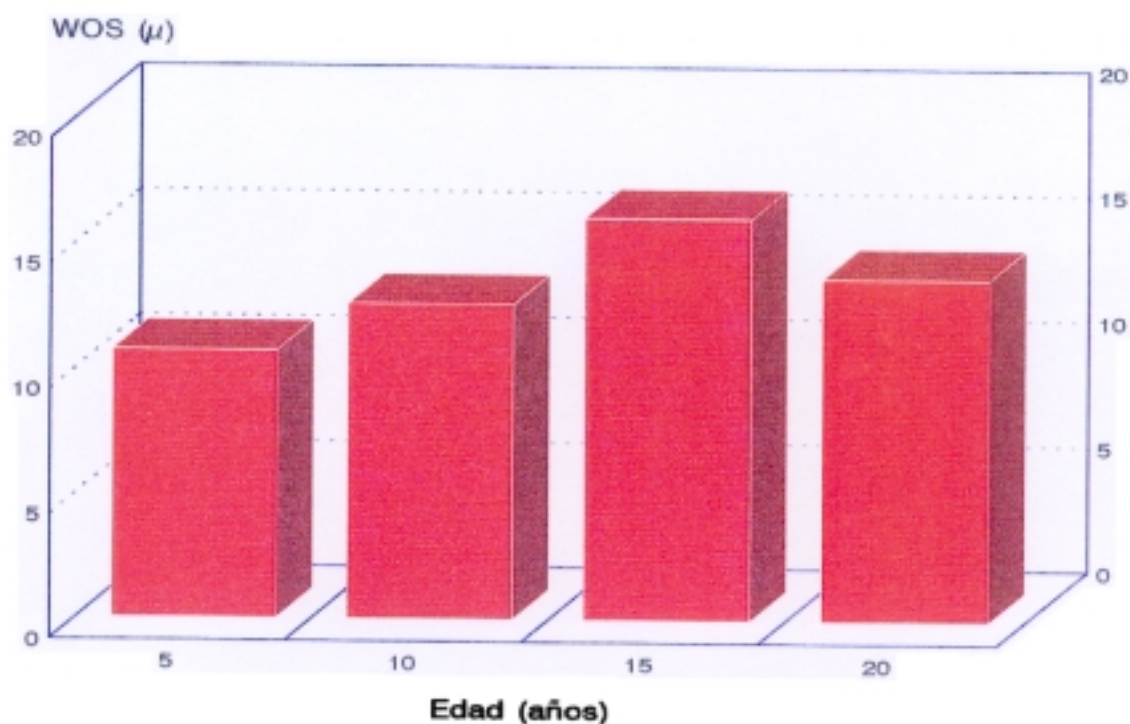


Figura 4.49.- Anchura Media de los Ribetes de Trabeculares de Osteoide por grupos de 5 años

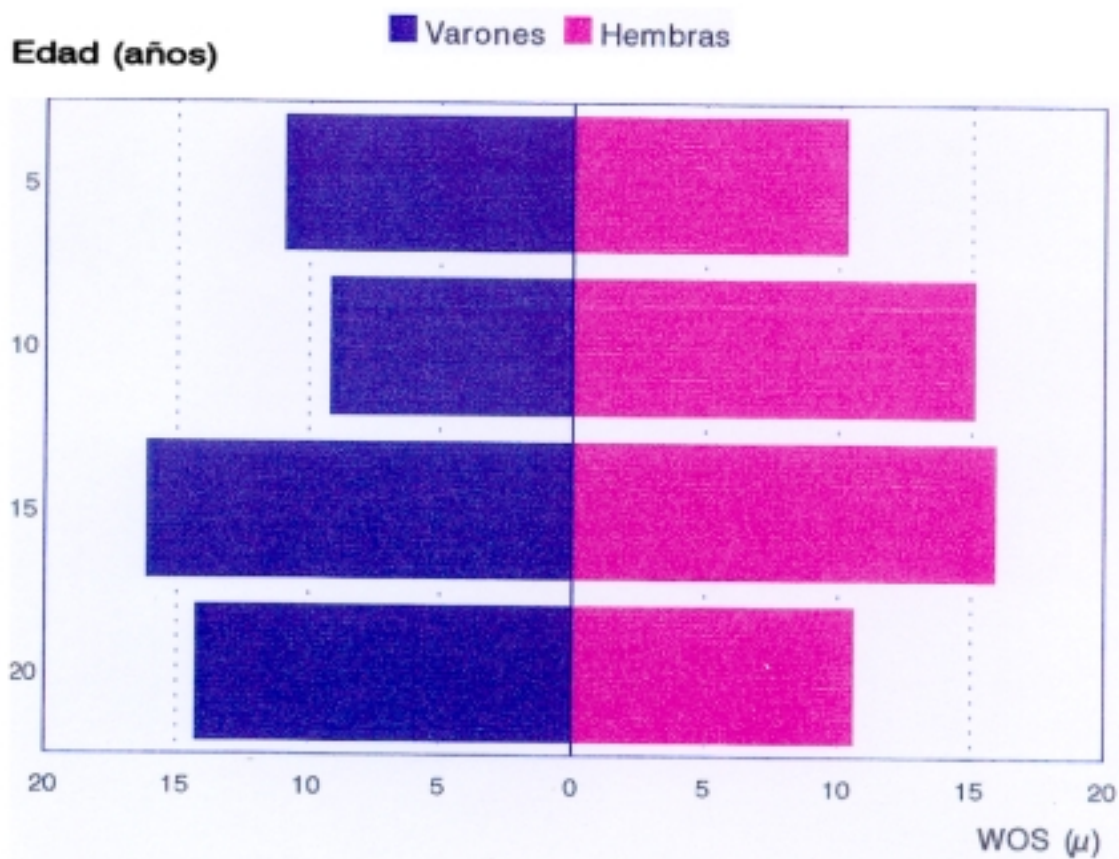


Figura 4.50.- Anchura Media de los Ribetes Trabeculares de Osteoide por grupos de 5 años y sexo

El **Espesor Medio de los Ribetes de Osteoide (MOST)**, se comporta de manera idéntica al anterior. Muestra una tendencia a aumentar con la edad, tal y como puede advertirse en la recta de regresión correspondiente (Figura 4.51), observándose, así mismo, un aumento significativo ($p < 0.01$) de la primera a la segunda década (Figura 4.52), que se cumple de manera similar en ambos sexos (Figura 4.53).

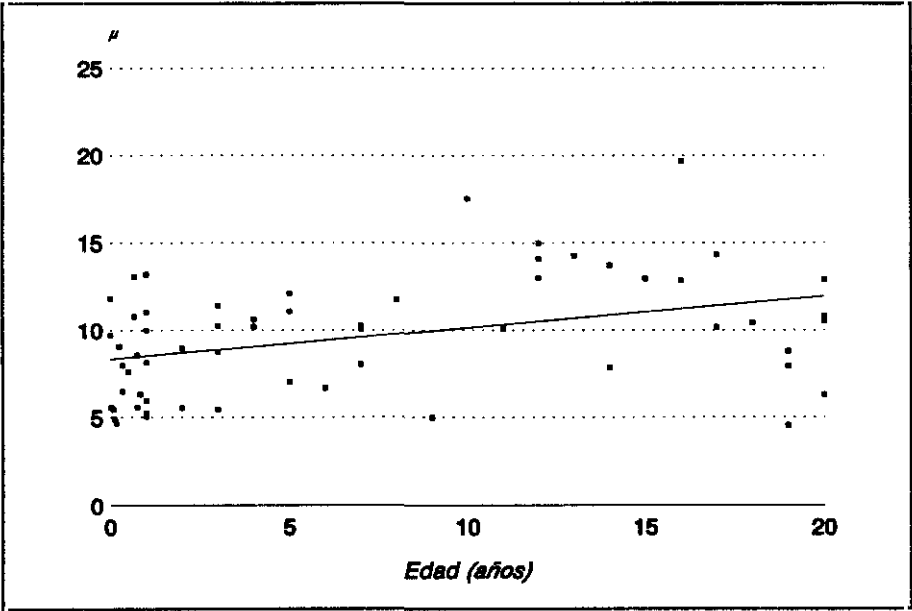


Figura 4.51. -Espesor Medio de los Ribetes de Osteoide (MOST).

La distribución por grupos de cinco años, muestra un aumento en el grupo de 10 a 15 años (Figura 4.54), coincidiendo también, como en el parámetro anterior, con el valor máximo para los varones (12.70μ). El sexo femenino presenta un aumento del grupo de 0 a 5 al de 5 a 10 años (11.88μ), disminuyendo nuevamente en el de 15 a 20 años (Figura 4.55).

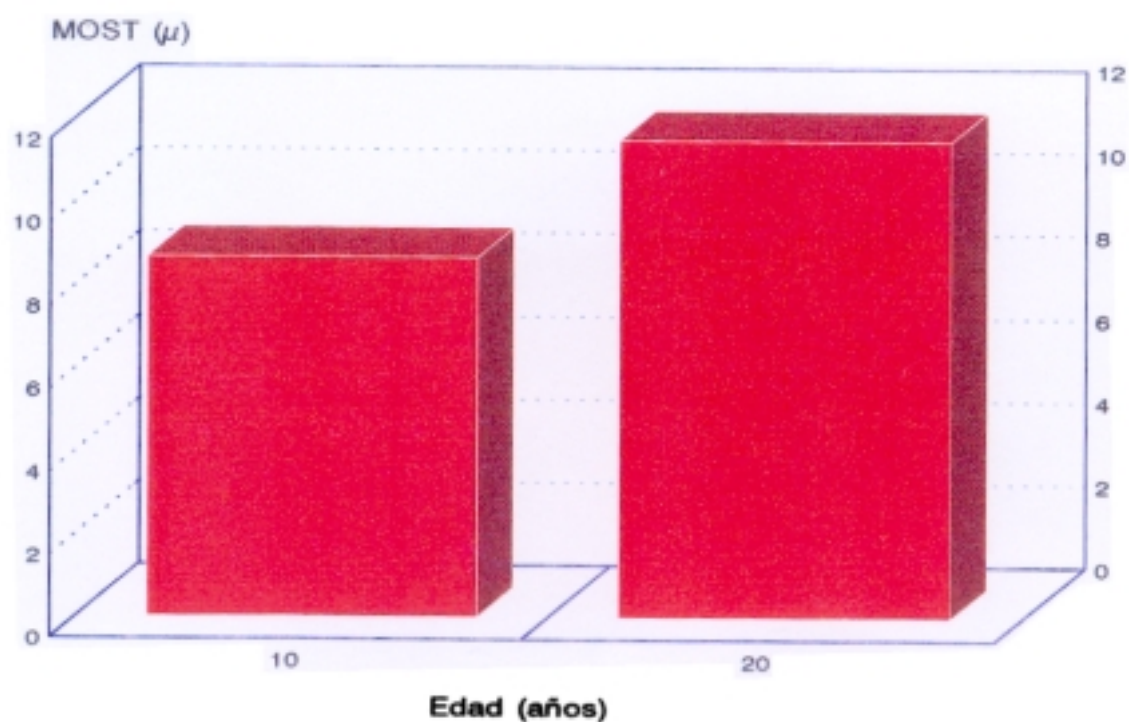


Figura 4.52.- Espesor Medio de los Ribetes de Osteoide por décadas

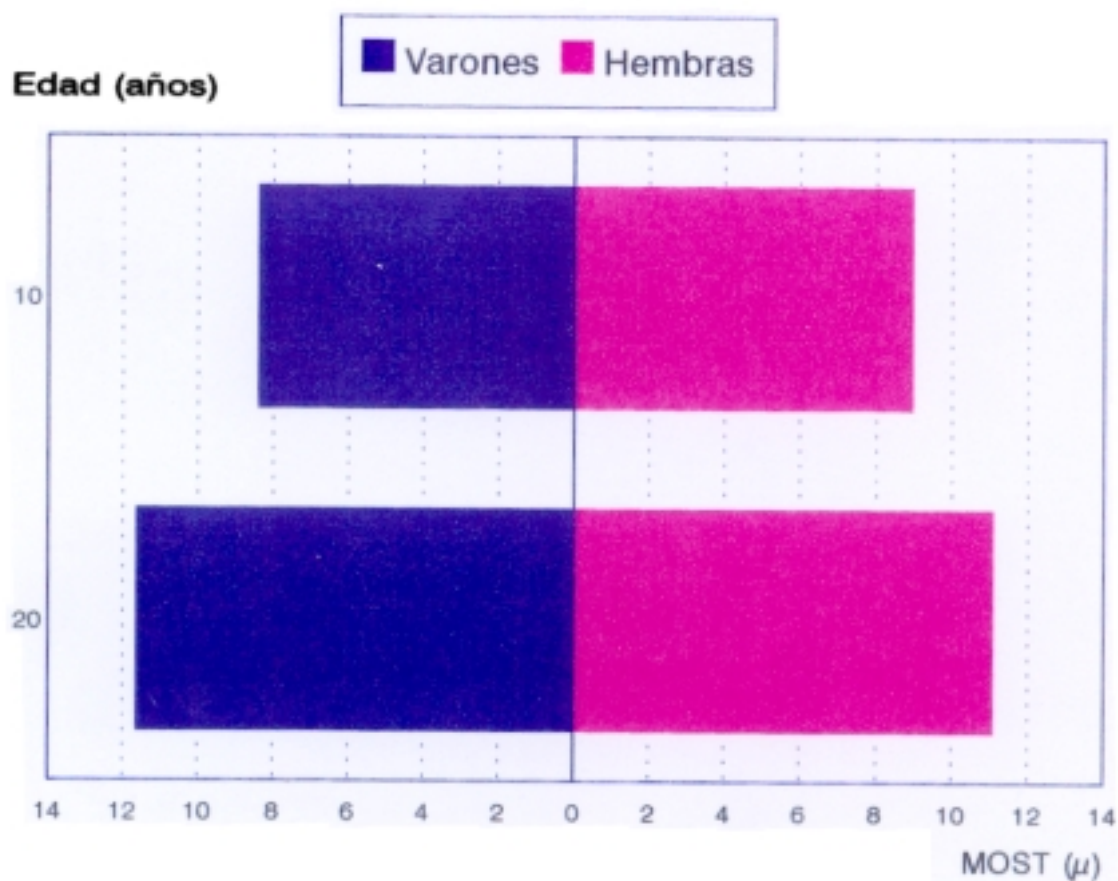


Figura 4.53.- Espesor Medio de los Ribetes de Osteoide por décadas y sexo

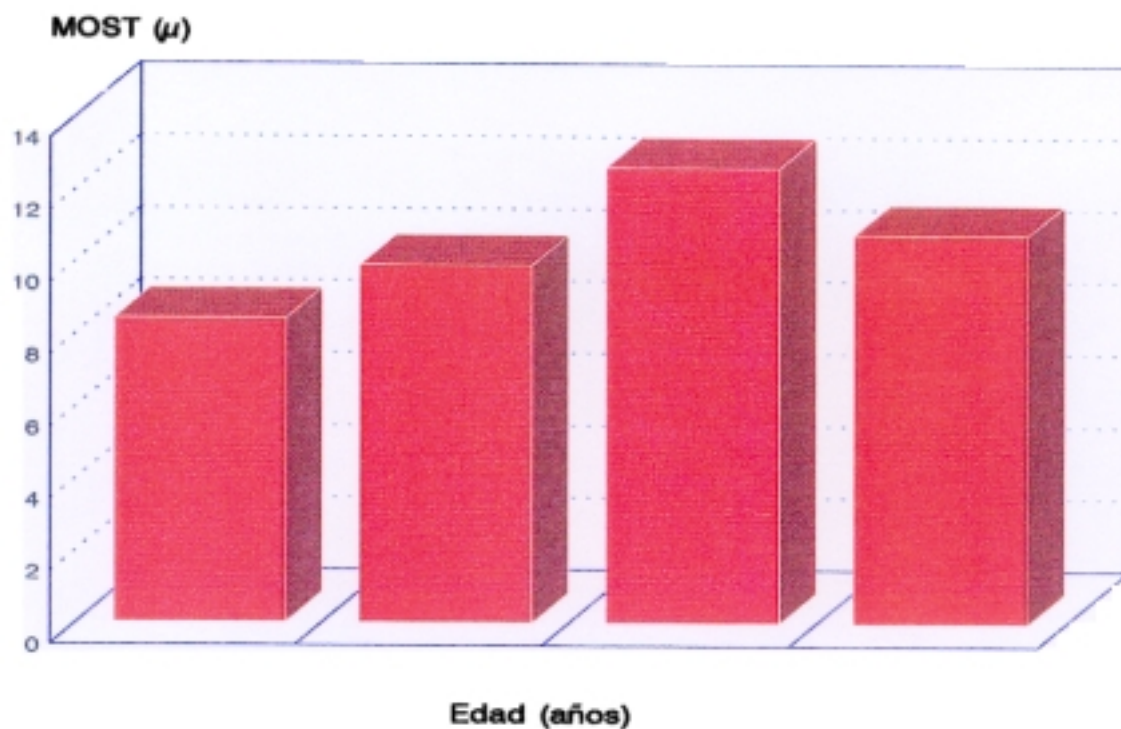


Figura 4.54.- Espesor Medio de los Ribetes Trabeculares de Osteoide por grupos de 5 años

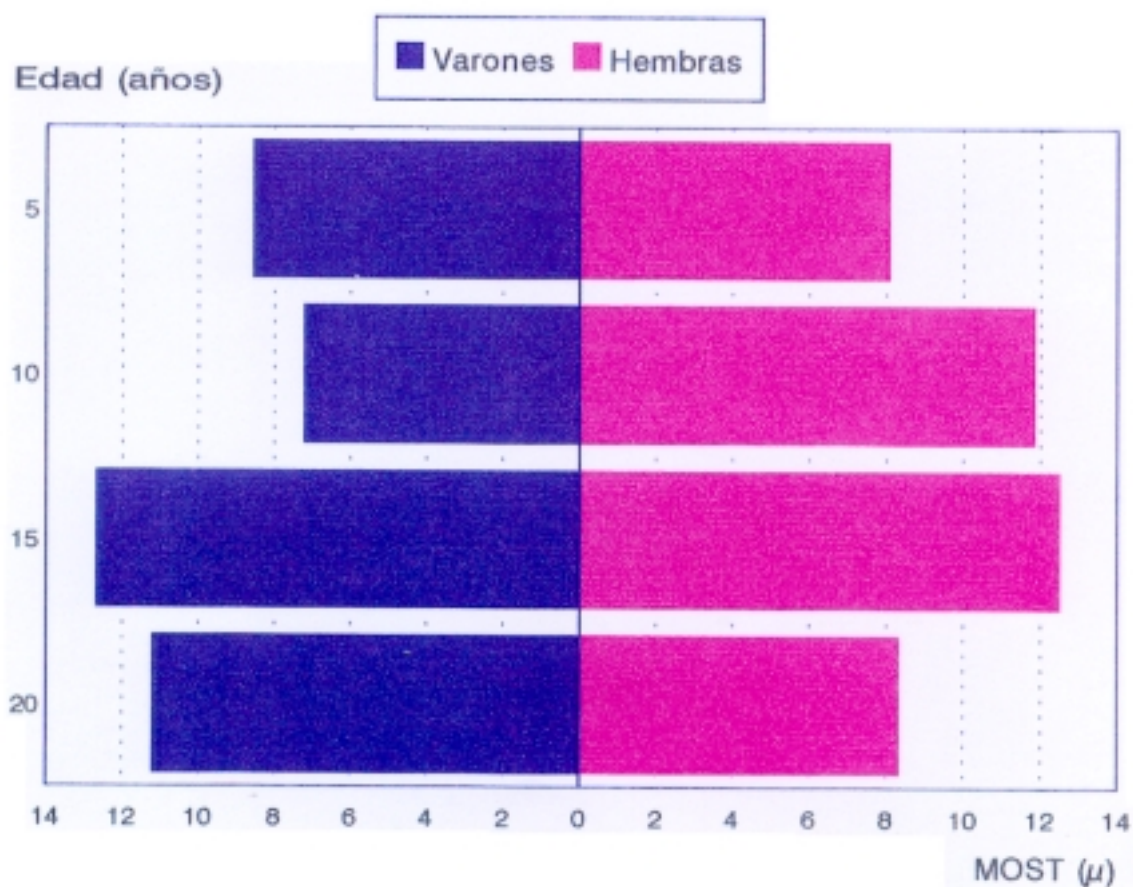


Figura 4.55.- Espesor Medio de los Ribetes Trabeculares de Osteoide por grupos de 5 años y sexo

Parámetros de Reabsorción Osea

La Superficie de Reabsorción (Sr), muestra una tendencia a descender, representada por la recta de regresión (Figura 4.56), con un descenso significativo ($p < 0.05$) en la segunda década respecto a la primera (Figura 4.57), que se observa de manera similar en ambos sexos (Figura 4.58).

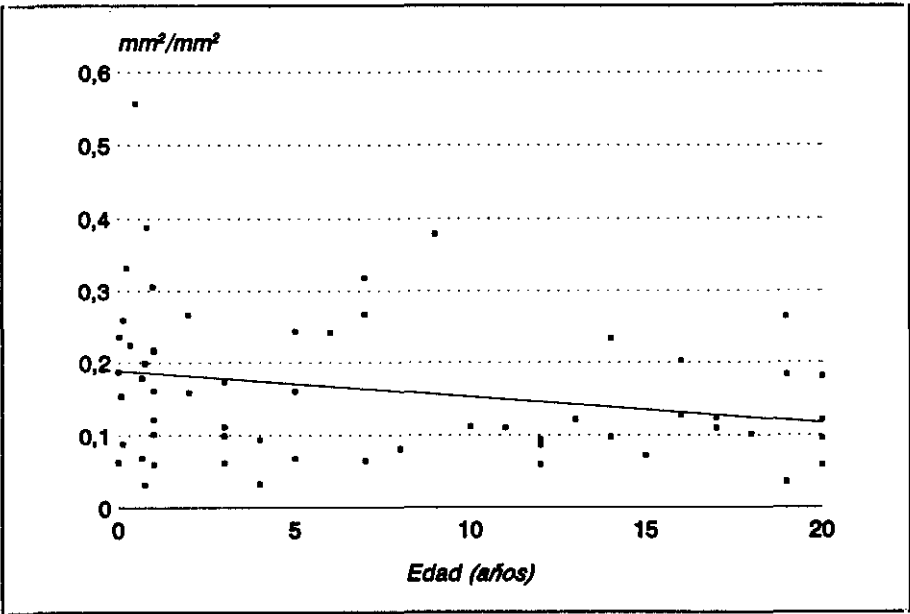


Figura 4.56.- Superficie relativa de reabsorción.(Sr).

En la distribución por grupos de cinco años, se observa un máximo valor en el grupo de 5 a 10 años ($0.209 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$), con una caída casi significativa ($p < 0.1$) en el grupo siguiente de 10 a 15 años ($0.109 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$) (Figura 4.59). Este comportamiento es similar en el grupo de varones ($0.295 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$ en el grupo de 5 a 10 años), mientras que las hembras muestran su máximo valor en el grupo de 0 a 5 ($0.189 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$) (Figura 4.60).

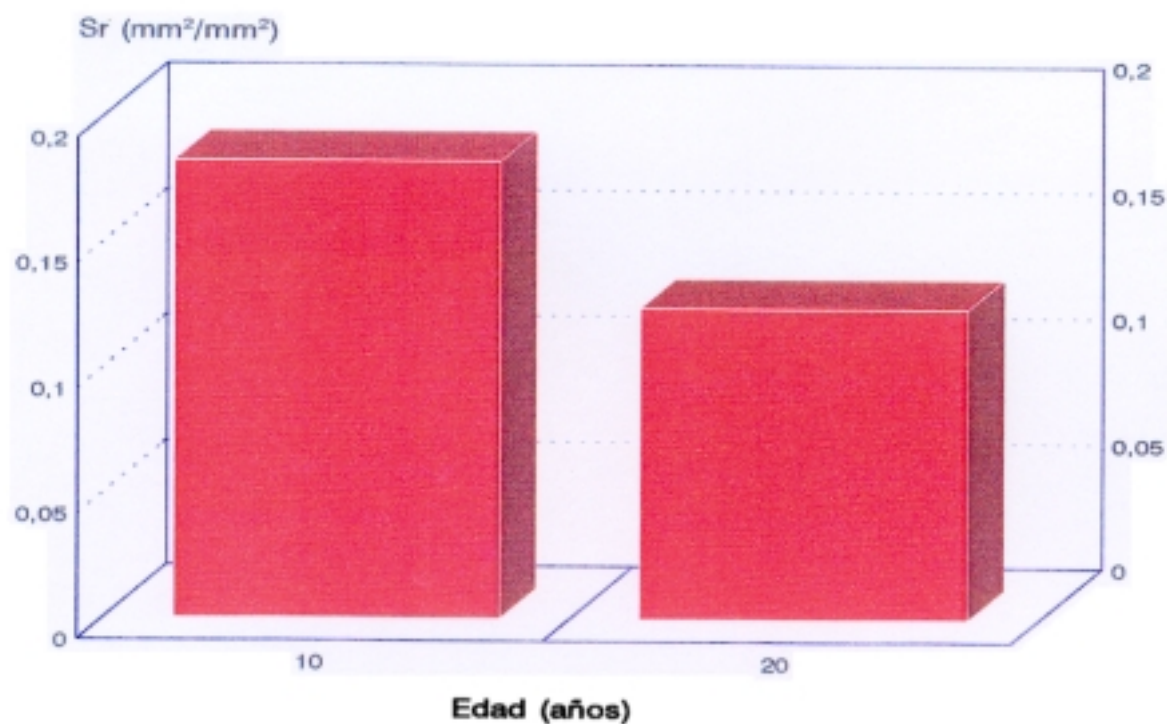


Figura 4.57.- Superficie Relativa de Reabsorción por décadas

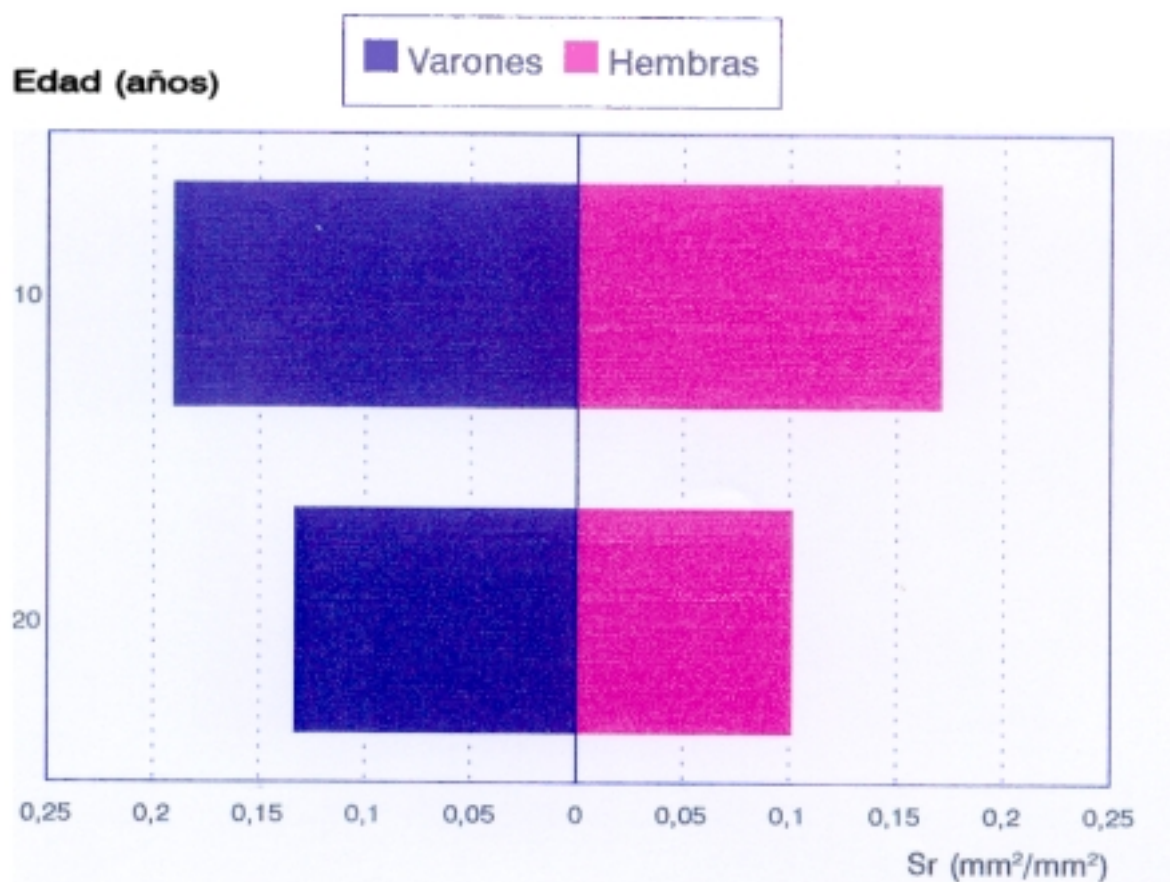


Figura 4.58.- Superficie Relativa de Reabsorción por décadas y sexo

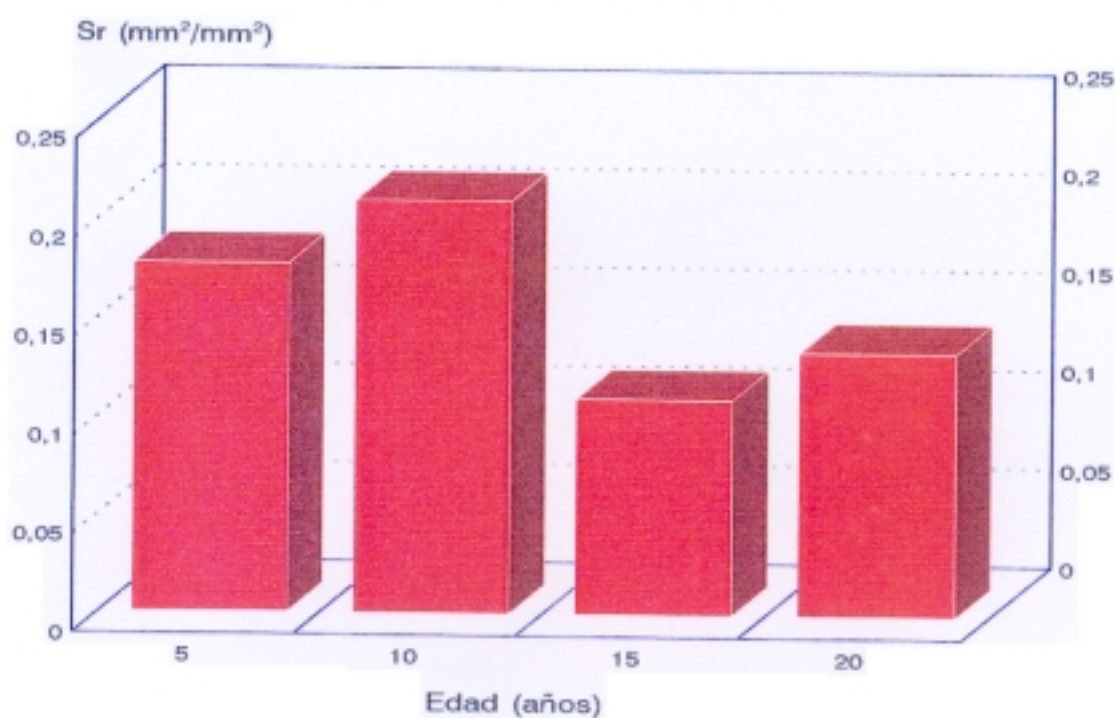


Figura 4.59.- Superficie Relativa de Reabsorción por grupos de 5 años

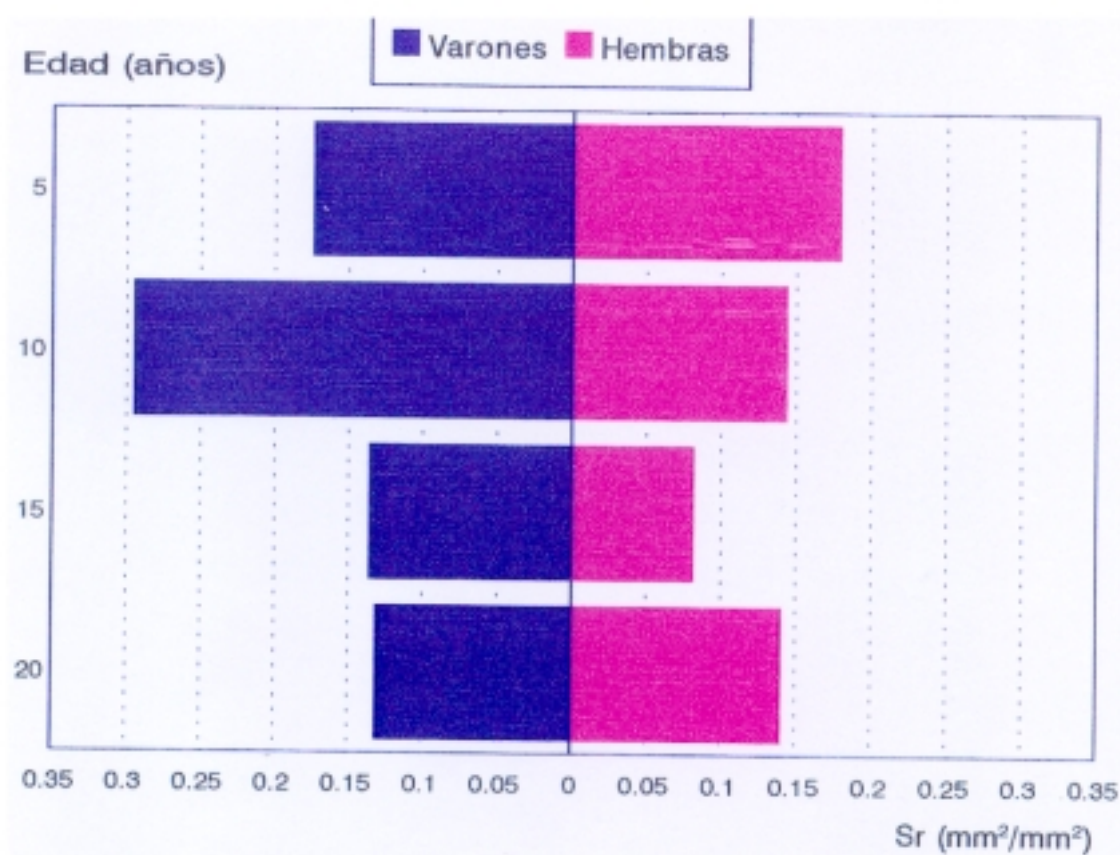


Figura 4.60.- Superficie Relativa de Reabsorción por grupos de 5 años y sexo

La Superficie de Reabsorción Activa (Sra), muestra una tendencia al descenso, representada por la recta de regresión (Figura 4.61). Esta tendencia se refleja en la distribución global por décadas (Figura 4.62), aunque en la distribución por sexos se observa una caída significativa ($p < 0.01$) en las hembras, mientras que en los varones no es tan apreciable (Figura 4.63).

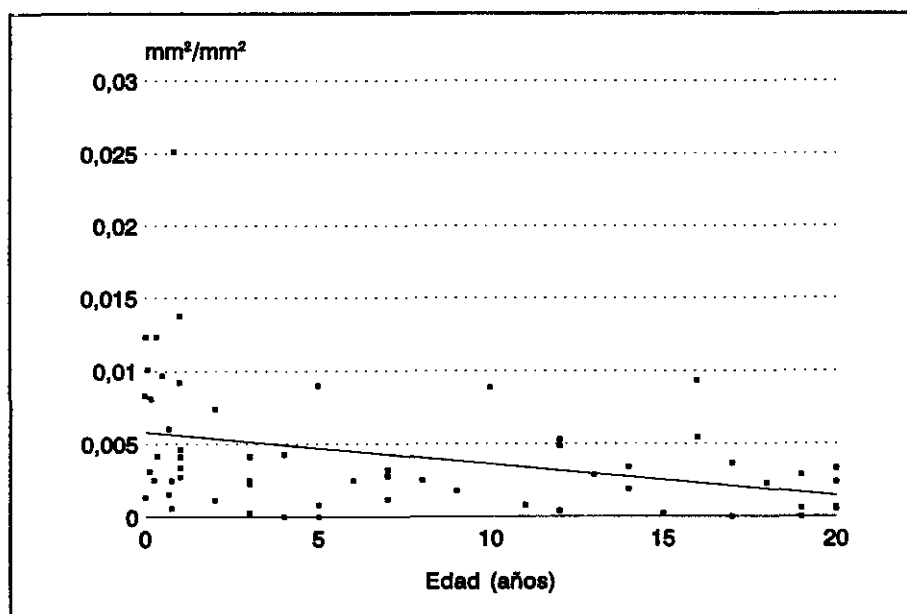


Figura 4.61. - Superficie relativa de reabsorción activa.(Sra).

En la distribución por grupos de cinco años el valor máximo se da en los primeros cinco años de la vida ($0.0055 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$) (Figura 4.64), situación común en ambos sexos, con valores en general más altos para el sexo femenino, advirtiéndose una disminución significativa en el grupo de edad de 5 a 10 años ($0.0018 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$ para el sexo masculino y $0.0043 \text{ mm}^2/\text{mm}^2$ para el sexo femenino) (Figura 4.65).

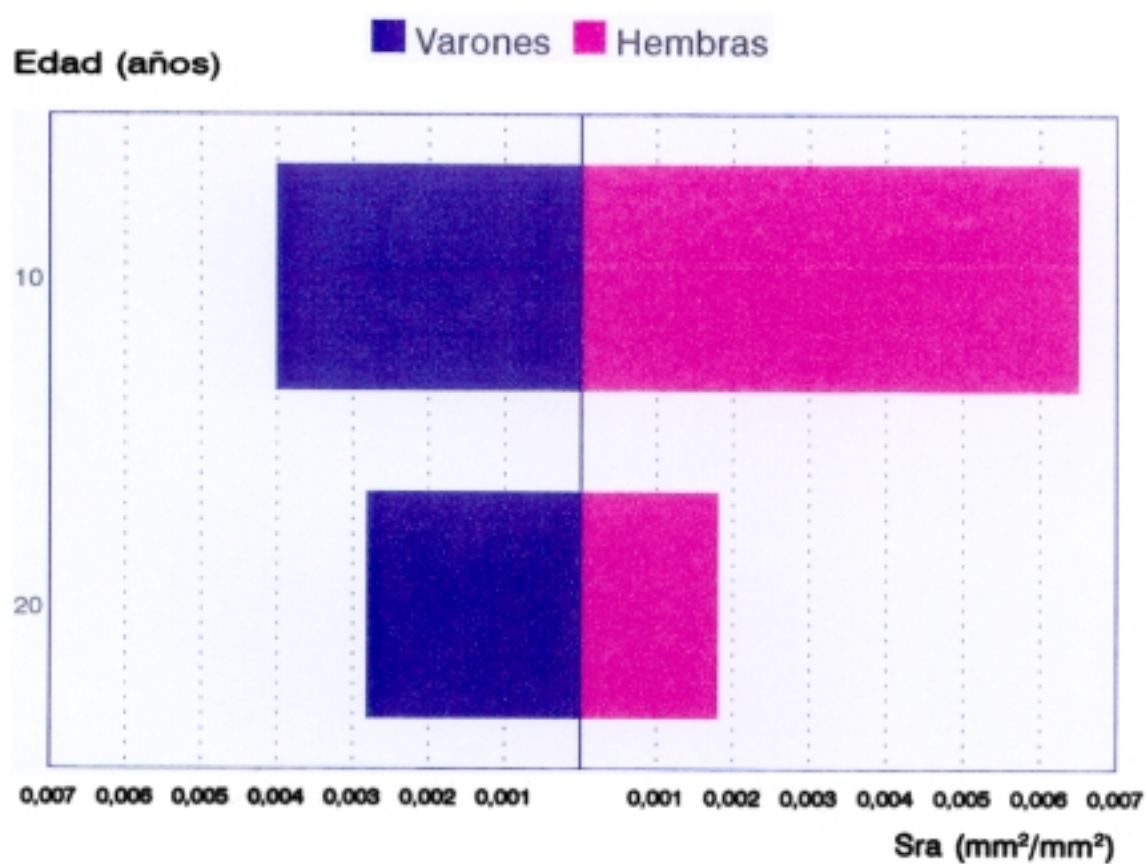
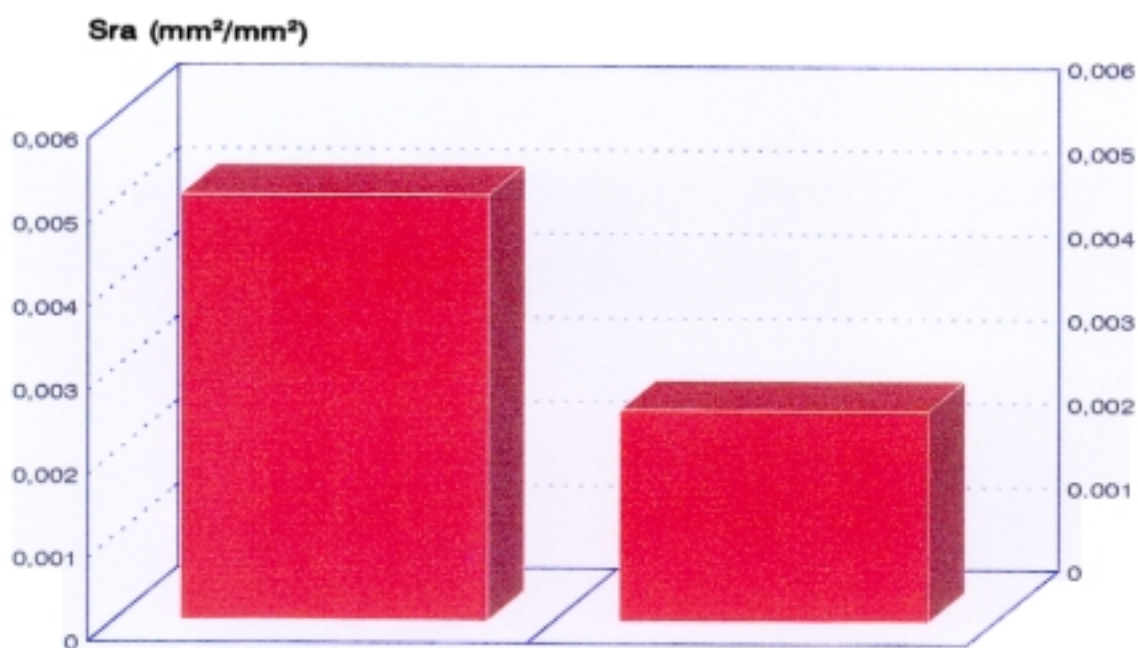


Figura 4.63.- Superficie Relativa de Reabsorción Activa por décadas y sexo

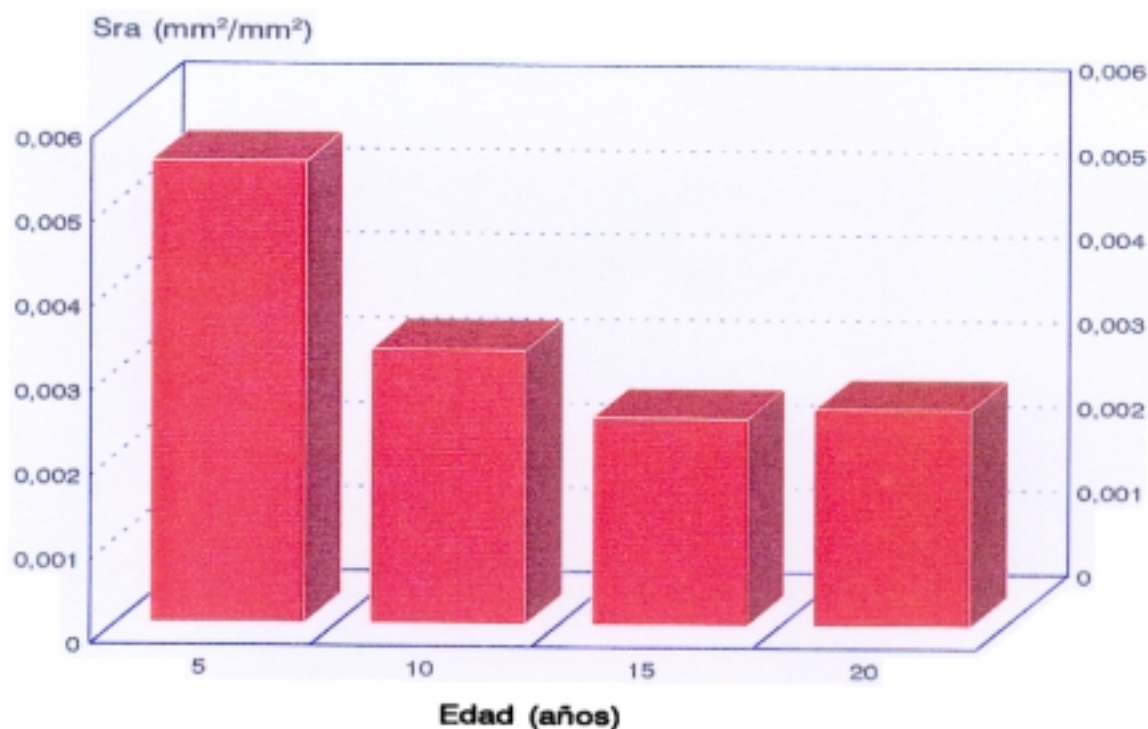


Figura 4.64.- Superficie Relativa de Reabsorción Activa por grupos de 5 años

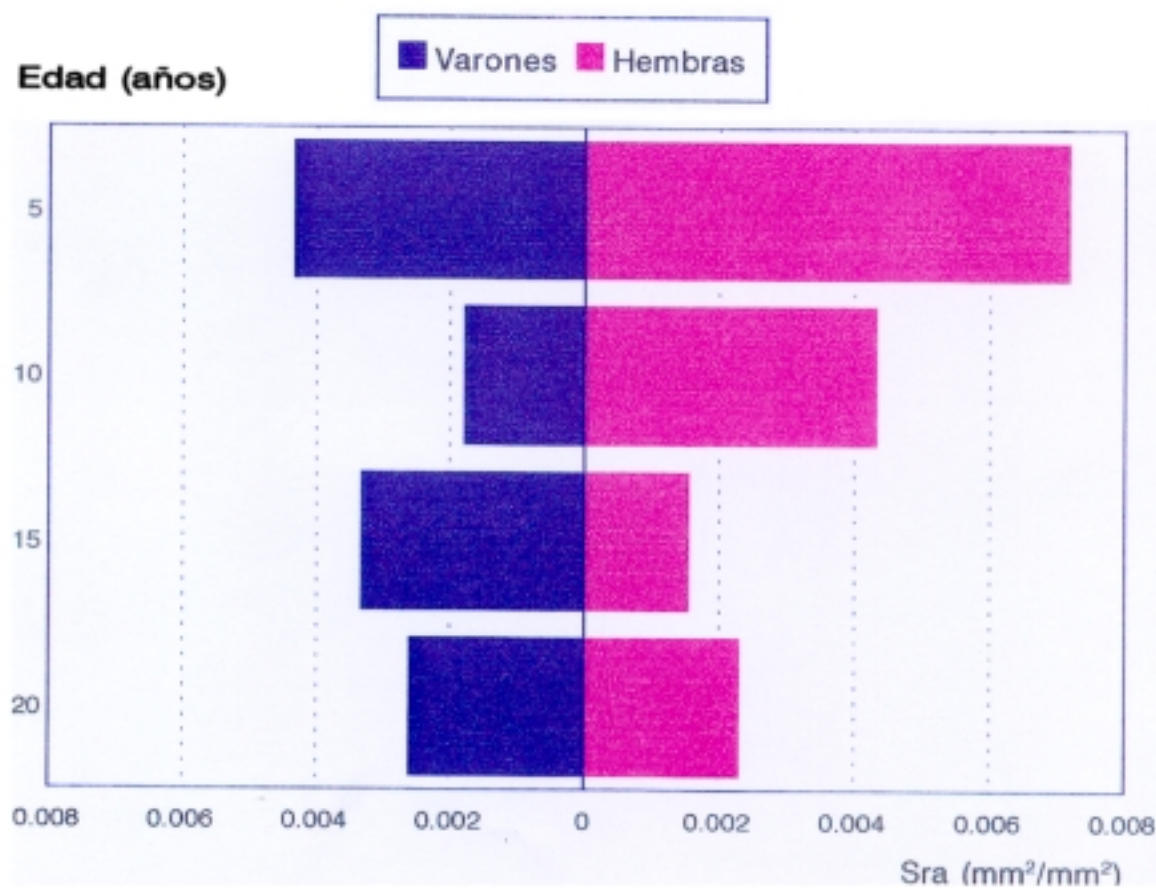


Figura 4.65.- Superficie Relativa de Reabsorción Activa por grupos de 5 años y sexo

El Índice Osteoclástico (OI), muestra así mismo una tendencia a disminuir, representada por la recta de regresión correspondiente (Figura 4.66), situación que se observa en la distribución por décadas de manera similar en ambos sexos (Figuras 4.67 y 4.68). No se observan variaciones significativas de este patrón en la distribución por grupos de cinco años (Figuras 4.69 y 4.70).

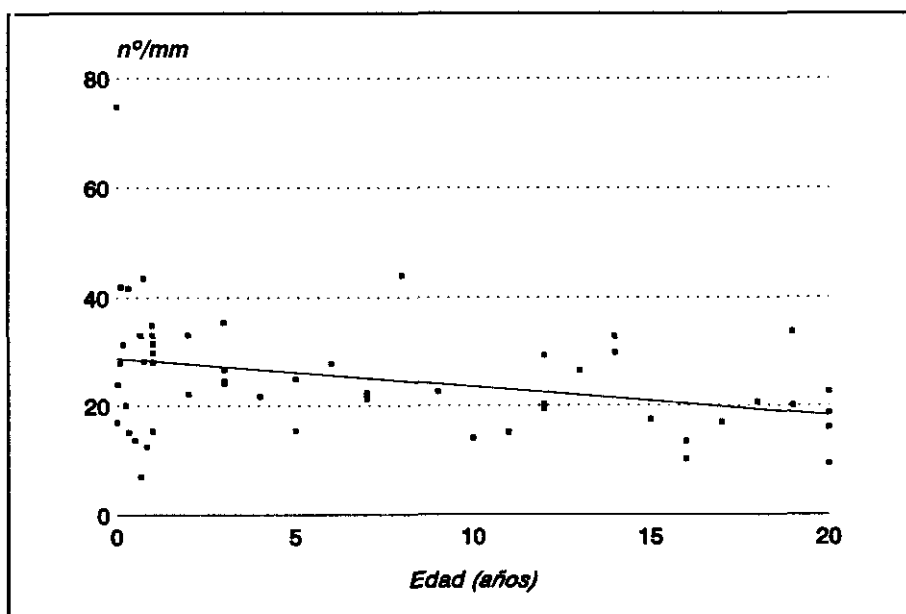


Figura 4.66.- Índice Osteoclástico.(OI).

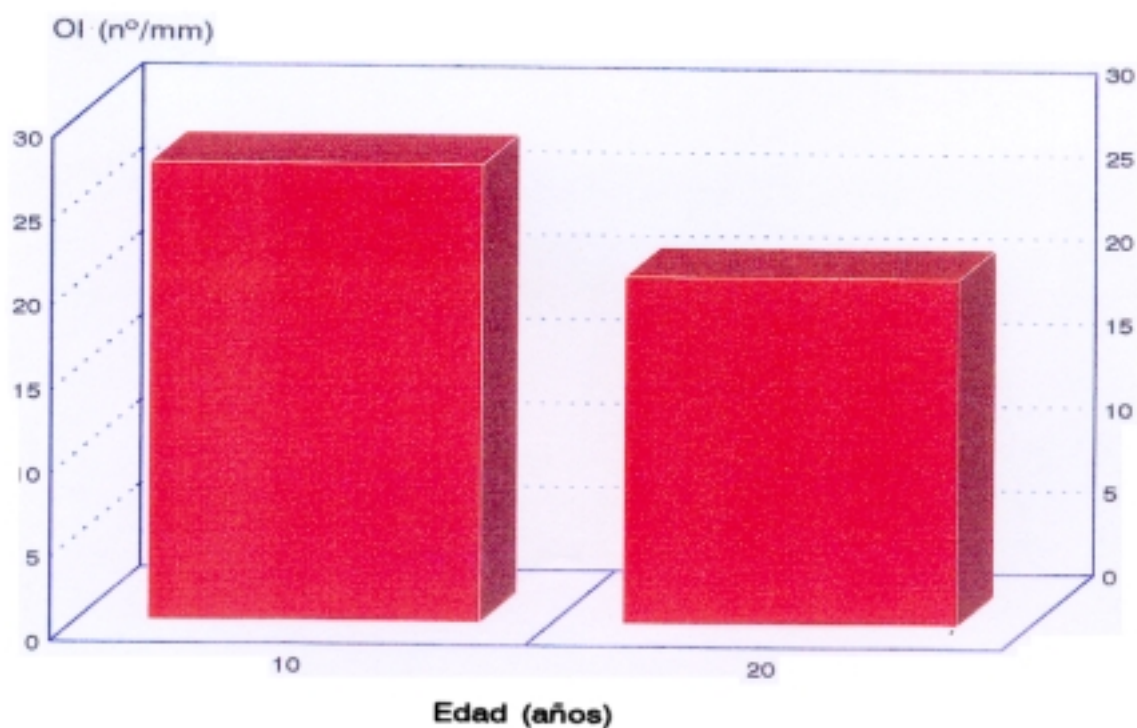


Figura 4.67.- Índice Osteoclástico por décadas

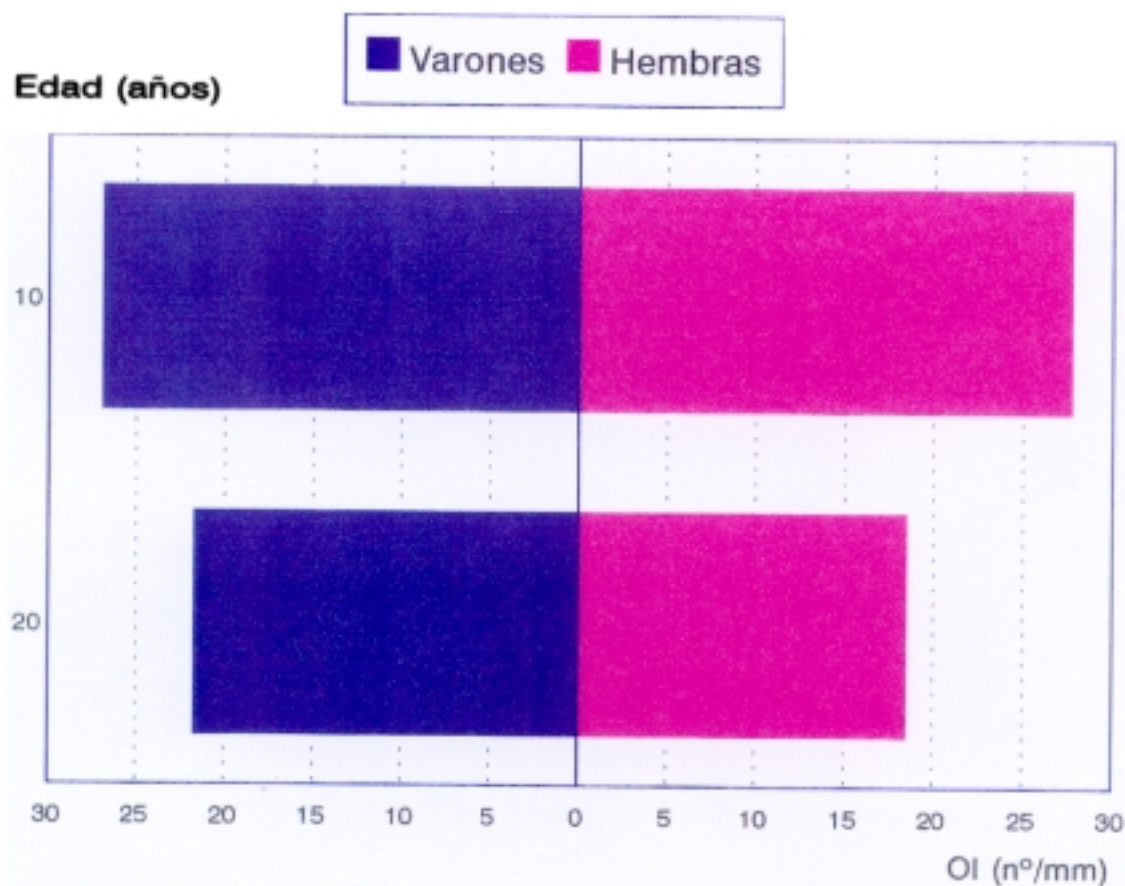


Figura 4.68.- Índice Osteoclástico por décadas y sexo

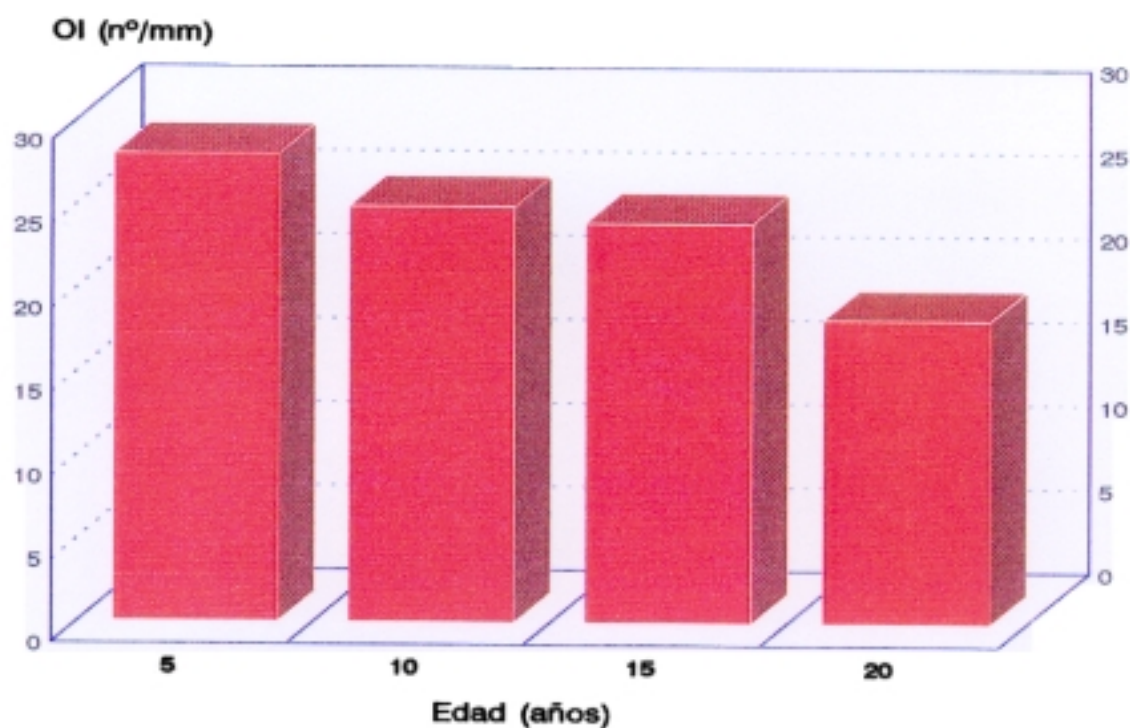


Figura 4.69.- Índice Osteoclástico por grupos de 5 años

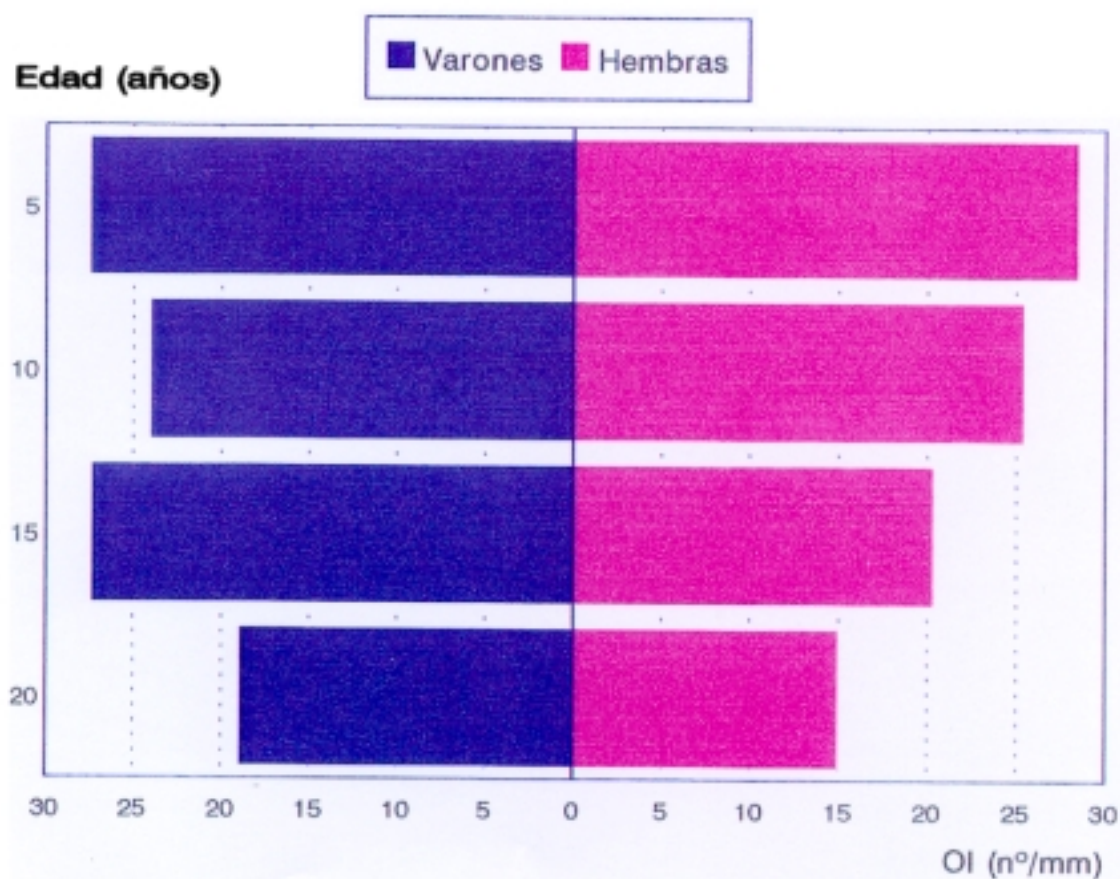


Figura 4.70.- Índice Osteoclástico por grupos de 5 años y sexo

El resultado de realizar la regresión lineal múltiple nos ha permitido obtener dos ecuaciones de regresión con factores de correlación similares:

Primera ecuación:

TERMINO	COEFICIENTE	ERR.ESTAND.
INDEPENDIENTE	-13.0006	1.1449
MWT	0.26435	0.016977
V	29.335	5.2863

Tamaño= 32 $r = 0.96962$ $r^2 = 0.94016$

A partir de ellos se ha elaborado la siguiente ecuación de regresión:

$EDAD = 0.26435xMWT + 29.335xV - 13.0006$

Segunda ecuación:

TERMINO	COEFICIENTE	ERR.ESTAND.
INDEPENDIENTE	-13.0006	1.1449
MWT	0.26435	0.016977
TTI	0.051168	0.013089
Sv	1.4863	0.36648

Tamaño= 32 $r= 0.97021$ $r^2= 0.9413$

A partir de ellos se ha elaborado la siguiente ecuación de regresión:

$EDAD= 0.26435xMWT + 0.051168xTTI + 1.4863xSv -13.0006$

La tabla 4.40 muestra el resultado de aplicar las fórmulas obtenidas a cada uno de los casos.

EDAD REAL	ECUACION. N°1	ECUACION. N°2	DIF.ECUACIO.N°1	DIF.ECUAC.N°2
0.12329	-0.52633	0.32769	-0.64962	0.20769
0.75	3.5208	2.9037	2.7708	2.1537
0.83333	1.4282	1.1684	0.59485	0.3333
1	0.081767	-0.092042	-0.91823	-1.09079
1	2.8651	3.0939	1.8651	2.0939
1	1.1662	1.5375	0.16625	0.5375
2	3.2422	3.1686	1.2422	1.1686
2	0.88299	0.96071	-1.117	-1.03929
3	4.4711	4.3803	1.4711	1.3803
3	3.9944	3.8998	0.99441	0.8998
3	2.8262	3.3165	-0.17384	0.3165
4	3.9319	3.8322	-0.068054	-0.1678
4	5.6607	6.2201	1.6607	2.2201
5	3.2534	3.1992	-1.7466	-1.8008
5	4.2552	3.9691	-0.74475	-1.0309
7	8.7005	8.6886	1.7005	1.6886
7	5.0092	4.8973	-1.9908	-2.1027
8	9.6704	9.5264	1.6704	1.5264
10	10.9616	10.4354	0.9616	0.4354
11	11.042	10.9216	0.042046	-0.0784
12	8.5948	8.2556	-3.4052	-3.7444
12	9.8676	9.7778	-2.1324	-2.2222
13	14.8449	14.7041	1.8449	1.7041
14	14.8442	14.6002	0.8442	0.6002
15	10.3292	10.276	-4.6708	-4.724
16	16.5146	16.7387	0.51457	0.7387
17	17.5748	17.6597	0.57475	0.6597
17	17.9361	17.5441	0.93607	0.5441
19	19.4282	19.6393	0.4282	0.6393
20	17.4945	18.8037	-2.5055	-1.1963
20	20.2391	20.6508	0.23907	0.6508
20	19.597	18.8837	-0.40296	-1.1163

Tabla 4.40.- Resultado de la aplicación de las fórmulas 1 y 2.

La diferencia entre la edad real y la estimada se encuentra, en la primera, en un rango de -4.6708 a 2.77, con una media de -0.001284 y una desviación típica de 1.665. Para la segunda ecuación el rango de variación de la edad se sitúa entre -4.724 y 2.22, con una media de 0.0056886 y una desviación típica de 1.6491.

5 - DISCUSSION

DISCUSION

El uso de técnicas de corte conservando el contenido mineral del hueso, y el incremento de las aplicaciones de la histología cuantitativa como herramienta objetiva en la clínica y la investigación, han hecho necesario el estudio de parámetros celulares y estructurales en individuos normales dentro de la población infantojuvenil española, con la finalidad de establecer unas tablas de referencia.

El papel de la biopsia ósea en el diagnóstico de la enfermedad metabólica del hueso es controvertido, dado que no es una herramienta de rutina, ya que en muchos casos el diagnóstico puede efectuarse utilizando métodos clínicos no invasivos. Sin embargo, las posturas son unánimes al valorar el papel indispensable de la histomorfometría ósea en la investigación y descubrimiento de los mecanismos fundamentales de las enfermedades óseas, y efectos de nuevos tratamientos.

5.1.- Material y Métodos

Biopsia

El empleo de criterios de selección para garantizar la normalidad de los datos es esencial. Han de excluirse las patologías hepáticas, renales e intestinales que alterarían los resultados alcanzados.

Debido a ello las biopsias se han obtenido de individuos que han muerto de manera súbita o violenta, en los que la autopsia no reveló patologías orgánicas que pudieran alterar el metabolismo óseo. La aparición de fenómenos autolíticos a partir de las 24 horas posteriores a la muerte,¹¹² es la razón por la que se han desechado los casos cuya data de la muerte era superior. No obstante, la cuantificación del hueso mineralizado es posible que no sufra modificaciones aunque exista autolisis, motivo por el cual es posible su aplicación en Antropología Forense.

Como ya se dijo anteriormente, el lugar de elección de la biopsia ósea ha de proporcionar material representativo de los cambios que tienen lugar en el conjunto del esqueleto.

En este sentido, sabemos que diferentes localizaciones (columna vertebral, cresta iliaca, cuello femoral,...) proporcionan valores diferentes para los mismos parámetros histomorfométricos, e incluso

diferentes áreas de la cresta iliaca pueden mostrar pronunciadas variaciones^{121,147} dependiendo del parámetro y diagnóstico⁴⁷ como veremos con posterioridad.

En el presente trabajo se optó por tomar muestras en cuña de cresta iliaca derecha, que permiten seleccionar con precisión aquellas áreas más apropiadas para llevar a cabo las mediciones.

En el pasado,⁷⁴ e incluso actualmente en numerosos trabajos de histomorfometría aplicada a la práctica forense o paleoantropología^{170,173} se ha utilizado con frecuencia como lugar de elección, la costilla. Las piezas de costilla proporcionaban una buena muestra de hueso cortical y dado que los paquetes de remodelado estaban orientados en el eje longitudinal de la costilla se obtenía la muestra por sección transversal.

Sin embargo, ante la escasez de tejido trabecular de la costilla y mejor accesibilidad de la cresta iliaca que implica menores complicaciones, es éste último el lugar más común de obtención de biopsias óseas, habiendo suplantado actualmente a la biopsia costal.¹⁹

La mayoría de los parámetros obtenidos de la valoración de **biopsias verticales**, son significativamente más altos que en las **biopsias horizontales**, salvo la masa ósea trabecular, que permanece

constante, y el diámetro medio trabecular, que muestra valores inferiores. Las diferencias entre **localizaciones superiores o inferiores** ha de tenerse en cuenta cuando se trate de biopsias horizontales, tendiendo los valores de los parámetros a ser menores en las localizaciones inferiores, con diferencias significativas para el volumen osteoide, grosor de las bandas de osteoide y fracción de superficie trabecular recubierta por osteoide. No se han observado variaciones, sin embargo, en cuanto a la **localización anterior o posterior** de las biopsias verticales. No se han evidenciado variaciones tampoco, en los parámetros estructurales tales como la masa de hueso trabecular, diámetro medio trabecular, volumen de osteoide, superficie trabecular recubierta por osteoide, y grosor medio de las bandas de osteoide, en muestras obtenidas de **localizaciones contralaterales** (izquierda - derecha), de la cresta iliaca, aunque sí en los parámetros celulares tales como el índice osteoclástico o superficie de reabsorción, que son significativamente mayores en la cresta iliaca derecha.¹¹²

En cuanto al tamaño de la muestra, mientras que muestras de 3mm. de diámetro son suficientes para diagnósticos cualitativos, no observándose diferencias en cuanto a la producción de artefactos tales como microfracturas, desgarros, solapamientos o arrugas con respecto a las muestras de 5mm. de diámetro,⁶⁶ numerosos trabajos coinciden en que biopsias de 5mm. de diámetro son suficientes para cuantificar

los parámetros histomorfométricos.^{112,162}

Dado que el material utilizado para este trabajo procede de autopsias, no hubo limitación en cuanto al tamaño de la muestra, lo que nos permitió obtener una gran representatividad, y eliminar aquellas zonas (bordes), que mostraban restos de trabéculas rotas y artefactos que pudieran alterar las mediciones, obteniendo cortes de, al menos, 6mm. de anchura, conteniendo ambas corticales y hueso esponjoso, debido a que la presencia de las corticales permite el adecuado reconocimiento de la cavidad medular, utilizado como referencia para muchos de los parámetros morfométricos.²¹

Técnica de procesado

Las razones para evitar la descalcificación son obvias y numerosas; la más importante es la conservación de las diferencias entre el hueso calcificado y no calcificado (osteoide) de cara a que sea posible diagnosticar y medir las alteraciones en el proceso de formación y/o mineralización del hueso. Así mismo, la óptima conservación de la estructura celular y la mínima reducción de la médula ósea para evitar artefactos en la unión entre hueso y médula, son también de la mayor importancia.⁹

La experiencia previa ha revelado que el alcohol absoluto tiene la ventaja de fijar y deshidratar, debido a lo cual fue utilizado como

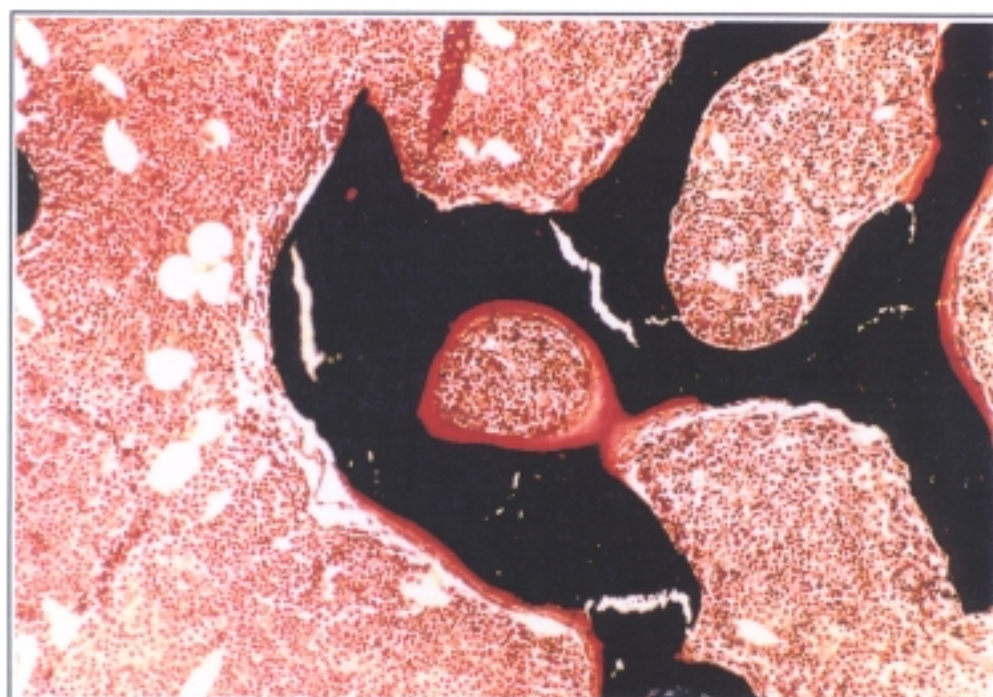
fijador de elección para este trabajo.

Se han probado y recomendado una gran variedad de derivados plásticos para la inclusión, originalmente procedentes de métodos diseñados para microscopía electrónica. Tanto los derivados acrílicos (Metacrilato de metilo), como las resinas epoxi son los más utilizados para estas aplicaciones.¹⁸⁴

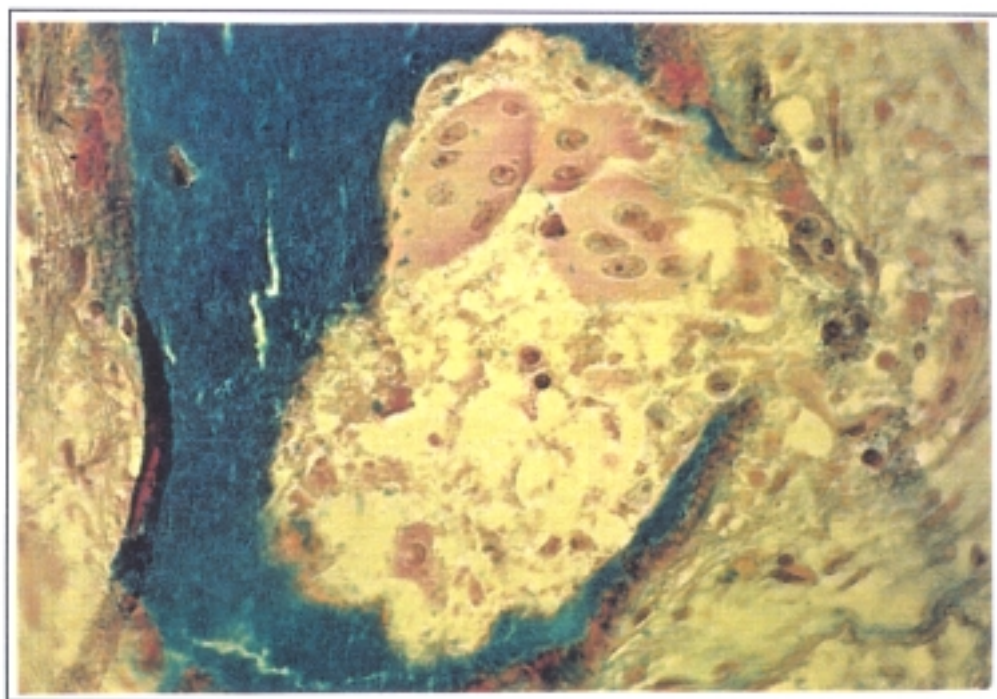
Se ha utilizado el metil metacrilato para la inclusión de las piezas, dado que permite una polimerización lenta, sin desprender calor, y su dureza es parecida a la del hueso.

Indiscutiblemente, la tinción más fiable para la distinción entre osteoide y hueso calcificado es la técnica de **Von Kossa**,¹⁸⁸ aunque no proporciona un detalle celular óptimo. (Figura 5.1). La técnica más comunmente utilizada en los laboratorios es la modificación de **Goldner**⁷⁹ del **Tricrómico de Masson**, permite observar con nitidez las células óseas, pero tiene tendencia a sobreestimar el volumen de osteoide, especialmente cuando tiene poco espesor. (Figura 5.2). Es por este motivo por lo que las mediciones de área y longitud trabecular, y área y longitud osteoide se han llevado a cabo en preparaciones teñidas con la técnica de Von Kossa; mientras que la longitud osteoblástica, longitud de reabsorción y reabsorción activa, y número de osteoclastos en preparaciones teñidas con la técnica de

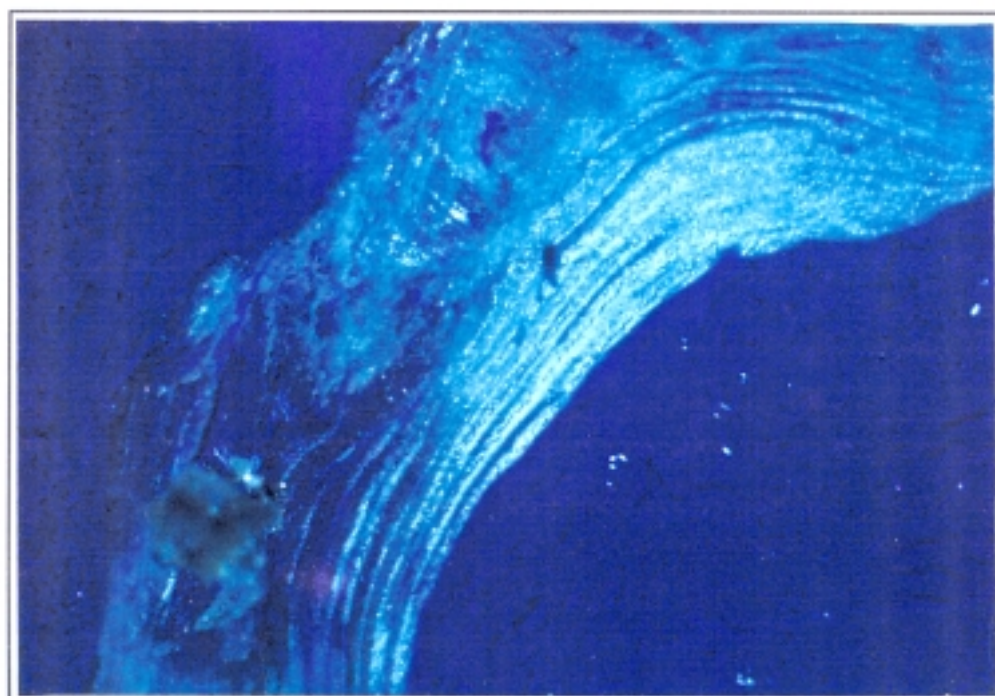
Masson-Goldner. Para la identificación de la línea de cemento de las osteonas trabeculares se ha utilizado la luz polarizada (Figura 5.3)



Fotografía n° 1 (Técnica de Von Kossa) (x4)



Fotografía n° 2 (Técnica de Goldner) (x40)



Fotografía n° 3 (Técnica de Luz polarizada) (x10)

Evaluación

La definición de los parámetros utilizados se basa en la referida en la bibliografía.¹⁶² Dado que la variabilidad interobservador depende de diferencias en la técnica histológica empleada, experiencia en métodos de medición o uso de diferentes aumentos que provocan diferencias en las medidas de superficie,^{18,24,55,146} es de la mayor importancia disponer de una información exhaustiva de la metodología seguida y la utilización de una nomenclatura estandarizada, a la hora de comparar resultados procedentes de distintos laboratorios.^{37,41,141}

La mayoría de los autores coinciden en que los métodos manuales, semiautomáticos y automáticos proporcionan resultados equivalentes, sin diferencias significativas, cuando son utilizados por patólogos experimentados.^{12,42,77,162,192} La ventaja de los métodos automatizados frente a los manuales, vendría dada por el ahorro de tiempo que éstos proporcionan,^{48,111} tanto por la reducción del número de campos a medir (aproximadamente un 50%), como por la automatización del registro de los datos y parámetros histomorfométricos,¹¹⁰ y la consiguiente reducción de la subjetividad y fatiga del observador.¹⁶⁶ Aunque parece evidente el ahorro de tiempo que esta técnica proporciona, existen una serie de problemas que la hacen poco efectiva en la práctica:

- Requieren unas preparaciones técnicamente perfectas, para evitar los falsos resultados derivados de roturas de las estructuras histológicas.

- Han de realizarse tinciones especiales para lograr un alto nivel de contraste entre las distintas estructuras que queremos medir.

La mayoría de estos sistemas permiten un alto grado de interacción con el observador, que puede modificar la imagen que aparece en la pantalla, obviando alguno de los inconvenientes expuestos, lo que en la práctica hace que estos equipos se utilicen como semiautomáticos, motivo por el cual se empleó el sistema de medición semiautomático en este trabajo.

La variabilidad intraobservador es la suma de las variaciones introducidas por la subjetividad del observador, y los errores metodológicos. Según la bibliografía consultada,^{55,162,183} es pequeña en personal experimentado (<6%), presentando mayor variación los parámetros correspondientes a superficies (de osteoide, de reabsorción, ...), y parámetros celulares (número de osteoclastos, superficie de reabsorción activa, superficie de osteoide recubierta por osteoblastos cúbicos,...),¹¹¹ por lo que el coeficiente de variabilidad estimado en el presente estudio, de un 4,36%, puede considerarse dentro de los límites aceptados como normales.

5.2.- RESULTADOS

Este trabajo aporta la mayor serie mundial en número de casos y es el único específico, para la población de estudio, habiendo constituido una ardua labor de varios años la recolección de las muestras, dado el escaso número de autopsias judiciales que se llevan a cabo en la población de estudio. No obstante, somos conscientes de que, desde un estricto punto de vista estadístico, los resultados obtenidos, en relación al tamaño muestral, no deben ser interpretados de manera concluyente y definitiva, sino como una primera aportación que permita orientar las implicaciones histomorfométricas de la fisiología ósea en la etapa de crecimiento, y la posibilidad de su aplicación en la clínica y la Medicina Forense, abriendo así un camino que pueda irse ampliando en el futuro con una mayor casuística.

Hay que señalar, además, que los resultados correspondientes al grupo femenino de 15 a 20 años no son representativos, dado que tan sólo se cuenta con una muestra, y sóloamente se han tenido en cuenta de manera orientadora.

Tan sólo constan en la bibliografía consultada dos trabajos, referidos parcialmente a la población de estudio. El primero de ellos es el realizado por Malluche en 1982 en sujetos americanos¹² que incluye dos grupos de edad (de 0-10 y 11-20 años), pero con una

muestra total de 15 individuos (5 y 10 respectivamente). El segundo se llevó a cabo por Melsen en 1978 en daneses¹¹⁹ y tan sólo contempla un grupo de 10 a 19 años con un total de 14 individuos (9 masculinos y 5 femeninos).

Hay que resaltar que el uso de una nomenclatura diferente para la mayoría de los parámetros en ambos trabajos, así como la utilización de distintos aumentos en las mediciones y el uso de técnicas manuales en la serie de Melsen, pueden condicionar las diferencias observadas en los resultados obtenidos, sobre todo en las mediciones de superficies.

El comportamiento de los parámetros estructurales en nuestra serie (N.S.) es similar a los datos aportados por las series de Malluche y Melsen, produciéndose una ganancia del volumen (V) y espesor trabecular (TTI) en la segunda década, junto con una disminución de la superficie (Sv). No obstante, el incremento no es tan importante en la serie de Malluche para V (Figura 5.4), y el TTI alcanza valores más elevados (Figura 5.5), si bien los nuestros se aproximan más a las cifras dadas por Serrano para adultos. Los valores de Sv son algo mayores en nuestra serie, aunque parece observarse una tendencia semejante en Malluche (Figura 5.6).

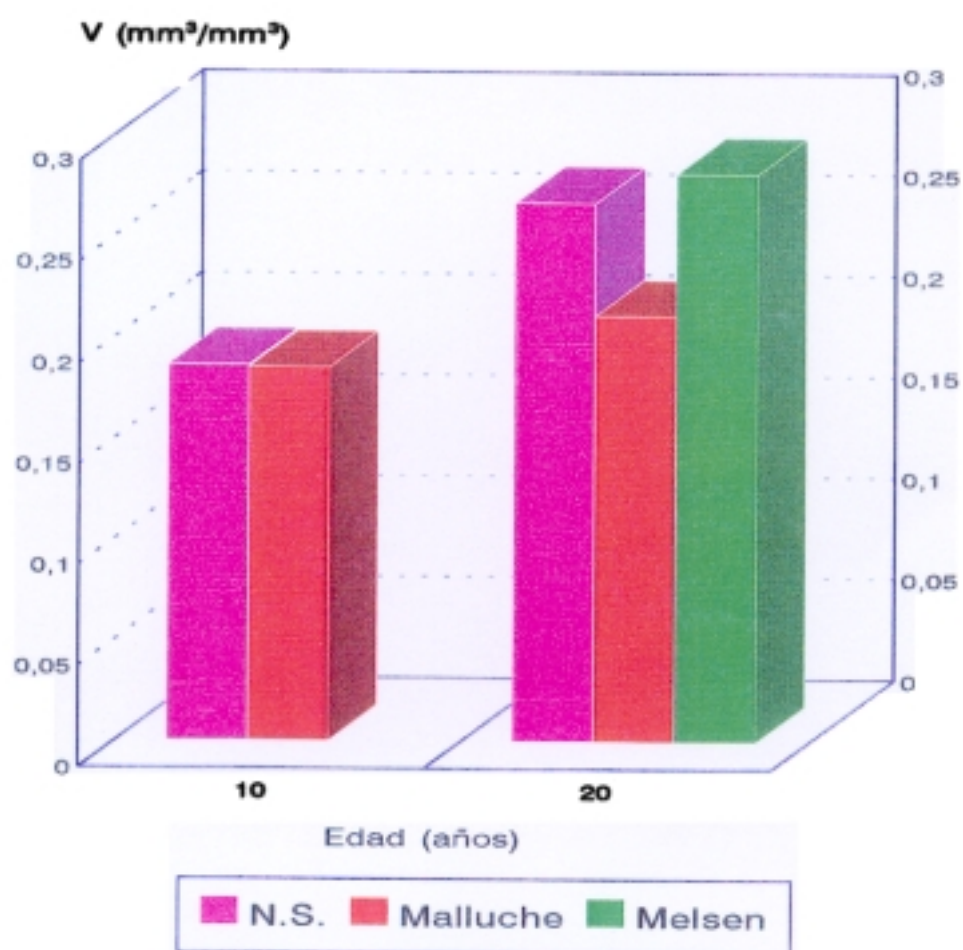


Figura 5.4.- Comparación del Volumen Trabecular

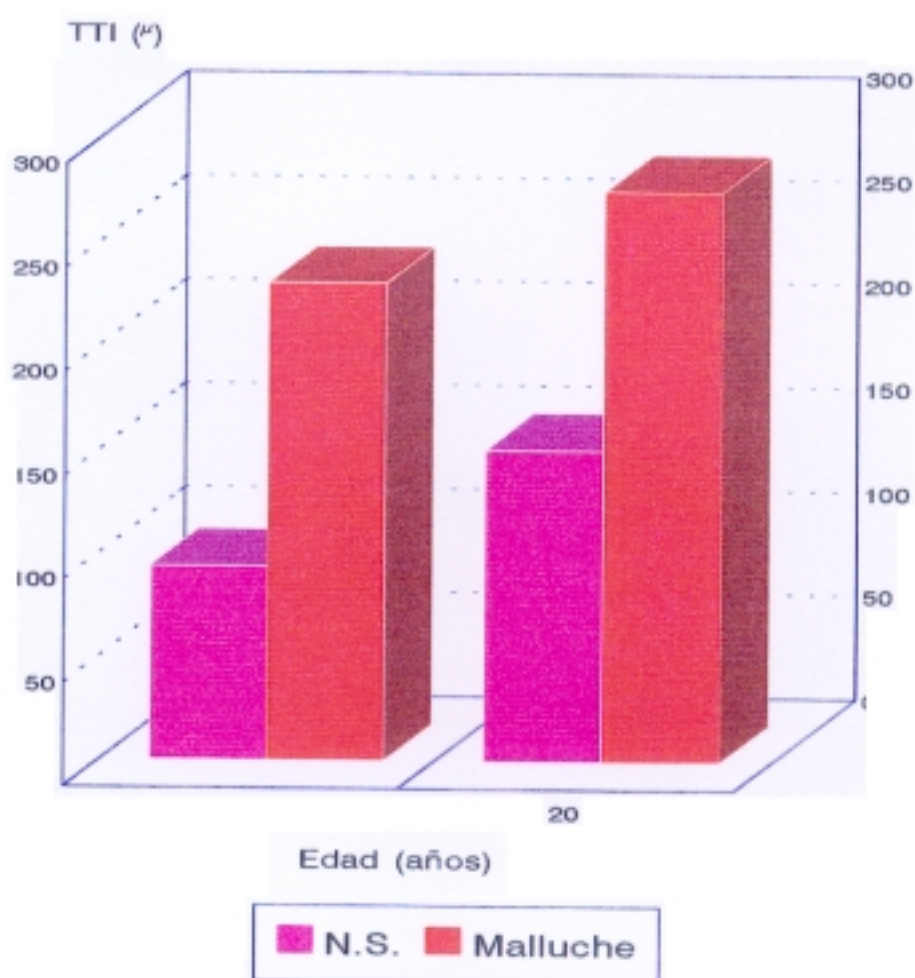


Figura 5.5.- Comparación del Índice de Espesor Trabecular

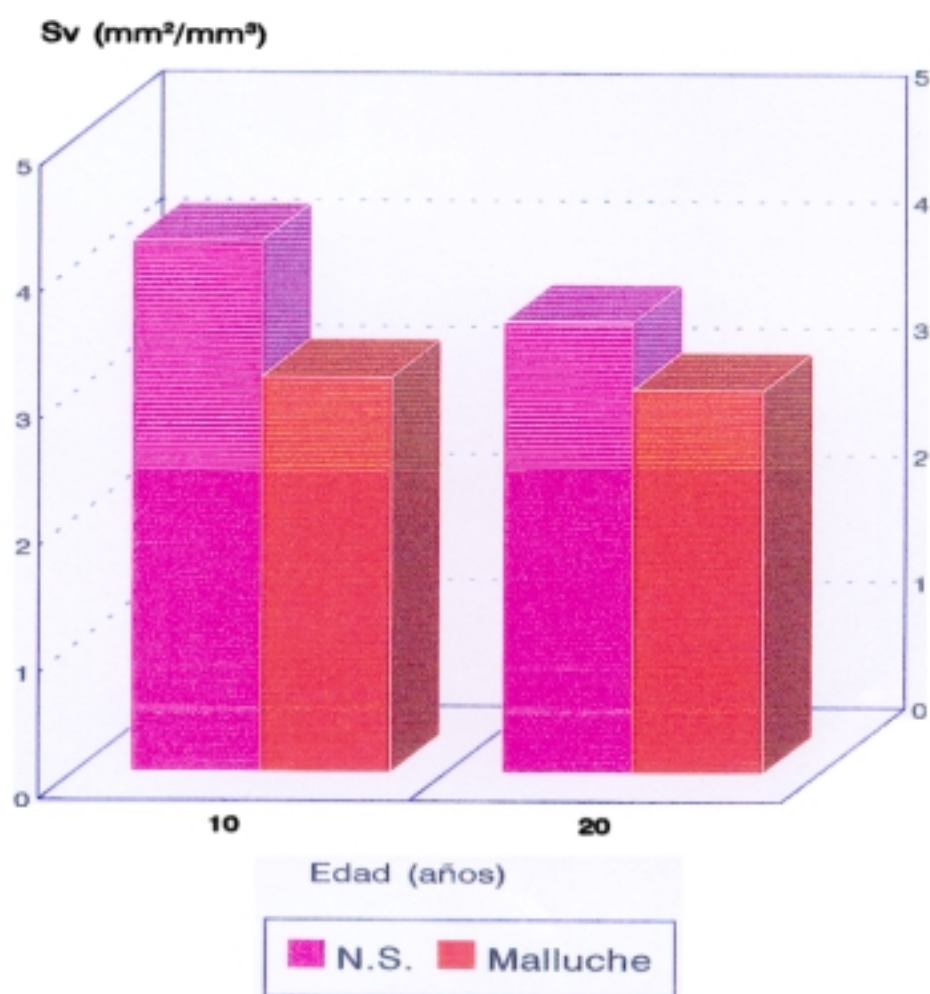


Figura 5.6.- Comparación de la Superficie Específica de Hueso Trabecular

Los parámetros de formación muestran diferencias muy significativas en las medidas de superficie (S_f , S_{fa}), lo que puede deberse a las causas apuntadas. Mientras en nuestra serie no hay variaciones significativas, en la serie de americana hay una apreciable disminución en ambos parámetros (Figuras 5.7 y 5.8). Las medidas de volumen se asemejan a la serie de Melsen (aunque sólo pueden compararse los correspondientes a la segunda década), existiendo discordancia con Malluche respecto a la variación sufrida por Vos que disminuye notablemente en su serie, mientras en la nuestra no varía de manera significativa (Figura 5.9).

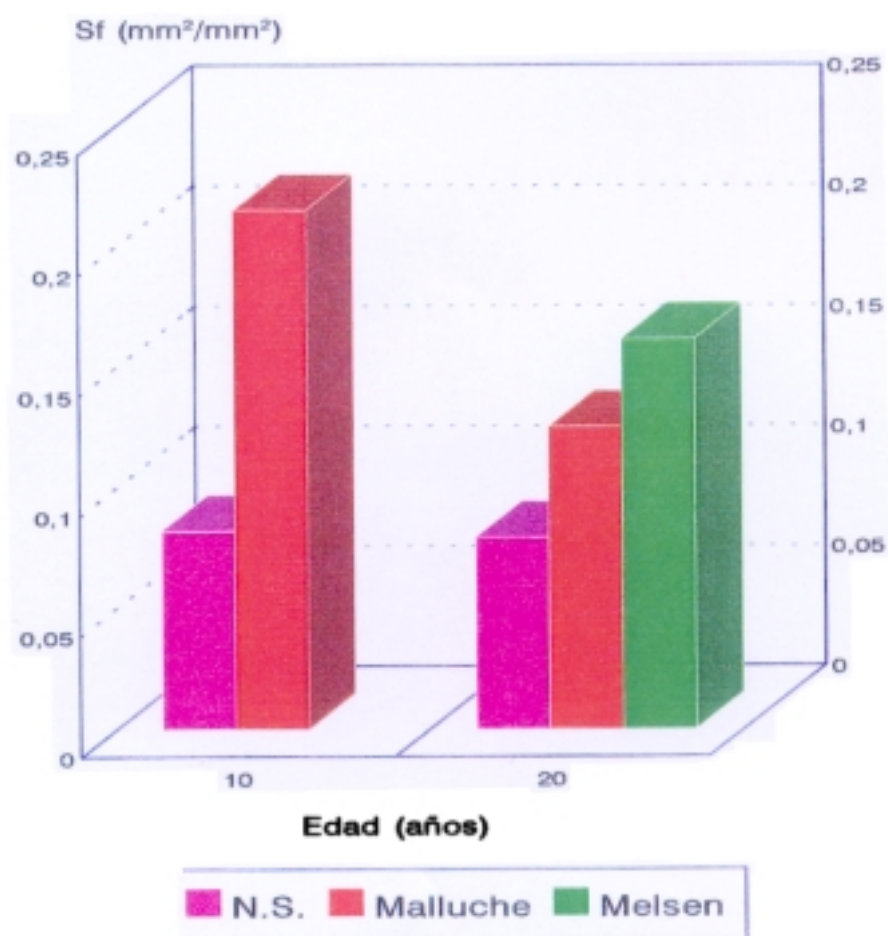


Figura 5.7.- Comparación de la Superficie Relativa de Formación

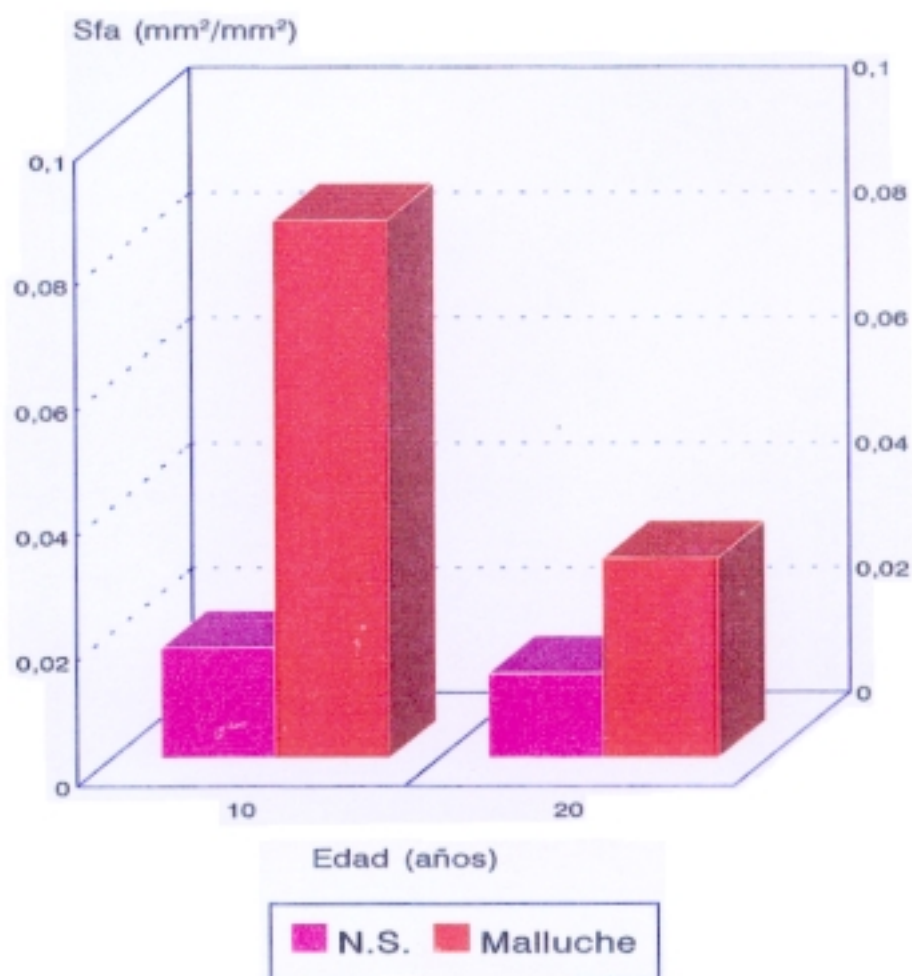


Figura 5.8.- Comparación de la Superficie Osteoblástica Activa

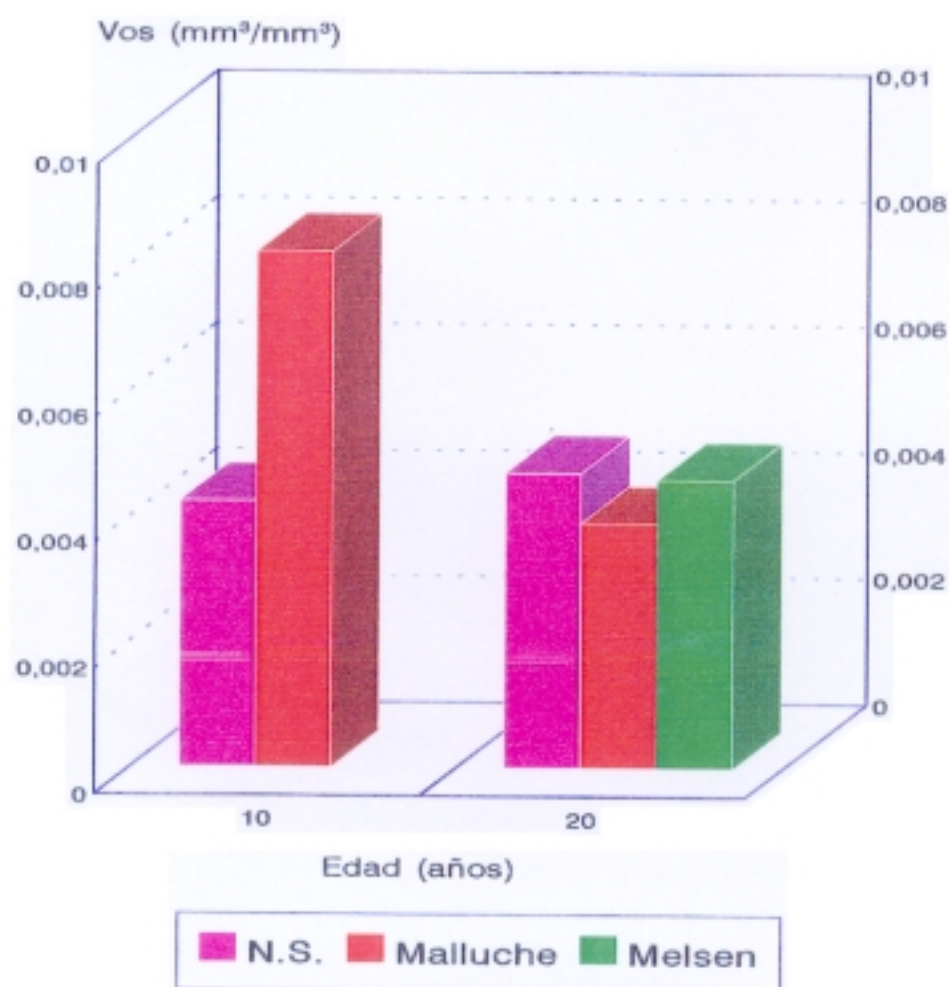


Figura 5.9.- Comparación del Volumen de Osteoide (Vos)

Por último, los parámetros de reabsorción (S_r , S_{ra}) muestran así mismo una tendencia similar, respecto a la serie de Malluche, con disminución de la primera a la segunda década, aunque con valores más bajos para éste, respecto a S_r (Figura 5.10), mientras que en la S_{ra} hay una diferencia notablemente significativa con valores muy altos en la serie de Malluche (Figura 5.11).

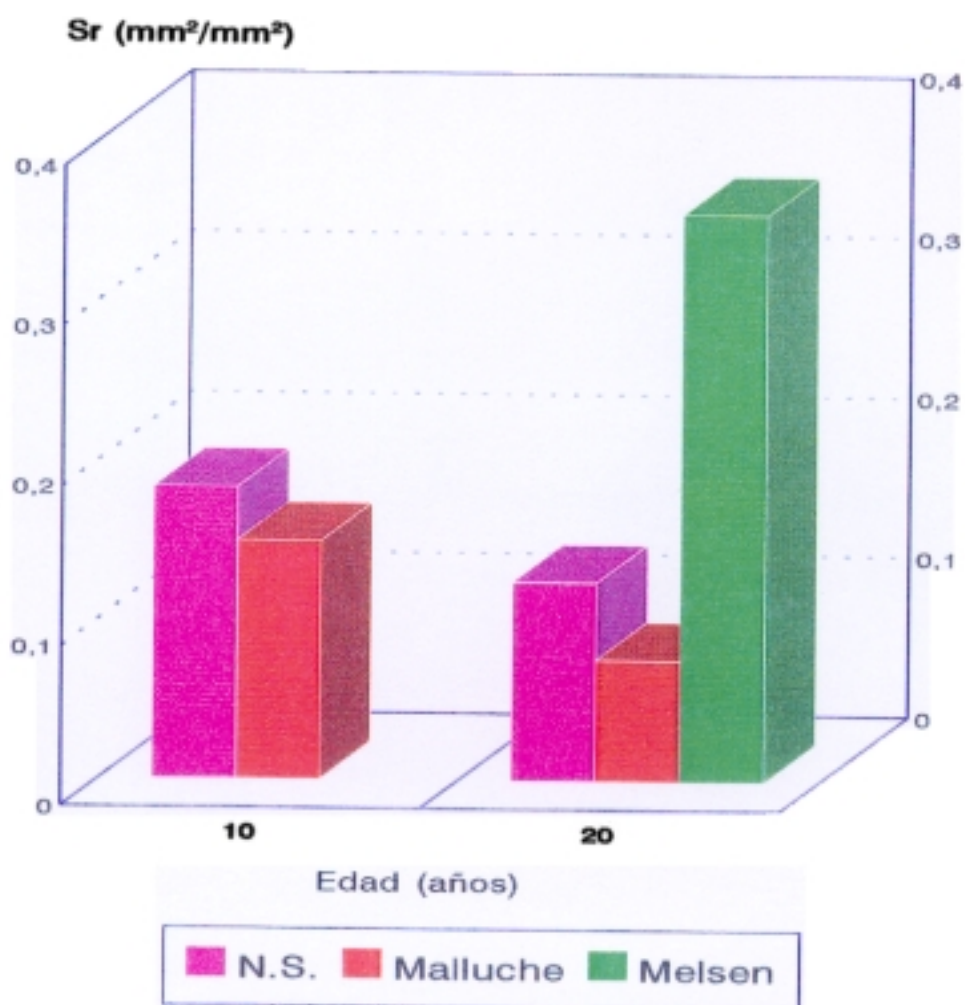


Figura 5.10.- Comparación de la Superficie Relativa de Reabsorción

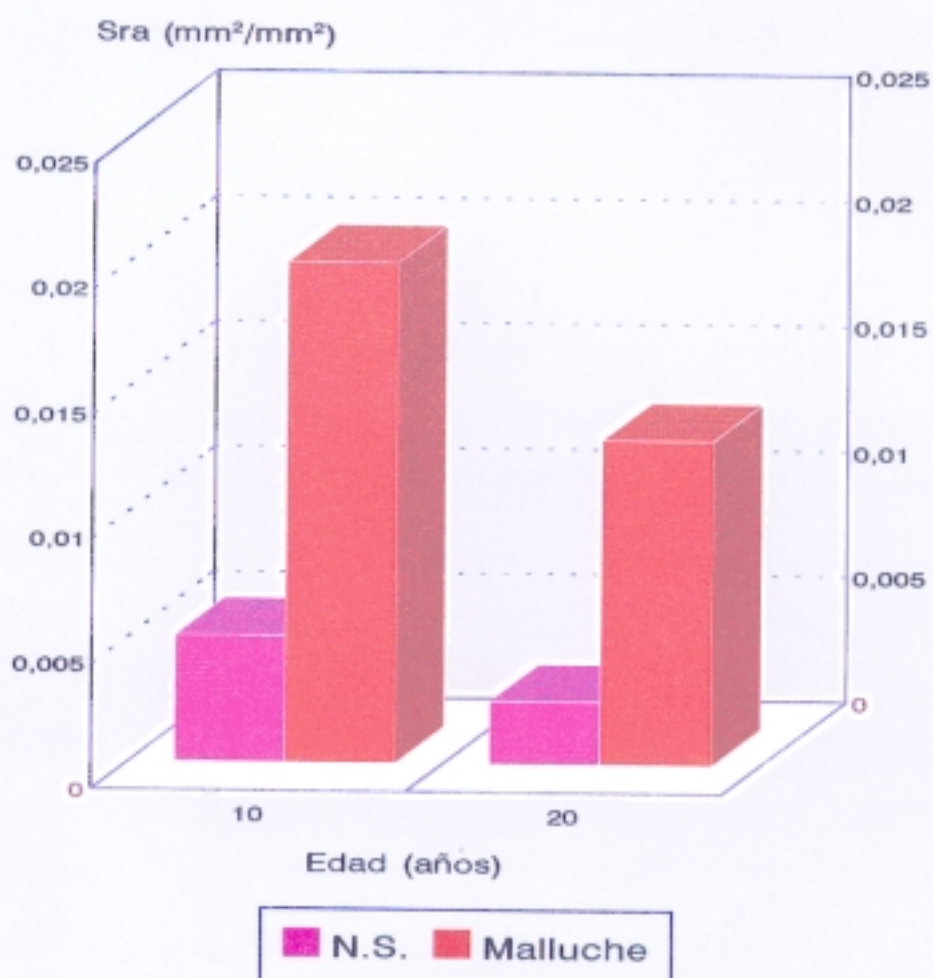


Figura 5.11.- Comparación de la Superficie Relativa de Reabsorción Activa

Analizando nuestros resultados **de manera global**, podemos decir que el aumento de la formación que tiene lugar en los períodos de crecimiento (el primero durante los dos primeros años y el segundo sobre los 10-11 años en las hembras y los 12-13 años en varones), se presenta paralelamente a la disminución de la reabsorción, por lo que se produce un aumento significativo de V y TTI, es decir una ganancia neta de hueso, mientras que las trabéculas, pequeñas y numerosas en los primeros años de la vida, se van uniendo reduciendo su superficie y aumentando en grosor. Una vez que ha tenido lugar el período de desarrollo puberal, los varones continúan presentando muestras de actividad hasta los 20 años, mientras las hembras mantienen una situación constante.

Al evaluar los resultados **por décadas**, observamos una disminución de los parámetros de reabsorción en la segunda década de la vida, que coincide con variaciones no significativas del volumen y la superficie del osteoide, aumentando su grosor, debido a lo cual hay una ganancia neta de masa ósea representada por un aumento del volumen y espesor trabecular.

Atendiendo a los resultados **por lustros**, observamos los siguientes grupos:

0-5 años.- Se caracteriza por una intensa actividad productora y destructora de hueso, que demuestra la existencia de un **alto recambio óseo**. Ambas actividades se muestran equilibradas existiendo una **rápida maduración ósea** (poco osteoide inmaduro, con una alta actividad de formación). **(FASE DE MADURACION)**

6-10 años.- El grupo femenino muestra una intensa actividad formadora de hueso frente a una menor reabsorción, incrementando la masa ósea a expensas de hueso inmaduro no mineralizado, incremento que se produce sobre los 9-10 años (aumento de la actividad de formación mediada por la progesterona) estabilizándose en niveles algo inferiores a los de los varones, y disminuyendo a partir de los 17-18 años. El comportamiento de los varones no sufre variaciones significativas. **(FASE DE CRECIMIENTO FEMENINO)**

11-15 años.- Los varones muestran la misma situación que las hembras en el grupo anterior. Hay intensa actividad formadora, muy superior a la reabsorción, con ganancia neta de masa ósea, pero con mucho hueso inmaduro que no puede ser mineralizado. Esta ganancia ósea tiene lugar sobre los 13 años (la testosterona inhibe la pérdida de hueso y aumenta la masa ósea total), manteniéndose posteriormente pequeños incrementos hasta los 20 años. Las hembras mantienen cierta actividad de formación que se compensa con la de reabsorción. **(FASE DE CRECIMIENTO MASCULINO)**

16-20 años.- Hay poco recambio, aunque los varones muestran más actividad que las hembras. **(FASE DE DETENCION DEL CRECIMIENTO)**

Como sabemos por la bibliografía consultada,^{23,43,145} coincidiendo con los cambios que tienen lugar en el inicio de la pubertad, se produce una aceleración del crecimiento inducida por la producción de hormonas sexuales, para disminuir posteriormente hasta detenerse con el cierre de los cartílagos diafisoepifisarios.

El momento de su comienzo es variable y unos dos años más precoz en la hembra que en el varón (9,5-14 años en las hembras y 10,5-16 en varones), interviniendo de forma muy importante la testosterona en el crecimiento puberal de los varones; y en las niñas los esteroides suprarrenales (menos activos que la testosterona sobre el crecimiento), y posteriormente los estrógenos ováricos que cierran el cartílago de crecimiento, motivo por el cual el crecimiento se detiene antes en las hembras y la talla es más corta. (La parada del crecimiento óseo tiene lugar a los 18-20 años en varones y 16-17 en las hembras).

Así mismo, durante el período puberal hay un hipertiroidismo pasajero,²³ que producirá un estímulo de la reabsorción ósea y aumento de los osteoclastos,¹⁸⁹ reflejado por el aumento de Sra y OI. Figuras.

Los resultados obtenidos, con las observaciones indicadas en relación al tamaño muestral, pueden representar el soporte histomorfométrico de las curvas de velocidad de crecimiento (Figuras 5.12 y 5.13), dado que muestran una clara coincidencia con los datos aportados por los estudios sobre la fisiología del crecimiento y maduración ósea.

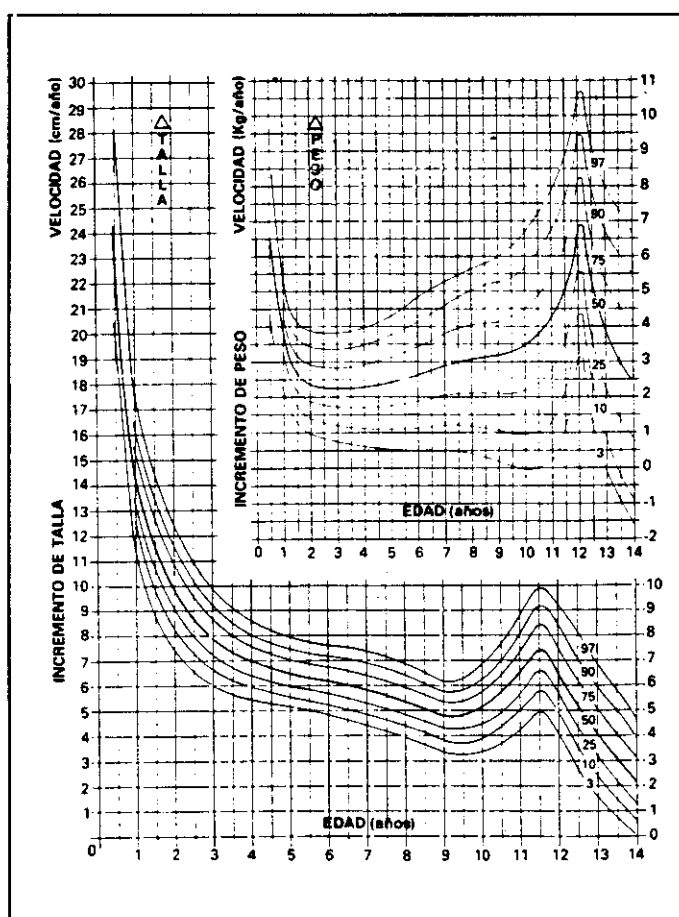


Figura 5.12.- Curva de velocidad de crecimiento para niñas españolas de 0 a 14 años (Cruz Hernandez)

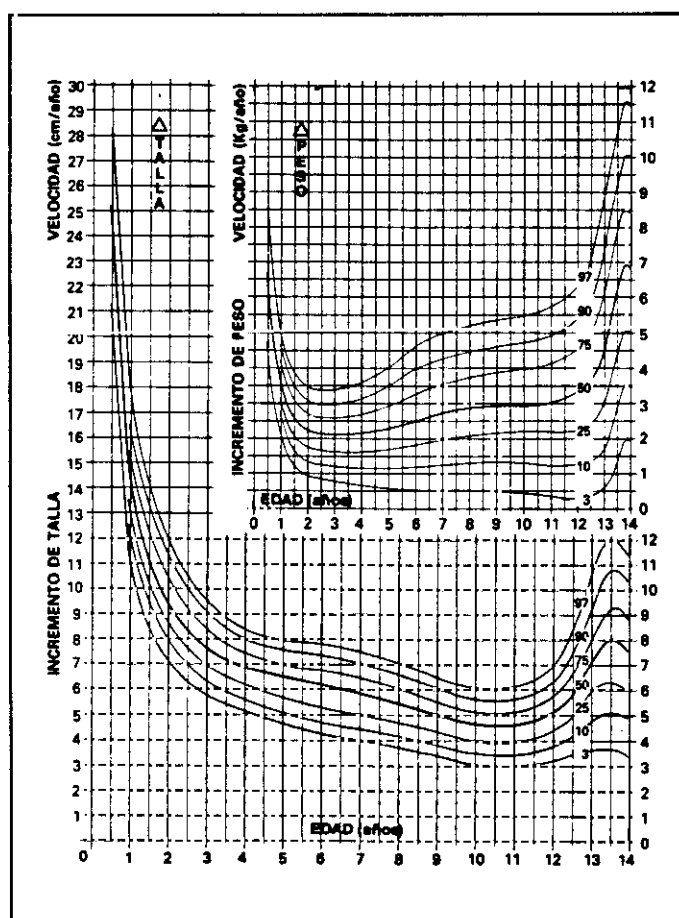


Figura 5.13.- Curva de velocidad de crecimiento para niños españoles de 0 a 14 años.(Cruz Hernández)

Las ecuaciones obtenidas mediante la aplicación de la regresión lineal múltiple, nos permiten estimar la variable dependiente "EDAD", a partir de las variables independientes V, Sv, TTI y MWT.

Aunque ambas tienen un coeficiente de correlación similar, la mayor facilidad y sencillez de la primera, con el consiguiente ahorro de tiempo, hacen de ésta la de elección, a la hora de su aplicación con el fin de determinar la edad de un cadáver por métodos histomorfométricos.

A mi parecer el método presenta cierta utilidad frente a los existentes, por varias razones. Dado que es el primero en utilizar unos parámetros de uso común en la clínica, aporta una metodología estandarizada,¹⁴ es el primero específicamente dirigido a una población infantojuvenil; al ser realizado en cresta iliaca puede ser utilizado cuando no contemos con huesos largos; no precisa más que una pequeña cuña de cresta iliaca, debido a lo cual no altera apenas la anatomía del hueso iliaco, pudiéndose realizar todo tipo de determinaciones antropométricas y antroposcópicas en el mismo.

Además, comparando los resultados con los más recientes trabajos de Thompson^{173,176} y Stout¹⁷⁰, parece evidente la mayor exactitud del método propuesto, si bien es cierto que, en individuos de menor edad, pequeñas variaciones pueden arrojar datos porcentualmente más elevados.

Por todo ello consideramos el método propuesto como un método válido para la estimación de la edad en restos esqueléticos infantojuveniles, mediante la cuantificación de parámetros histomorfométricos en hueso trabecular de cresta iliaca, de aplicación en Antropología Forense.

6 - CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA.- Este trabajo aporta la mayor serie mundial en número de casos y es el único específico para la población infantojuvenil, que ha cuantificado una serie de parámetros histomorfométricos óseos, de referencia en la evaluación de biopsias óseas, con fines clínicos y de investigación de la fisiología ósea durante la etapa de crecimiento.

SEGUNDA.- En comparación con los resultados obtenidos por otros autores para las poblaciones estadounidense y danesa, observamos, en general, un comportamiento similar en cuanto a los parámetros estructurales y de reabsorción ósea, mientras que los relacionados con la superficie de formación difieren notablemente. Estas diferencias podrían deberse al uso de una nomenclatura diferente, así como a la utilización de distintos aumentos en las mediciones.

TERCERA.- El incremento en la formación ósea que tiene lugar en los períodos de crecimiento, se presenta paralelamente a la disminución de la reabsorción, por lo que se produce una ganancia neta de hueso, mientras que las trabéculas, pequeñas y numerosas en los primeros años de la vida, se van uniendo reduciendo su superficie y aumentando en grosor.

CUARTA.- Se han diferenciado cuatro fases, atendiendo a las variaciones histomorfométricas, durante la etapa de crecimiento:

0-5 años.- Fase de alto recambio óseo con rápida maduración ósea.
(FASE DE MADURACION)

6-10 años.- Intensa actividad formadora de hueso en el grupo femenino, frente a una menor reabsorción, mientras el comportamiento de los varones no sufre variaciones significativas.

(FASE DE CRECIMIENTO FEMENINO)

11-15 años.- Los varones muestran la misma situación que las hembras en el grupo anterior. Hay intensa actividad formadora, muy superior a la reabsorción, con ganancia neta de masa ósea. Las hembras mantienen cierta actividad de formación que se compensa con la de reabsorción. **(FASE DE CRECIMIENTO MASCULINO)**

16-20 años.- Hay poco recambio, aunque los varones muestran más actividad que las hembras. **(FASE DE DETENCION DEL CRECIMIENTO)**

QUINTA.- Los resultados obtenidos pueden representar el soporte histomorfométrico de las curvas de velocidad de crecimiento, dado que muestran una clara coincidencia con los datos aportados por los estudios sobre la fisiología del crecimiento y maduración ósea.

SEXTA.- Las dos ecuaciones obtenidas mediante la aplicación de la regresión lineal múltiple, nos permiten estimar la variable dependiente "EDAD", a partir de las variables independientes V, Sv, TTI y MWT.

SEPTIMA.- Aunque en ambas ecuaciones el coeficiente de correlación es similar, la mayor facilidad y sencillez de aquélla en la que intervienen V y MWT, proporciona un significativo ahorro de tiempo, haciendo de ella la de elección a la hora de su aplicación con el fin de determinar la edad de un cadáver por métodos histomorfométricos.

OCTAVA.- Consideramos el método propuesto como un método válido para la estimación de la edad en restos esqueléticos infantojuveniles, que presenta diversas ventajas frente a los métodos tradicionales.

7 - BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- AARON J.E., CARTER D.H. Rapid preparation of fresh-frozen undecalcified bone for histological and histochemical analysis. J.Histochem.Cytochem. 35(3):361-369. 1987.
- 2.- AARON J.E., MAKINS N.B., SAGREIYA K. The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. Clin.Orthop.and Related Res. 215:260-270. 1987.
- 3.- ALEXIADES M.M., BOACHIE-ADJEI O., VIGORITA V.J. Histomorphometric analysis of vertebral and iliac crest bone samples. A correlated study. Spine. 15(4):286-288. 1990.
- 4.- ANDERSON C. Manual for the examination of bone. CRC PRESS. Boca Ratón. Florida. 1982.
- 5.- ARNOLD J.S., JEE W.S.S. Embedding and sectioning undecalcified bone and its application to radioautography. Stain Technol. 29:225. 1954.

- 6.- BAAK J.P.A., OORT J. **Obtaining quantitative data.** In: A manual of morphometry in diagnostic pathology. Baak J.P.A. Oort J. Springer-Verlag. Berlín. pp 15-26. 1983.
- 7.- BALLANTI P., DELLA ROCCA C., BONUCCI E., MILANI S. LO CASCIO V., IMBIMBO B. **Sensitivity of bone histomorphometry in the diagnosis of metabolic bone diseases.** Pathol Res Pract. 185(5):786-789. 1989.
- 8.- BARON R., VIGNERY A., HOROWITZ M. **Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling.** In Peck W.A.(ed.): Bone and Mineral Research. Annual 2. Amsterdam. The Netherlands, Elseiver. pp:175-243. 1984.
- 9.- BARON R., VIGNERY A., NEFF L., SILVERGLATE A., SANTA MARÍA A. **Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry.** In Bone Histomorphometry: Techniques and interpretation. Robert R.Recker. CRC Press. Boca Ratón. 1983.
- 10.- BARON R., GERTNER JM., LANG R., VIGNERY A. **Increased bone turnover with decreased bone formation by osteoblasts in children with osteogenesis imperfecta tarda.** Pediatr Res. 17(3):204-207. 1983.
- 11.- BARON R., VIGNERY A. **Metab.Bone.Dis.Relat.Res.** 2:48-55. 1981.
- 12.- BARTLEY M.H., TARGONSKI S., JEE W.S.S. **Comparison of some quantitative studies of trabecular bone.** In: Stereology IInd. Inter. Congr. Skeletal. Ellas (ed.). Springer-Verlag. Chicago. pp:68-69. 1967.
- 13.- BAUD C.A., AUIL E. **Osteocyte differential count in normal human alveolar bone.** Acta Anat. 78:321-327. 1971.

-
- 14.- BAUD C.A. Submicroscopic structure and functional aspects of the osteocyte. Clin.Orthop.rel.Res. 46:227-236. 1968.
- 15.- BAYLINK D.J., WERGEDAL J.E. Bone formation by osteocytes. Am.Jour.Physiol. 221:669-678. 1971.
- 16.- BERLYNE G.P. Methacrylate as an embedding medium for woody tissues. Stain Technol. 38:23-28. 1963.
- 17.- BIRGE S.J., PECK W.A., BERMAN M., WHENDON G.D. Study of calcium absorption in man. A kinetic analysis and physiologic model. J.Clin.Invest. 48:1705-1713. 1969.
- 18.- BIRKENHAGER-FRENKEL D.H., SCHMITZ P.I.M., BREULS P.N.W.M., LOCKEFEEER J.H.M. Biological variation as compared to inter-observer variation and intrinsic error of measurement, for some parameters, within single bone biopsies. In: Meunier P.J.(ed.). Bone histomorphometry. 2nd Int. Workshop. Société de la Nouvelle Imprimerie Fournié. Toulouse. pp:299-319. 1977.
- 19.- BORDIER P., MATRAJT H., MIRAVET L., HIOCO D. Mesure histologique de la mase et de la résorption des travées osseures. Path et Biol. 12:1238-1243. 1964.
- 20.- BORDIER P.H., RASMUSSEN H., MARIE P. Vitamine D metabolites and bone mineralization in man. J.Clin.Endocrinol.Metab. 46:284-294. 1978.
- 21.- BORDIER P.J., TUN C.S. Quantitative histology of metabolic bone disease. Clin.Endocrinol.Metab. 1:197-215. 1972.

- 22.- BOSKEY A.L., REDDI A.H. **Changes in lipids during matrix: induced endochondral bone formation.** *Calcif.Tissue Int.* 35:549-554. 1983.
- 23.- BOTELLA LLUSIA J., CLAVERO NUÑEZ J.A. **Tratado de Ginecología. Tomo I: Fisiología femenina.** Ed.Científico-Médica. 1980.
- 24.- BOYDE A. **Intermethod variation in bone histomorphometry: comparison between manual and computerized methods applied to iliac bone biopsies [letter]** *Bone.* 7(3): 235. 1986.
- 25.- BOYDE A. **Evidence against "osteocytic osteolysis".** In: Jee, Parfitt. *Bone histomorphometry.* pp 239-255. Societé Nouvelle de Publications Médicales et Dentaires. París 1981.
- 26.- BULLAMORE J.R., WILKINSON R., GALLAGHER J.C., NORDIN B.E.C., MARSHALL D.H. **Effect of age on calcium absorption.** *Lancet* ii:535-537. 1970.
- 27.- BULLOUGH P.G., BANSAL M., DICARLO E.F. **The tissue diagnosis of metabolic bone disease. Role of histomorphometry.** *Orthop Clin North Am.* 21(1):65-79. 1990.
- 28.- BURING K. **On the origin of cells in heterotropic bone formation.** *Clin. Orthop.* 110:293-302. 1975.
- 29.- BURKHARDT R. **Technische Verbesserungen und Anwendungsbereich der Histo-biopsie von Knochenmark und Knochen.** *Klinisches Wochenschrift.* 44:326. 1966.

-
- 30.- BURKHARDT R. **Präparative Vorassetzungen zur Klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarks.** Blut. 14:30. 1966.
- 31.- CANALIS E., MCCARTHY T.L., CENTRELLA M. **Growth factors and cytokines in bone cell metabolism.** Annu Rev.Med. 42:17-24. 1991.
- 32.- CANALIS E., MCCARTHY T., CENTRELLA M. **Growth factors and the regulation of bone remodelling.** J.Clin.Invest. 81:277-281. 1988.
- 33.- CANALIS E. **Local Bone Growth Factors.** Calcif.Tiss.Int. 36:632-634. 1984.
- 34.- CANALIS E.M., HINTZ R.L., DIETRICH J.W. **Effect of somatomedin and growth hormone on bone collagen synthesis "in vitro".** Metab.Clin.Exp. 26:1079-1087. 1977.
- 35.- CARTER D.H., BARNES J.M., AARON J.E. **Histomorphometry of Fresh Frozen Iliac Crest Bone Biopsies.** Calcif.Tissue Int. 44:387-392. 1989.
- 36.- CLERMONT E.C., BIRKENHAGER-FRENKEL D.H. **Software for bone histomorphometry by means of a digitizer.** Comput Methods Programs Biomed. 21(3):185-94. 1985.
- 37.- COEN G., BALLANTI P., TACCONE-GALLUCCI M., BIANCHI A.R. y cols. **Bone histomorphometry: methodological criteria in the study of metabolic skeletal diseases.** Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 57(18):1873-9. 1981.
- 38.- COHEN J., HARRIS W.H. **The three dimensional anatomy of Haversian Systems.** J.Bone Joint Surg. 40A:419. 1958.

-
- 39.- COLE M.B. Glycol methacrylate embedding of bone and cartilage for light microscopic staining. *J.Microsc.* 127:139-148. 1982.
- 40.- COMPSTON J.E., MELLISH R.W.E., GARRAHAN N.J. Age-related changes in iliac crest trabecular microanatomic bone structure in man. *Bone* 8:289-292. 1987.
- 41.- COMPSTON J.E., VEDI S., STELLON A.J. Inter-observer and intra-observer variation in bone histomorphometry. *Calcif.Tissue.Int.* 38(2): 67-70. 1986.
- 42.- COUPRON P. Données histologiques quantitatives sur le vieillissement osseux humain. Thèse Médecine. Lyon. France. 1972.
- 43.- CRUZ HERNANDEZ M. *Tratado de Pediatría* (6ª ed.). Ed:ESPAXS. Barcelona. 1988.
- 44.- CHALMERS J., WEAVER JK. Cancellous bone : Its Strength and changes with ageing and an evaluation of some methods for measuring its mineral content. *J.Bone Jt.Surg.* 48A:299-308. 1966.
- 45.- CHAMBERS T.J. Osteoblast release osteoclast from calcitonin-induced quiescence. *J.Cell.Sci.* 57:247-260. 1982.
- 46.- CHAMBERS T.J., BRISTOW K., ATHANASOU N.A. The effect of calcitonin, prostaglandins and parathyroid hormone on the cytoplasmic spreading of osteoclast. *Calcif.Tissue Int.* 4-5A, 639. 1983.

- 47.- CHAVASSIEUX P.M., ARLOT M.E., MEUNIER P.J. **Intersamples variation in bone histomorphometry: comparison between parameter values measured on two contiguous transiliac bone biopsies.** Calcif.Tiss.Int. 37:1345-1350. 1985.
- 48.- CHAVASSIEUX P.M., ARLOT M.E., MEUNIER P.J. **Intermethod variation in bone histomorphometry: comparison between manual and computerized methods applied to iliac bone biopsies.** Bone. 6:221-229.1985.
- 49.- CHEN T.L., ARANOW L., FELDMAN D. **Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture.** Endocrinology. 100:619-628. 1977.
- 50.- CHYUN Y.S., KREAM B.E., RAISZ L. **Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation.** Endocrinology. 114:477-480. 1984.
- 51.- DAHL E., NORDAL KP., HALSE J., ATTRAMADAL A. **Histomorphometry of bone tissue.** Tidsskr Nor Laegeforen. 105(23):1503-1507. 1985.
- 52.- DE VERNEJOUL M.C., KUNTZ D., MIRAVET L., GOUTALLIER D., RYCKEWAERT A. **Bone histomorphometric reproducibility in normal patients.** Calcif Tissue Int. 33(4):369-74. 1981.
- 53.- DELMAS PD. **Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease.** Endocrinol Metab Clin North Am. 19(1): 1-18. 1990.
- 54.- DELLING G. **Age-related bone changes.** Curr.Top.Path. 58:117-147. 1973.

- 55.- DELLING G., LUEHMANN H., MATHEWS C.H.E. **Investigation of intra and interreader reproductibility.** In: Bone Histomorphometry. Third International Workshop. Jee W.S.S., Parfitt A.M. (ed.). Sun Valley. USA. 419-427. 1980.
- 56.- DELLUCA H.F. **Vitamine D: The vitamin and the hormone.** Fed.Proc. 33:221-229. 1974.
- 57.- DEQUEKER J., REMANS J., FRANSSSEN R., WAES J. **Ageing patterns of trabecular and cortical bone and their relationship.** Calcif.Tiss.Res. 7:23-30. 1971.
- 58.- DORR L., MALLUCHE H.H., FAUGERE M.C., KANTOR G., HARRIS A. **Bone structural and cellular characteristics in patients with total hip arthroplastiy.** Orthop.Trans. 1985.
- 59.- DOYLE F., BROWN J., LACHANCE C. **Relation between bone mass and muscle weight.** Lancet i:391-393. 1970.
- 60.- DULL T.A., HENNEMAN P.H. **Urinary hydroxyproline excretion in carcinoma of the breast.** Br.J.Exp.Pathol. 53:237-241. 1972.
- 61.- DUNNILL MS. ANDERSON JA. WHITEHEAD R. **Quantitative histological studies on age changes in bone.** J.Path.Bact. 94:275-291. 1976.
- 62.- Editorial **Corticosteroid and bone.** Calcif.Tissue Int. 36:4-7. 1984.
- 63.- ELIAS H., HENNING A., SCHWARZ D.E. **Stereology: application to biomedical research.** Physiol.Rev. 51:158. 1971.

- 64.- ELIAS H. **Three-dimensional structure from single sections.** Science. 174:999. 1971.
- 65.- ERIKSEN E.F., MOSEKILDE L., MELSEN F. **Trabecular bone resorption depth decreases with age:differences between normal males and females.** Bone. 6:141-146. 1985.
- 66.- ERIKSEN E.F., STEINICHE T., MOSEKILDE L., MELSEN F. **Histomorphometric analysis of bone in metabolic bone disease.** Endocrinol.Metab.Clin.North Am. 18(4):919-54. 1989.
- 67.- FALLON M.D., TEITELBAUM S.L. Calcif.Tissue Int. 33:281-283. 1981.
- 68.- FARLEY J.R., BAYLINK D.J. **Purification of a skeletal growth factor from human bone.** Biochemistry. 21:3502-3507. 1982.
- 69.- FAUGERE M.C. MALLUCHE H.H. **Comparison of different bone biopsy techniques for qualitative and quantitative diagnosis of metabolic bone diseases.** J.Bone Jt.Surg. 65 A:1314-1319. 1983.
- 70.- FAWCETT DON W. **A text book of Histology.** Ed. W.B. Saunders. 1986.
- 71.- FISHMAN D.A., HAY E.D. **Origin of osteoclast from mononuclear leucocytes in regenerating new limbs.** Anat.Rec. 143:329. 1962.
- 72.- FROST H.M. **Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid method.** Stain Technol. 33:273. 1958.
- 73.- FROST H.M. **Dynamics of bone remodeling.** In Frost H.M.(ed.): Bone biodynamics. Little, Brown and Co., Boston 1.964.

- 74.- FROST H.M., VILLANUEVA A.R. **Human osteoblastic activity.I:A comparative method of measurement with some results.** Henry Ford Hosp.Med.Bull. 9:76-86. 1961.
- 75.- FROST H.M. **Bone histomorphometry:choice of marking agent and labeling schedule.** In: Recker R.R.: Bone Histomorphometry: Technics and interpretation. pp 38-52. CRC Press. 1983.
- 76.- FROST H.M. **Bone remodelling dynamics.**Charles C.Thomas, Springfield. Illinois. 1963.
- 77.- GARRICK R., DOMAN P., POSEN S. **Quantitative histology of bone. The use of a computer program and results in normal subjects.** Clin.Sci. 43:789-797. 1972.
- 78.- GLOWACKI J., DEFTOS L.J. **The effects of calcitonin of bone formation.** En: Effects of calcitonin in man. Gennari C., Segre G. (eds.). Masson. Milan. 133-140. 1983.
- 79.- GOLDNER J. **A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes.** Am.J.Path. 14:237-243. 1938.
- 80.- HANCOX N.M. **The biology of bone.** Cambridge University Press. Oxford. 1985.
- 81.- HARRIS W.H, HEANEY R.P. **Skeletal renewal and metabolic bone disease.** New Eng.Jour.Med. 280:193-202,253-259,303-311. 1969.
- 82.- HAUSSLER M.R., MCCAIN T.P. **Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action.** New Eng.J.Med. 297:974-983 y 1041-1050. 1977.

-
- 83.- HERNANDEZ E.R., NUÑEZ TORRÓN, H., MATUTE J.A. **El hueso: mecanismo de formación y destrucción.** *Rheuma: Osteoporosis*. 19:13-22. 1984.
- 84.- HERRING G.M. **Chemistry of the bone matrix.** *Clin Orthop*. 36:169. 1964.
- 85.- HODGSON S.F., JOHNSON K.A., MUHS J.M. **Outpatient percutaneous biopsy of the iliac crest: Methods, morbidity, and patient acceptance.** *Mayo Clin. Proc.* 61:28-33. 1986.
- 86.- HORTON W.A., DOCKERY N., SILLENCE D., RIMOIN D.L. *Stain Technol.* 55:19-29. 1980.
- 87.- HOTT M. MARIE P.J. **Glycol methacrylate as an embedding medium for bone.** *Stain Technol.* 62(1):51-7. 1987.
- 88.- JASANI C., NORDIN B.E.C., SMITH D.A. **Spinal osteoporosis and the menopause.** *Proc.Royal Soc.Med.* 58:441-444. 1965.
- 89.- JAWROSKI Z.F.G. **Some morphologic and dinamic aspects of remodeling on the endosteal-cortical and trabecular surface.** In J.Menezel, P.Howell (eds.): *Calcified Tiss.* Academic Press, N.Y. 1971.
- 90.- JOHNSON K.A., KELLY P.J., JOWSEY J., PHIL D. **Percutaneous Biopsy of the Iliac Crest.** *Clin Orthop*. 123:34-36. 1977.
- 91.- JUVIN R., CAMUS E., USSON Y., PHELIP X. **An automatic method for bone histomorphometry: assessment with reference to usual static and dynamic parameters.** *J.Bone Miner.Res.* 5(3):235-44. 1990.

- 92.- KASPERK C.H., WERGEDAL J.E., FARLEY J.R. **Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro.** *Endocrinology*. 124:1576-1578. 1989.
- 93.- KAWASHIMA K., IWATA S., ENDO H. **Selective activation of diaphysed chondrocytes by parathyroid hormone, calcitonin and N,O-dibutyl 3'5'-cyclic monophosphoric acid in proteoglycan synthesis of chick embryonic femur cultivated < in vitro > .***Endocrinol. JPN*. 27:357-361. 1980.
- 94.- KENNY A.D. **Role of Carbonic Anhydrase in bone.** *Calcif. Tiss. Int.* 37:126-133. 1985.
- 95.- KERLEY E. **The microscopic determination of age in human bone.** *Am. Jour. of Phisic. Anthrop.* 23:149-164. 1965.
- 96.- KIMMEL D.B., JEE W.S.S. **Measurements of area, perimeter, and diatance: details of data collection in bone histomorphometry.** In: Recker R.R.: *Bone Histomorphometry: Technics and interpretation.* pp 90-110. 1983.
- 97.- KIMMEL D.B., JEE W.S.S. **A Quantitative Histologic Analysis of the Growing Long Bone Metaphysis.** *Calcif. Tissue Int.* 32:113-122. 1980.
- 98.- KOMM B.S., TERPENING C.M., BENZ D.J. **Estrogen binding receptor mRNA and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells.** *Science*. 241:81-84. 1988.
- 99.- KOVARIK J., WILLVONSEDER R., PLENK H. JR., BOHLER N., WOLOSZCZUK W., ESCHBERGER J., DORDA W., HABER P. **Evidence for negative correlation between quantitative histological studies and microradiography of iliac crest bone and forearm osteodensitometry in elderly women with osteoporosis.** *Calcif Tissue Int.* 34(5):456-458. 1982.

- 100.- KOWALEWSKI K., HERON F., RUSSEL J.C. **Effect of sex hormones on the metabolism of collagen and ^{45}Ca by the bone of young gonadectomized rats.** Acta Endocrinol. 67:740-755. 1971.
- 101.- KREMPIEN B. **Osteocyte activation hormonal and mechanical factors.** Parfitt J. Bone Histomorphometry. pp 257-268. Société Nouvelle de Publications Médicales et Dentaires. París. 1981.
- 102.- KROGMAN W.M. **The Human Skeleton in Forensic Medicine (Segunda edición).** Charles C.Thomas. Springfield. Illinois. 1.986.
- 103.- KURIHARA N., CIVIN C., ROODMAN G.D. **Osteotropic factor responsiveness of highly purified populations of early and late precursors for human multinucleated cells expressing the osteoclast phenotype.** J.Min.Res. 6:257-261. 1991.
- 104.- LALOR B., FREEMONT A., CARLILE S. **An improved transilial crest bone biopsy drill for quantitative histomorphometry.** Bone. 7(4):273-276. 1986.
- 105.- LANGMAN J. **Embriología Médica.** Ed. Interamericana. 1976.
- 106.- LAVAL-JEANTET A.M., CHATEAU J.Y., BERGOT C., LAVAL-JEANTET M., KUNTZ D. **Comparison of radiodensitometry and histomorphometry in normal and abnormal bone.** Pathol Biol (Paris). 29(3):155-161. 1981.
- 107.- LIPS P., COUPRON P., MEUNIER P.J. **Mean wall thickness of trabecular bone packets in the human iliac crest: changes with age.** Calcif.Tiss.Res. 26:13-17. 1978.

- 108.- MALGARALI A., MELDOLESI J., ZAMBOLLIN ZALLONE A. **Control of cytosolic free calcium in rat and chicken osteoclasts: the role of extracellular calcium and calcitonin.** J.Biol.Chem. 264:14342-14347. 1989.
- 109.- MALLUCHE H.H., GOLDSTEIN D.A., MASSRY S.G. **1,25-(OH)₂-VitD modulates bone cell number and activity in uremia.** Clin.Res. 30:754A. 1982.
- 110.- MALLUCHE H.H., FAUGERE M.C. **Atlas of mineralized Bone Histology (Primera edición).** KARGER. 1.986.
- 111.- MALLUCHE H.H., SHERMAN D., MEYER W., MANAKA R., MASSRY S.G. **A new semiautomatic method for quantitative static and dynamic bone histology.** Calcif.Tissue Int. 34:439-448. 1982.
- 112.- MALLUCHE H.H., MEYER W., SHERMAN D., MASSRY S.G. **Quantitative Bone Histology in 84 Normal American Subjects - Micromorphometric analysis and evaluation of variance in iliac bone.** Calcified Tissue Int. 34:449-455. 1982.
- 113.- MAREN T.H. **Carbonic Anhydrase.** New Eng.Jour.of Med. 313:180-181. 1985.
- 114.- MAROTTI G. **Three-dimensional study of osteocytic lacunae.** Metab.Bone Dis.Rel.Res. 25:223-229. 1980.
- 115.- MATHEWS C.H., MEHR L. J.Histotechnol. 2:23-24. 1979.
- 116.- MATRAJT M., HIOCO D. **Solochrome cyanin R as an indicator dye of bone morphology.** Stain Technol. 41:97. 1966.

- 117.- MAZESS R.B., WHEDON G.D. **Immobilization and bone.** Calcif.Tiss.Int. 35:265-267. 1983.
- 118.- MECHANIC G.L., YOUNG D.R., BANES A.J., YAMAUCHI M. **Nonmineralized and Mineralized Bone Collagen in Bone of Immobilized Monkeys.** Calcif.Tissue Int. (1986).
- 119.- MELSEN F., MELSEN B., MOSEKILDE L., BERGMAN S. **Histomorphometric analysis of normal bone from the iliac crest.** Acta Pathol.Microbiol.Scand. 86:70-81. 1978.
- 120.- MELSEN F., MELSEN B. **The relation between densitometric and quantitative histological analyses of bone specimens from the iliac crest.** Clin.Orthop. 117:321-326. 1976.
- 121.- MELSEN F., MELSEN B., MOSEKILDE L. **An evaluation of the quantitative parameters applied in bone histology.** Acta Pathol.Microbiol.Scand. 86:63-69. 1978.
- 122.- MERZ W.A., SCHENK R.K. **A quantitative histological study on bone formation in human cancellous bone.** Acta Anat.Basel. 76:1-15. 1970.
- 123.- MEUNIER P. **La dynamique du remaniement osseux étudiée par lecture quantitative de la biopsie osseuse.** Thesis. Lyon. 1967.
- 124.- MEUNIER P., VIGNON G., VAUZELLE J.L. **Methodes histologiques quantitatives en pathologie osseuse.** Lyon Med. 18:133. 1966.

- 125.- MEUNIER P., BRESSOT C. **Endocrine influences on bone cells and bone remodeling evaluated by clinical histomorphometry.** In: Endocrinology of calcium metabolism. Parsons J.A. (ed.). Raven Press. N.Y. 445-465. 1982.
- 126.- MEUNIER P.J. **Use of an image analyzing computer for bone morphometry.** In: Clinical Aspects of metabolic bone diseases. Frame B., Parfitt A.M., Duncan H. (eds.). Excerpta Medica. Amsterdam. 148-151. 1973.
- 127.- MEUNIER P.J., COUPRON P., EDOUARD C.M. **Physiological and comparative histological data.** Clin.Endocrino. Metab. 2:239-259. 1973.
- 128.- MEUNIER P.J., CHAVASSIEUX P. **Histomorphometry. Method for evaluating the bone mass.** Rev Rhum Mal Osteoartic. 52(12):669-673. 1985.
- 129.- MILLER E.J., MARTIN G.R. **The collagen of bone.** Clin.Orthop. 59:195. 1968.
- 130.- MINKIN C., DENNINGS J.M. **Carbonic Anhydrase and bone remodeling: sulfonamide inhibition of bone resorption in organ culture.** Science. 176:1031-1033. 1972.
- 131.- MOHAN S., BAYLINK D.J. **Bone growth factors.** Clin.Orthop. 263:30-48. 1991.
- 132.- NAGANT DE DEUXCHAISNES C., KRANE SM. **Paget's disease of bone; clinical and metabolic observations.** Medicine 43:232-266. 1964.
- 133.- NEWMAN W.F., NEWMAN M.W. **The chemical dynamics of bone mineral.** Chicago. University of Chicago Press. 1985.

- 134.- NORDIN B.E.C. **Calcium, phosphate and magnesium metabolism.** Churchill, London. pp 113-161. 1976.
- 135.- ORNOY A., GOODWIN D., NOFF D. **24,25-(OH)₂-D₃ is a metabolite of vitamin D essential for bone formation.** Nature 276:517-559. 1978.
- 136.- OWEN M. **Histogenesis of bone cells.** Calcif.Tiss.Res. 25:205. 1978.
- 137.- PARFITT A.M. **The quantitative approach to bone remodeling: A critique of current methods and their interpretation.** In Frame B., Parfitt A.M., Duncan H. (eds.): Clinical aspects of metabolic bone disease. Amsterdam. Excerpta Medica. 1973.
- 138.- PARFITT A.M. **Stereologic basis of bone histomorphometry: theory of quantitative microscopy and reconstruction of the third dimension.** In Recker R.R. : Bone Histomorphometry:Technics and interpretation. pp 53-88. CRC Press. 1983.
- 139.- PARFITT A.M. **Quantum concept of bone remodeling and turnover:implications for the pathogenesis of osteoporosis.**
- 140.- PARFITT A.M., VILLANUEVA M.M., CROUCH M.M., MATHEWS C.H.E., DUNCAN H. **Classification of osteoid seams by combined use of cell morphology and tetracycline labelling. Evidence for intermittency of mineralization.** Meunier. Bone histomorphometry. pp 299-319. Société de la Nouvelle Imprimerie Fournié. Toulouse. 1977.

- 141.- PARFITT A.M., DREZNER M.K., GLORIEUX F.H., KANIS J.A., MALLUCHE H., MEUNIER P.J., OTT S.M., RECKER R.R. **Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.** J Bone Miner Res. 2(6):595-610. 1987.
- 142.- PARFITT A.M. The actions of Parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis and metabolic bone disease. I. Mechanisms of calcium transfer between blood and bone and their cellular basis. Morphological and kinetic approaches to bone turnover. Metabolism. 25:909-955. 1976.
- 143.- PARFITT A.M., MATHEWS C.H.E., VILLANUEVA A.R., KLEERKOPER M., FRAME B., RAO D.S. Relationships between surface, volume and thickness of iliac trabecular bone in aging and osteoporosis. J.Clin:Invest. 72:1395-1409. 1983.
- 144.- PARFITT J. **Bone Histomorphometry.** Société Nouvelle de Publications Médicales et Dentaires. Paris. 1981.
- 145.- PERALTA SERRANO A. **Patología del crecimiento y desarrollo en el niño.** Ed: Peralta Serrano A. Madrid. 1975
- 146.- POEDENPHANT J. Methodological problems in bone histomorphometry and its application in postmenopausal osteoporosis. Dan.Med.Bull. 37(5):424-433. 1990.
- 147.- POEDENPHANT J., CHRISTIANSEN C. The value of iliac crest biopsy in spinal osteoporosis. A critical view. In Christiansen C. (ed): Osteoporosis. Alborg. Denmark. Alborg Stiftbogtrykkeri. 735-737. 1988.

- 148.- PRICE P.A., PARTHEMORE J.G. DEFTOS L.J. **New biochemical marker for bone metabolism: measurement by radioimmunoassay of bone GLA-protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease.** J.Clin.Invest. 66:878-883. 1980.
- 149.- PRIETO J.L. **El uso de la histomorfometría ósea en Paleopatología.** En Munibe (Antropología-Arkeología). Sociedad de Ciencias Aranzadi. Supl.nº8: 203-207. 1992.
- 150.- RAINA V. **Normal Osteoid tissue.** J.Clin.Pathol. 25:229-232. 1972.
- 151.- RAO D.S. **Practical approach to bone biopsy.** In Recker R.R.: Bone Histomorphometry: Technics and interpretation. Boca Raton. CRC Press. 1983.
- 152.- RASSMUSSEN H., BORDIER P. **The physiological and celular basis of metabolic bone disease.** William & Wilkins Company. 1974.
- 153.- RECKER R.R. **Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation.** CRC Press. Boca Ratón. 1983.
- 154.- REVELL P.A. **Histomorphometry of bone.** J.Clin.Pathol. 36(12):1323-1331. 1983.
- 155.- RIIS B.J. KRABBE S., CHIRSTIANSEN C., CATHERWOOD B.D., DEFTOS L.J. **Bone turnover in male puberty: a longitudinal study.** Calcif.Tiss.Int. *:213-217. 1985.
- 156.- RUSSELL R.G.G., KANIS J.A., GOWEN M. **Cellular control of bone formation and repair.** Osteoporosis: A multidisciplinary problem. 31-42. Dixon J., Russell R.G.G., Stamp T.C.B. Eds. Academic Press. 1983.

- 157.- SATO K., WAKAMATSU E., SATO T., HONMA T., KOTAKE H., BYERS P.D. **Histomorphometric study of trabecular channels in normal iliac bone.** *Calcif.Tissue Int.* 39(1):2-7. 1986.
- 158.- SATO K., BYERS P. **Quantitative Study of Tunneling and Hook Resorption in Metabolic Bone Disease.** *Calcif.Tissue Int.* 33:459-466. 1981.
- 159.- SCHENK R.K., OLAH A.J., HERRMANN W. **Preparation of calcified tissues for light microscopy.** In *Methods of Calcified Tissue Preparation.* Dickson G.R. Ed. Elsevier Science Publishers. 1984.
- 160.- SELA J. **Bone remodeling in pathologic conditions.** *Calcif.Tiss.Res.* 23:229-234. 1977.
- 161.- SELLERS A., MEIKLE M.C., REYNOLDS J.J. **Comlagenase and collagenase inhibitors levels following changes in bone resorption in vitro.** *Calcif.Tiss.Int.* 31:35-43. 1980.
- 162.- SERRANO S., AUBIA J., MARIÑOSO M.L. **Patología Osea Metabólica.** SANDOZ S.A.E. 1990.
- 163.- SERRANO S., MARIÑOSO M.L. **La biopsia ósea en la osteodistrofia renal.** *Medicina Clínica.* 96(15):573-574. 1991.
- 164.- SISSONS H.A. **The cancellous bone of the iliac crest.** *Calcif.Tissue Res.* 4:147-161. 1969.

- 165.- SMITH D.M., NANCE W.E., KANG K.W., CHRISTIAN J.C., JOHNSTON C.C. **Genetic factors in determining bone mass.** Jour.clin.Invest. 52:2800-2808. 1973.
- 166.- SMITH J.M., JEE W.S.S. **Automated skeletal histomorphometry.** In: Recker R.R.: Bone Histomorphometry: Technics and interpretation. Boca Raton. CRC Press. 1983.
- 167.- SMITH E.L., GILLIGAN C. **Physical activity effects on bone metabolism**
- 168.- STEVENSON J.C., ABYASEKERA G., HILLYARD C.J. **Calcitonin and the calcium regulating hormones in postmenopausal women: effects of estrogens.** Lancet. 1:693-695. 1981.
- 169.- STOUT S.D. **The use of bone histomorphometry in skeletal identification: The case of Francisco Pizarro.** Journal Forensic Sciences. 31:296-300. 1986.
- 170.- STOUT S.D., PAINE R.R. **Histological Age estimation using rib and clavicle.** Am.Jour.Phys.Anthrop. 87:111-115. 1992.
- 171.- TERMINE J.D., KLEINMANN H.K., WITHSON S.W. **Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen.** Cell. 26:99-105. 1981.
- 172.- TERMINE J.D., ROBEY P.G., FISHER L.W., SHMOKAWA H., DRUM M.A., CONN K.M., HAWKINS G.R., CRUZ J.B. THOMPSON K.G. **Osteonectin, bone proteoglycan and phosphophoryn defects in a form of bovine osteogenesis profecta.** Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 81:2213. 1984.

- 173.- THOMPSON D.D. **Microscopic determination of age at death in an autopsy series.** Journal of Forensic Sciences. 26:470-475. 1981.
- 174.- THOMPSON D.D. **Age changes in bone mineralization, cortical Thickness, and Haversian Canal area.** Calcif.Tiss.Int. 31:5-11. 1980.
- 175.- THOMPSON D.D. **The core technique in the determination of age at death in skeletons.** J.Forensic Sciences. 24:902-915. 1979.
- 176.- THOMSON D.D., GALVIN C.A. **Estimation of age at death by tibial osteon remodeling in an autopsy series.** Forensic Science Int. 22:203-211. 1983.
- 177.- TROTTER M., BREWMAN G.E., PETERSON K.K. **Densities of bones of white and negro skeletons.** J.Bone Jt. Surg. 42-A:50-58. 1960.
- 178.- TURNER R.T., SCHRAEN H. **Estrogen induced sequential changes in avian bone metabolism.** Calcif.Tissue Res. 24:157-162. 1977.
- 179.- UEDA K, SAITO A., NAKANO H. **Cortical Hyperostosis following long term administration prostaglandin E₂ in infants with cyanotic heart disease.** J.Pediatr. 97:834. 1980.
- 180.- UENO K., TAKAHASHI H. **Diagnosis of metabolic bone diseases: bone biopsy and bone histomorphometry.** Nippon Rinsho. 44(11):2461-2466. 1986.
- 181.- VANDERSCHUEREN D., GEVERS G., DEQUEKER J., GEUSENS P., NIJS J., DEVOS P., DE ROO M., BOUILLON R. **Seasonal variation in bone metabolism in young healthy subjects.** Calcif.Tiss.Int. 49:84-89. 1991.

- 182.- VEDI S., COMPSTON J.E. **Direct and indirect measurements of osteoid seam width in human iliac crest biopsies.** Metab.Bone.Dis. 5(6):269-274. 1984.
- 183.- VEDI S., COMPSTON J.E., WEBB A., TIGHE J.R. **Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of normal British subjects.** Bone 4:231-236. 1982.
- 184.- VELDE J.T.E., BURKHARDT R., KLEIVERDA K., LEENHEERS-BINNENDIJK L., SOMMERFELD W. **Methyl-methacrylate as an embedding medium in histopathology.** Histopathology 1:319-330. 1977.
- 185.- VIGORITA V.J. **The bone biopsy protocol for evaluating osteoporosis and osteomalacia.** Am.Jour.Surg.Pathol. 8:925-930. 1984.
- 186.- VIGORITA V.J. **The tissue Pathologic features of metabolic bone disease.** Orthop. Clin. of North America. 4:613-629. 1984.
- 187.- VILLANUEVA A.R. **Methods for preparing and interpreting mineralized sections of bone.** In Bone Morphometry. Jaworski Z.F.G. Ed. University of Ottawa Press. Ottawa, Canada. 1976.
- 188.- VON KOSSA **Ueber die im Organismus Kuenstlich erzeugbaren Verkalkungen.** Beitr.Path.Anat. 29:163-202. 1901.
- 189.- WATROUS D.A., ANDREWS B.S. **The metabolism and Immunology of bone.** Seminars in Arthritis and Rheumatism. 19(1):45-65. 1989.

- 190.- WEISS R.E., SINGER F.R., GORN A.H. **Calcitonin stimulates bone formation when administered prior to initiation of osteogenesis.** J.Clin.Invest. 68:815-818. 1981.
- 191.- WHITEHOUSE W.J. **Cancellous bone in the anterior part of the iliac crest.** Calcif.Tiss.Res. 23:67-76. 1977.
- 192.- WHITEHOUSE W.J. **The quantitative morphology of anisotropic trabecular bone.** J.Microsc. 101:153-168. 1974.
- 193.- WHITEHOUSE W.J. **Structural variations in spongy bone as revealed by measurements of scanning electron micrographs.** In: The health effects of plutonium and radium. Jee W.S.S. (Ed.) J.W.Press. University of Utah, Salt Lake City. 1986.
- 194.- WOLFF J. **The law of bone remodeling.** Springer-Verlag. 1986.
- 195.- WOODS C.G., MORGAN D.B., PATERSON C.R., GOSSMANN H.H. **Measurement of osteoid in bone biopsy.** J.Path.Bact. 95:441-447. 1968.
- 196.- WU K. SCHUBECK KE. FROST HM. VILLANUEVA A. **Haversian bone formation rates determined by a new method in a Mastadon, and in human Diabetes Mellitus and Osteoporosis.** Calcif.Tiss.Research. 1970. 6:204-219.
- 197.- XIPELL J.M., BROWN D.J. **Histology of normal bone - a computerized study in the iliac crest.** Pathology 11:235-240. 1979.
- 198.- ZAIDI M., DATTA H.K., PATCHELL A. **"Calcium - activated" intracellular calcium elevation: a novel mechanism of osteoclast regulation.** Biochem. Biophys.Res. Commun. 163:1461-1465. 1989.

199. - ZERWEKH J.E. **Bone Metabolism** Seminars in Nephrology. 12(2):79-90. 1992.

8 - APENDICE

APENDICE**MUESTRA: B-04**

SEXO: HEMBRA
EDAD: 10 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 20 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: SHOCK TRAUMATICO.

MUESTRA: B-02

SEXO: HEMBRA
EDAD: 11 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 20 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: SHOCK TRAUMATICO.

MUESTRA: B-01

SEXO: HEMBRA
EDAD: 0.66667 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 22 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: TCE CON FRACTURA CONMINUTA OCCIPITAL.

MUESTRA: M-51

SEXO: VARON
EDAD: 6 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: ? horas.
CAUSA DE LA MUERTE: TCE. CAIDA CASUAL.

MUESTRA: M-50

SEXO: VARON
EDAD: 9 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 19 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: HEMORRAGIA INTRACEREBELOS.

MUESTRA: M-48

SEXO: HEMBRA
EDAD: 0.16667 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 24 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: HEMORRAGIA CEREBRAL. ATROPELLO.

MUESTRA: M-47

SEXO: VARON
EDAD: 3 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 16 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO. ATROPELLO.

MUESTRA: M-46

SEXO: VARON
EDAD: 7 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 8 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: TCE. ATROPELLO.

MUESTRA: M-45

SEXO: VARON
EDAD: 0.5 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 22 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: SHOCK SECUNDARIO A QUEMADURAS
DEL 75%

MUESTRA: M-43

SEXO: VARON
EDAD: 2 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 19 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: PCR.

MUESTRA: M-41

SEXO: VARON
EDAD: 14 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 14 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: ESTALLIDO CRANEAL POR ARMA DE
FUEGO.

MUESTRA: M-40

SEXO: HEMBRA

EDAD: 7 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 16 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: TCE.TRAFICO.

MUESTRA: M-39

SEXO: VARON

EDAD: 19 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 20 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: SHOCK HIPOVOLEMICO POR HERIDA DE ARMA DE FUEGO.

MUESTRA: M-38

SEXO: VARON

EDAD: 17 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 18 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: SOBREDOSIS.

MUESTRA: M-37

SEXO: VARON

EDAD: 0.33333 años. ^

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 23 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: MUERTE SUBITA DEL LACTANTE.

MUESTRA: M-35

SEXO: VARON

EDAD: 1 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 23 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO. TRAFICO.

MUESTRA: M-34

SEXO: VARON

EDAD: 0.75 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 21 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: MUERTE SUBITA DEL LACTANTE.

MUESTRA: M-33

SEXO: HEMBRA

EDAD: 0.083333 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 5 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: ASFIXIA.

MUESTRA: M-32

SEXO: VARON

EDAD: 12 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 17 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: TCE. HEMORRAGIA CEREBRAL.

MUESTRA: M-31

SEXO: VARON
EDAD: 3 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 11 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: SUMERSION.

MUESTRA: M-30

SEXO: VARON
EDAD: 4 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 18 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: SHOCK TRAUMATICO.

MUESTRA: M-27

SEXO: HEMBRA
EDAD: 12 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 12 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO.

MUESTRA: M-26

SEXO: HEMBRA
EDAD: 12 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 17 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO.

MUESTRA: M-25

SEXO: VARON
EDAD: 5 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 17 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: TCE.SECCION MEDULAR.

MUESTRA: M-24

SEXO: HEMBRA
EDAD: 1 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 19 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO.

MUESTRA: M-23

SEXO: VARON
EDAD: 13 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 16 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: ASFIXIA POR SUMERSION.

MUESTRA: M-22

SEXO: HEMBRA
EDAD: 15 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 15 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: INTOXICACION POR MONOXIDO DE CARBONO.

MUESTRA: M-20

SEXO: VARON
EDAD: 0.0027397 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 15 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: ASPIRACION DE LIQUIDO AMNIOTICO.

MUESTRA: M-19

SEXO: VARON
EDAD: 0.12329 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 20 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: CARDIOPATIA CONGENITA.

MUESTRA: M-17

SEXO: HEMBRA
EDAD: 5 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 14 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: TRAUMATISMO CERVICAL.

MUESTRA: M-16

SEXO: HEMBRA
EDAD: 7 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 14 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: TRAUMATISMO CRANEOENCEFALICO.

MUESTRA: M-15

SEXO: HEMBRA
EDAD: 0.75 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 22 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: PCR.

MUESTRA: M-13

SEXO: VARON
EDAD: 0.25 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 23 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: ASFIXIA MECANICA POR ASPIRACION DE ALIMENTOS.

MUESTRA: M-12

SEXO: VARON
EDAD: 0.33333 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 17 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: NEUMONIA POR ASPIRACION.

MUESTRA: M-10

SEXO: HEMBRA
EDAD: 0.83333 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 15 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: PCR.

MUESTRA: M-09

SEXO: VARON

EDAD: 1 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 12 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: SHOCK HIPOVOLEMICO POSTRAUMATICO.

MUESTRA: M-08

SEXO: HEMBRA

EDAD: 5 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 20 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: INTOXICACION POR MONOXIDO DE CARBONO.

MUESTRA: M-07

SEXO: HEMBRA

EDAD: 8 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 20 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: INTOXICACION POR MONOXIDO DE CARBONO.

MUESTRA: M-06

SEXO: HEMBRA

EDAD: 0.027397 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 18 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: MUERTE SUBITA DEL LACTANTE.

MUESTRA: M-05

SEXO: HEMBRA
EDAD: 0.83333 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 22 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: ASFIXIA POR SUMERSION.

MUESTRA: M-04

SEXO: HEMBRA
EDAD: 0.66667 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 10 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: MUERTE SUBITA DEL LACTANTE.

MUESTRA: M-03

SEXO: VARON
EDAD: 1 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 21 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: ASFIXIA POR SUMERSION.

MUESTRA: M-02

SEXO: VARON
EDAD: 4 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 21 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: TRAUMATISMO CRANEOENCEFALICO.

MUESTRA: M-01

SEXO: VARON

EDAD: 2 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 15 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: SHOCK POR INHIBICION.

MUESTRA: OR-01

SEXO: HEMBRA

EDAD: 1 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 14 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: ASFIXIA POR SUMERSION.

MUESTRA: PM-01

SEXO: VARON

EDAD: 16 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 16 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: CARDIOPATIA HIPERTROFICA.

MUESTRA: S-14

SEXO: VARON

EDAD: 20 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 19 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO. TRAFICO.

MUESTRA: S-13

SEXO: VARON
EDAD: 1 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 21 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: MUERTE SUBITA DEL LACTANTE.

MUESTRA: S-12

SEXO: VARON
EDAD: 16 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 18 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO. ATROPELLO.

MUESTRA: S-11

SEXO: VARON
EDAD: 19 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 18 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO. TRAFICO.

MUESTRA: S-10

SEXO: HEMBRA
EDAD: 18 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 20 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: TCE. TRAFICO.

MUESTRA: S-09

SEXO: VARON

EDAD: 19 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 21 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO. TRAFICO.

MUESTRA: S-08

SEXO: VARON

EDAD: 20 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 14 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO. TRAFICO.

MUESTRA: S-07

SEXO: VARON

EDAD: 20 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 20 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: TCE. FRACTURA CRANEAL. TRAFICO.

MUESTRA: S-06

SEXO: VARON

EDAD: 17 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 15 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: POLIRAUMATISMO. TRAFICO.

MUESTRA: S-05

SEXO: VARON
EDAD: 14 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 23 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: ASFIXIA MECANICA POR AHORCADURA.

MUESTRA: S-04

SEXO: VARON
EDAD: 3 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 17 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: PRECIPITACION.

MUESTRA: S-02

SEXO: VARON
EDAD: 3 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 20 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: ASFIXIA POR COMPRESION CERVICAL.

MUESTRA: S-01

SEXO: HEMBRA
EDAD: 1 años.
RAZA: BLANCA
DATA DE LA MUERTE: 13 horas.
CAUSA DE LA MUERTE: FRACTURA DE BOVEDA CRANEAL.

MUESTRA: SS-01

SEXO: HEMBRA

EDAD: 20 años.

RAZA: BLANCA

DATA DE LA MUERTE: 15 horas.

CAUSA DE LA MUERTE: POLITRAUMATISMO.