

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**LABORATORIO DE ANTROPOLOGÍA FÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO HISTOLOGICO DEL HUESO PARA ANALISIS DE
LOS CAMBIOS POR DIFERENCIA DE TEMPERATURA**

TESIS DOCTORAL

Rafael Fernández Castillo

Granada, 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rafael Fernández Castillo
D.L.: GR 681-2012
ISBN: 978-84-694-6354-3



D. JOSE ANTONIO LORENTE ACOSTA, Doctor en Medicina, Profesor Titular de Medicina Legal y Toxicología y Psiquiatría de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis Doctoral ***ESTUDIO HISTOLOGICO DEL HUESO PARA ANALISIS DE LOS CAMBIOS POR DIFERENCIA DE TEMPERATURA*** ha sido realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Antropología Física de la Universidad de Granada por el licenciado en Antropología Don Rafael Fernández Castillo, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente Tesis ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes extiendo el presente en la ciudad de Granada, siendo el día cinco de Mayo de dos mil once

Fdo: Jose Antonio Lorente Acosta



D. RAFAEL JOSÉ ESTEBAN DE LA ROSA, Doctor en Medicina y Médico Especialista en Nefrología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada,.

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis Doctoral ***ESTUDIO HISTOLOGICO DEL HUESO PARA ANALISIS DE LOS CAMBIOS POR DIFERENCIA DE TEMPERATURA*** ha sido realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Antropología Física de la Universidad de Granada por el licenciado en Antropología Don Rafael Fernández Castillo, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente Tesis ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes extiendo el presente en la ciudad de Granada, siendo el día cinco de Mayo de dos mil once.

Fdo: Rafael José Esteban de la Rosa.

**ESTUDIO HISTOLOGICO DEL HUESO PARA ANALISIS DE
LOS CAMBIOS POR DIFERENCIA DE TEMPERATURA**



Rafael Fernández Castillo
Granada, 2011

Agradecimientos

En una de tantas conversaciones que se tienen en el día a día, escuché de un amigo al que tengo bastante aprecio, una de las expresiones que mas me han gustado y que además he tratado de llevar siempre como lema: *“Un barco no lo puede construir una sola persona, sino un grupo de personas, todas ellas con diferentes capacidades que hacen que el resultado final sea posible”*.

Quiero comenzar este apartado dedicándole mi mas sincera gratitud:

A Ruth, por enrolarte y compartir este proyecto conmigo, estar siempre ahí cuando te necesito, inspirarme y ayudarme en los momentos en los que remar resulta difícil, acercarte siempre con una sonrisa cuando me has visto mas preocupado, por soportar todo el tiempo y esfuerzo que ha supuesto este proyecto aun cuando lo he tomado del nuestro propio. Te quiero.

Al doctor Douglas Ubelaker, por interesarse por mi trabajo y permitirme visitar el Instituto Smithsonian de Washington DC, ayudándome y reorientando mi trabajo en todo momento con sus valiosos consejos, siempre dispuesto a echar una mano.

Al doctor José Antonio Lorente Acosta por haber confiado en mi desde que me acerque para preponerle la dirección de esta tesis, ayudándome a conseguir los medios necesarios para poder realizar mi trabajo. Por estar siempre ahí y ayudarme con optimismo y paciencia incluso en largas distancias.

Al doctor Rafael José Esteban de la Rosa por su ayuda y dedicación, siempre disponible, orientándome en la metodología y redacción de mi trabajo.

A Elisa María Cabrerizo, por ayudarme a obtener las muestras necesarias para mi investigación, sin ella hubiera sido bastante difícil realizar mi trabajo.

Al doctor Javier Esquivias por orientarme a la hora de escoger el mejor método para el estudio de las muestras óseas.

A Carmen Ruiz Guzmán por su inestimable ayuda en el laboratorio preparando las muestras para la investigación.

A Javier Cañizares por su ayuda en el laboratorio del parque tecnológico de Ciencias de la Salud

Al laboratorio de antropología física por su acogida durante el tiempo que en el que se ha desarrollado este trabajo.

A Ruth y Guillermo, razón de mi existencia.

INDICE:

CAPITULO I: INTRODUCCION.	5
1.1. El proceso de cremación.	6
1.2. Recuperación de restos.	17
1.3. Análisis.	18
1.3.1. Análisis de las características visuales.	19
1.3.1.1. Cambios en el color.	19
1.3.1.2. Contracción y deformación.	21
1.3.1.3. Material útil para la investigación.	23
1.3.1.4. Patrón de fracturas.	25
1.3.2. Análisis de las características histológicas.	27
1.3.2.1. Matriz inorgánica.	28
1.3.2.2. Matriz orgánica.	28
1.3.2.3. Técnicas de estudio del tejido oseo.	32

1.3.2.3.1. Termogravimetría.	32
1.3.2.3.2. Difracción de rayos x.	34
1.3.2.3.3. Microscopio electrónico de barrido.	35
1.3.3. Análisis antropométrico de los restos cremados.	37
1.3.3.1. Estimación de la Edad.	37
1.3.3.2. Determinación del sexo.	39
1.3.3.3. Estimación de la estatura.	41
1.4. Estructura ósea.	43
1.5. Crecimiento y remodelado óseo.	44
1.6. Histomorfología ósea.	47
1.7. La pelvis y la cresta lliaca.	51
1.7.1 El ilion.	52
1.7.2. La cresta lliaca.	53
1.8. Biopsia ósea.	54
CAPITULO II: JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	58
2.1. Justificación.	59
2.2. Objetivos.	61

CAPITULO III: MATERIAL Y METODO	62
3.1. Material.	63
3.2. Métodos.	66
3.2.1. Obtención de las muestras.	66
3.2.2. Quemado de las muestras.	67
3.2.3. Procesado de las piezas.	68
3.2.3.1 Fijación e inclusión.	68
3.2.3.2. Corte.	73
3.2.3.3. Tinción.	74
3.2.3.4. Número de preparaciones.	77
3.2.3.5. Análisis y procesado de las imágenes.	77
CAPITULO IV: RESULTADOS	78
4.1. Cambios en el color.	79
4.2. Cambios histológicos a 100°C.	83
4.3. Cambios histológicos a 200°C.	90
4.4. Cambios histológicos a 300°C.	94
4.5. Cambios histológicos a 400°C.	97
4.6. Cambios histológicos a 500°C.	100
4.7. Cambios histológicos a 600°C.	103

4.8. Cambios histológicos a 700°C.	107
4.9. Cambios histológicos a 800°C.	111
4.10. Cambios histológicos a 900°C.	114
4.11. Cambios histológicos a 1000°C.	118
4.12. Cambios histológicos a 1100°C.	123
4.13. Estudio de la matriz ósea.	126

CAPITULO V: DISCUSION	142
------------------------------	------------

CAPITULO VI: CONCLUSIONES	163
----------------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	165
---------------------	------------

CAPITULO I

INTRODUCCION



CAPITULO 1: INTRODUCCION.

El fuego es sin duda una de las fuerzas más destructivas desde un punto de vista forense, puede ser el arma o el evento que cause la muerte tales como: accidentes aéreos, bombardeos, explosiones, terremotos, homicidios, suicidios, muertes accidentales. Pero además el fuego puede ser empleado para tratar de destruir pruebas forenses en casos criminales, a menudo para tratar de dificultar la identificación y recuperación del propio cuerpo.

1.1. El proceso de cremación.

Cuando un cuerpo es sometido a la acción del fuego, podemos observar que el proceso de cremación no es homogéneo en su efecto sobre el cuerpo. El fuego va a producir quemaduras en los tejidos en diferentes grados perfectamente diferenciados, tal y como podemos observar en contextos clínicos en personas vivas.

Sin embargo en contextos criminales, grandes catástrofes o en cremaciones arqueológicas, donde no se produce la cremación uniforme en el cuerpo, es posible observar restos con diferentes grados de quemaduras en tejidos blandos y óseos.

Los efectos del fuego sobre los diferentes tejidos humanos varían según la proximidad del cuerpo al fuego, la temperatura alcanzada (determinado por el tipo de combustible), y la duración de la exposición al fuego.

Los distintos grados de quemaduras de tejidos se basan en la intensidad y la duración de la exposición a la fuente de calor. Por lo tanto, estos grados pueden ser usados como un indicador del proceso de cremación.

- Quemaduras de Primer Grado.

Las quemaduras de primer grado son las más superficiales. Se limitan a la capa superficial de la piel, la epidermis. Por lo general se caracteriza por un enrojecimiento e inflamación del sitio de la quemadura. El enrojecimiento es debido al aumento del flujo de sangre a esta zona como resultado de la vasodilatación. Van acompañadas de inflamación debido a la edematización en la zona.

- Quemaduras de segundo grado.

El siguiente paso en el proceso de cremación es la destrucción de las capas superficiales de la piel. En estos casos, la marca clásica en quemaduras de segundo grado es la formación de ampollas en la zona afectada. La afectación no va más allá de la capa epidérmica de la piel.

Esta categoría puede dividirse en otros dos niveles: tipo a y tipo b. El primero cursa con quemaduras en las capas superiores de la epidermis, mientras que la segunda se refiere a la necrosis de todo el espesor de la epidermis.

- Quemaduras de tercer grado.

Una vez superadas las capas superficiales, el fuego actúa directamente sobre todo el espesor de la dermis y pasa a la hipodermis. La profundidad de estas quemaduras de tercer grado se traduce en la destrucción de las terminaciones nerviosas.

Quemaduras de cuarto grado

- Se caracterizan por la destrucción de todas las capas de la piel y los tejidos subyacentes, incluyendo el músculo, tendón, y en última instancia, el hueso (Spitz, 1993). Algunos autores, como DeHaan (2002) categorizan este grado incluyendo el músculo y el hueso subyacente.

Sin embargo, las quemaduras de cuarto grado se caracterizan por la necrosis de los tejidos profundos: adiposo, muscular y óseo. No obstante, los huesos sufren un proceso diferente durante la cremación, debido a su matriz inorgánica.

El hueso posee una matriz inorgánica dura compuesta de sales que le confiere una estructura rígida, pero también hay una parte menos dura, la orgánica, compuesta principalmente por proteínas colágenas y no colágenas que le proporcionan flexibilidad estructural.

Entre las partes orgánicas del hueso se encuentra la médula ósea, alojada en el interior de los huesos largos extendiéndose a lo largo de estos, además existe una red de hueso esponjoso que se encuentra en los huesos planos, cortos e irregulares. Una vez que el tejido blando alrededor del hueso es eliminado, el fuego actúa sobre el hueso y todos sus componentes. Sin embargo, hay que tener en cuenta muchos otros factores a considerar antes de la desaparición de los tejidos blandos como es el hecho de que durante la cremación, los músculos pueden afectar a la posición del cuerpo, así como al estado de conservación de los restos.

No obstante cuando se producen grandes catástrofes, los cuerpos carbonizados resultan muy difíciles de identificar, realizándose sobre ellos radiología general, fichas dentales, exámenes químico-toxicológicos, serogenéticos e histopatológicos (Jablonski 1989; Johanson 1969; Mincer 1990; Alonso 2001).

En este sentido autores como Crow y Glassman (1996), realizaron una clasificación donde proponen una estandarización en casos de cadáveres con quemaduras, esta escala la dividieron en cinco niveles:

Nivel 1: Lesiones por quemaduras característica de muerte por asfixia, despegamiento de la epidermis, la cabeza y el vello facial aparecen quemados. La identificación es posible.

Nivel 2: El cuerpo es reconocible, presenta diferentes grados de carbonización. Destrucción de partes periféricas: manos y / o pies, y posiblemente, genitales y orejas.. La identificación se realiza mediante colaboración del médico forense y un odontólogo forense.

Nivel 3: Además de la destrucción del cuerpo faltan extremidades, brazos y / o piernas. La cabeza está presente aunque irreconocible. Se debe incluir un antropólogo forense para su recuperación, determinación del sexo, edad, raza, etc.. desde el esqueleto, la identificación es coordinada por un médico forense que puede requerir la ayuda de un odontólogo forense.

Nivel 4: El cráneo aparece fragmentado y separado del cuerpo. Algunas extremidades brazos y / o piernas pueden seguir articulados con el cuerpo carbonizado. La búsqueda y recuperación debe ser realizada por un antropólogo forense utilizando métodos sistemáticos y procedimientos de detección para localizar pequeños fragmentos del cuerpo y piezas dentales.

La identificación es coordinada por un médico forense, un antropólogo forense y un odontólogo como consultores.

Nivel 5: El cuerpo está totalmente incinerado y no queda ningún tejido. Los restos están fragmentados, dispersos e incompletos. A este nivel el antropólogo forense debe ser un consultor sobre el terreno para la identificación, recuperación e identificación de los atributos físicos de la persona fallecida, ya que la identificación personal es más difícil a este nivel. La recuperación de las piezas dentales requiere los conocimientos de un odontólogo forense.

La escala de Crow-Glassman para describir la magnitud de las quemaduras de los restos de una víctima de incendio, sigue la premisa de que los cuerpos se descomponen por lo general siguiendo un patrón sistemático basado en la exposición al fuego, la temperatura y la duración del mismo (Glassman 1996).

Anteriormente Eckert et al. (1988) fue el primero en proponer un sistema que fué más tarde popularizado por Mayne Correia (1997). Este sistema de clasificación define los grados de alteración térmica según cantidad de tejido superviviente a la cremación. Las clasificaciones incluyen:

Estadio 1: Los órganos internos permanecen intactos.

Estadio 2: Cremación parcial de los tejidos blandos.

Estadio 3: La incineración incompleta, aun se mantienen fragmentos óseos.

Estadio 4: Cremación, sólo quedan cenizas.

Tanto la escala Crow/Glassman como la escala Eckert son clasificaciones útiles para describir el estado de hueso después de la cremación.

No obstante es importante resaltar que un cuerpo puede exhibir trazas de todas estas clasificaciones. Esto es debido a que al no haber uniformidad en el proceso de cremación, el cuerpo va a mostrar los efectos de la variabilidad de la exposición. Cuando se considera la totalidad de la variabilidad de la exposición en un cuerpo, surge un patrón de quemaduras.

Las quemaduras postmórtem tienen una apariencia característica diferente de las quemaduras que pueden hallarse en una víctima viva, no existe inflamación como en el tejido vivo, además exhiben una consistencia característica dura con un aspecto amarillento (Spitz, 1993).

El tipo de calor al que un cuerpo es expuesto determina como el fuego actúa sobre el. Por ejemplo, la pérdida de masa del cuerpo es más pronunciada cuando se ejerce una acción directa de una fuente de calor que cuando este es radiante (Bohnert 1998). Si la fuente es directa el propio cuerpo actuará como fuente de combustible para el fuego, mientras que si el calor es radiante este tenderá a reducir la masa corporal eliminando líquidos de los tejidos.

La reacción inicial de la piel al calor consiste en la dilatación de los vasos sanguíneos dérmicos y epidérmicos. Cuando se produce un aumento de la temperatura o una exposición directa al calor, la circulación sanguínea en esta área cesa. Además se producen ampollas en piel y la destrucción de la dermis y epidermis, la queratina del cabello comienza a derretirse a 240°C, el pelo es destruido por completo, a temperaturas de más de 300°C.

Debido a la cremación de de tejidos blandos, se produce la contracción y deshidratación de la epidermis, la dermis subyacente y la grasa subcutánea. En esta situación, la grasa puede actuar como fuente de combustible para el fuego (DeHaan 1999).

Además la presencia de ropa, suponiendo que sobreviva el fuego, puede actuar como mecha para cualquier grasa adyacente (Spitz, 1993; DeHaan 1999). Esto se traduce en un aumento en el grado de la cremación, así como en la integridad de las quemaduras, ya que se ha añadido un combustible mas. Además la ropa ajustada, zapatos, medias, ropa con elásticos y cinturones, puede actuar inhibiendo el paso de aire y por lo tanto obstaculizar el avance del fuego en una víctima.

Cuando en cuerpo es expuesto a temperaturas de 670° a 810°C este adopta una "actitud pugilista" después de aproximadamente 10 minutos (Bohnert 1998). Después de 20 minutos de exposición, la bóveda del cráneo queda libre de tejidos blandos e incluso presenta fisuras. En los siguientes 10 minutos de exposición, son visibles las cavidades del cuerpo (es decir, órganos internos).

A los 40 minutos los órganos internos se han reducido y muestran una estructura en forma red o esponja (Bohnert et al., 1998). A los cincuenta minutos las extremidades se destruyen quedando el torso. A la hora y media se descompone el torso. En total, la incineración del cuerpo, a esta temperatura, dura aproximadamente de 2 a 3 horas.

Bohnert et al (1998) no han sido los únicos en evaluar los efectos del fuego sobre restos humanos. Günther y Schmidt (1953) y Richards (1977), también realizaron estudios para observar el proceso de la destrucción del cuerpo como consecuencia de procesos térmicos.

Estos estudios son complementarios entre si y demuestran que la carbonización diferencial de tejidos es un hecho en contextos de cremación. Así por ejemplo los huesos de los brazos, cara y tórax quedan expuestos a 800°C en unos 20 minutos. Es decir las áreas que están más cercanos a la superficie de la piel son las primeras en desaparecer, a diferencia de aquellas que estan más profundas o adyacentes al músculo.

También se ha demostrado que el margen tibial anterior después de 25 minutos a la misma temperatura, queda expuesto antes que el resto de la tibia, el peroné y el fémur que quedaran expuestos tras 35 minutos de cremación (Spitz 1993).

Desde luego todos estos estudios presuponen una temperatura uniforme y una exposición continua y controlada a dicha temperatura ya que se realizaron en entornos controlados de confinamiento y temperatura, como hornos crematorios.

Sin embargo, la realidad es que calor tiende a no ser uniforme, especialmente si el fuego no se produce en un espacio reducido, o incluso donde se dan varios tipos de combustible. De hecho, la temperatura de las llamas y la duración alcanzada en un incendio no serán suficientes para destruir los restos de un adulto o incluso todos los tejidos blandos del torso, debido al importante porcentaje de agua que se encuentra en los tejidos (Duffy 1989). Sin embargo, habrá alteraciones significativas a los huesos debido a su exposición al fuego.

1.2 Recuperación de restos.

Dada la naturaleza y el contexto de los restos humanos quemados, es necesario prestar especial atención a su recuperación por parte de personal especializado (Dirkmaat 2002, Warren 2002) ya que existen dos factores principales que pueden complicar la extracción de los mismos: la fragmentación y las condiciones del hallazgo.

Los cambios en los tejidos blandos sometidos a altas temperaturas incluyen contracturas postmortem del músculo, la deshidratación y desnaturalización de la proteína conducen a un acortamiento muscular provocando la llamada posición pugilística. El siguiente paso tras la destrucción de las partes blandas es la quema de hueso que puede conducir a la fragmentación extrema del mismo, por lo que se debe tener cuidado en la evaluación de restos en el lugar del hallazgo.

El contexto es muy importante, ya que en la mayoría de los casos, los restos humanos se encuentran mezclados con otros materiales que aparecen quemados de manera similar. Puede ser un reto, incluso para los antropólogos forenses mas experimentados diferenciar pequeños fragmentos de huesos quemados a partir de fragmentos carbonizados de materiales de construcción, restos vegetación, maderas entre otros materiales.

Por lo tanto los métodos de recuperación puede afectar el tamaño a la estructura, forma y tamaño del hueso (McKinley 1994). por lo que la recuperación de este tipo de material debe ser realizado por antropólogos forenses expertos mediante un enfoque prudente que facilite la evaluación in situ de los restos humanos.

1.3. Análisis.

La investigación de los restos humanos quemados se pueden organizar en tres categorías generales: análisis de las características visuales (cambios en el color, contracción y deformación, material útil para la identificación, patrón de fracturas); análisis de las características histológicas y el análisis demográfico de los restos cremados, incluyendo edad, sexo y estatura. Una cuarta fuente de información son los datos que proviene de casos forenses procedentes de la literatura aportados por la comunidad médico-legal.

1.3.1 Análisis de las características visuales.

1.3.1.1. Cambios en el color.

La reacción química del fuego depende de cuatro componentes: fundamentales: material combustible, adecuada temperatura de ignición, suficiente oxígeno y un medio ambiente adecuado para el mantenimiento de estas condiciones (Holck 2005).

La medida en que se cumplan estos requisitos va a determinar en que grado el fuego afecta al cuerpo humano en la cremación. Un buen combustible y un fuego bien ventilado puede reducir a cenizas rápidamente un cuerpo calcinado, mientras que la poca oxigenación y la falta de combustible puede dar lugar a un cuerpo parcialmente quemado con algunas zonas muy alteradas y otras prácticamente no afectadas.

El fuego modifica el color, tamaño y peso de los huesos, provoca fracturas y modifica la microestructura interna (Mayne Correia 1997), el alcance de estos cambios depende de las condiciones que se produzcan en el entorno de la cremación. El color de los huesos cremados proporciona pistas acerca de las condiciones de los restos en el momento de la cremación y el entorno en el que se produjo la cremación.

Los huesos pasan por cuatro etapas en el proceso de cremación: deshidratación, descomposición, inversión y fusión, por tanto los cambios

de color reflejan los procesos químicos que van ocurriendo en cada fase (Mayne Correia 1997).

Cuando se inicia el proceso de cremación, los huesos incinerados a temperaturas bajas (200 a 300°C) comienzan a adquirir coloraciones que pasan desde el marfil, marrón claro a marrón oscuro o negro, estas coloraciones son debidas principalmente al proceso de carbonización de los componentes orgánicos que tiene lugar a estas temperaturas (Mayne Correia 1997).

A temperaturas algo más altas, el hueso adquiere coloraciones que pasan de negro a gris oscuro, según la duración de la exposición al calor ya que se ha completado la carbonatación y los carbonatos comienzan a desaparecer (Mayne Correia 1997).

A partir de 800°C se produce la calcinación del hueso produciéndose un cambio en el color tornándose blanco (Buikstra y Swegle 1989; Shipman et al. 1984; Van Vark, 1970). A temperaturas tan altas, el carbono formado por la combustión de la materia orgánica con el oxígeno para formar CO₂, produce la calcinación y la fusión de las sales del hueso (Mayne Correia, 1997). Bonucci y Graziani (1975) encontraron que la

hidroxiapatita se convierte en beta fosfato tricálcico a estas temperaturas, pero Shipman et al. (1984) discrepan de esta conclusión.

Todos estos cambios de color varían según la duración del proceso de la cremación y según la medida en que los huesos están protegidos de la exposición al calor directo por los tejidos blandos. Por ejemplo, la exposición de un hueso a un calor intenso durante un corto período de tiempo puede ser insuficiente para reducirlo a un estado calcinado. Del mismo modo, las porciones del esqueleto protegido por gruesas capas de tejidos blandos o huesos adyacentes a menudo son menos afectados por la quema de huesos en las zonas menos protegidas (Buikstra y Swegle, 1989; Holck 2005).

1.3.1.2. Contracción y deformación.

La contracción del hueso durante los procesos de cremación ha sido sin duda una de los mas estudiados y documentados en la literatura (Thompson 2005).

La cremación provoca la reducción en longitud y anchura del hueso. Muchos estudios han intentado cuantificar los cambios que se producen en el hueso compacto y esponjoso como consecuencia de la contracción y la deformación, ya que estos cambios pueden inducir a errores en

determinaciones de sexo, edad y estatura en el proceso de identificación de un individuo.

Uno de los estudios mas significativos a este respecto fue el realizado por Malinowski y Porawski (1969), efectuaron mediciones en cráneos y huesos largos humanos antes y después de la cremación, registraron las diferencias en milímetros, por ejemplo, la disminución en el diámetro del radio fue de 0,7 mm, mientras que la cabeza del radio disminuyó 1,2 mm.

Otra de estas investigaciones fueron las realizadas por Dokladal (1971) sobre cadáveres incinerados en un horno a gas con temperaturas que oscilaron entre 600 y 1000°C, estableció tasas de contracción de entre un 5 a un 12%. Herrmann (1976) realizó cremaciones de secciones de femoral a temperaturas de 150 a 1200°C estableciendo tres fases en la contracción: La primera, de 150 a 300°C y la segunda, 750 a 800°C, donde se produce del 1 a 2% de contracción y una tercera fase de 1000 a 1200°C donde se produce de un 14 a 18% de a contracción.

Herrmann llegó a la conclusión de que la contracción depende de cuatro criterios: tipo de hueso (compacto, esponjoso o laminar), temperatura de exposición del hueso , el contenido mineral del hueso, y aspectos del contenido mineral del tejido óseo. Encontró una relación entre el sexo y el

porcentaje de contracción: los hombres tuvieron un mayor porcentaje de contenido mineral óseo y por lo tanto, más contracción.

En un estudio posterior sobre hueso esponjoso, Grupe y Herrmann (1983) obtuvieron una reducción del 12% en varias medidas. Todos estos estudio coinciden en que la contracción esperada en los huesos incinerados a temperaturas de 800°C no es significativo en la interpretación de los huesos, y es conveniente realizar más investigaciones sobre hueso esponjoso.

1.3.1.3. Material útil para la investigación.

Cuando se producen pequeños cambios térmicos no muy extensos sobre restos humanos, se pueden seguir métodos forenses de recuperación rutinarios. En cambio en grandes catástrofes, o en situaciones donde se producen alteraciones importantes como consecuencia de la temperatura, los procedimientos de recuperación de restos se tornan mas complejos y especializados, pero con frecuencia se pueden obtener suficientes pruebas para facilitar la identificación.

Los procesos de contracción y de fragmentación, en definitiva, las alteraciones en la forma pueden afectar el análisis del esqueleto y deben ser considerados y tomados en cuenta en la investigación. La edad del

individuo y la enfermedad deben ser factores muy tenidos en cuenta en la investigación ya que el hueso osteoporótico tiende a fragmentarse con mayor frecuencia que el hueso sano (Christensen 2002).

La fragmentación puede facilitar la degradación de los materiales orgánicos, tales como la albúmina útiles para la identificación (Cattaneo C et al. 1995). Otro aspecto muy a tener en cuenta es la identificación del mayor número de elementos específicos del esqueleto para el cálculo del número mínimo de individuos presentes y determinar las edades representadas en el hallazgo.

Se han registrado en fragmentos calcinados en cremaciones domesticas evidencias de arteriosclerosis (Warren 1999), inclusiones materiales no esqueléticos, tales como materiales quirúrgicos, prótesis dentales, números de serie que han sobrevivido a las altas temperaturas y que son de vital importancia para la identificación [Murray 1993; Schultz 2008).

Algunos autores han presentado algunas pautas metodológicas a la hora de trabajar con restos quemados (Chandler 1987; Van Vark 1974). Así por ejemplo estas investigaciones indican que en las muestras de hueso que han sufrido procesos térmicos a temperaturas entre 800 y 1200°C la

estructura histológica aún se conserva, pero el ADN mitocondrial humano y la albúmina humana no sobreviven (Cattaneo 1999).

A temperaturas más altas, las estructuras histológicas pueden sufrir alteraciones, (Van Vark (1970), en este sentido Grupe y Hummel (1991) encontraron que, la estructura histológica era difícil de identificar, debido a la modificación cristalina. Otros estudios muestran que los huesos expuestos a temperaturas por encima de 200°C pueden tener alterados los valores de isótopos de nitrógeno y de carbono (Schurr 2008).

1.3.1.4. Patron de fracturas.

Las fracturas producidas por el calor han sido uno de los parámetros mas controvertidos y discutidos por los antropólogos forenses, debido a que las interpretaciones de lo traumas en los casos de restos óseos quemados puede ser difícil debido al calor y las fracturas relacionadas con fragmentación. Sin embargo, tanto en estudios experimentales como de casos , la experiencia indica que las pruebas de diagnóstico de trauma puede sobrevivir a la cremación.

En este sentido se han establecido numerosos sistemas de clasificación (Krogman 1939, 1943a, b; Baby, 1954; Binford, 1963; Mayne, 1990; Symes 1996):

1. Fracturas longitudinales: Este tipo de fracturas características de los huesos largos son probablemente las más comunes en los procesos de cremación, ocurren con regularidad y son fácilmente predecibles. La superficie ósea se calienta hasta el punto de evaporación de la osteocalcina y la hidroxapatita provocando su desnaturalización y la reducción de la matriz ósea, lo que facilita un fallo estructural. Estas fracturas se producen en paralelo a los canales osteonales, aunque también pueden tomar un camino helicoidal a lo largo del eje longitudinal del hueso.

2. Fracturas Transversales. Estas fracturas se asocian a menudo con fracturas longitudinales. Una fractura del paso se extenderá desde el margen de la fractura longitudinal transversalmente al eje de hueso, a través del hueso compacto, a otra fractura longitudinal de fractura

3. Fracturas en malla. Estas fracturas superficiales, aparentemente menos destructiva que otros tipos de fractura, aparecen como una fina malla de manera uniforme. Este patrón es algo difícil de interpretar, pero se

observa a menudo en las áreas planas de los huesos postcraneales, y puede ser el resultado de un gran acumulo de calor durante la cremación. Su aparición, es muy característica en los extremos de las epífisis y en los huesos del cráneo.

4. Grietas y decapación. Estas fracturas se caracterizan por la aparición en capas de las zonas que limitan el hueso cortical del hueso esponjoso, la separación de las zonas interna y externa del hueso craneal, o la exposición de hueso esponjoso de la epífisis.

5. Fracturas lineales. Estas fracturas siguen la trayectoria producida por el fuego, se pueden apreciar claramente en las divisiones que separan las zonas quemadas de las no dañadas por el fuego en los huesos.

1.3.2. Análisis de las características histológicas.

La característica especial que distingue el tejido óseo de todos los demás es que consta de un componente inorgánica y uno o más componentes orgánicos. Esta característica es la que lo hace ta importante a la hora de estudiar restos humanos quemados, ya que el componente inorgánico del hueso es la hidroxapatita, mientras que el componente orgánico consiste en gran parte en colágeno y algunas proteínas no colágenas entre otras.

Para entender cómo estas llegan a alterarse estas estructuras debido al calor, es necesario un conocimiento detallado de las mismas.

1.3.2.1. Matriz inorgánica.

La matriz inorgánica del hueso esta formada en esencia por una forma de fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Sin embargo, la estructura de la hidroxiapatita en huesos y dientes es considerada como un medio imperfecto de la matriz. Los iones de calcio y fosfato tienen una afinidad muy alta el uno por el otro por el otro, lo que provoca una matriz ósea inestable. Por lo tanto, no es de extrañar que la hidroxiapatita desempeñe un papel tan importante en la estructura y fisiología de huesos y dientes. La apatita biológica puede tener una composición variable.

La proporción ideal atómica de calcio a fósforo es 10:06. Esta relación Ca:P también se puede cambiar a favor de uno y otro gradiente, manteniendo las características fisiológicas de apatita biológica.

1.3.2.2. Matriz orgánica.

La matriz orgánica u osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%). La matriz orgánica juega un papel importante en el

conjunto del sistema óseo, y constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo (Young 2003).

La contribución estructural del colágeno en el hueso, es que está impregnado de cristales de apatita entre las fibrillas de colágeno y dentro de estas. A modo de breve resumen, las fibras de colágeno son producidas por los osteoblastos, odontoblastos, y cementoblastos. El fosfato de calcio, se encuentra en estado amorfo, y la hidroxiapatita se convertirá en cristales que con el tiempo aumentan en número, produciendo un gran medida la zona mineralizada.

Proteínas no colágenas:

- Entre ellas destacan: Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico: osteocalcina (OCN). La osteocalcina es una proteína característica del hueso y la dentina. Es la proteína no-colágena más abundante en la masa ósea. La osteocalcina regula la homeostasis del calcio. Inhibiendo la precipitación de fosfato y calcio evitando la excesiva mineralización de la matriz ósea. La osteocalcina es producida por el osteoblasto, posterior a su síntesis, la mayor parte se incorpora a la matriz extracelular del hueso, sin embargo, una fracción es liberada a la circulación donde puede ser medida.

La osteocalcina sérica se incrementa en condiciones asociadas con aumento del remodelado óseo, como en el hiperparatiroidismo primario o secundario y en la enfermedad de Paget. Los niveles séricos de osteocalcina generalmente son un buen indicador del ritmo de remodelado óseo cuando la resorción y la formación se encuentran acopladas. En casos como la osteoporosis posmenopáusica, donde la resorción y la formación se encuentran desacopladas, la osteocalcina sólo sirve como un marcador de formación ósea (Foley 1999; Couttenye 1999).

- Fosfatasa alcalina.

Existen 4 isoenzimas de fosfatasa alcalina: placentaria, intestinal, de células germinales y hepática/hueso/riñón. La isoenzima de fosfatasa alcalina encontrada en el hígado, huesos y riñones es el principal componente de esta enzima en el suero y es por ello que la medición de la actividad de fosfatasa alcalina total en el suero es un pobre indicador de la formación ósea. En pacientes con osteoporosis pueden producirse incrementos ligeros en la actividad de fosfatasa alcalina debido a varias razones:

1. El aumento en el remodelado óseo que ocurre inmediatamente después de la menopausia incrementa los niveles de actividad de fosfatasa alcalina aproximadamente 2 veces.
2. Enfermedades que causan osteoporosis como el hiperparatiroidismo y la tirotoxicosis pueden elevar los niveles de fosfatasa alcalina.
3. La presencia de fracturas u otras alteraciones localizadas del metabolismo óseo también pueden elevar los niveles de fosfatasa alcalina.

Los niveles de actividad de fosfatasa alcalina en sujetos con osteoporosis generalmente alcanza 2 veces el límite superior normal del rango de referencia. Elevaciones mayores a estos niveles sugieren que puede tratarse de una enfermedad ósea diferente a la osteoporosis. Algunas patologías que pueden producir niveles muy elevados de actividad de fosfatasa alcalina son la enfermedad de Paget y la osteomalacia, así como aumentos de fosfatasa alcalina proveniente de fuentes no esqueléticas como es el caso de varias enfermedades hepáticas (Drueke 2000).

1.3.2.3. Técnicas de estudio del tejido oseó

1.3.2.3.1. Termogravimetría

La Termogravimetría (TG) está basada en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando es sometida a un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. Esta variación consiste en una pérdida o una ganancia de masa. El registro de estos cambios nos dará información sobre si la muestra se descompone o reacciona con otros componentes.

En el caso de los huesos cremados, la termogravimetría nos proporciona evidencia de los cambios de peso experimentados por el tejido óseo debido el aumento de temperatura.

Algunos autores identificaron tres fases que se referían a la pérdida de agua, la pirólisis de los componentes orgánicos, la pérdida de carbonatos y la fusión de los cristales (Bonucci y Graziani, 1975; Civjan 1971;. Holager 1970; Rootare y Craig 1977). La primera fase se inicia a 105°C, y es constante hasta 300°C. El agua extraída en esta fase es absorbida (Rootare y Craig, 1977). Este agua es atraída por la superficie del cristal y se elimina más fácilmente. Esta fase se completa aproximadamente a los 500 a 600°C (Civjan 1971). Es entonces cuando comienza, la pérdida de materia orgánica.

Las sustancias orgánicas (mucopolisacáridos, aminoácidos, colágeno, etc) son pirolizados por el momento una temperatura de 600°C se alcanza (Bonucci y Graziani, 1975; Civjan 1971.). Esta pérdida introduce la segunda fase de reducción de peso. La polimerización del colágeno puede ser identificado a 500 a 600°C, porque en este punto, el tejido óseo se vuelve isotrópico, el colágeno pierde su birrefringencia con luz polarizada. Schultz (2008) sostiene que la birrefringencia del tejido óseo aún se observa en 750 a 800°C.

El resto de componentes de los huesos, los carbonatos y sales minerales, serán importantes participantes durante la tercera fase, en la cual, los carbonatos (CaCO_3) desaparecen, y hay una cierta descomposición (liberación) de magnesio. Civjan et al. (1971) identificó esta pérdida de peso de 700 a 900 ° C, pero Bonucci y Graziani (1975) lo coloca entre 600 a 900 ° C. Durante esta fase la hidroxiapatita también se ve afectada, Bonucci y Graziani (1975) afirman que el aumento del tamaño de cristales de hidroxiapatita , y el cambio ultraestructural de hidroxiapatita a fosfato tricálcico produce la pérdida de peso. Civjan et al. (1971) apoyo a esta sugerencia, pero, en cambio, Shipman et al. (1984) no observa indicios de que en los cristales se produzca transformación química alguna, sólo un aumento en el tamaño de los cristales.

1.3.2.3.2. Difracción de rayos x.

Cuando se produce un aumento de temperatura se produce un mayor tamaño de los cristales de hidroxiapatita. Newesely (1988) demostró esta teoría mediante la difracción de rayos X, su estudio concluyó en que la hidroxiapatita es alterada en su estructura, cambio que ocurre de los 700 a 1000°C y se transforma en fosfato tricálcico, atribuyendo esta alteración a una fusión de los cristales.

Este proceso de pérdida de agua, pérdida de carbonato, y sinterización de minerales es estudiado por Shipman et al. (1984) describiendo el proceso en cuatro etapas: a primera etapa, la deshidratación, se refiere a la ruptura de los lazos hidroxilo, y la eliminación tanto de agua como del mineral apatita. La segunda etapa es la descomposición, y se correlaciona con la pirólisis de materiales orgánicos. La tercera fase es la inversión, se identifica por la pérdida de los carbonatos y la conversión de cristal. La etapa final, la fusión, se correlaciona con la fusión de los cristales.

En definitiva estos investigadores se basaron en el hecho de que el calentamiento de hueso ocasiona una agudización de los patrones de difracción, atribuido al aumento de la cristalinidad.

Estudios mas actuales demuestran que esta técnica es de gran importancia y utilidad en restos humanos quemados proporcionando indicaciones precisas no solo sobre la temperatura alcanzada durante el rito funerario de la cremación, sino también sobre la duración de la exposición al fuego (Piga 2009).

1.3.2.3.3. Microscopio electrónico de barrido.

El microscopio electrónico de barrido describe la superficie de tejido óseo a diferentes temperaturas observando los cambios estructurales, así mismo este método puede servir como complemento para explicar los hallazgos realizados por termogravimetría.

Visto al microscopio, la primera etapa, el proceso de deshidratación se identifica por las burbujas en las láminas externas (Hunger, 1978), y el hueso comienza a agrietarse (Susini 1988). La estructura fina del hueso cortical permanece visible (Bonucci y Graziani 1975), con las lagunas en expansión y cada vez apretadas (Schultz 1986). Shipman et al. (1984) describen la superficie como "en bruto" hasta la marca de 285°C, y luego como "vidrioso y sin problemas".

Evans (1973) señala que el aumento de la temperatura y la disminución en el contenido de agua causa un aumento de la microdureza, esta disminución en la capacidad de absorción de energía del hueso en última instancia resulta en la formación de un material frágil.

Durante la etapa de descomposición, la estructura ósea sigue siendo identificable (Bonucci y Graziani 1975), pero los cristales aumentan de tamaño a 80 μ m de diámetro (Bonucci y Graziani 1975; Susini 1988). Las lagunas son más grandes, y los bordes de los canales de Havers aparecen rugosos (Schultz 1986). Hunger y Leopold (1978) identificaron grandes grietas diagonales y retículas, y mayor profundidad en las burbujas. La superficie lisa vidriosa descrita por Shipman et al. (1984) adquiere una apariencia "espumosa y lanuda".

En la tercera fase (inversión), las grietas son más amplias, y láminas se pierden al igual que la matriz pasando a ser un tejido más homogéneo (Schultz 1986). Es sólo en este punto en el que Schultz (1986) observa las fisuras. Los cristales han perdido su aspecto hexagonal típico, y han sido sustituidos por cristales poligonales irregulares (Bonucci y Graziani 1975).

Una vez que la fusión se inicia de 800°C en adelante, las osteonas aparecen deformadas (Schultz 1986), y se observan ampollas y grandes aberturas ovaladas (Schultz 1986; Shipman et al 1984).

La etiología de estas ampollas no está claro. Las lagunas, según Schultz (1986), todavía son visibles a 1100, pero poco a poco desaparecen.

Las grietas se alargan entre las osteonas para producir fisuras de gran tamaño. Los cristales aparecen grandes (0,2 a 0,3 micras) e irregulares (Susini 1988). Cuando termina esta etapa, hay una disminución en la tasa de contracción (Herrmann 1977; Schultz 1986). Después de este punto, no hay cambios observables hasta que el hueso comienza a derretirse alrededor de 1600°C (Schultz 1986).

1.3.3. Análisis antropométrico de los restos cremados.

1.3.3.1. Estimación de la Edad.

Las técnicas para la estimación de la edad en los restos cremados han sido las mismas que las realizadas en la de los huesos no quemados.

Habitualmente en antropología física, para la estimación de la edad se han utilizado las suturas craneales, aunque en 1968 se consideraron como no fiables para el estudio de los huesos cremados (Lisowski 1968).

La mayoría de investigadores sugieren que el cierre de la sutura ecto o endocraneal es una metodología válida (Dzierzykay-Rogalski 1967; Gejvall 1969; Malinowski y Porawski 1969), pero otros (Buikstra y

Goldstein 1973; Dokladal 1971) creen que esta metodología se encuentra muy limitada en huesos cremados.

Las estimaciones más fiables de la edad pueden lograrse mediante la observación de una combinación de la fusión de las epífisis, piezas dentarias y su desgaste, longitud de huesos largos, sínfisis del pubis, costillas, espesor del hueso del cráneo, densidad de los dientes, conteo de osteonas y remodelación (Kerley 1978), y las enfermedades degenerativas.

Dudar (1993) señaló que las observaciones hechas sobre los huesos cremados dependían de la cantidad de contracción y / o deformación del hueso.

Pero no basta con establecer un método fiable para determinar la edad, todavía hay que determinar el número de categorías fiables de edad. Se han establecido entre dos (Krumbein 1934) y once categorías (Herrmann 1977) para categorizar la edad del individuo. La mayoría de los investigadores, sin embargo, utiliza seis categorías (por ejemplo, infantil I, Infantil II, juvenil, adulta, madura y senil).

La precisión de la estimación de la edad depende de la precisión del método, el grado de destrucción del hueso y la distorsión. Dokladal (1971) en su trabajo de investigación reportó una estimación del 60% de la edad en un grupo control, su peor grupo fue el 45 a 65 años de edad (adultos). Utilizó una combinación de las epífisis, suturas, tamaño de la cavidad ósea, porosidad y el deterioro patológico en los que basar su conclusión. En una muestra arqueológica, con la fusión epifisaria, el cierre de las suturas, Merbs (1967) fue capaz de estimar la edad en sólo el 36% de los adultos, no dio ninguna estimación del porcentaje de personas no adultas.

1.3.3.2. Determinación del sexo.

La determinación del sexo en huesos cremados es otra de las asignaturas pendientes dentro del estudio de los restos humanos quemados. En este sentido algunos investigadores fueron aparentemente conscientes de las posibles imprecisiones que puedan surgir debido a la deformación del hueso expuesto a altas temperaturas (Dzierzykay-Rogalski1967).

Para la determinar el sexo, el uso de las características morfológicas del cráneo y la mandíbula han sido los métodos de elección, el cráneo de las mujeres se percibe como más grácil que el del hombre, por lo que se cuentan con varias características para ser comparados: grado de desarrollo muscular, tamaño de la apófisis mastoides, forma del margen

supraorbitario, tamaño de la protuberancia occipital externa, grosor de los huesos del cráneo, ángulo de la mandíbula, forma de la protuberancia mental, son todas las características, que se utilizan en combinación (siempre que sea posible), para establecer el sexo de la persona (Lisowski, 1968; Merbs, 1967; Piontek, 1975).

El análisis de estas características depende de dos factores principales: de la supervivencia y del grado de contracción. Dokladal (1971) señaló que cuando el cráneo se expone a altas temperaturas se fragmenta en varias partes y los huesos que los forman raramente permanecen intactos, pero, las porciones más densas, como la pars petrosa, cresta occipital, el margen supraorbitario, partes de la mandíbula y partes de los huesos planos (parietal, frontal y occipital) pueden permanecer sin alteraciones.

El estudio de los restos postcraneales es más complejo en restos cremados, a pesar de que la pelvis se considera la mejor zona para estimar el sexo (Stewart 1979), a menudo es la que mas sufre la acción directa del fuego encontrandola la mayoría de las veces fragmentada por el fuego (Correira 2002). Por lo tanto es necesario siempre valorar en que condiciones ha quedado la pelvis para obtener una interpretación

correcta, ya que los mayores indicadores están presentes en el ángulo subpúbico de la sínfisis púbica y en la escotadura ciática.

El tamaño de la cabeza del fémur, húmero, y radio se ha utilizado, pero el grado de contracción que experimenta el hueso esponjoso cuando se expone al calor intenso (hasta 12%: Herrmann 1977) hace que estas estimaciones sean muy inexactas y totalmente subjetivas por lo que no son del todo fiables a la hora de inferir el sexo.

1.3.3.3. Estimación de la estatura.

La estimación de la estatura de un individuo que ha sido sometido a altas temperaturas no es ni mucho menos una tarea fácil y esta plagada de problemas.

Cuando la reconstrucción es posible, los huesos largos están medianamente conservados y se pueden tomar medidas, entonces se pueden usar las ecuaciones de regresión para talla diseñados por Trotter y Gleser (1952), sin embargo, si la fragmentación es extrema, y sólo podemos reconstruir pequeñas porciones de los huesos largos, se impone utilizar otros métodos (Holland 1992; Steele y McKern, 1969; Steele 1970).

Estos métodos se han utilizado de forma conservadora por investigadores que trabajan con los restos cremados (Malinowski y Porawski 1969; Piontek 1975).

Otra posibilidad es que si un hueso largo ha sido protegido por una masa muscular (por ejemplo, el fémur), hay una mayor probabilidad de obtener un hueso casi completa para su análisis. Teniendo en cuenta el potencial de error con restos fragmentarios Holland (1992) estima entre un 50 y un 100% la precisión en la estimación de la estatura, por tanto queda muy entredicho que cualquier acercamiento a la estatura real del individuo no es viable y da lugar a errores.

En definitiva no parece haber una respuesta satisfactoria a la cuestión de la estimación de estatura. El uso de las vértebras para la estimación no es factible, ya que la supervivencia de las vértebras tras una incineración es escasa (Dokladal 1971).

1.4. Estructura ósea.

El hueso es una estructura rígida de tejido conectivo especializado que sirve de soporte, sistema de protección y la locomotora para el cuerpo. Esta formado por una corteza y una matriz ósea (Freemont 1998). La característica fundamental que distingue a los huesos del resto de los tejidos en el cuerpo es el proceso de mineralización que sufre la matriz (Ross 1995). La corteza rodea la cavidad ósea y las trabéculas, que se definen como la interconexión de espículas óseas (Freemont 1998).

Todos los huesos están compuestos por tejido esponjoso y por tejido compacto. El hueso esponjoso se origina en la cara interna del hueso, se conoce también como trabecular o reticular. Se caracteriza por presentar finas espículas, que crean un entramado lleno de medula ósea o tejido conjuntivo embrionario.

El hueso compacto también es conocido como denso, laminar o cortical. Contiene básicamente osteonas laminares concentricas y láminas intersticiales que aportan robustez y resistencia a la torción. El hueso compacto forma la corteza ósea, la porción principal del cuerpo o tallo que rodea a la cavidad medular.

1.5 Crecimiento y remodelado óseo.

La estructura ósea interna se encuentra en un estado continuo de remodelación (Stout 1989). La remodelación es un proceso mediante el cual tejido óseo envejecido es sustituido por tejido óseo nuevo. El volumen de hueso preexistente que es cambiado por hueso nuevo, por unidad de tiempo, se denomina recambio óseo o turnover (Hall 2005).

El proceso de remodelación requiere una actividad interactiva celular, que está regulada por factores bioquímicos y mecánicos. Este proceso de remodelación ayuda a mantener la forma del hueso durante el crecimiento (Ott 2002). El remodelado óseo comienza con la acción de diferentes mediadores como la hormona paratiroidea (PTH), la interleucina-1 (IL-1), diversas prostaglandinas o el factor de necrosis tumoral α (FNT- α) sobre diferentes elementos celulares, incluyendo las células estromales y los osteoblastos (Puza 1996).

Más aún, recientes evidencias han mostrado que el objetivo primario de estas sustancias en la modulación de la actividad osteoclástica son los osteoblastos, células que actuarían como receptoras y procesadoras de las señales de reabsorción ósea (Ahmed 2001).

Al ser estimulados, estos elementos celulares liberan diversos factores solubles (factor estimulador de colonias de macrófagos y de granulocitos-macrófagos, IL-6, IL-11, factor activador del colágeno tisular, etc.) con múltiples acciones: inducen la proliferación y diferenciación de los precursores de los osteoclastos y la activación de estas células una vez diferenciadas, estimulan la degradación de colágeno e inhiben su síntesis, etc. (Puzas 1996). La interacción entre el colágeno tipo I, las proteínas de la matriz y el mineral óseo expuesto determina la liberación local de factores quimiotácticos para osteoclastos, cuya acción a través de catepsinas y otras enzimas lisosómicas concluye con la degradación de la matriz y la disolución mineral (Haris 2006).

Cuando una cantidad determinada de hueso ha sido reabsorbida, el aumento de la concentración local de calcio (Ca), producto del proceso de reabsorción, y la activación de mediadores como el factor transformante del crecimiento beta (TGF- β), inhiben la función de los osteoclastos e inducen su apoptosis (Raggi 2007). Algunos de estos mediadores (TGF- β , factores de crecimiento ligados a heparina) actúan a su vez como factores de crecimiento para los osteoblastos (Banks 1994), los cuales alcanzan las zonas de reabsorción comenzando así el proceso de producción de hueso nuevo.

La formación de hueso incluye la proliferación y diferenciación de los precursores de los osteoblastos, la síntesis de matriz osteoide y factores reguladores, la mineralización y la formación final de hueso maduro. Incluso en la edad adulta, los huesos poseen la capacidad de modificar su forma y estructura en respuesta a los cambios ambientales (Freemont 1998). El objetivo de la remodelación es permitir que el hueso se adapte a las tensiones mecánicas encontradas a lo largo de la vida (Ott 2002). Los procesos simultáneos de la reabsorción y formación ósea es responsable de mantener la forma del hueso, mientras que crece. Son estos cambios continuos los que conducen a la posibilidad de determinación de la edad en adultos con la histología ósea.

En los niños pequeños, la velocidad a la que se remodela el hueso es mayor que en adultos. Una variedad de factores, como el embarazo, tensión en el cuerpo, las hormonas y factores de crecimiento pueden tener un efecto sobre el proceso de remodelado óseo.

1.6. Histomorfología ósea:

La morfología histológica ósea viene determinada por los componentes orgánicos en un 30 % (matriz orgánica) y en un 70% por componentes inorgánicos (depósitos de sales de calcio y fósforo) (Quarles 2003).

Sin lugar a dudas, existe una variación significativa en la densidad y el grado de distribución de estos componentes en función del tipo de tejido óseo (tejido compacto, laminar o trabecular), tipo de hueso (largo, corto, plano, o irregular), y la edad del individuo (Owsley 1985).

Como el hueso es un tejido altamente vascularizado es decir es fisiológicamente activo a través de los procesos de remodelación, las condiciones optimas saludables de este tejido son totalmente dependientes del estado nutricional del individuo.

La naturaleza cambiante de los huesos y su capacidad para adaptarse a la variedad de demandas funcionales en las que se encuentran en el cuerpo contribuirá a su arquitectura. Por lo tanto, el aspecto macroscópico de varios huesos está muy relacionada con su función (Cho 2002).

La densidad del hueso compacto en la superficie, y la orientación de las trabéculas individuales de hueso esponjoso que se encuentran a nivel profundo del hueso compacto superficial dictará la forma en que reacciona a las fuerzas externas, como el calor (Kalsbeek 2006).

Como ya hemos visto el colágeno tiene una importancia vital como componente orgánico del tejido óseo. Pues bien la orientación de las fibras de colágeno determina la función estructural en las diferentes áreas de un elemento óseo específico, ya sea el extremo proximal de un fémur, o el extremo lateral de la clavícula (Ubelaker 1995).

En el caso del tejido óseo, las fibras de colágeno están orientadas al azar en huesos jóvenes y en sitios de reparación de los tejidos en las fracturas, en cambio, el hueso lamelar es muy ordenado y se agrupa en láminas paralelas-fibrosas, como se ve en hueso maduro (Pope 2007).

Utilizando el ejemplo de un hueso largo con forma de cilindro, el hueso laminar paralelo a la superficie perióstica se conoce como hueso laminar circunferencial (o laminillas primarias). El tejido óseo compacto está formado por láminas óseas concéntricas, agrupadas formando estructuras cilíndricas llamadas osteonas o sistemas de Havers. Las laminillas están dispuestas alrededor de canales que contienen nervios y vasos

sanguíneos linfáticos, estos canales se conocen con el nombre de conductos de Havers. Existen además conductos transversales que conectan los conductos de las osteonas con el periostio (Bass 2004).

Los osteocitos, células propias del hueso, están dispuestos en anillos concéntricos dentro de las laminillas, los restos de laminillas que no se disponen alrededor de los conductos de las osteonas forman sistemas intersticiales situados entre los osteonas. El tejido óseo esponjoso está formado por láminas óseas o trabéculas que se entrecruzan formando redes complejas, que dejan entre ellas amplios espacios, estas cavidades están ocupadas por medula ósea.

La estructura en capas de láminas, y la arquitectura del tejido óseo esponjoso, determina la forma de un hueso que responden al calor, tanto a nivel macroscópico y microscópico.

Hay varios tipos de células que se encuentran en el tejido óseo. De estos, los osteocitos tienen la mayor relevancia con respecto a la forma en que el hueso reacciona al estrés térmico:

Estas células se hallan en contacto entre sí y con las células de la superficie (células de revestimiento, osteoblastos) mediante finas

prolongaciones tubulares de su citoplasma que recorren la matriz ósea en diversas direcciones. La cavidad de la matriz ósea que contiene el cuerpo celular del osteocito se denomina laguna osteocitaria y los diminutos canalículos que albergan sus prolongaciones citoplásmicas reciben el nombre de conductos calcóforos.

En los puntos de contacto entre las prolongaciones citoplásmicas se observan uniones tipo "gap". En estas uniones existen pequeños canales intercelulares que permiten el paso directo de una a otra célula de iones inorgánicos y pequeñas moléculas hidrosolubles (aminoácidos, azúcares, nucleótidos y vitaminas) por lo que posibilitan una comunicación química y eléctrica. Los osteocitos son células con una escasa actividad metabólica pero su preservación parece necesaria para que el tejido óseo mantenga sus propiedades biomecánicas. La situación de los osteocitos es teóricamente ideal para detectar el estrés térmico y las microlesiones de la matriz.

1.7. La pelvis y la cresta iliaca.

La pelvis adulta está formada por dos huesos denominados huesos coxales (coxal derecho y coxal izquierdo). A su vez, cada coxal esta formado por la unión de tres huesos, el ilion, el isquion y el pubis. Este conjunto de huesos se encuentran fusionados en el adulto a nivel del acetábulo (zona del coxal donde se articula con el fémur). Ambos coxales están articulados a nivel ventral por la sínfisis del pubis, mientras que a dorsalmente se articulan con la columna vertebral a nivel del hueso sacro (Tortora 1990; Matshes 2005:).

El coxal presenta dos caras, medial y lateral; cuatro bordes, superior, inferior, anterior y posterior; y cuatro ángulos, antero-superior, postero-superior, antero-inferior, postero-inferior. En el ángulo anterosuperior se ubica la espina iliaca anterosuperior. En el ángulo posterosuperior se ubica la espina iliaca posterosuperior. En el ángulo anteromedial se ubica el ángulo del pubis. En el ángulo posteroinferior se ubica la tuberosidad isquiática. El borde superior corresponde a la cresta ilíaca, lugar de inserción muscular abdominal lateral. El borde posterior presenta la incisura innominada, la espina ilíaca posteroinferior, las incisuras isquiáticas mayor y menor, separadas por la espina isquiática. El borde anterior posee la incisura innominada, espina ilíaca anteroinferior. El margen inferior posee la rama isquiopubiana.

En su cara lateral se encuentra la cara articular para la cabeza femoral, el acetábulo, que es el lugar de la fusión de los tres huesos. El acetábulo en su profundidad presenta una superficie rugosa no articular conocida como fosa acetabular. Rodeando esta fosa, se encuentra la faceta lunata o semilunar. El acetábulo se encuentra limitado por la ceja o reborde acetabular que presenta tres incisuras; isquípública o acetabular, iliopública e ilioisquiática. El coxal presenta tres superficies articulares: el acetábulo, para la cabeza femoral; la cara sacropélvica que articula con el sacro (cara auricular y tuberosidad ilíaca); y, finalmente, la cara sinfisaria del pubis que articula con el pubis contralateral.

1.7.1 El ilion

El ilion es el mayor de los tres huesos coxales de la pelvis, es un hueso grande, aplanado, parecido a una taza con una gran cresta anterior y posteriormente tiene cuatro espinas que sirven como sitios de anclaje para músculos y ligamentos.

También son importantes puntos de referencia anatómica, la cresta ilíaca forma la prominencia de la cadera y es un hueso muy útil para obtener implantes óseos para algunas cirugías, debido a su fácil acceso y que tiene mucho hueso disponible, también es común obtener médula ósea de

ahí, para tratar enfermedades como la leucemia. En su extremo anterior la cresta forma la espina ilíaca superior, y justo debajo del final esta la espina ilíaca anteroinferior. La terminación posterior forma la espina ilíaca superior y la inferior forma la espina ilíaca inferior (Aiello 1990; Scheuer 2000).

1.7.2. La cresta iliaca

La cresta ilíaca es el nombre que recibe el borde superior del ala de ilion que se extiende hasta el margen de la pelvis mayor. La cresta ilíaca es palpable tanto en un hombre como en una mujer en toda su extensión, de forma general convexa y levemente curva o sinuosa con concavidad interna en el frente y hacia afuera por detrás.

La cresta ilíaca es más angosta hacia el centro que en los extremos y termina en la espina ilíaca antero-superior y posterior. La superficie de la cresta ilíaca es amplia y se puede dividir en un borde lateral o externo y un borde medial o interno y entre estos, una línea intermedia. A unos 5 cm detrás de la espina ilíaca anterosuperior se encuentra una prominencia sobre el borde externo, conocido como el tubérculo ilíaco (*tuberculum iliacum*). Hacia el borde externo se insertan los músculos tensor de la fascia lata, oblicuo mayor del abdomen y el músculo dorsal ancho. La fascia lata, que es la aponeurosis profunda del muslo, corre la

extensión de la cresta ilíaca hasta llegar al músculo oblicuo menor del abdomen.

La cresta iliaca es el lugar considerado como optimo para el estudio histomorfométrico, ya que ofrece un contenido apropiado de hueso trabecular y hueso cortical.

1.8. Biopsia osea.

Hoy en día, la biopsia ósea y el estudio histomorfométrico permanecen como el estándar de oro para el diagnóstico exacto de las diferentes formas de enfermedades óseas metabólicas (Fournier 1997; Sprague 2000).

Para que un estudio histológico sea útil, la muestra ósea obtenida debe 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 (Paine 2006).

La cresta iliaca es facilmente accesible, y existe evidencia de que su estructura y dinámica se modifican paralelamente con el esqueleto (Melsen 1978).

Para realizar una biopsia ósea en la cresta ilíaca existen dos técnicas, la biopsia vertical, que se realiza a través de la cresta ilíaca o la de tipo horizontal de tipo transilíaco. La biopsia vertical se realiza atravesando la cresta ilíaca a unos 2-3 cm por detrás de la espina ilíaca anterosuperior. En la biopsia vertical se utilizan trocares con un diametro interno de 5 mm a 10 mm que permiten obtener cilindros de hasta 4 cm de longitud (Merz 1970). El problema es que esta técnica proporciona poco tejido oseó cortical (Figura 1).

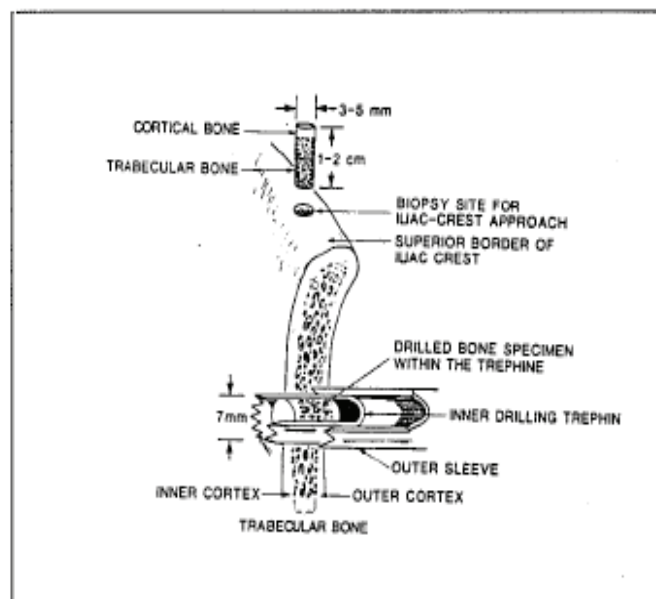


Figura 1. Tipos de biopsia iliaca (Recker).

La biopsia transilíaca se realiza en el centro de un triángulo equilátero invertido de 5 cm de lado, cuya base corresponde al segmento anterior de la cresta ilíaca (Figura 2). Esta técnica permite utilizar trocares de hasta 10mm de diámetro interno. Proporciona un cilindro de tejido ose de unos 15mm de longitud que contiene las corticales interna y externa del hueso ilíaco separados por el tejido óseo esponjoso (Villanueva 1980).

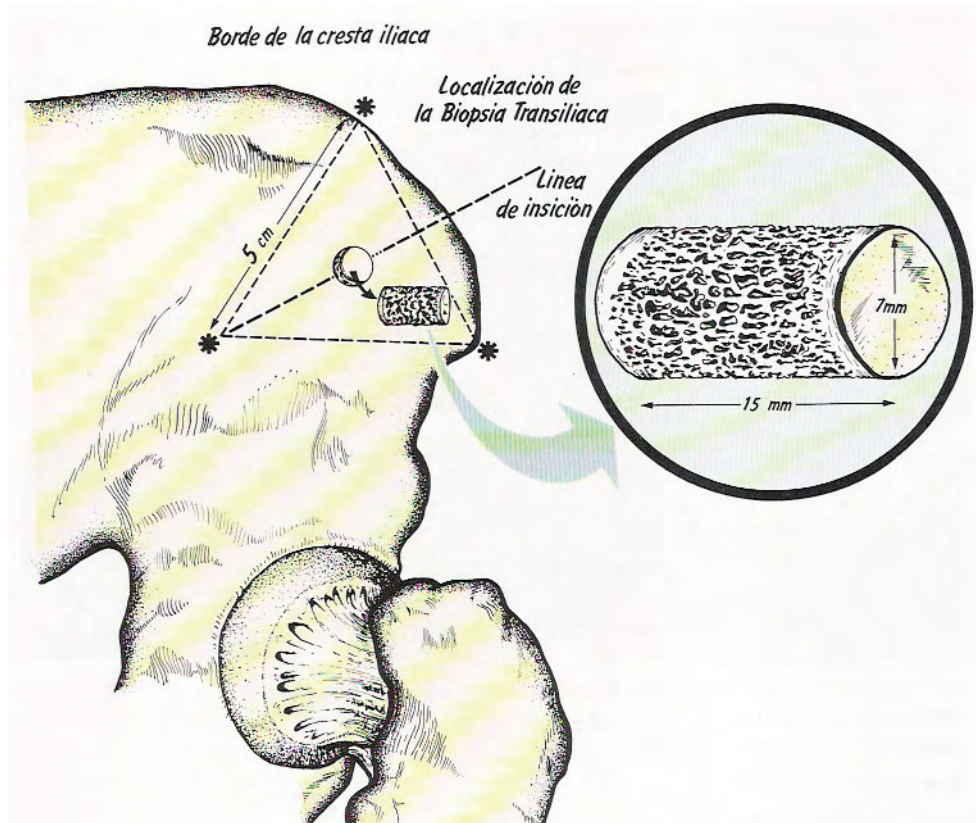


Figura 2. Zona de obtención de la Biopsia Osea Transilíaca

La arquitectura del hueso iliaco varia tanto en sentido anteroposterior como en sentido cráneo caudal, y por eso es necesario estandarizar la técnica de abordaje y obtención de la biopsia, permitiendo así que los parámetros histomorfométricos de la biopsia obtenida puedan ser comparados con valores de referencia (Gruber 1981).

Se ha generado una gran controversia acerca de cual es el diámetro óptimo de biopsia que proporcione un máximo de información (Faugere 1983). Diversos estudios comparativos han demostrado que las biopsias de 5 mm de diámetro proporcionan suficiente información para el estudio de la arquitectura y dinámica del hueso, siendo suficientes para cuantificar los parámetros histomorfométricos (Malluche 1982; Yeung 1987).

CAPITULO II

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS



CAPITULO 2: JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

2.1. Justificación.

El análisis de los restos humanos quemados siempre ha suscitado un gran interés entre los antropólogos forenses y clínicos debido en gran parte a las importantes repercusiones que el fuego y el calor tienen en la alteración de pruebas materiales y restos humanos así como en su análisis e interpretación.

En el análisis de los restos humanos quemados establecer la mejor metodología para la preservación y la interpretación de los huesos alterados por procesos térmicos es prioritario y debe incluir: distinción entre huesos quemados en la carne de los quemados sin carne, relación entre la coloración y la temperatura alcanzada por el fuego, contracción y cambios estructurales a nivel macro y microscópico (Van Vark 1974).

A nivel macroscópico podemos observar que durante el proceso de cremación el fuego y el calor modifican y destruyen la estructura ósea en tamaño, color y forma (Shipman 1984; Van Vark 1997). Entre 100°C y 300°C el hueso se deshidrata provocando una reducción del mismo en un 1-2% de su volumen (Correia. 1997). Después se inicia una fase entre 300°C – 600°C, en la cual se produce una alteración las principales características estructurales del tejido óseo mineralizado (Herrmann1977).

Con la temperatura entre 600 – 800°C la materia orgánica se quema por completo y se produce un aumento de la contracción en la estructura del hueso (Holland 1989). Con temperaturas mayores de 800°C los cristales formados con el aumento de la temperatura se funden en cristales más grande y la estructura del hueso se torna mas quebradiza (Bohnert 1998). El punto de fusión se alcanza aproximadamente a los 1630°C (Correira 2002).

Durante la última década, las investigaciones de los huesos cremados se han centrado en el estudio del color de la superficie ósea, en la morfología macroscópica y microscópica de la estructura cristalina del hueso quemado en un ambiente controlado (Hiller 2003; Thompson 2005; Piga, 2008; Christensen A.M. 2002); sin embargo, una revisión de la literatura antropológica revela que las metodologías actuales para el análisis de huesos humanos quemados sigue siendo, en el mejor de los casos, confusas, si bien es cierto que hasta donde sabemos no hemos encontrado ningún estudio que se centre en los cambios estructurales a nivel histológico con microscopio simple.

2.2 Objetivos

Los objetivos de este estudio son:

Generales:

Analizar los efectos que produce el calor, a diferentes temperaturas, de 100° a 1100° C. sobre el hueso vivo, analizando el efecto que provoca sobre células y tejido óseo.

Específicos:

- Describir los cambios que se producen en el hueso cortical y trabecular como consecuencia del aumento de la temperatura.
- Describir los cambios morfológicos que se producen en la matriz ósea.
- Crear una escala que permita medir los cambios que se producen a nivel histológico como consecuencia del aumento de temperatura.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODO



CAPITULO 3. MATERIAL Y METODO

3.1. Material.

Se obtuvieron un total de 165 muestras, a partir de autopsias de cadáveres judiciales, de edades comprendidas entre 26 y 88 años, que habían fallecido a consecuencia de muerte repentina o violenta.

Del total de muestras recogidas, se desecharon 15 debido a una o varias de las siguientes causas:

Data de la muerte superior a 24 horas: 4.

Insuficiente cantidad de muestra recogida 5.

Error en el procesado de la muestra 1.

Evidencia de enfermedad que pudiera alterar al metabolismo óseo 3.

De las 150 muestras estudiadas 87 corresponden a hombres y 63 a mujeres como muestra la tabla 1.

Tabla 1: Distribución de la muestra por edad y sexo:

Sexo	Grupos de edad						Total
	<30	31 a 40	41 a 50	51 a 60	60 a 71	>71	
Hombre	6	11	27	26	16	1	87
Mujer	5	11	10	20	15	2	63
Total	11	22	37	46	31	3	150

Las causas de la muerte se han clasificado en dos grupos principales: naturales y violentas. (Figura 3)

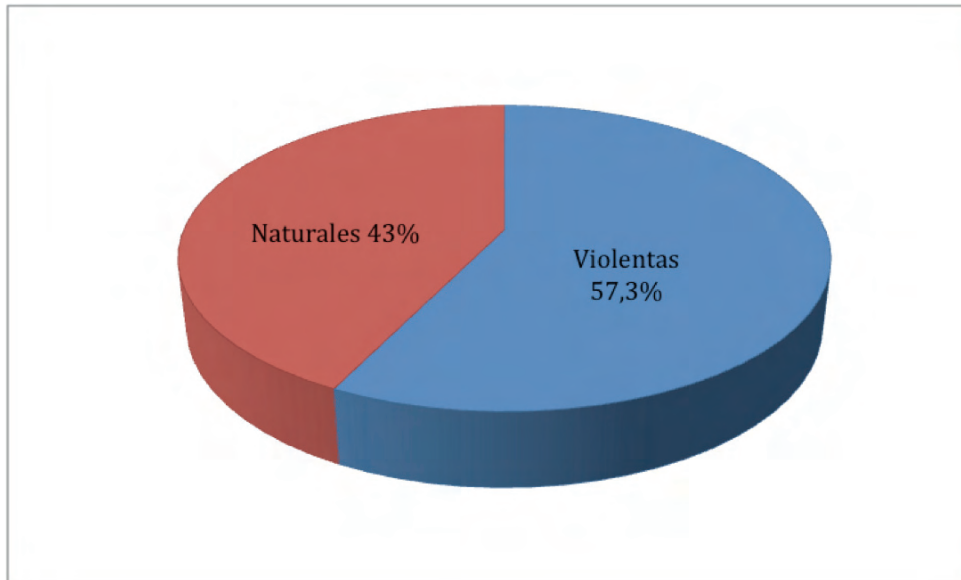


Figura 3. Porcentaje de muertes violentas y naturales.

Las muertes por causas naturales se clasificaron en: cardiopatías, accidentes cerebro vasculares (ACV) y de origen desconocido, (Figura 4):

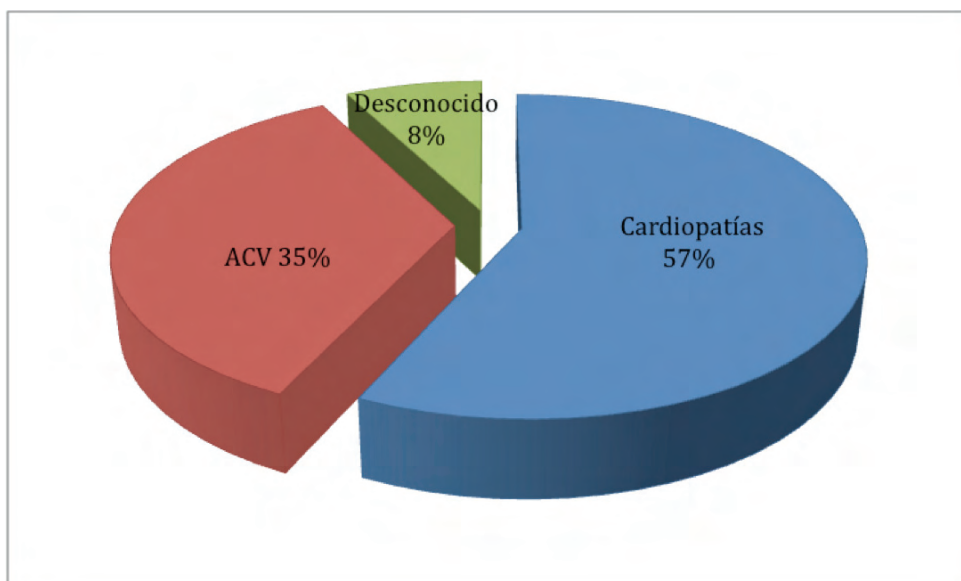


Figura 4. Porcentaje de muertes por causas naturales.

Las muertes por causas violentas se clasificaron en: traumatismo, intoxicaciones y asfixias (Figura 5):

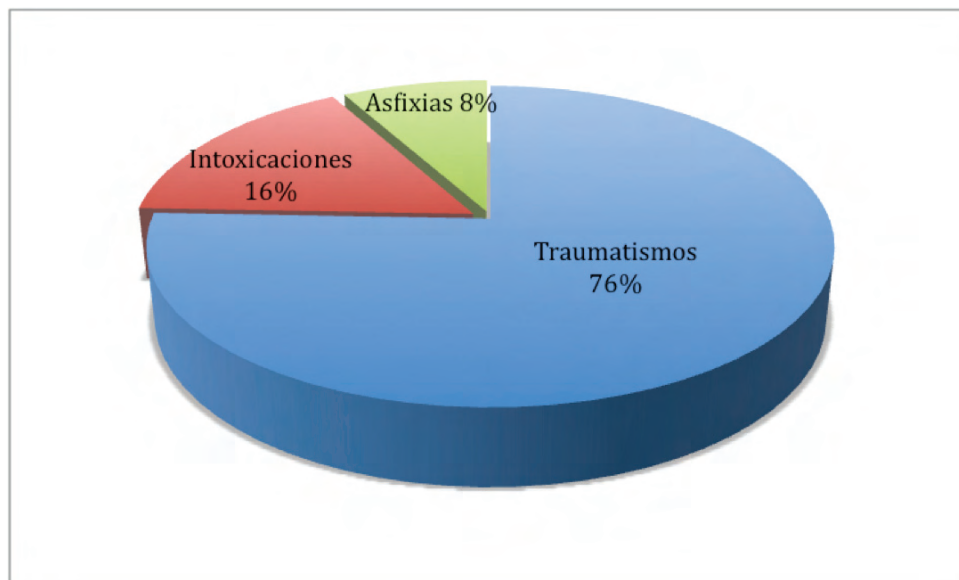


Figura 5. Porcentaje de muertes por causas violentas.

3.2. Métodos.

3.2.1. Obtención de las muestras

La obtención de la muestras se obtuvo mediante un trocar de bordier (Imagen 1) por biopsia ósea en cresta iliaca derecha en un plazo no superior a 24 horas después de la muerte. A partir de esta porción se obtuvo cilindro transilíaco de 7 mm de diámetro por 20 mm de largo.

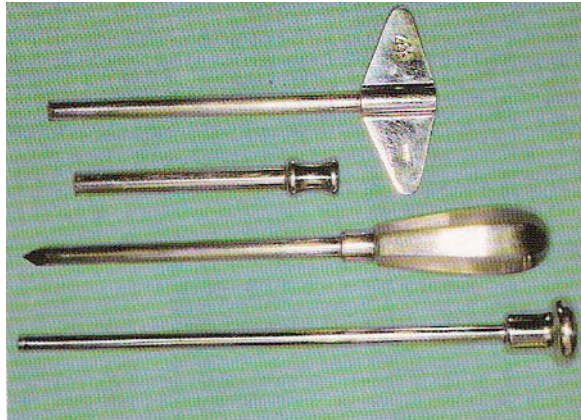


Imagen 1. Trocar de Bordier para biopsia ósea transilíaca

3.2.2. Quemado de las muestras

Una vez obtenidos las muestras fueron introducidas en crisoles individuales y quemadas en un horno (Imagen 2) a temperaturas controladas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 grados y mantenidas durante 20 minutos (Tabla 2). Una vez quemadas se dejaron enfriar a temperatura ambiente.



Imagen 2. Horno con control de temperaturas.

Tabla 2. Número de muestras quemadas a diferentes temperaturas.

	Temperatura en °C										
	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100
Número de muestras	13	10	13	15	13	15	13	15	15	15	13

3.2.3. Procesado de las piezas

3.2.3.1 Fijación e inclusión

La característica más importante que debe reunir un fijador en la biopsia ósea es que no provoque la descalcificación del hueso

La fijación debe realizarse lo más rápidamente posible y consiste en la inmersión de la muestra en alcohol etílico 70%, que debe emplearse a una temperatura de unos 4°C con el fin de disminuir la actividad de las enzimas autolíticas, al menos durante 24-48 horas.

La ventaja de realizar la fijación en alcohol etílico es que, mientras se produce la deshidratación las muestras pueden permanecer en él largos periodos de tiempo sin que se alteren las muestras.

Algunos autores realizan la fijación en formol 10% tamponado con fosfato sódico (Emmanuel 1987), la ventaja del uso del formol es que conservan mejor la morfología de las células en general, pero presenta el inconveniente de que el formol se transforma de manera gradual en ácido fórmico, y como ácido que es pueda producir una descalcificación, provocando de esta manera una pérdida o descenso en los parámetros histomorfométricos de interés. Por eso el formol ha de ser convenientemente tamponado antes de su uso (Carter 1989).

Las propiedades que debe reunir un material plástico para ser un buen medio de inclusión son:

1º Buena capacidad de penetrar en los tejidos.

2º Breve polimerización.

3º Endurecimiento homogéneo.

4º Consistencia estable con el tiempo.

5º Que no artefacte ni altere el tejido.

6º Que sea fácil de cortar, los cortes fácil de recoger extender y adherir a los portaobjetos y además que no dificulte la tinción. (Villanueva 1989)

En este sentido el metilmetacrilato reúne todas las características necesarias y para albergar una muestra y es hoy por hoy la técnica de elección en el procesado de la biopsia ósea sin decalcificar

La infiltración o inclusión consiste en sumergir las muestras en soluciones de monómero de metil metacrilato (100ml), dibutil-ftalato (plastificador 2 ml) y concentraciones crecientes de peróxido de benzoilo (catalizador 5gr) y Nonifenol poliglicol-eter-acetato (20 ml) hasta una solución final idéntica a la solución de polimerización.

La solución así obtenida debe almacenarse a 4°C durante al menos 3 días.

Las muestras de biopsia se introducen en tubos de cristal donde previamente se introdujo una base de metilmetacrilato polimerizado de 2,5 cm de altura y se rellena con la solución anterior hasta cubrir por completo la muestra, se cierra el tubo con parafina y se introduce en estufa a 32 grado hasta que endurezca (5 a 6 días aproximadamente).

Es aconsejable el uso de envases de vidrio de boca ancha, ya que durante la polimerización se producen corrientes de convección en el medio de inclusión debido al calor generado y este mayor diámetro facilita que se disipe (Villanueva 1986).

Se inicia así el proceso de polimerización donde es importante no tener prisa, puesto que al polimerizarse el metilmetacrilato desprende gas y, si se acelera el proceso, se forman burbujas que quedan atrapadas en el interior del bloque. Por ello es conveniente empezar con temperaturas de 32°C aumentándola cada día en un par de grados hasta lograr la polimerización que ocurre mas o menos a los 36-37°C (Villanueva 1989).

Una vez terminado el proceso se rompe el tubo de cristal y se obtiene un bloque cilíndrico de metacrilato con la muestra incluida en su interior (Imágenes 3 y 4).



Imagen 3. Tubo de cristal con biopsia incluida en metacrilato



Imagen 4. Cilindro de metacrilato con biopsia en su interior extraído del tubo de cristal

3.2.3.2 Corte.

Para los cortes y secciones se ha utilizado un microtomo POLICUT "5" (Reichert-Jung®), con cuchilla de carbono de tungsteno, recogiendo de cada una de las muestras varios cortes de 3 µm de espesor, el proceso requiere mojar los cortes y la cuchilla constantemente en alcohol de 70°, con el fin de evitar la aparición de fisuras en las zonas calcificadas dejándolos flotar en alcohol hasta que termina la sesión de corte.

Los cortes se depositaron sobre portaobjetos tratados con gelatina de Haupt y a continuación reblandecidos con etanol de 95° para que pudieran ser estirados y aplanados con un pincel.

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 durante 12 horas a 37°C.

3.2.3.3 Tinción.

Antes de proceder a la tinción, las secciones deben ser desplastificadas con metilacetato durante al menos 30 minutos y se lavan a continuación con etanol de 100°, 96°, 80°, 70°, 50° y finalmente con agua destilada, Se realizaron las tinciones de Azul de Toluidina , tricrómico de Goldner (Goldner 1938), y Hematoxilina–Eosina con arreglo a las técnicas descritas a continuación:

a) Técnica de tinción con azul de toluidina.

El colorante se prepara mezclando y disolviendo a temperatura ambiente azul de toluidina 1gr, tetraborato sódico 1gr y agua destilada 100ml. A continuación se tiñen las muestras preparadas:

- Inmersión y agitado suave de la preparación durante 5 minutos en un recipiente con agua oxigenada al 30%.
- Lavado con agua corriente abundante.
- Coloreado durante 15-20 minutos con solución de azul de toluidina.
- Lavado de nuevo con agua corriente.
- Secado y diferenciado de la muestra con acetona-alcohol 1:1 y se limpia rápidamente con un paño. Si el plexiglás tomaba color azul, se lavaba con alcohol de 70° con cuidado para no tocar la muestra. Después de 5 minutos se montaba la muestra para poder ser observada.

El azul de toluidina se ha utilizado para identificar las líneas de cemento y los frentes de mineralización.

b) Técnica de tinción con Tricromico de Goldner:

Se elabora una solución de Hematoxilina Férrica, mezclando dos soluciones preparadas extemporaneamente al 50%:

- 8 cc de solución A se prepara un litro de alcohol de 96° + 10gr. de hematoxilina en polvo

- 8c.c. de solución B (un litro 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 ácido clorhídrico al 1 %).

De nuevo a través de papel de filtro se cubren los portas con Ponceau de Xilidina (2gr. de ponceau de xilidina + 1gr. de fucsina ácida + 200ml. de agua destilada + 0,4ml. de ácido acético glacial), y se deja actuar entre 45 a 60 minutos.

Se pasan los portas a una batea que contiene agua a la que se ha añadido 1ml de Acido Acético Glacial, y de aquí se cambia a otra 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, a través de papel de filtro, durante unos 7 minutos.

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.

Por último se pasan los portas de nuevo por agua más ácido acético y agua destilada para eliminar el tinte, pasándolos por alcoholes (96°, 100°)

Esta tinción permite observar con nitidez las células óseas, tiñe el osteoide de rojo y el hueso mineralizado de verde.

c) Técnica de tinción de Hematoxilina–Eosina.

Esta técnica de tinción comprende el siguiente proceso:

- Aplicar a los portas Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
- Lavado con agua corriente.
- Diferenciación con alcohol-ácido.
- Lavado con agua corriente.
- Inmersión en agua amoniacal.
- Lavado con agua corriente (10-20 minutos).

- Tinción con eosina a temperatura ambiente.
- Inmersión en alcohol al 95 % para eliminar el exceso de eosina.
- Deshidratación y montaje.

La tinción hematoxilina-eosina permite observar el osteoide de color rosado pálido y el hueso mineralizado de color rosado oscuro.

3.2.3.4 Número de preparaciones

Se hicieron tres preparaciones, hematoxilina–eosina, tricromico de Goldner y azul de toluidna por cada muestra de metacrilato con cuatro cortes histologicos en cada preparación.

En total de procesaron un total de 1800 cortes histologicos.

3.2.3.5 Análisis y procesado de las imágenes.

La muestras fueron estudiadas mediante un microscopio Nikon Eclipse 50i y las imágenes se capturaron con una cámara Nikon DS-Qi1 adaptada a una tarjeta digitalizadora. Una vez obtenidas las imágenes de la sección ósea digitalizadas a 10x 20x 40x y 63x y 100x, se editaron y se realizó análisis de imagen mediante el software NIS-Elements

CAPITULO IV

RESULTADOS



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Cambios en el color.

Los cambios que se produjeron en el hueso como consecuencia del calor variaron en forma significativa Imagen (Imagen 5.). A partir de los 100°C, todas las muestras presentaron un oscurecimiento gradual de su color a marrón oscuro. A los 300 ° C, se produjo un cambio transitorio en el color de todas las muestras de marrón a negro, coincidiendo con el proceso de carbonización, temperatura a la que gran parte de los componentes orgánicos del hueso se volatilizan.

A temperaturas superiores a 300 ° C se produce un cambio de cambio en el color de negro a marrón y luego a gris (Imagen 6). De los 600°C a los 700°C se tornan grises. De los 800 en adelante los colores cambian de color blanco a rosado a los 1100°C (Imagen 7)

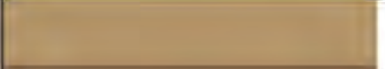
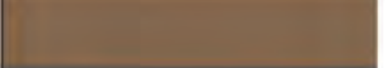
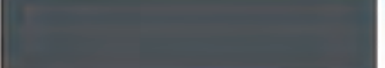
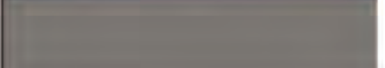
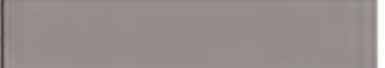

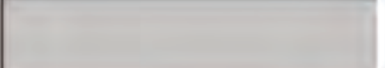
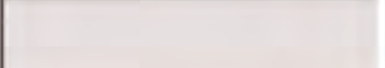


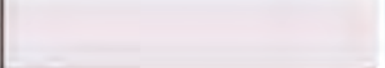
Temperatura en °C	Color
100	
200	
300	
400	
500	
600	
700	
800	
900	
1000	
1100	

Imagen 5. Modificación del color del hueso con el aumento de la temperatura

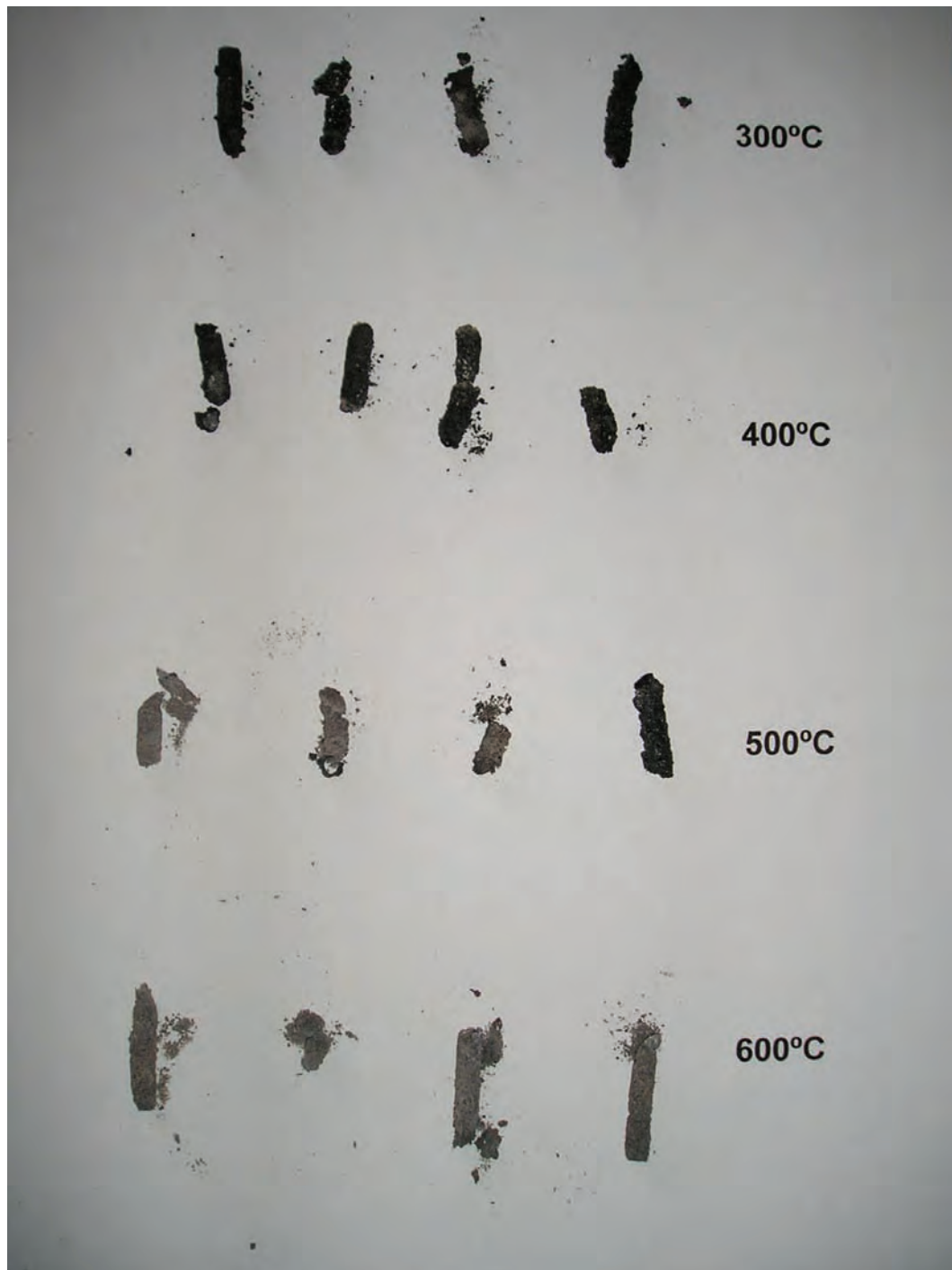


Imagen 6. Cambios en color de muestras óseas sometidas de 300°C a 600°C

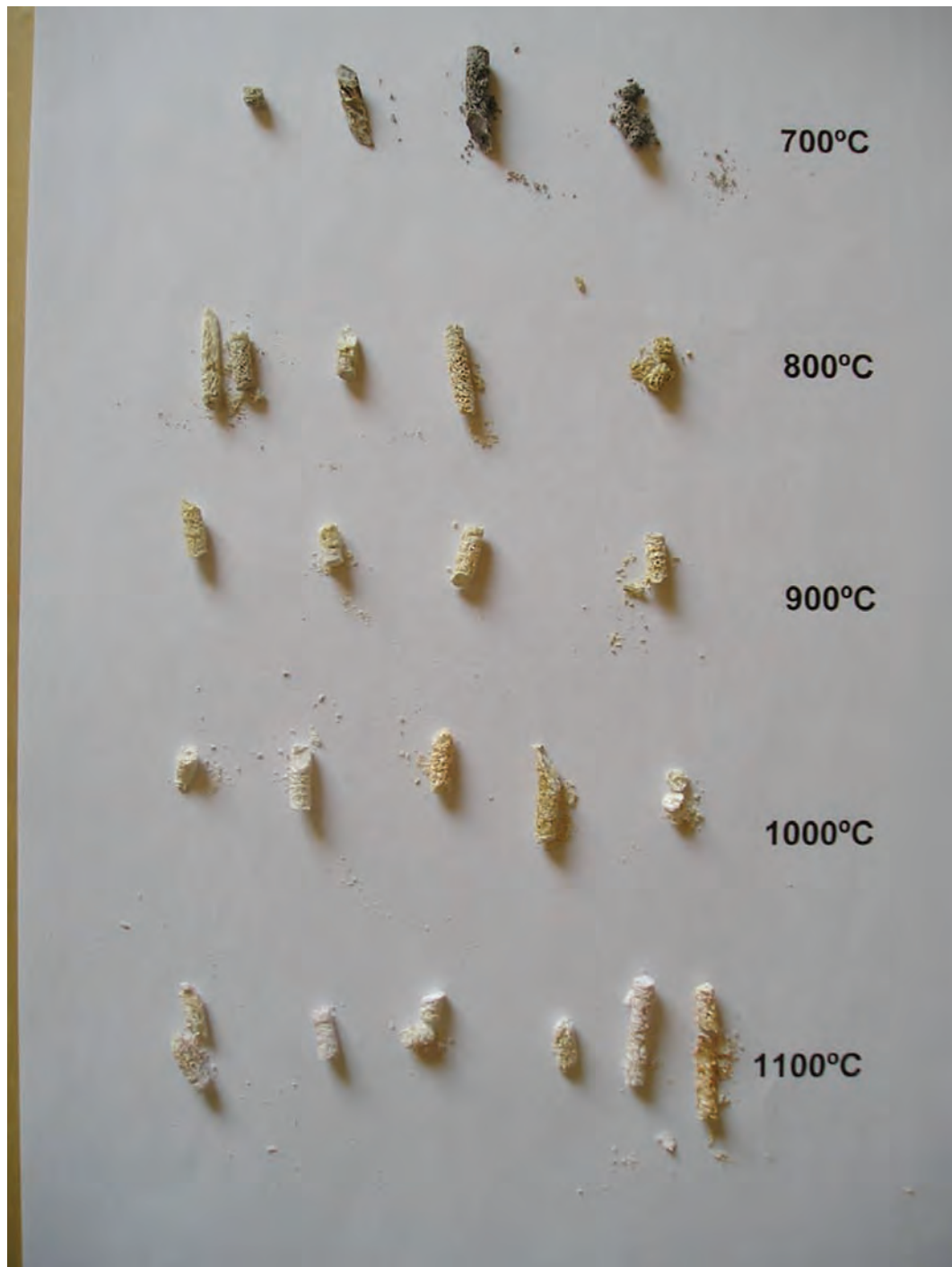


Imagen 7. Cambios en color de muestras óseas sometidas de 700°C a 1100°C

4.2 Cambios histológicos a 100°C.

A esta temperatura aún se aprecian células óseas (osteocitos, osteoblastos) y tejido muscular (Imagen 8):

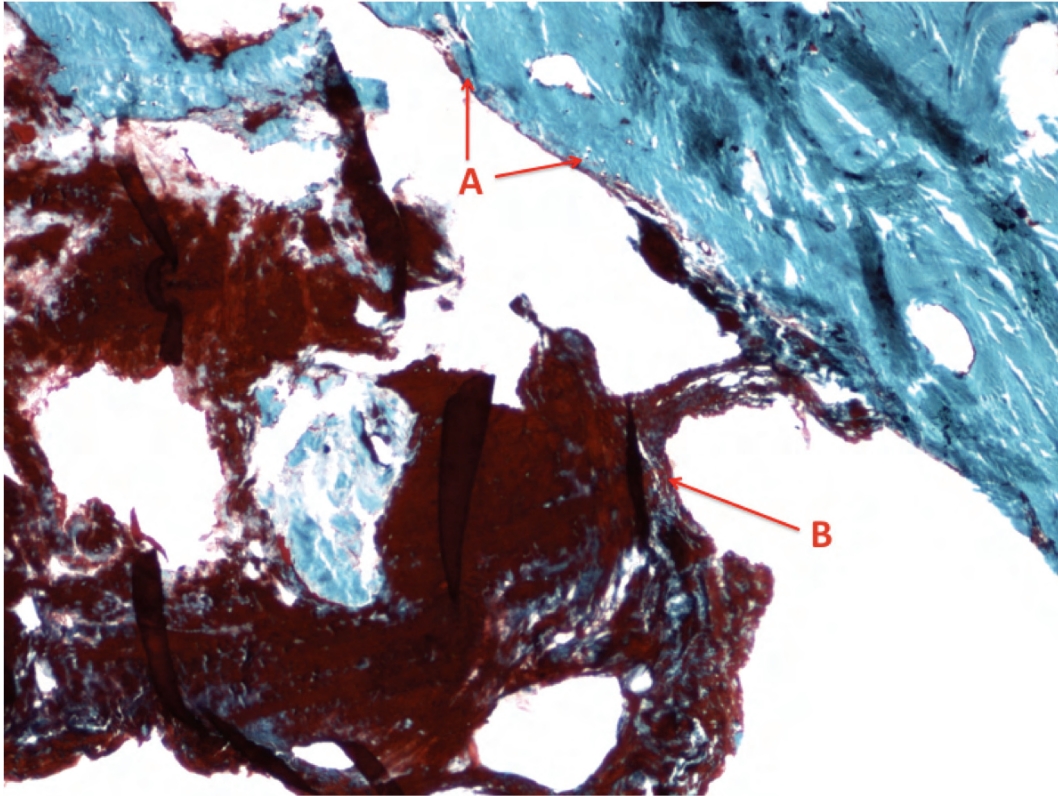


Imagen 8: A: Osteocitos y osteoblastos B: Tejido muscular. Tinción tricrómico de Goldner 20x.

Otra de las características fundamentales es la presencia de microfracturas longitudinales a lo largo del hueso trabecular (Imagen 9 y 10)

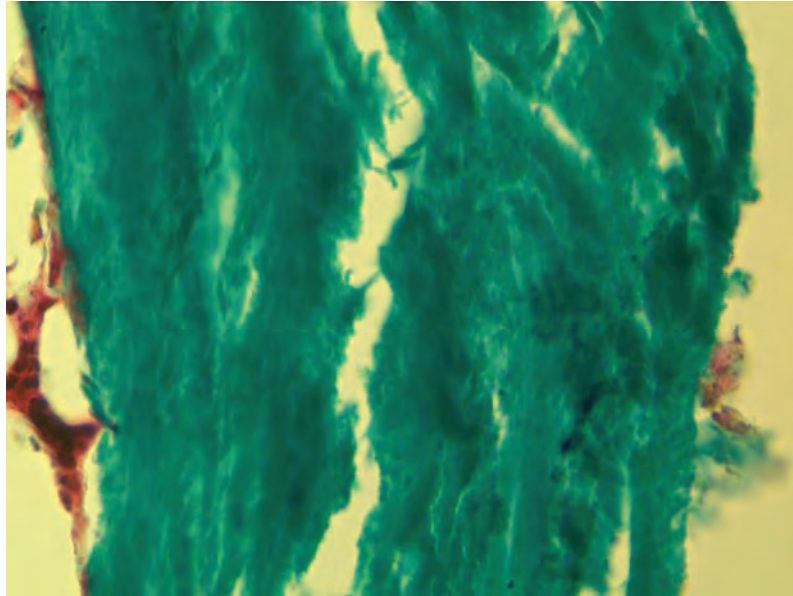


Imagen 9: Fractura longitudinal en trabécula. Tricrómico de Goldner 63x.

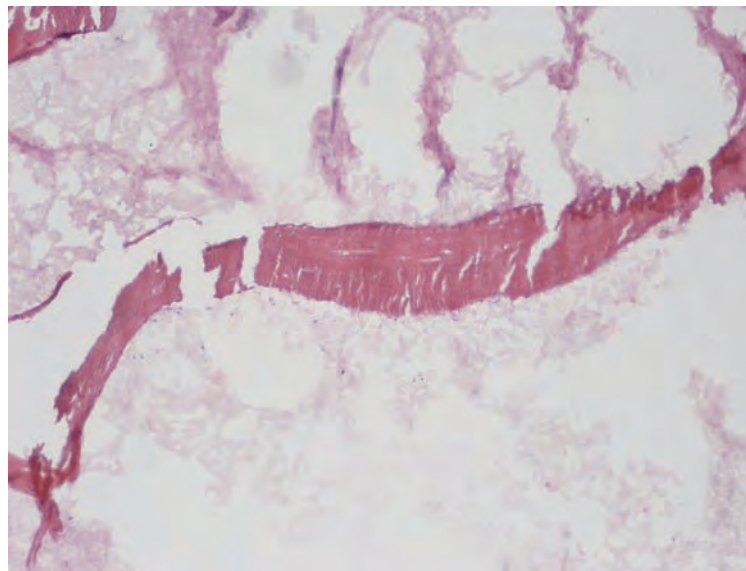


Imagen 10: Fracturas longitudinal en trabécula. Hematoxilina 10X.

En el hueso cortical aparecen deformaciones en los conductos de Havers, así como fracturas longitudinales en toda la estructura cortical, (Imagen 11).

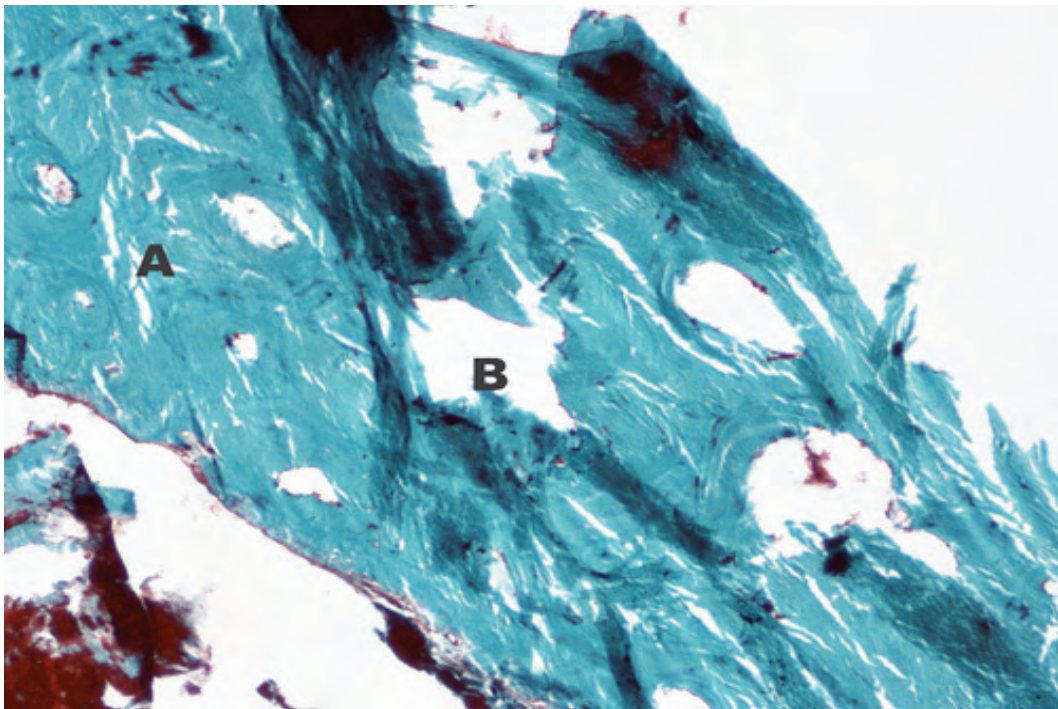


Imagen 11: A: deformación de los conductos de Havers; B: fracturas en tejido cortical. Vista del periostio en zona superior de la imagen Tinción tricrómico de Goldner.10x

El hueso trabecular y el hueso cortical se encuentran interconectados entre si por unidades estructurales óseas como puede apreciarse en la imagen 12, cuando el hueso es sometido a temperatura estas unidades estructurales aparecen destruida (Imagen 13).

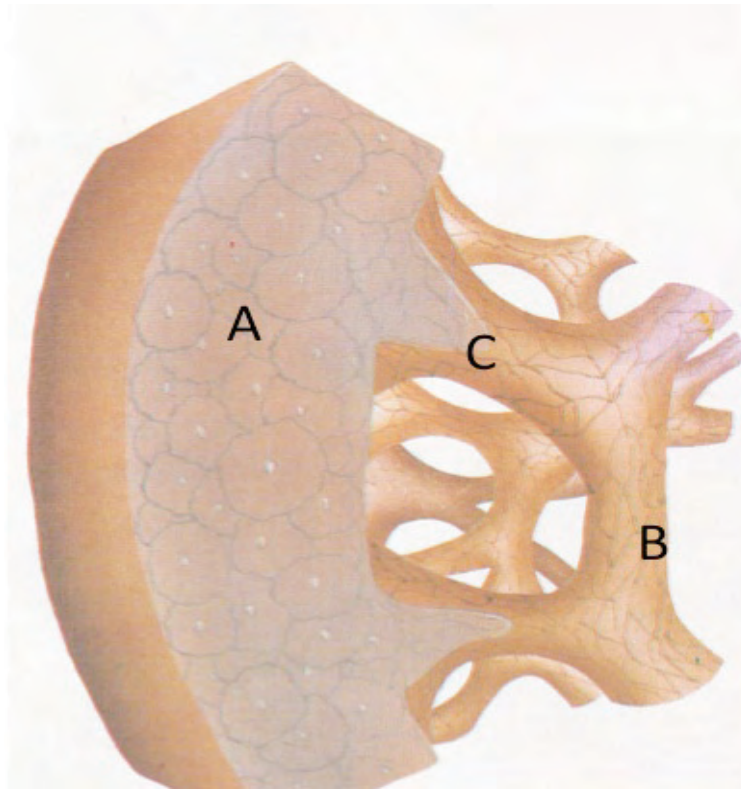


Imagen 12: A: Hueso cortical; B: Hueso trabecular; C: Unidades estructurales

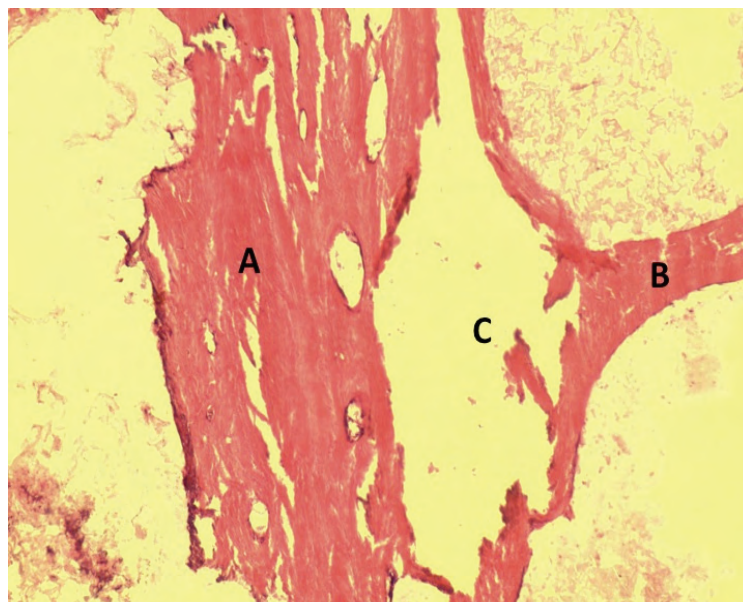


Imagen 13: A: Hueso cortical; B: Hueso trabecular; C: Unidades estructurales. Tinción Hematoxilina 10x

En el hueso trabecular los frentes de mineralización se tornan difuminados como consecuencia del calor mientras que la matriz ósea sufren además microfracturas en todo su estructura (Imagen 14).

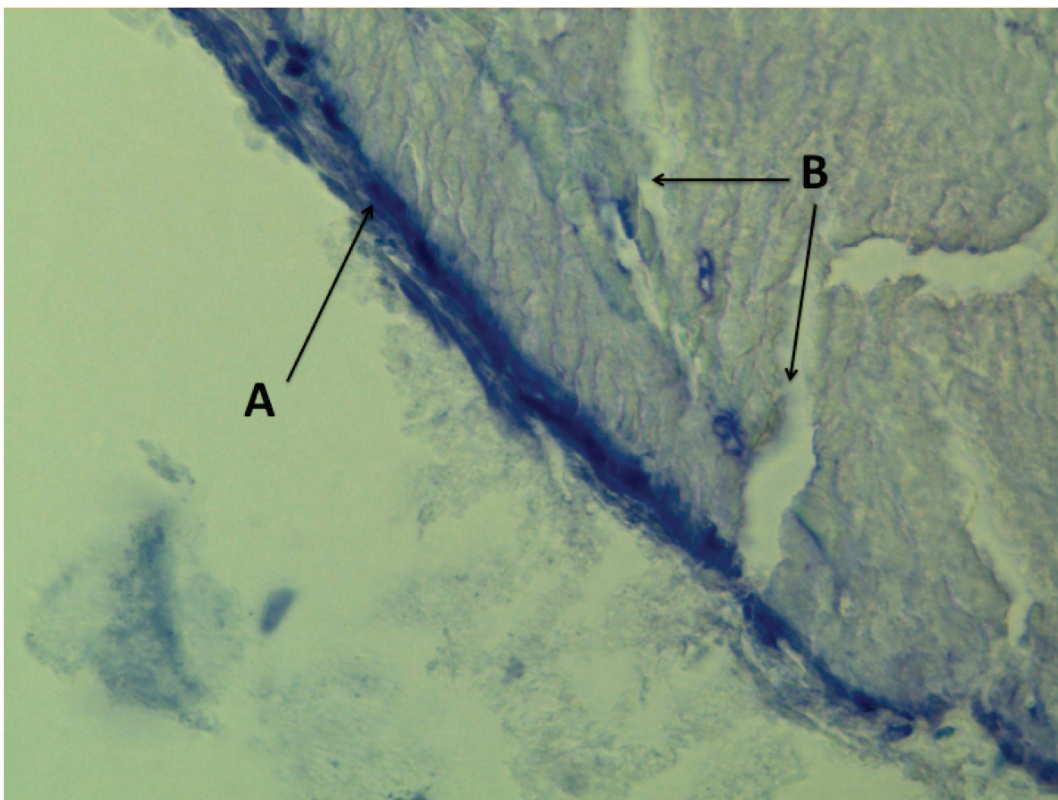


Imagen 14: A: Frente de mineralización B: Matriz ósea. Azul de toluidina 63x

Otro hallazgo de interés es la presencia de células lisas de tejido muscular, estas se encuentran deformadas y disminuidas de tamaño como consecuencia del calor (Imagen 15).

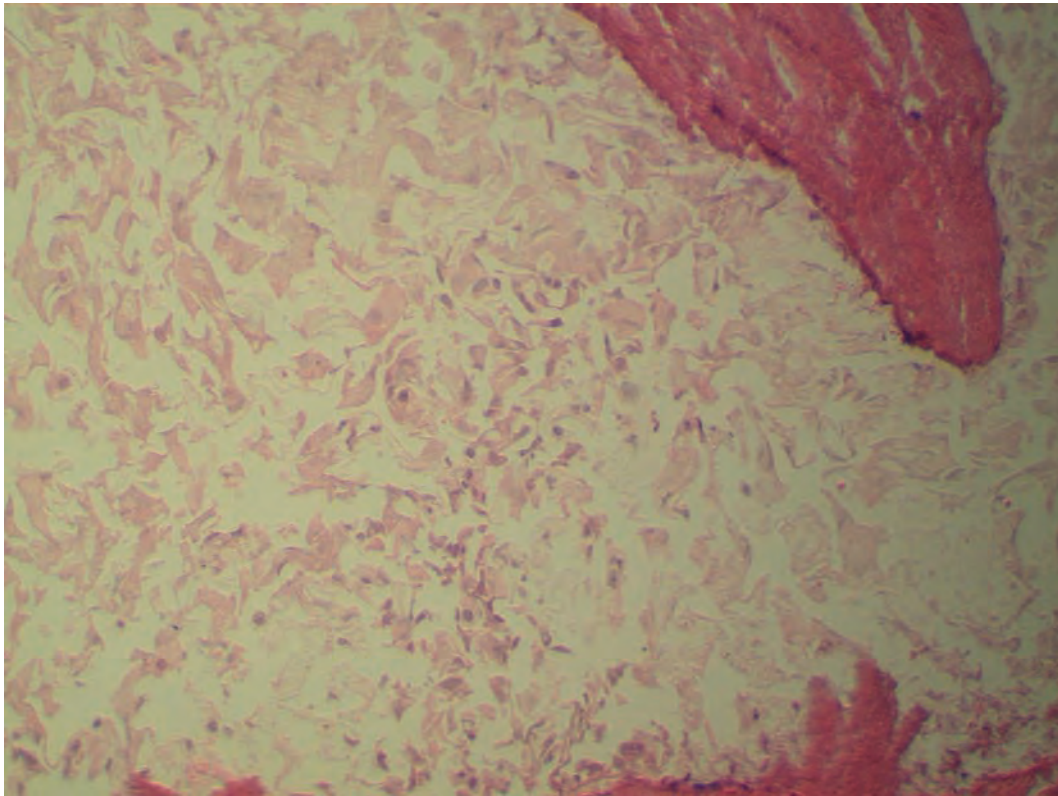


Imagen 15. Células del tejido muscular liso Hematoxilina 63x

En el hueso cortical, se puede observar como canal central vascular en el sistema de Havers comienza a deformarse, así como las fracturas longitudinales en toda la estructura cortical en forma de racimo (Imagen 16).

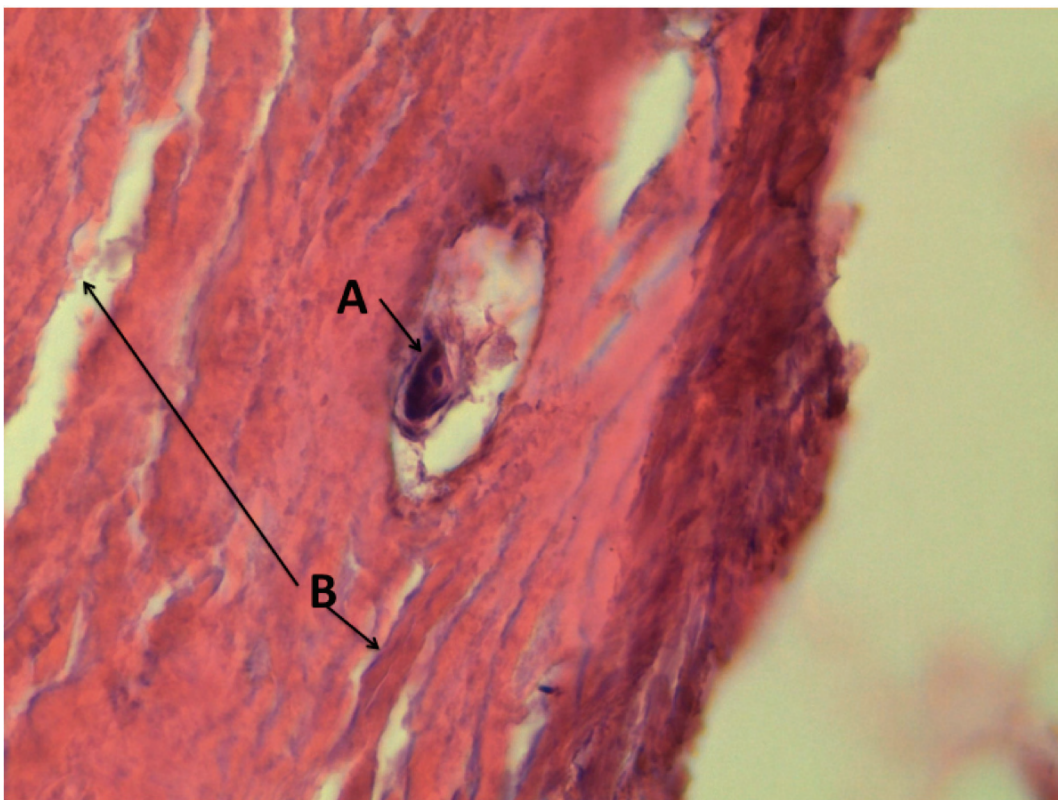


Imagen 16: A: canal central vascular en el sistema de havers; B: microfracturas longitudinales. Hematoxilina 63x

4.3 Cambios histológicos a 200°C.

A esta temperatura, el endostio de los canales de Havers comienza desintegrarse, la estructura lamelar cortical se fractura aún mas en forma de racimo, aparecen aun células óseas: osteocitos (Imagen 17).

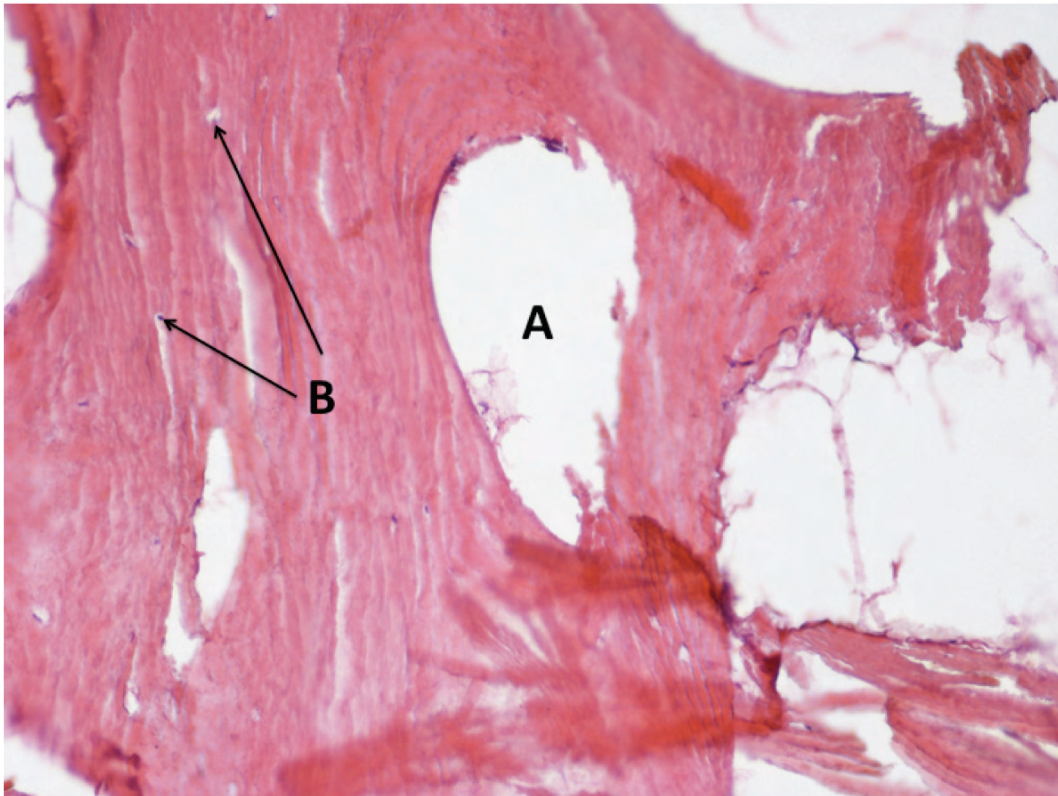


Imagen 17: A: Canal de Havers, B: Osteocitos. Hematoxilina 20x

Aun se aprecian restos de tejido celular muscular, también es de destacar las microfracturas longitudinales trabeculares que a esta temperatura aparecen aún mas contundentes (Imagen 18).

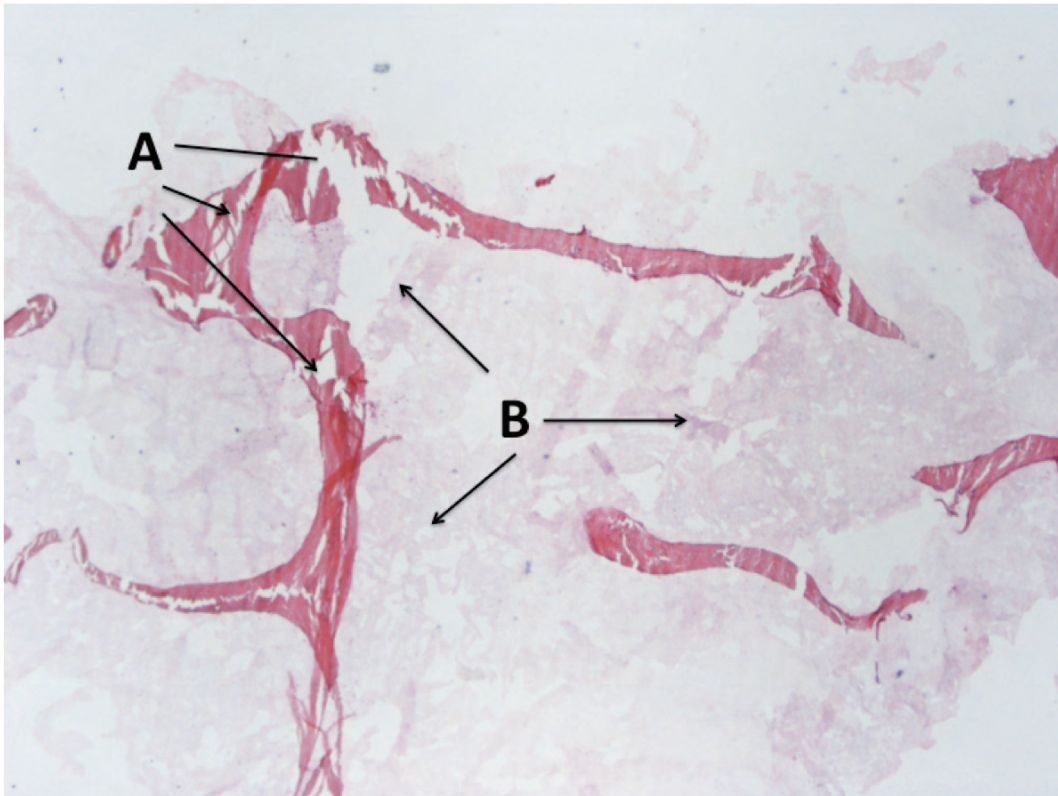


Imagen 18: A: Fracturas en hueso trabecular, B: Formaciones celulares musculares. Hematoxilina. 4x.

Un hallazgo de interés es el comienzo de aparición a esta temperatura de formaciones cristalinas poliédricas, tanto en el hueso cortical (Imagen 19), como en el hueso trabecular (imagen 20).

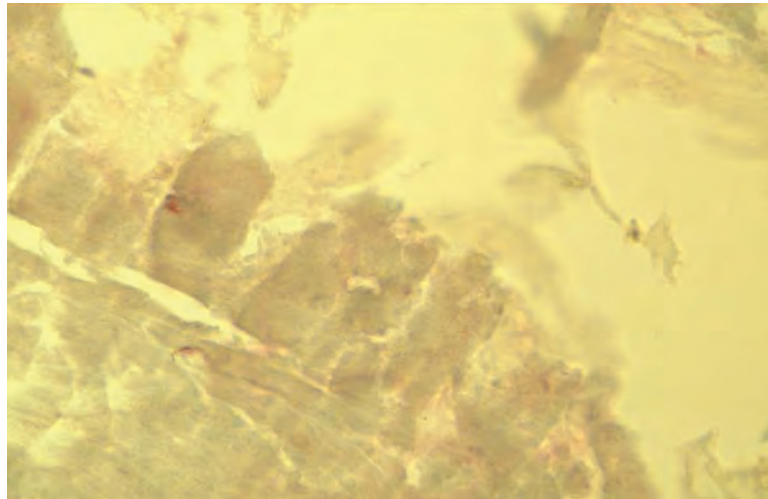


Imagen 19. Formaciones cristalinas poliédricas sobre hueso cortical. Hematoxilina 63x.

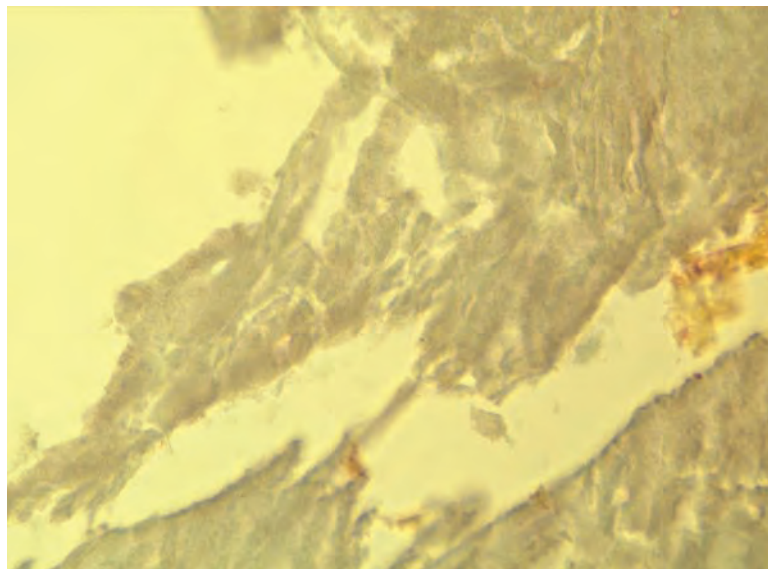


Imagen 20. Formaciones cristalinas poliédricas sobre hueso trabecular. Hematoxilina 63x.

El frente de mineralización comienza a desaparecer y aún quedan restos de célula óseas (Imagen 21).

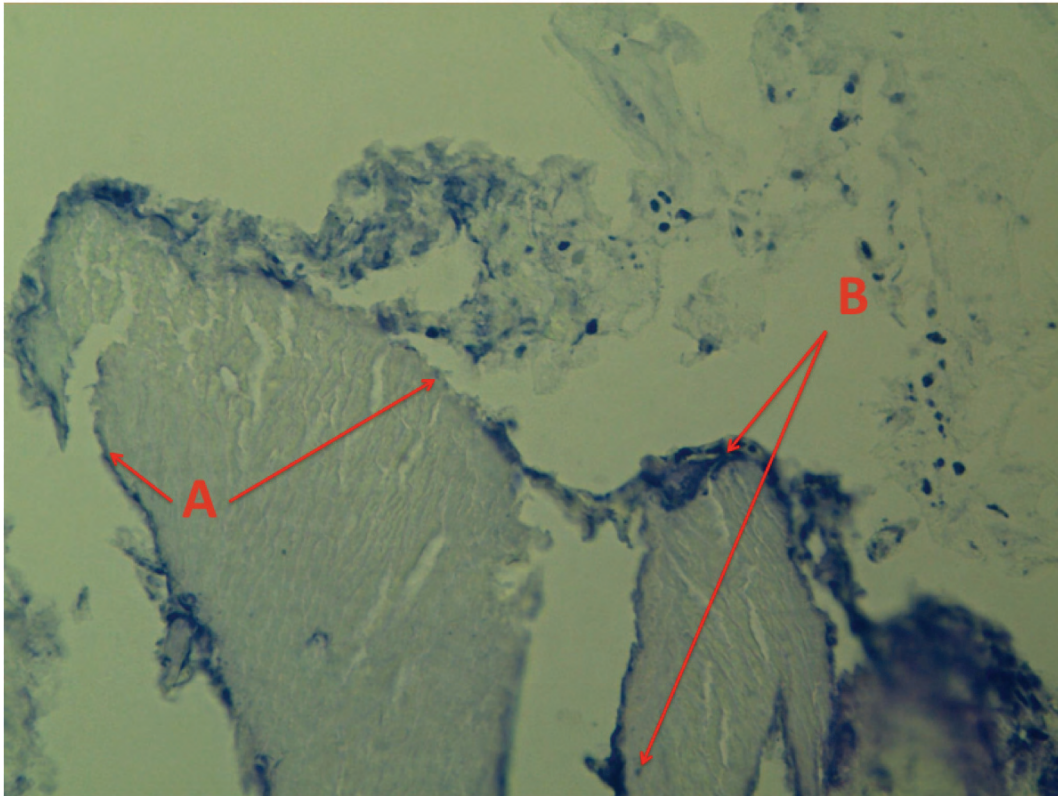


Imagen 21. A: Disminución en la cantidad de osteoide, B: Células óseas. Azul de toluidina x

4.4 Cambios histológicos a 300°C.

La principal característica a esta temperatura es la gran deformación que se produce en la estructura del hueso trabecular. El osteoide desaparece y se funde con el tejido conjuntivo en una gruesa franja de tejido conjuntivo. Desaparecen las fracturas longitudinales y transversales y se forman grandes lagunas dentro de la matriz (Imagen 22).

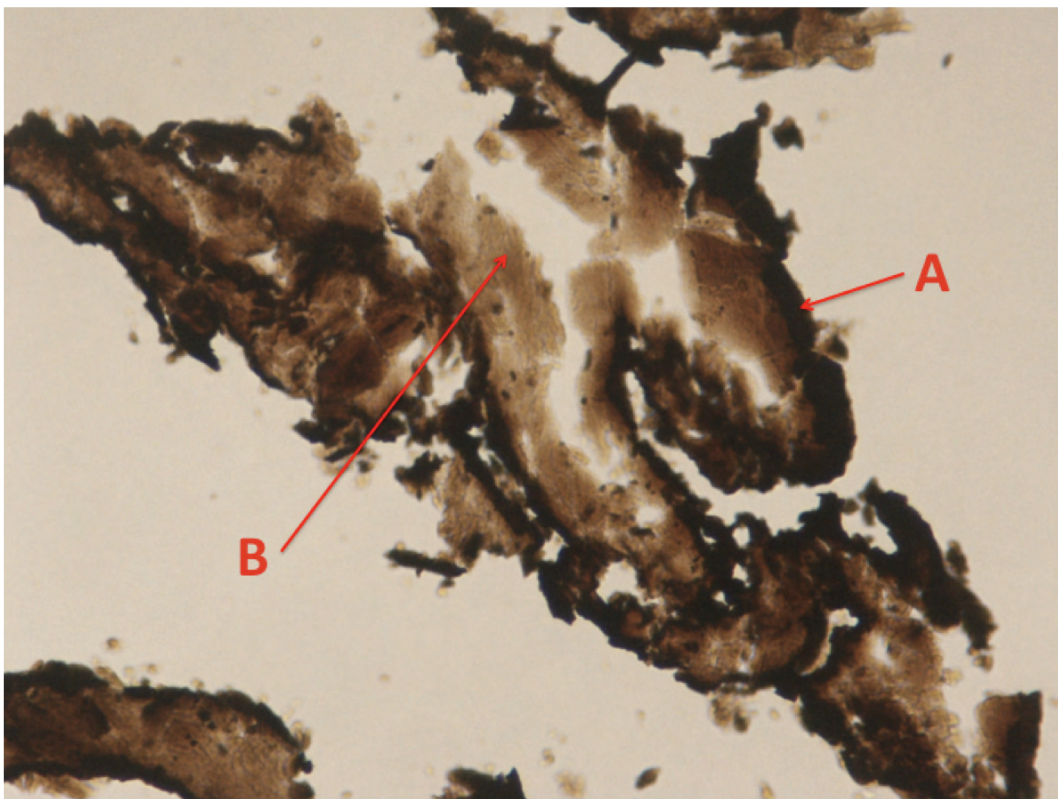


Imagen 22. A: Franja de osteoide mas matriz ósea; B Matriz ósea deformada. Hematoxilina 40x.

Se producen además en la matriz del tejido conjuntivo formaciones poliédricas cristalinas (Imagen 23 y 24).

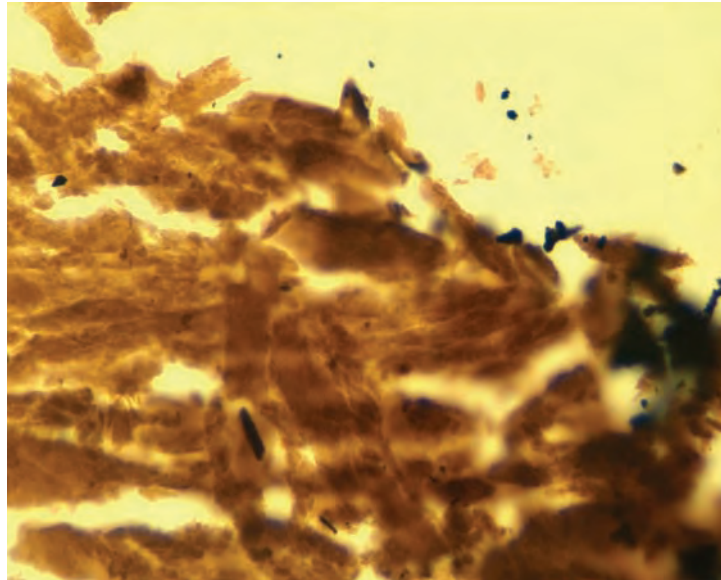


Imagen 23. Formaciones poliédricas en tejido trabecular. Hematoxilina 63x

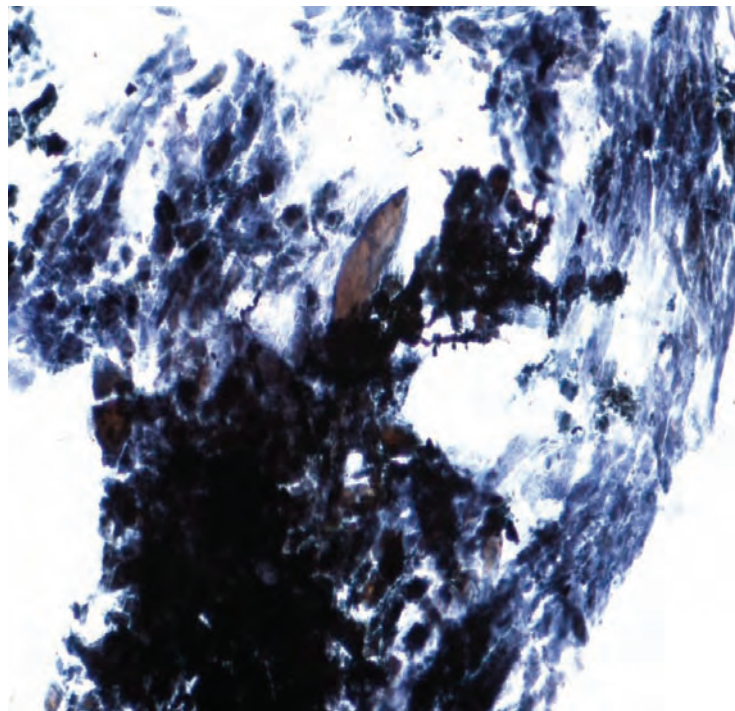


Imagen 24. Formaciones poliédricas en tejido trabecular. Azul de Toluidina 20x

La estructura del hueso cortical también comienza a deformarse, la estructura lamelar es más rica carbono por efecto de la combustión y se acentua con una coloración marrón-negro, además se produce una difusión hacia el exterior de las grietas de los canales de Havers a través de la matriz (Imagen 25).

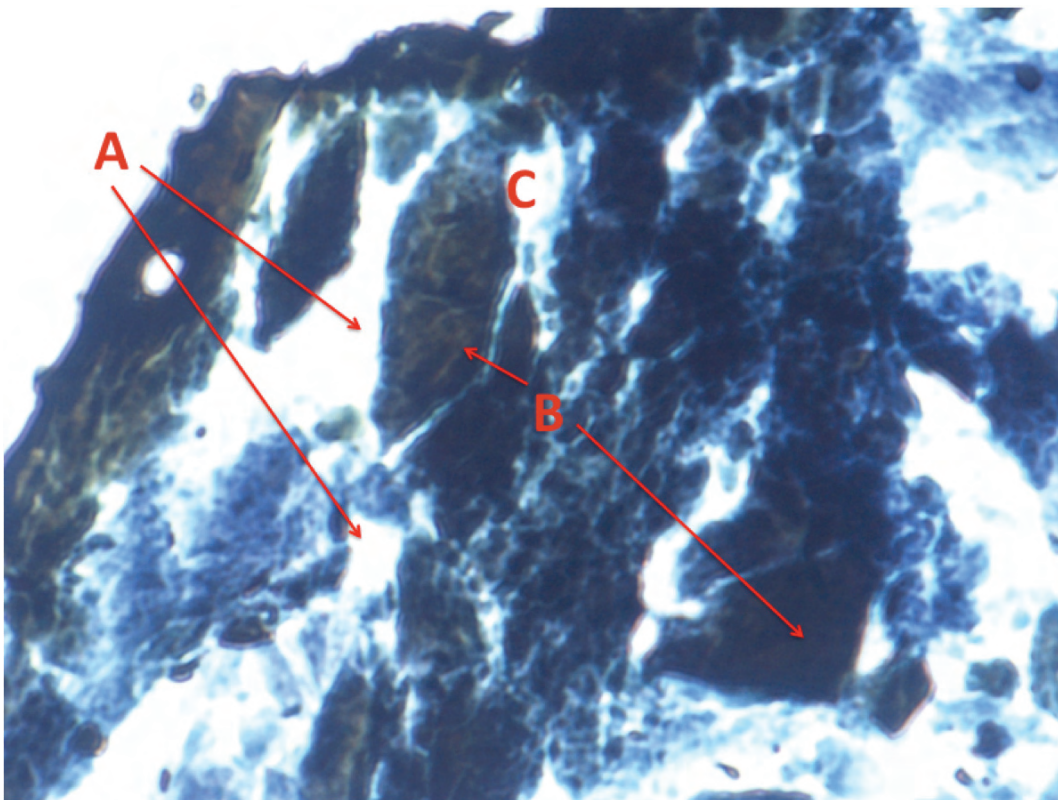


Imagen 25. A: Deformación del tejido cortical; B: Coloración por exceso de Carbono; C: Difusión de Grietas desde los canales de Havers.

4.5 Cambios histológicos a 400°C.

En este fase tanto el tejido cortical como el trabecular se vuelven irreconocibles, ya no aparecen ningun tipo de células óseas y se producen otro tipo de fenomenos de combustón que dan lugar a la cristalinización de la matriz ósea.

El hueso se vuelve negruzco y deleznable, la estructura comienza a volverse prácticamente cristalina (Imagen 26 y 27)

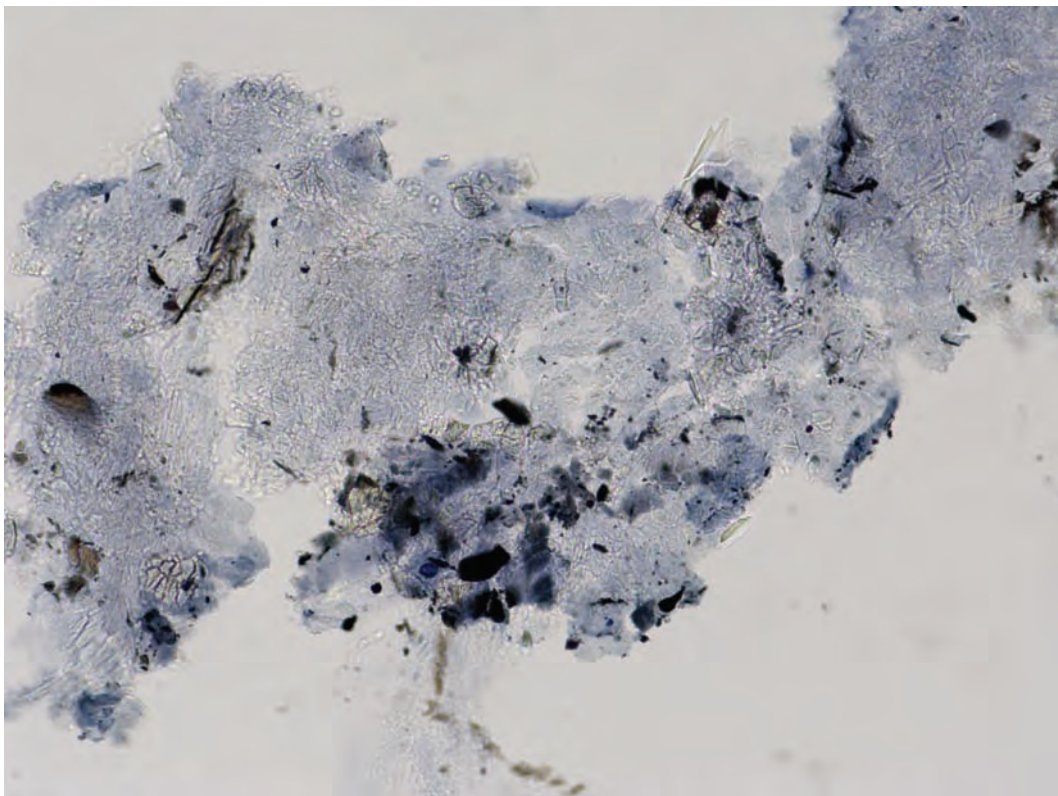


Imagen 26. Cristalización Trabecular. Azul de toluidina 20x

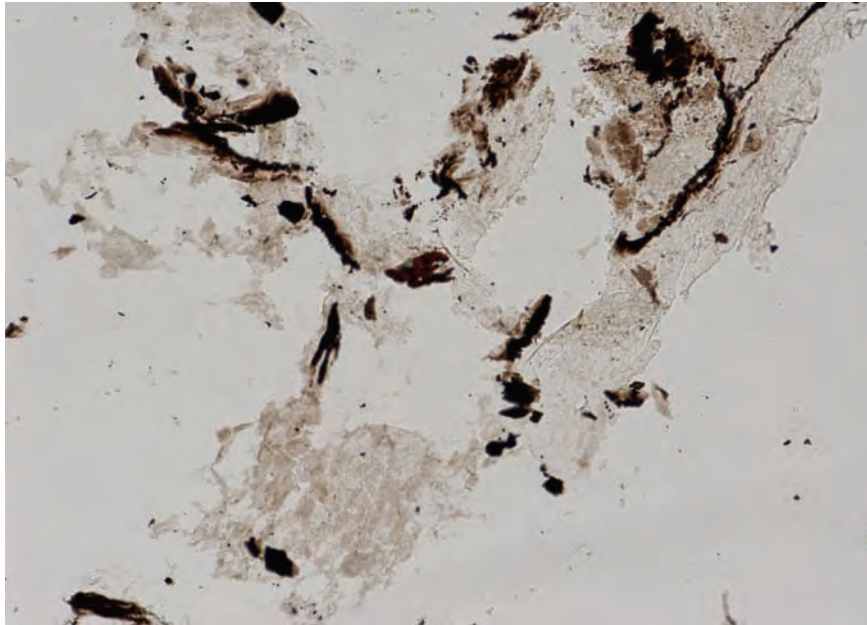


Imagen 27. Trabéculas. Tricrómico de Goldner 10x

El tejido trabecular se vuelve caótico. Tanto el osteoide como la matriz ósea, aparecen entrelazados y mezclados entre si. Las formaciones cristalinas van aumentando en forma y tamaño (Imagen 28).

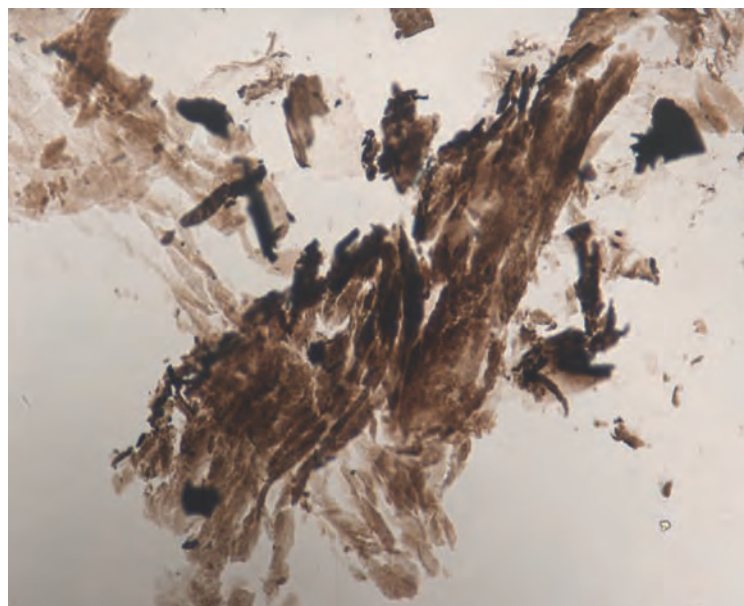


Imagen 28. Estructura caótica. Hematoxilina 40x

En las corticales se produce la aglutinación del tejido tras la deformación desde los canales de Havers lo que se traduce en formaciones cristalinas vítreas de forma cuadrada (Imagen 29 y 30).

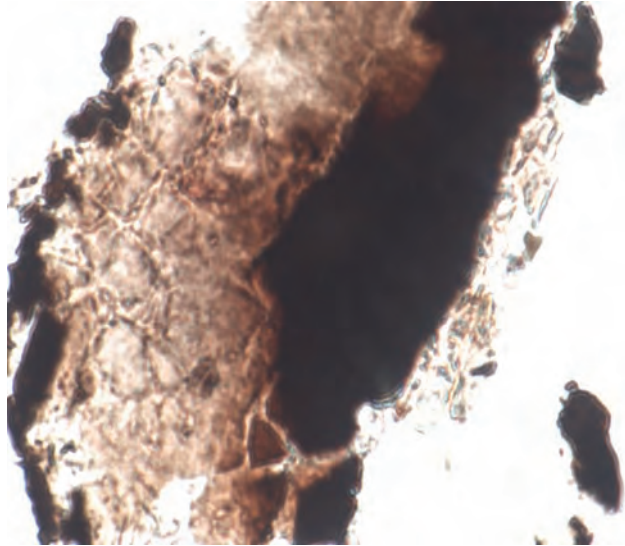


Imagen 29. Cortical con aglutinaciones y estructuras cristalinas cuadradas. Hematoxilina 65x

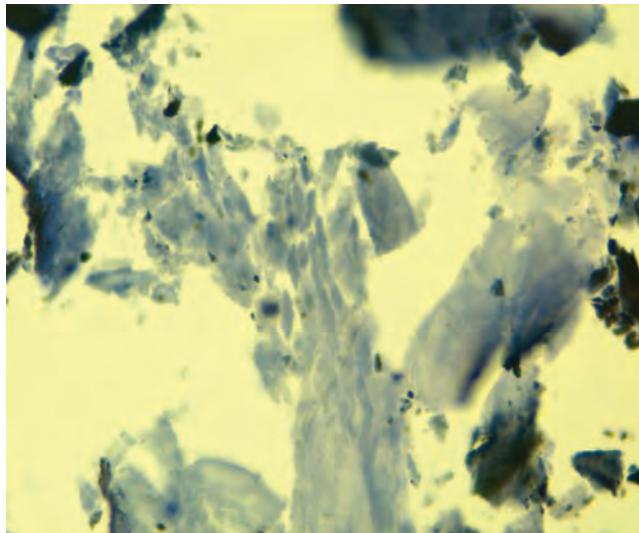


Imagen 30. Formaciones cristalinas. Azul de Toluidina 65x

4.6 Cambios histológicos a 500°C.

A partir de los 500 aparecen una serie de formaciones cristalinas que son muy características de estas temperaturas (imagen 31, 32, 33).



Imagen 31. Formación cristalina cortical hueso. Azul toluidina 20x

Estas estructuras presentan ramificaciones de forma poliédrica en incipiente formación, es decir de nueva creación, ocurre tanto en las áreas corticales como en las áreas trabeculares.

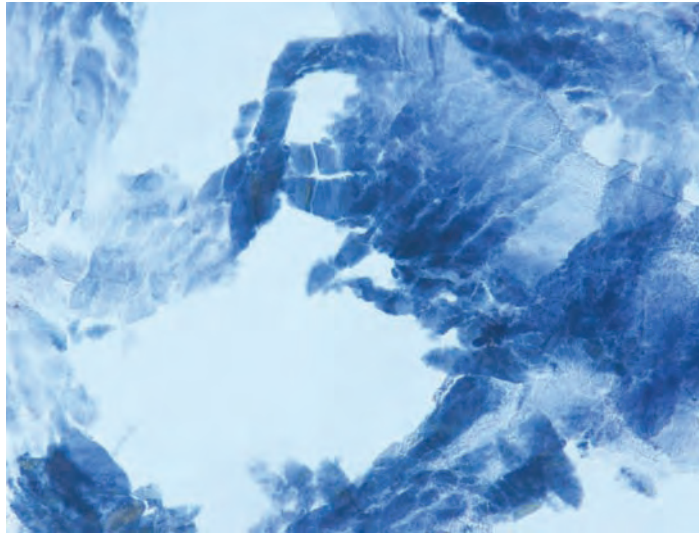


Imagen 32. Formación cristalina trabécula ósea. Azul toluidina 40x

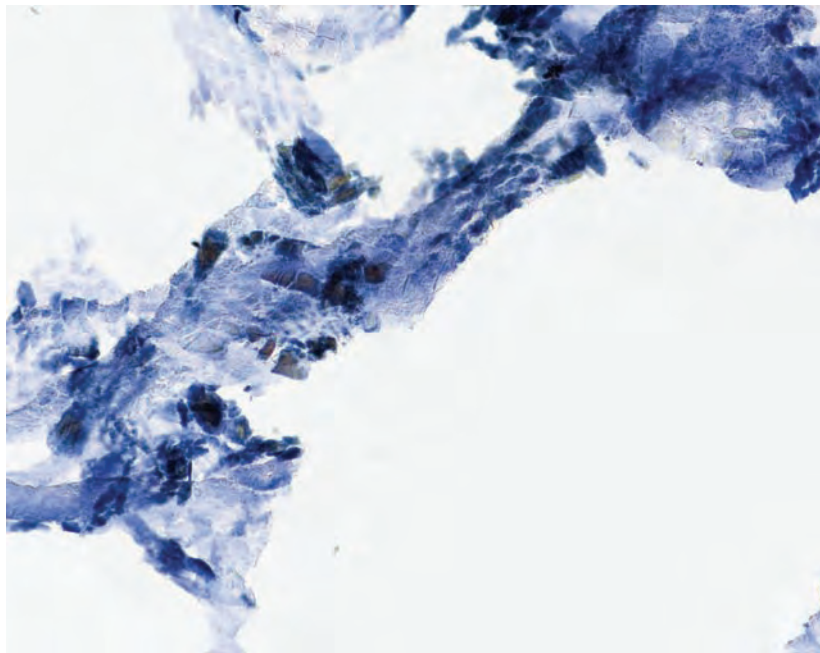


Imagen 33. Formación cristalinidad en trabécula. Azul toluidina 20x

Los cambios que llegan a producirse a esta temperatura son los mas importantes, van a marcar los cambios cristalográficos que se van a producir desde ahora en adelante.

Además como se puede observar en las imágenes 34 y 35, junto con las estructuras poliédricas aparecen además polímeros cristalinos macromoleculares lineales de colágeno y matriz extracelular.

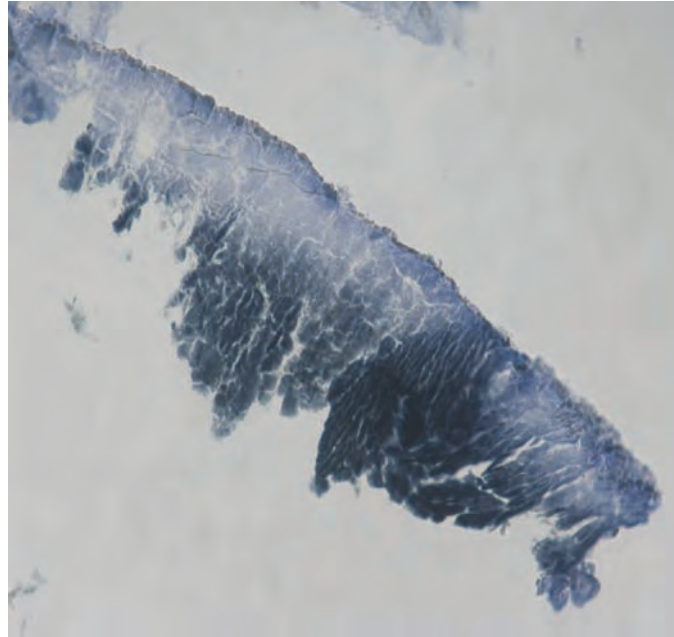


Imagen 34. Polímeros cristalinos Azul de toluidina 40x



Imagen 35. Polímeros cristalinos. Estructura trabecular. Azul de toluidina 20x.

4.7 Cambios histológicos a 600°C.

En esta fase se pierden los polímeros cristalinos y comienzan a aparecer formaciones cristalinas cúbicas de gran tamaño y bien definidas (Imagen 36 y 37.).

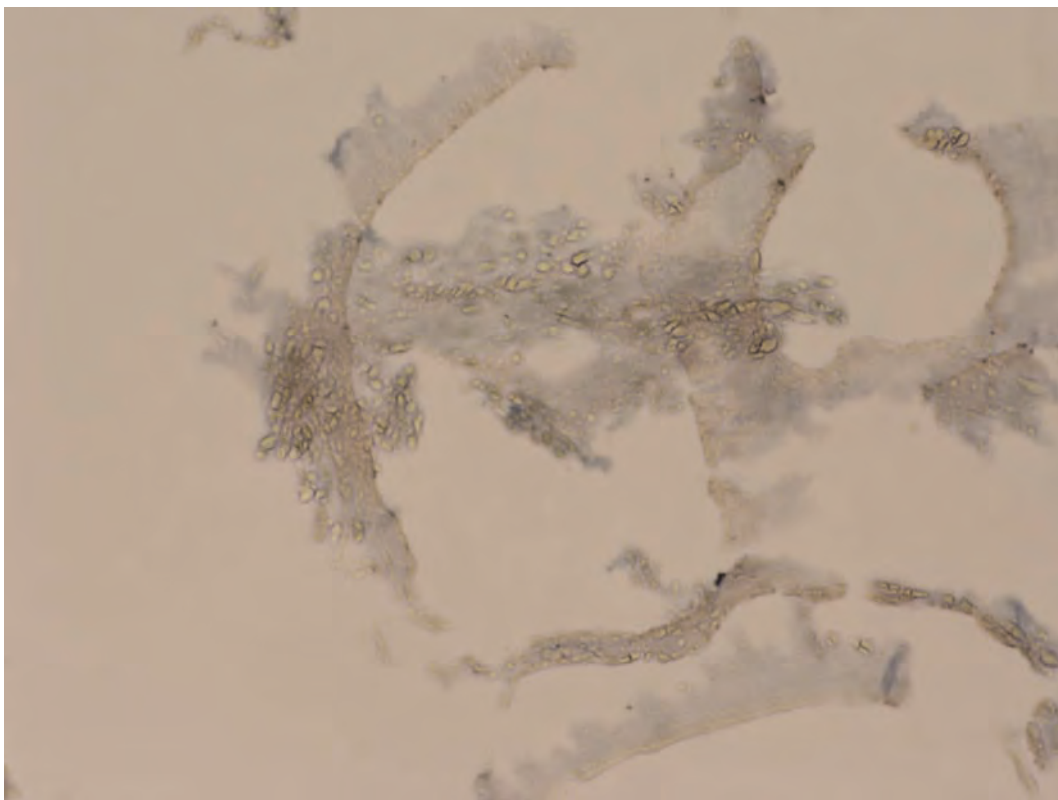


Imagen 36. Cristales sobre estructura trabecular. Tricrómico de Goldner 10x

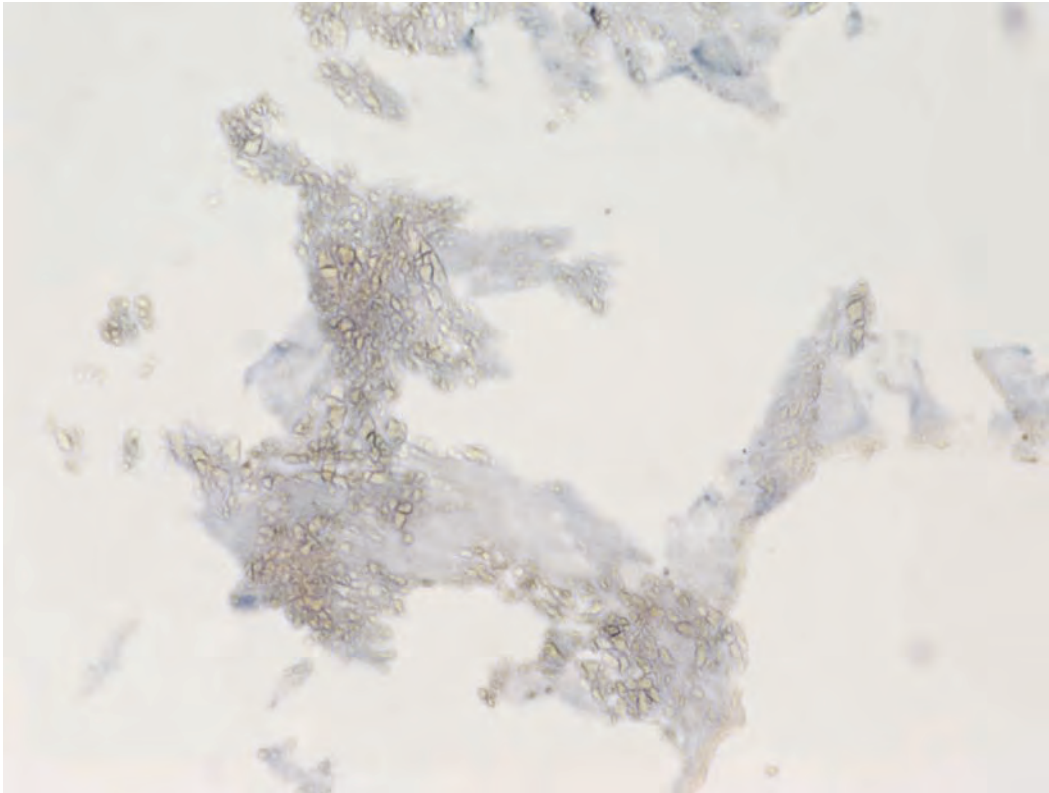


Imagen 37. Formación de cristales sobre estructura trabecular. Tricrómico de Goldner 10x

Las grietas y deformaciones a esta temperatura son numerosas y destacados a lo largo de la matriz, pero la estructura trabecular sigue siendo visible (Imagen 38 y 39)

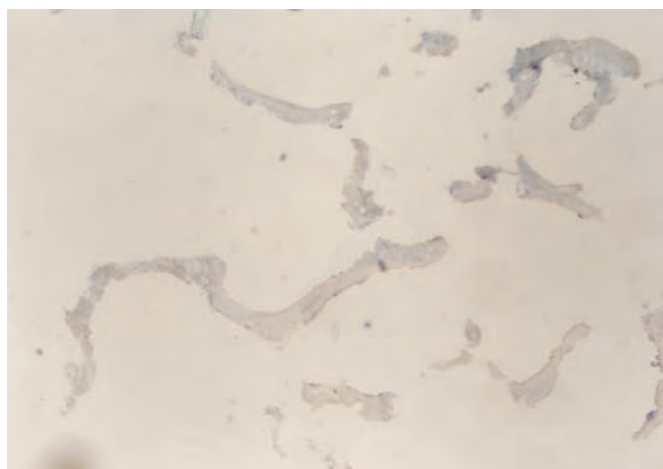


Imagen 38. Trabéculas. . Tricrómico de Goldner 10x

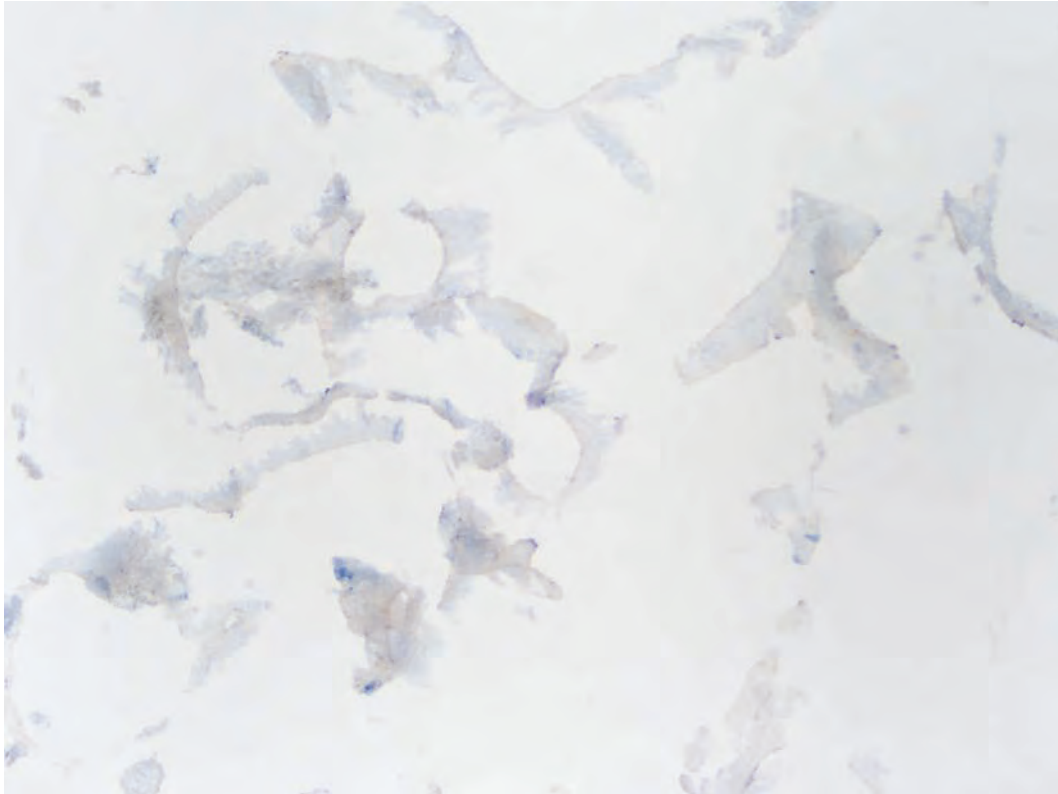


Imagen 39. Trabéculas. . Tricrómico de Goldner 4x

A nivel cortical, la estructura aparece también con cristales de gran tamaño y perfectamente definidos (Imagen 40 y 41)

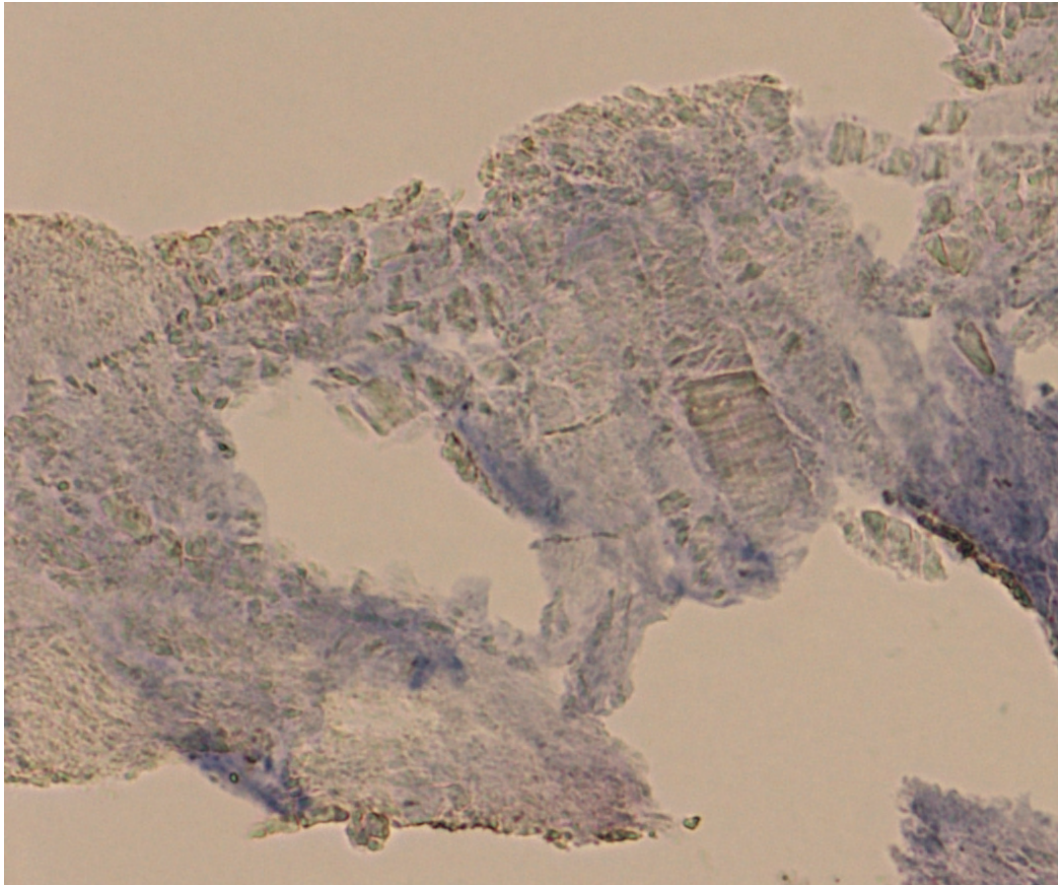


Imagen 40. Formaciones cristalinas en cortical. Tricrómico de Goldner 40x

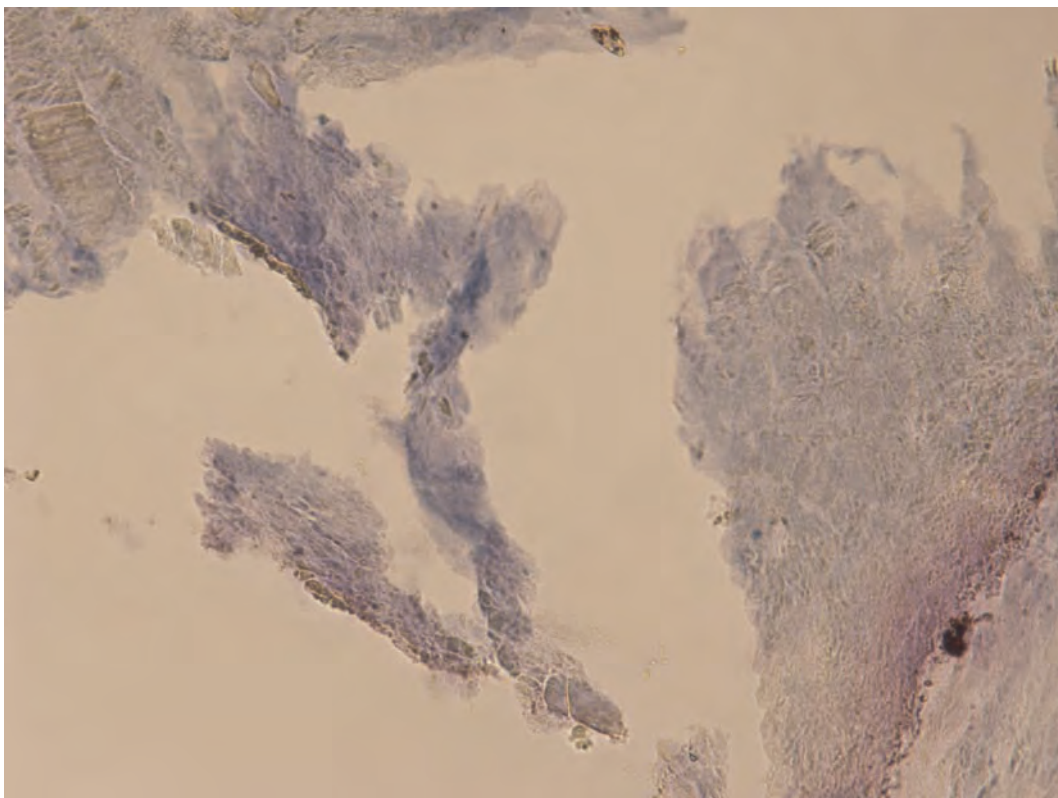


Imagen 41. Formaciones cristalinas en cortical. Tricrómico de Goldner 40x

4.8 Cambios histológicos a 700°C.

A esta temperatura la deformación es mas patente y las formaciones cristalinas comienzan a disminuir en tamaño y forma, la matriz se reduce por lo que las grietas son mas abundantes (Imagen 42, 43, 44).



Imagen 42. Formaciones cristalinas disminuidas. Azul de toudina 20x

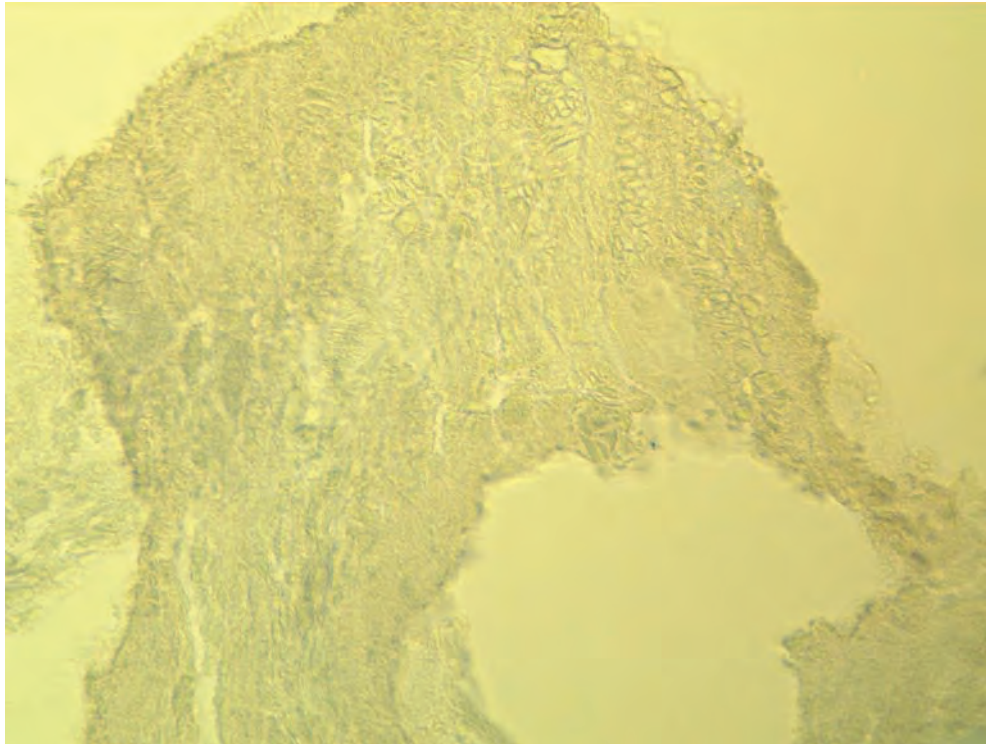


Imagen 43. Formaciones cristalinas y grietas en la matriz. Hematoxilina 40x

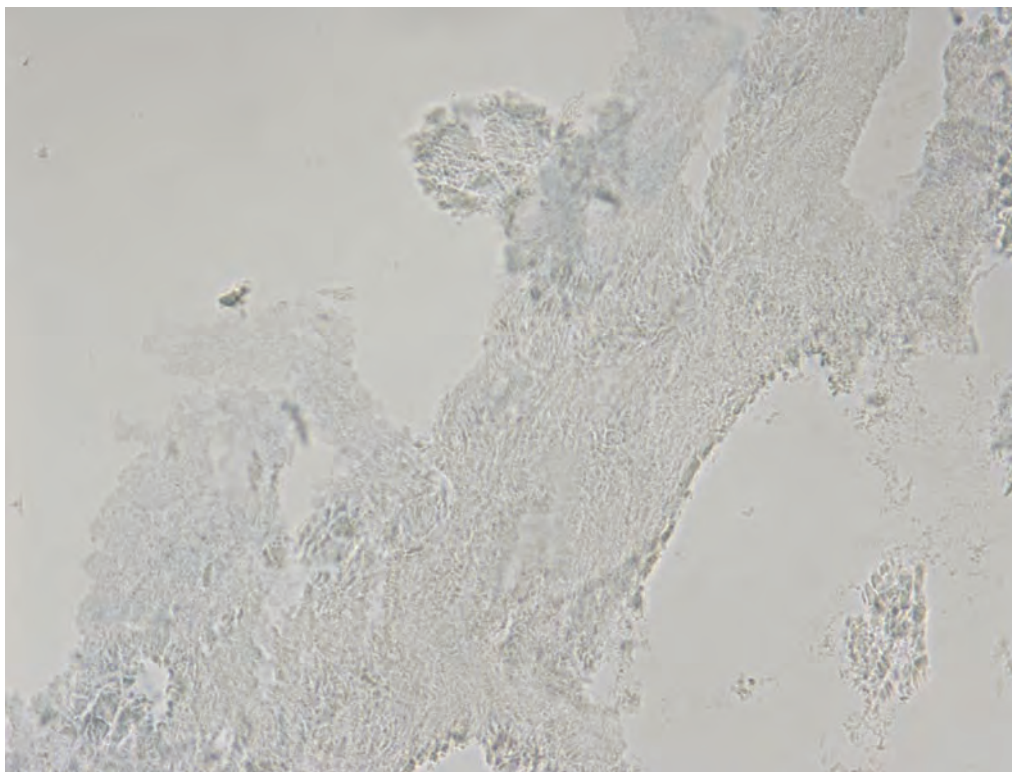


Imagen 44. Formaciones cristalinas y grietas en la matriz. Toluidina 40x

La estructura cortical presenta un aspecto espicular, probablemente puede deberse a los productos de la combustión depositados durante la carbonización (Imagen 45).

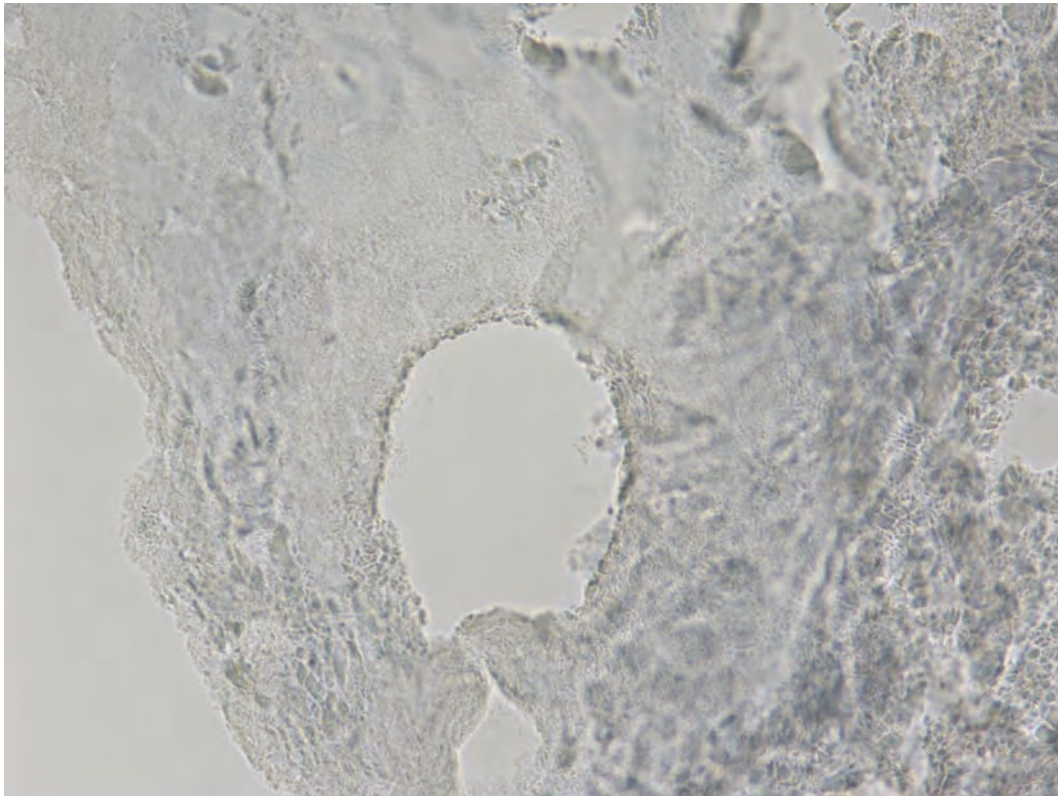


Imagen 45. Cortical. Formaciones espiculares. Toluidina 40x

Además puede apreciarse una disminución en la forma cristalina con respecto al estado de temperatura anterior. Con el aumento de la temperatura se produce una compactación de los tejidos y cristales, confiriendo a la estructura cortical un aspecto mas compacto (Imagen 46)

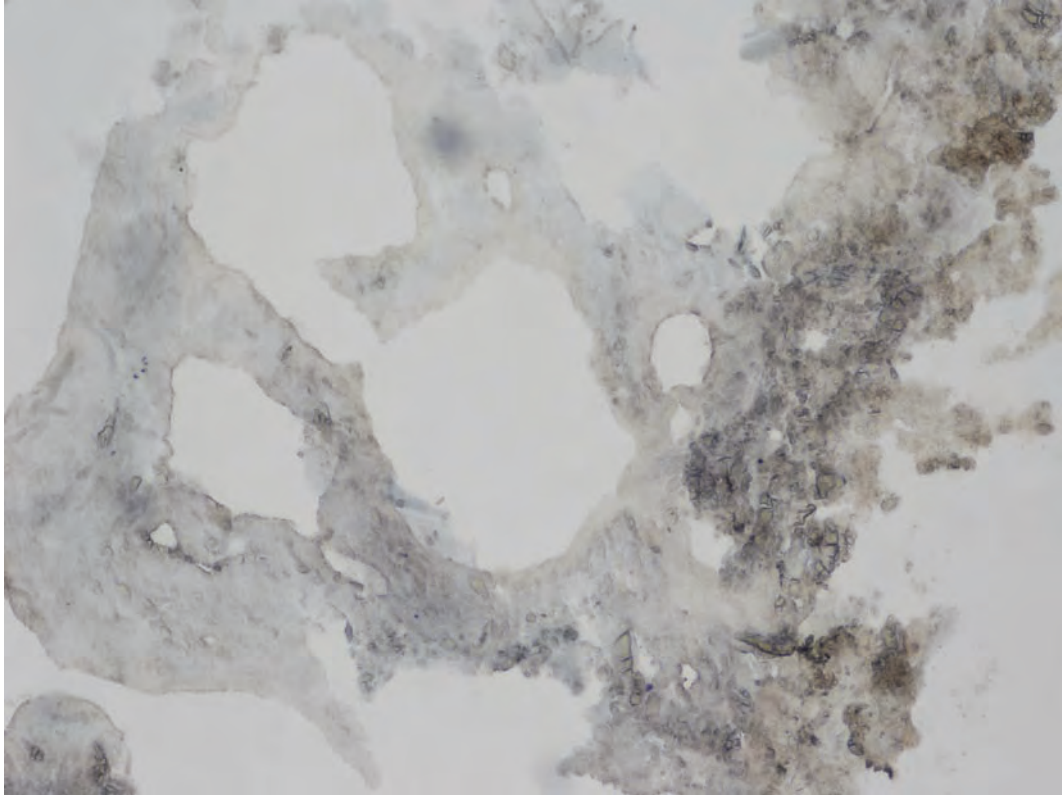


Imagen 46. Estructura cortical. Toluidina 10x

4.9 Cambios histológicos a 800°C.

La microestructura ósea se trasforma en cristales de gran tamaño, el aspecto espicular que presentaba a 700°C se agudiza aún mas. Las trabéculas se convierten en un conjunto de cristales de gran tamaño.

(Imagen 47 y 48)

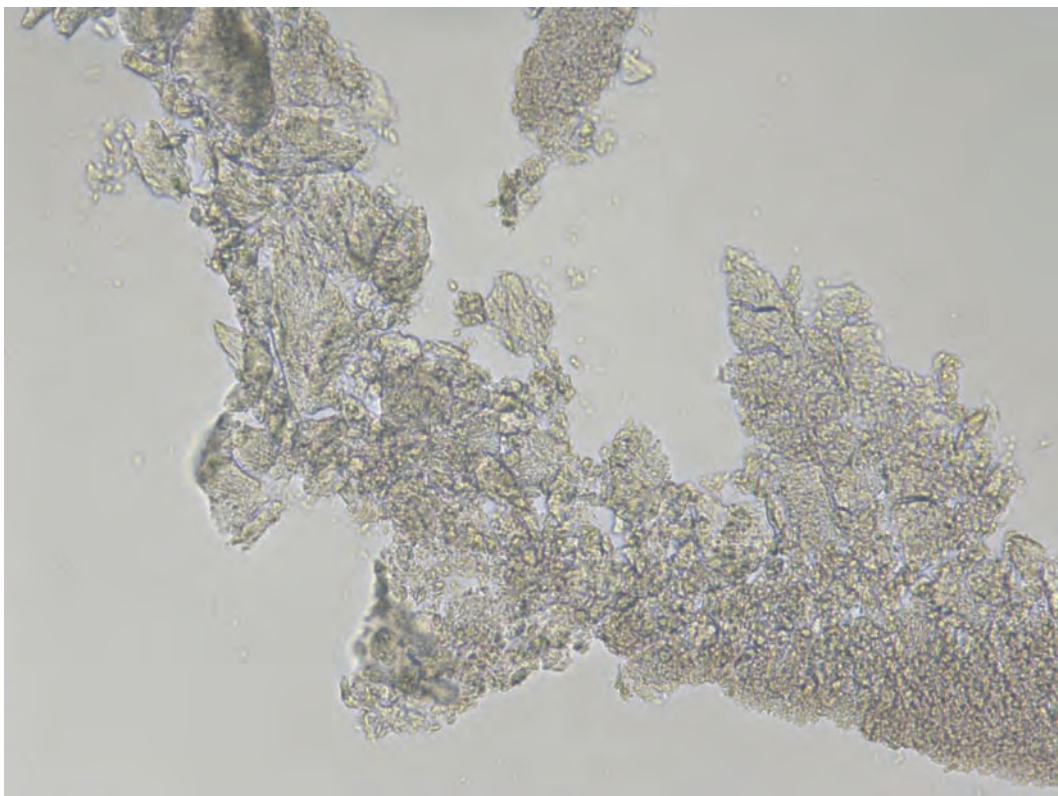


Imagen 47. Trabécula con cristales espiculares de gran tamaño. Toluidina 40x

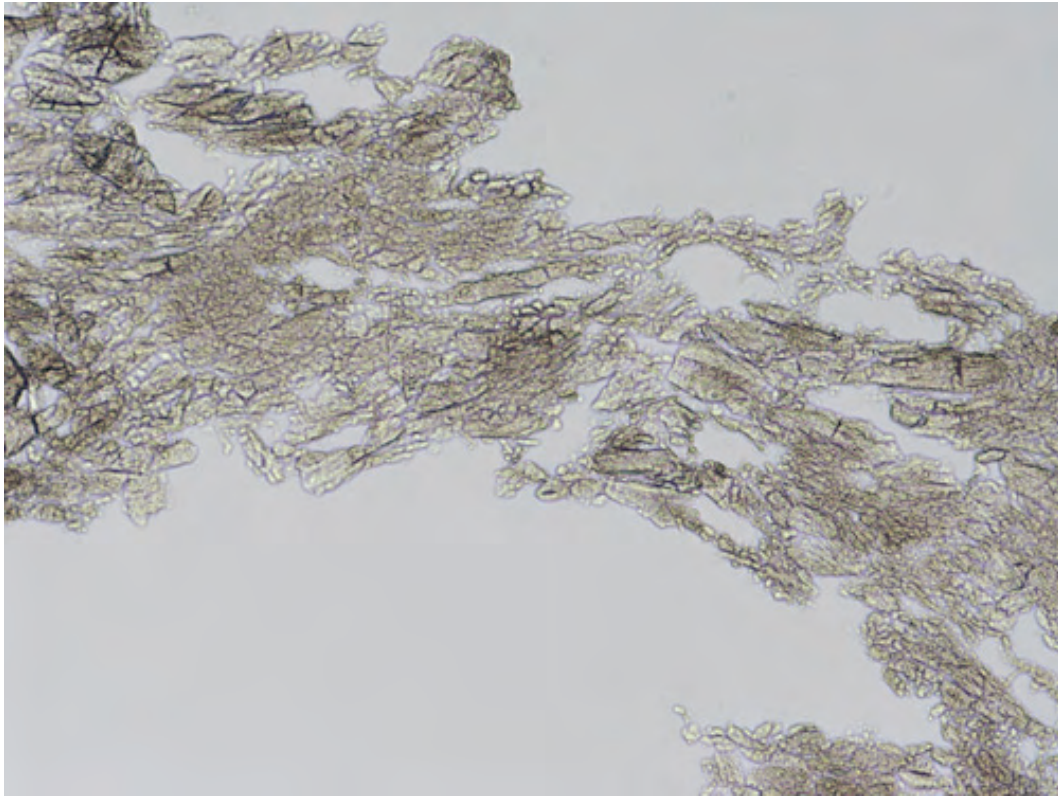


Imagen 48. Trabécula con cristales espiculares de gran tamaño. Toluidina 40x

Como se puede observar las partículas forman estructuras poligonales espiculares en el hueso trabecular y estructuras nodulares en el hueso cortical (Imagen 49).

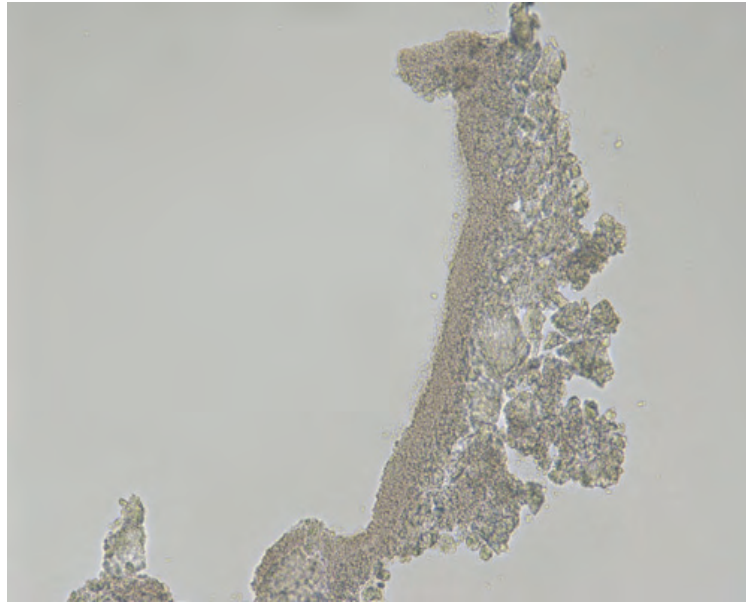


Imagen 49. Estructuras nodulares en el hueso cortical. Hematoxilina 40x

El calor provoca fisuras que tienden a producir segmentos rectangulares separados por hendiduras profundas perpendicular a la matriz ósea (Imagen 50).

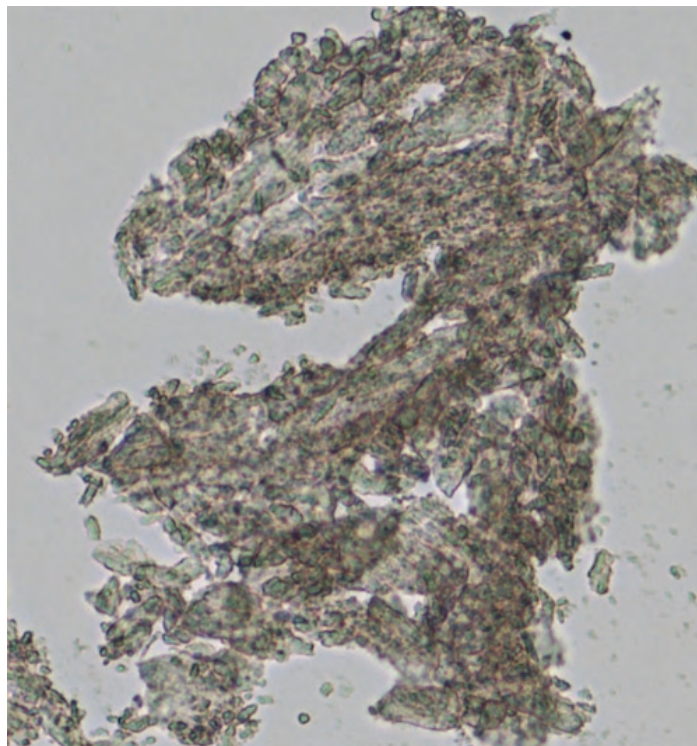


Imagen 50. Hendiduras profundas perpendicular a la matriz. Azul de toluidina 20 x

4.10 Cambios histológicos a 900°C.

La estructura se vuelve totalmente cristalina (Imagen 51). Se produce una retracción de la matriz ósea cortical y trabecular, empezando a producirse una compactación de la misma (Imagen 52 y 53).

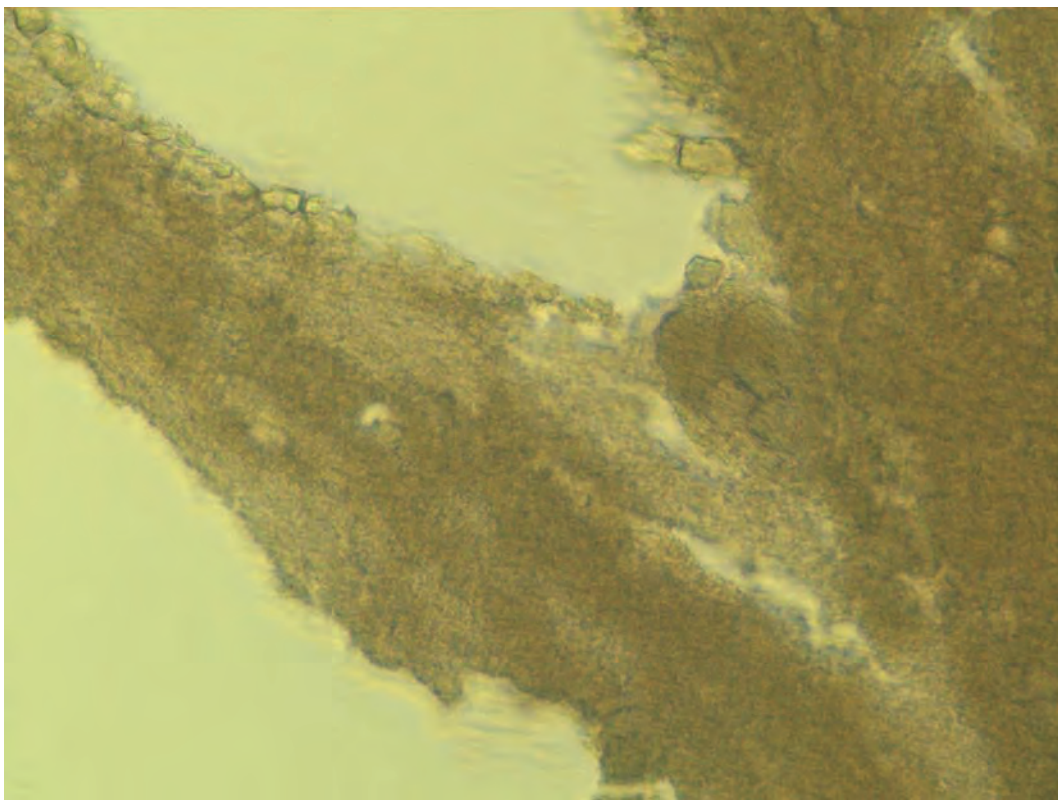


Imagen 51. Estructura cristalina. Tejido trabecular. Hematoxilina 65x

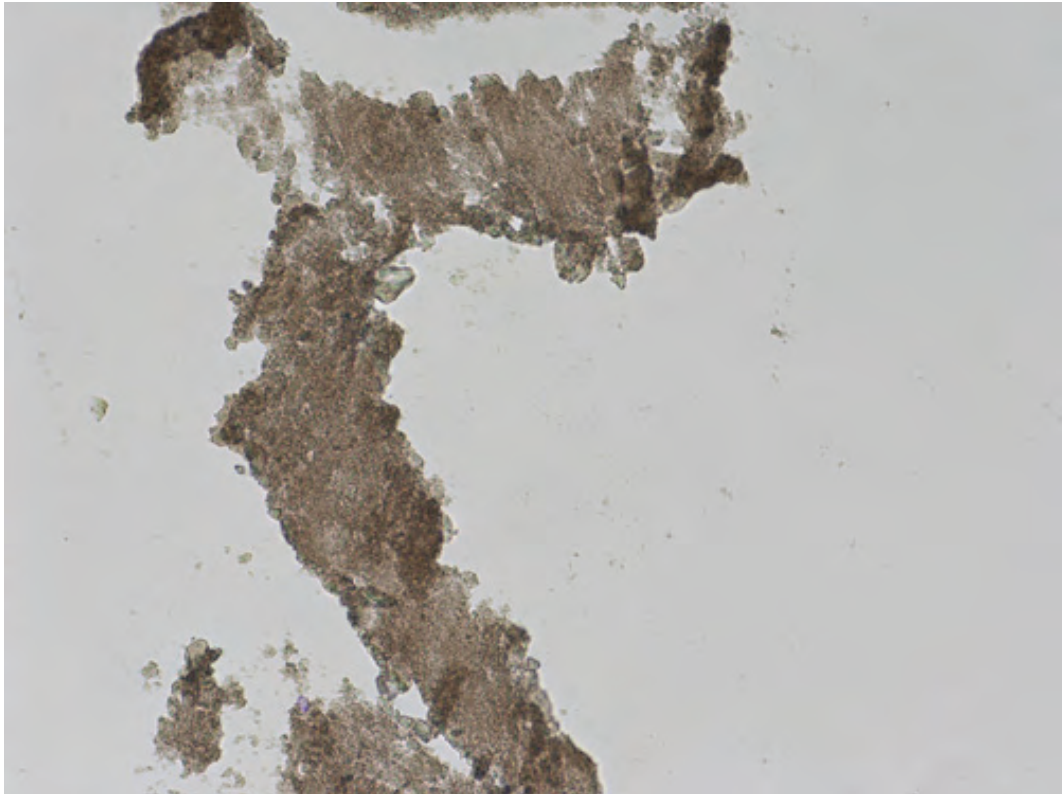


Imagen 52. Matriz ósea trabecular. Hematoxilina 20x

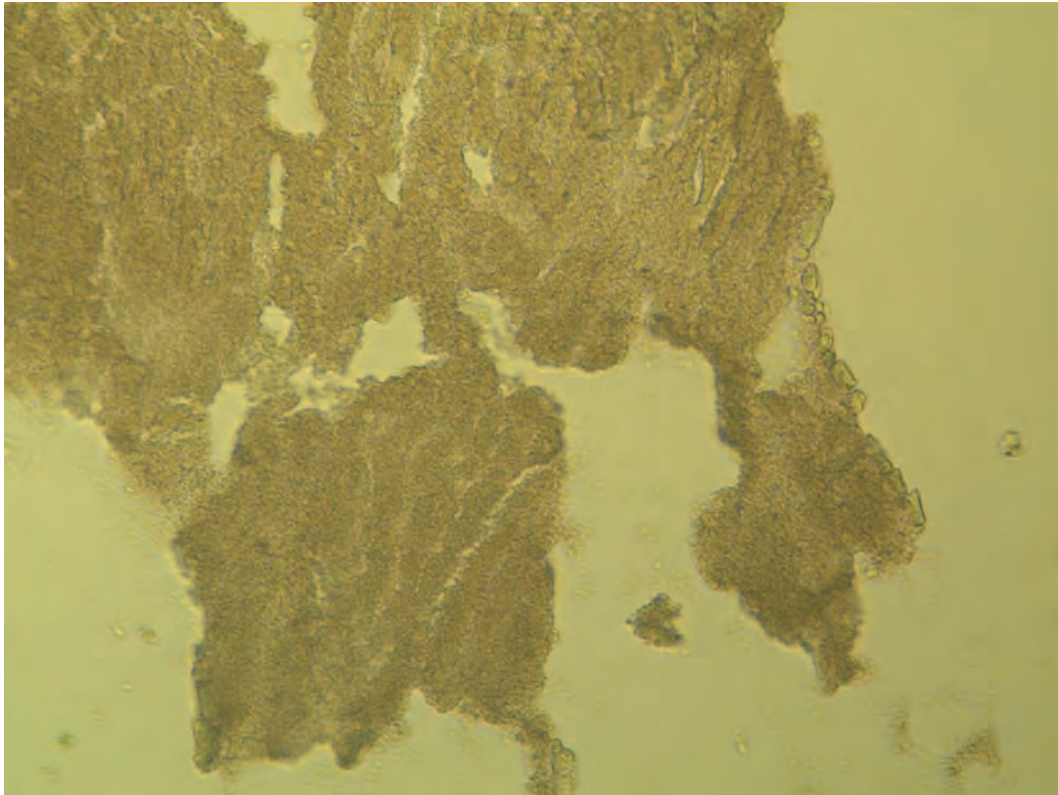


Imagen 53. Tejido óseo cortical. Hematoxilina 40x

Las trabéculas, tras la desintegración del tejido óseo quedan deformadas apareciendo en formas poliedricas y estrelladas (Imagen 54).

Lo mismo ocurre con la cortical, aparece desintegrado pero siguen siendo reconocibles los conductos de Havers (Imagen 55).

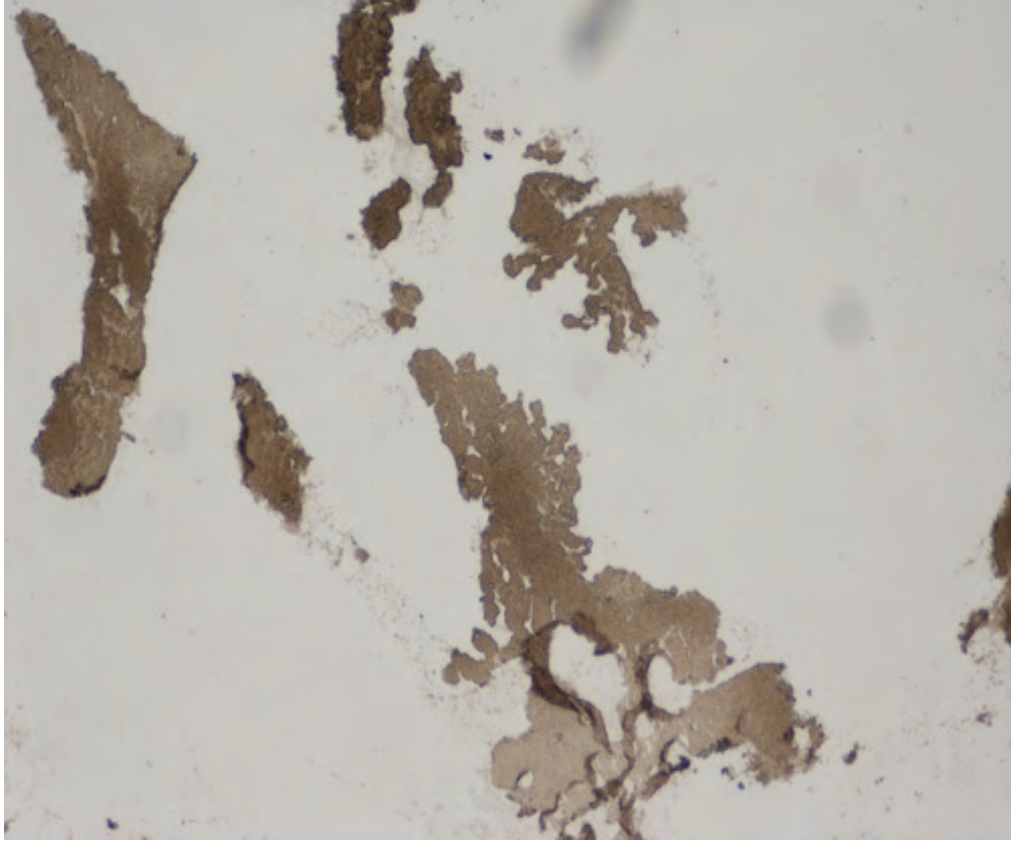


Imagen 54. Deformación trabecular. Hematoxilina 10x.

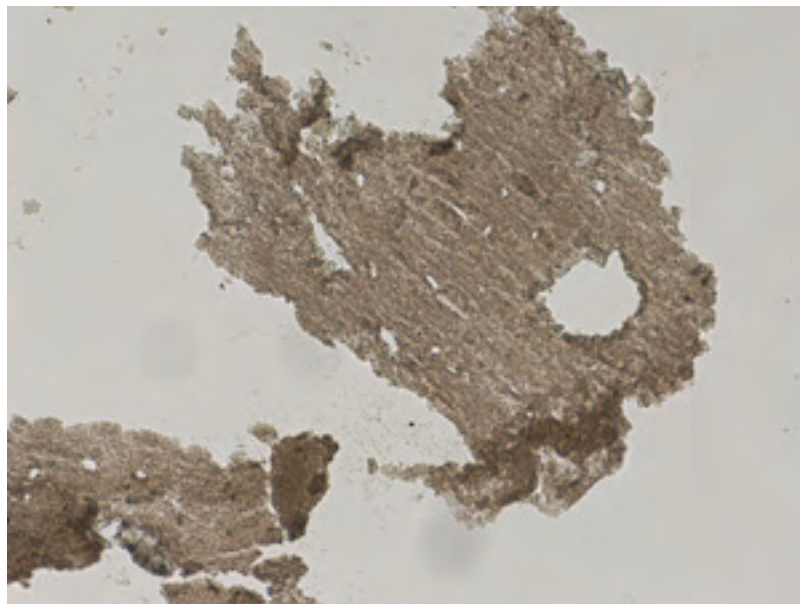


Imagen 55. Cortical . Hematoxilina 40x

4.11 Cambios histológicos a 1000°C.

La estructura sigue su cristalinización a medida que avanza la temperatura, la matriz ósea se vuelve cada vez mas compacta, tanto en el hueso trabecular como el cortical (Imágenes 56 y 57).

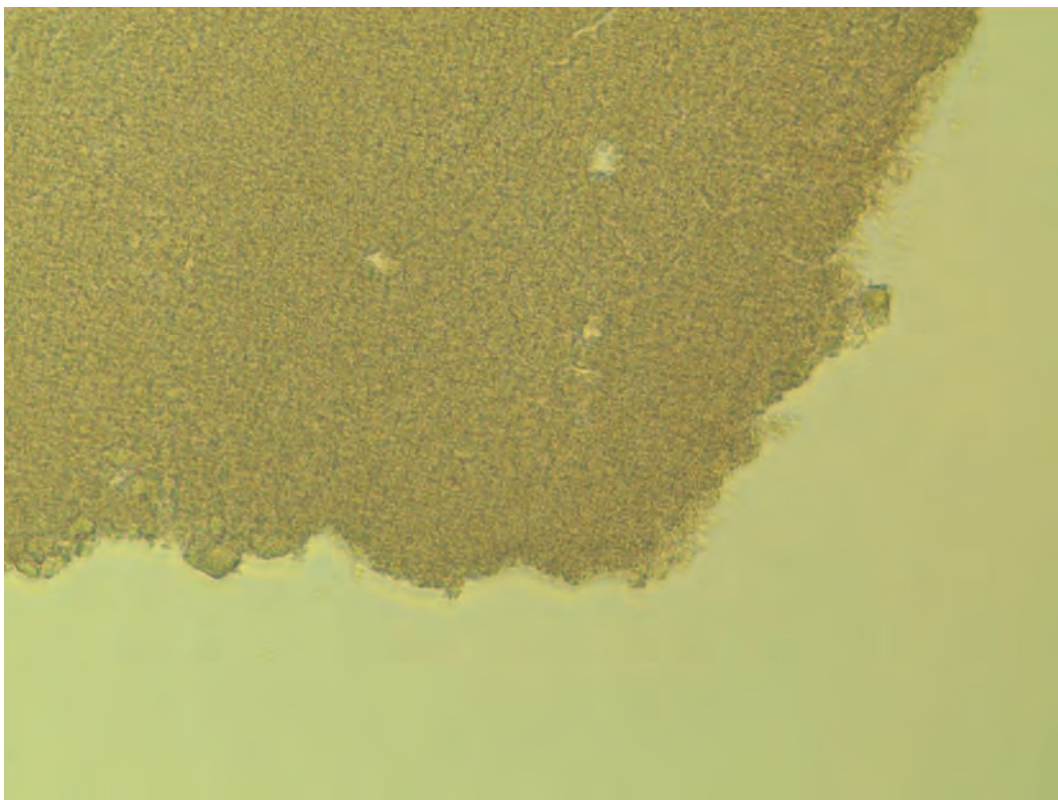


Imagen 56. Trabéculas. Compactación cristalina. Hematoxilina 65x.

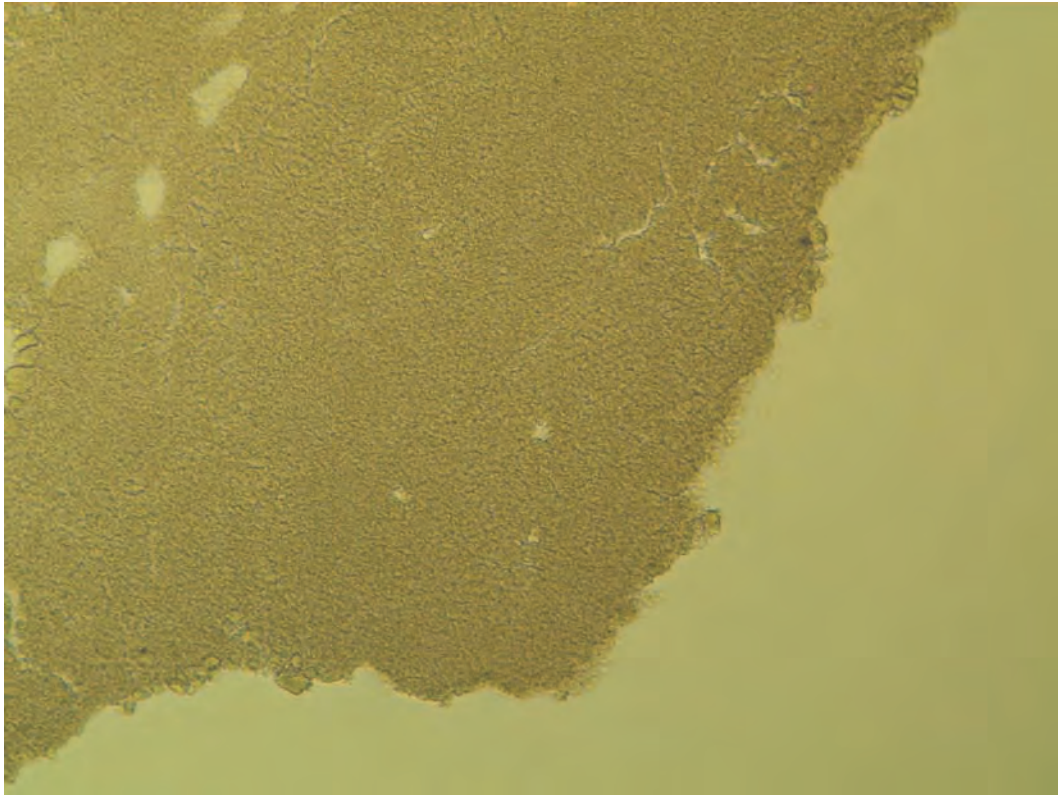


Imagen 57. Cortical. Compactación cristalina. Hematoxilina 40.

La deformación de las trabéculas es cada vez mas pronunciada (Imagen 58), la matriz osea aparece retorcida sobre su eje horizontal formando figuras poliedricas y lagunas Imagen (59),

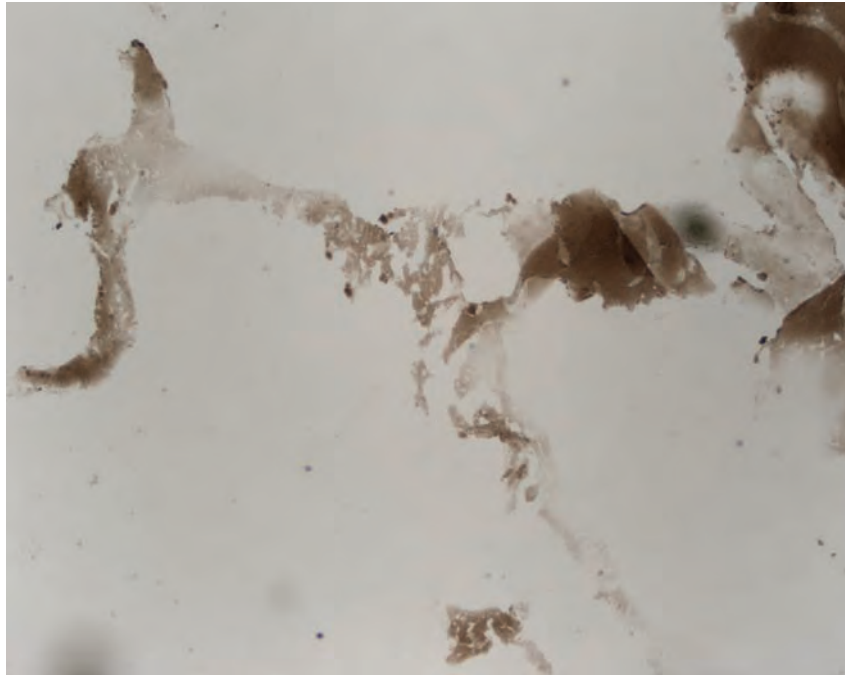


Imagen 58. Deformación trabecular. Hematoxilina 4x



Imagen 59. Deformación trabecular. Azul de toluidina 20x

Lo mismo ocurre en la cortical del hueso, la deformación es muy pronunciada, la estructura aparece estirada (Imagen 60), aun se observan canales de Havers, las unidades estructurales que unen hueso cortical y trabecular aparecen destruidos (Imagen 61)

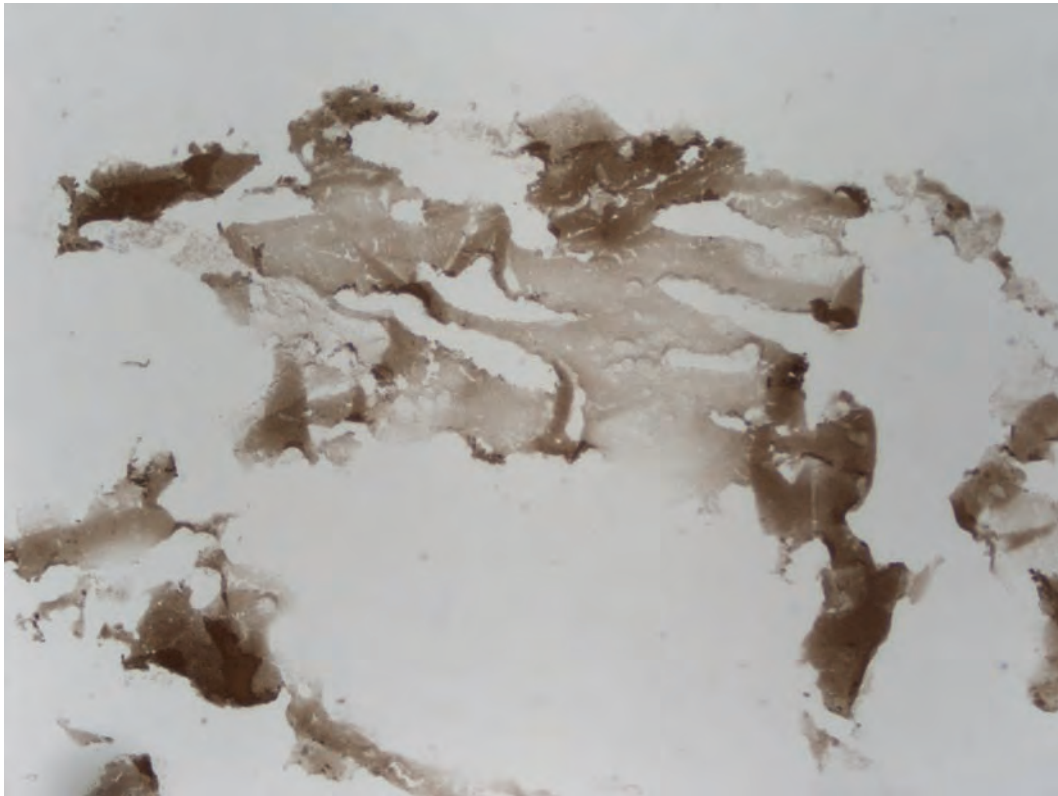


Imagen 60. Deformación. Azul de toluidina 10x

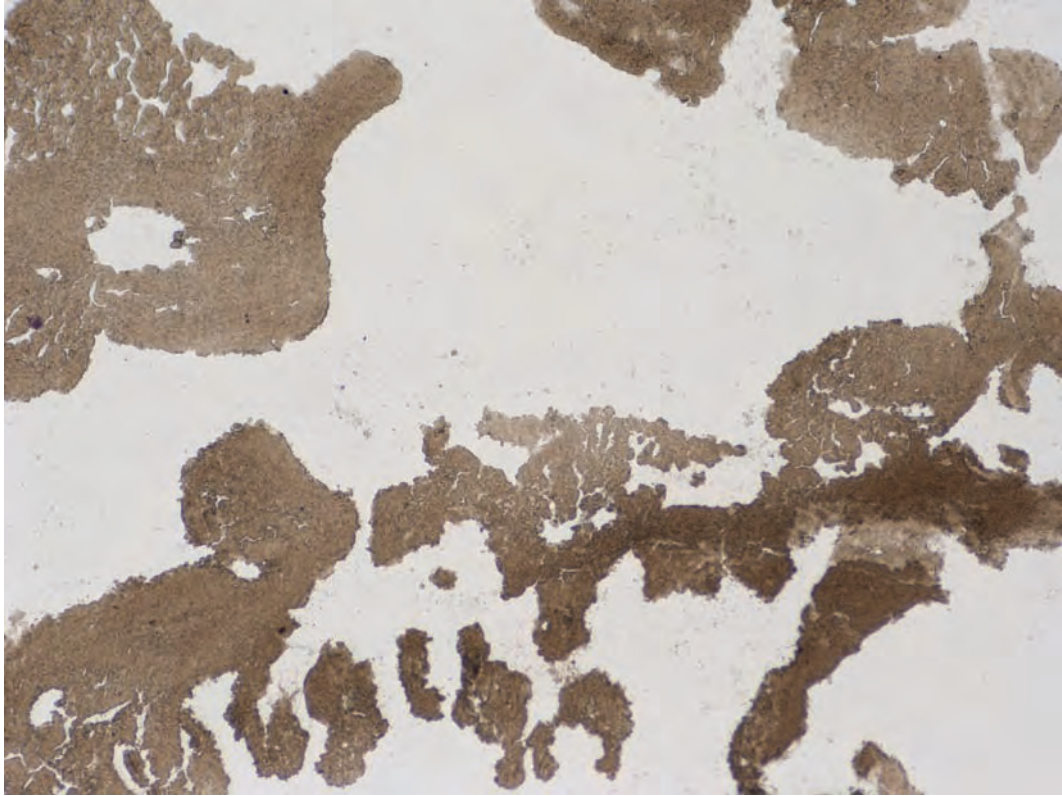


Imagen 61. Unidades estructurales cortico-trabeculares destruidos.

4.12 Cambios histológicos a 1100°C.

La cristalización es completa, las trabéculas apenas se distinguen, quedan prácticamente desintegradas y fracturadas (Imagen 62), la matriz ósea aparece granulada (Imagen 63).

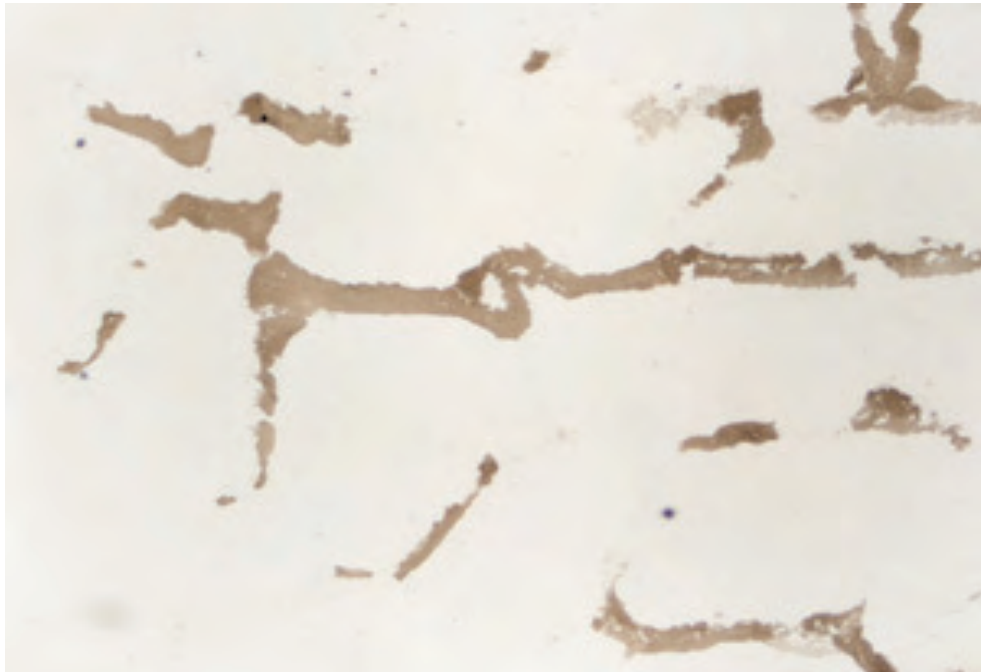


Imagen 62. Trabéculas. Azul de Toluidina 4x.

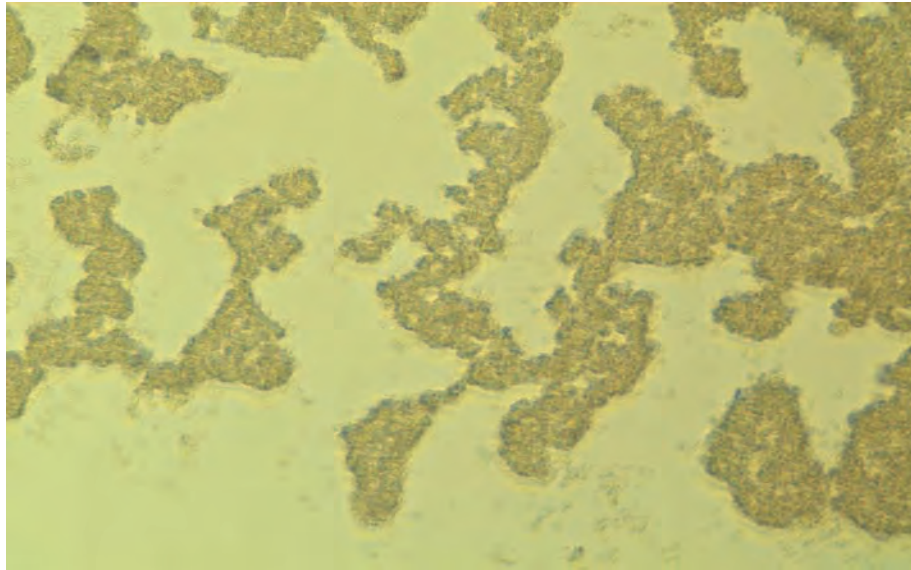


Imagen 63. Trabéculas formación grumosa. Hematoxilina 20x

La matriz ósea que se presentaba a 1000°C mas uniforme deja de ser compacta y aparece microfracturada (Imagen 64)

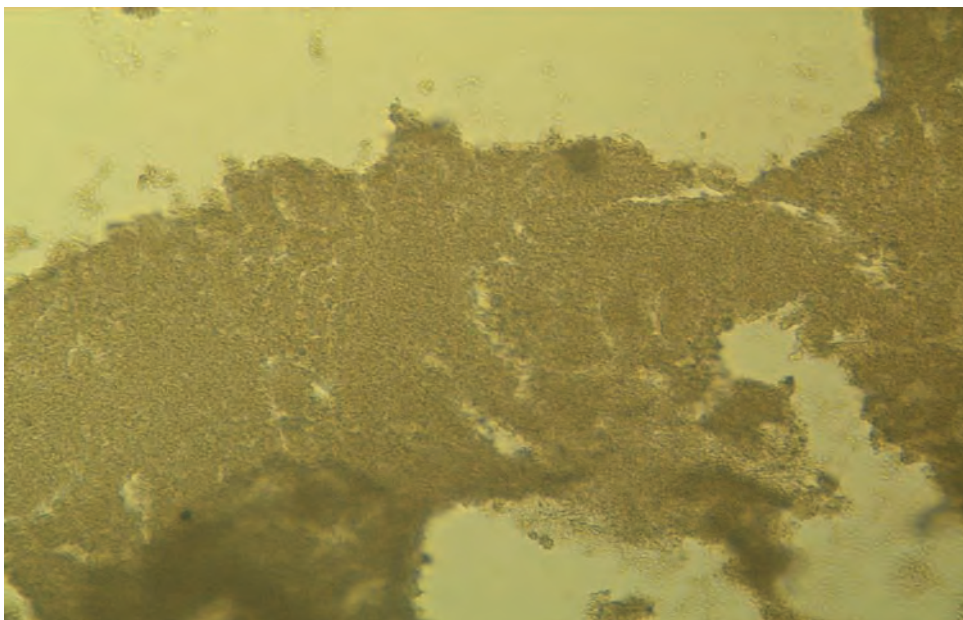


Imagen 64. Matriz ósea cristalizada con microfracturas. Hematoxilina 65x

El tejido cortical aparece mucho mas deformado y desintegrado que a temperaturas anteriores, aunque siguen siendo visibles los conductos de Havers, además pueden apreciarse fenomenos de torsion y desintegración, manifestado por la formación de estructuras poliédricas en forma de racimo (Imagen 65).

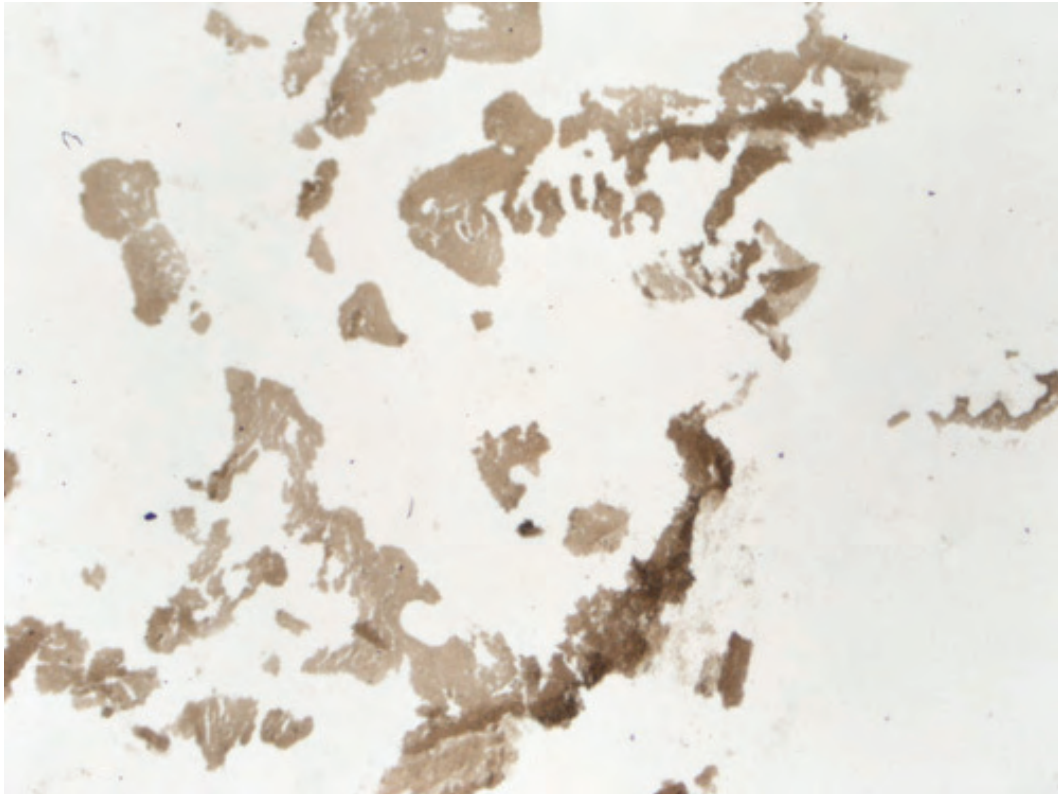


Imagen 65. Cortical ósea. Torsión y desintegración. Hematoxilina 4x

4.13. Estudio de la matriz ósea.

La matriz ósea es la que sufre los cambios mas deterrminantes como consecuencia del aumento de temperatura. A continuación se exponen los resultados obtenidos mediante observación microscópica a 100x.

A 100°C la matriz aparece con microfracturas pero lo mas característico es la estructura acordonada, mucho mas visible con tinción de hematoxilina. Esta estructura corresponde a fibras de colageno, que por efecto del calor y la microfracturación ósea, tienden a separarse (Imagen 66 y 67)

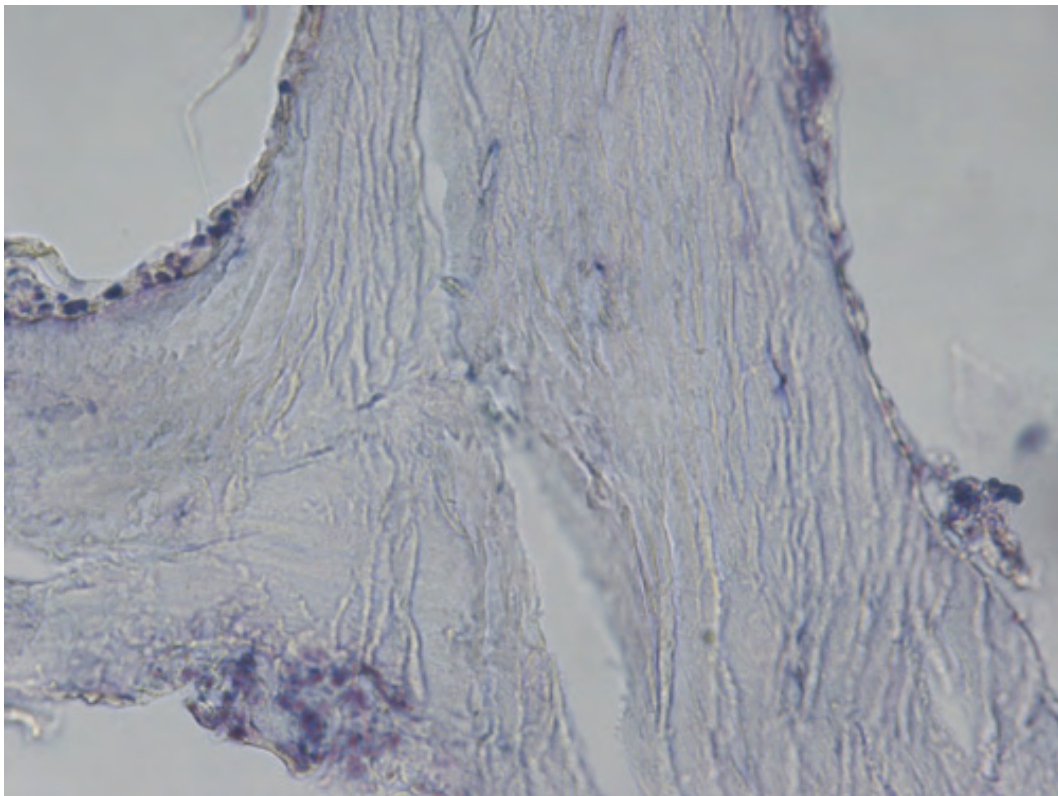
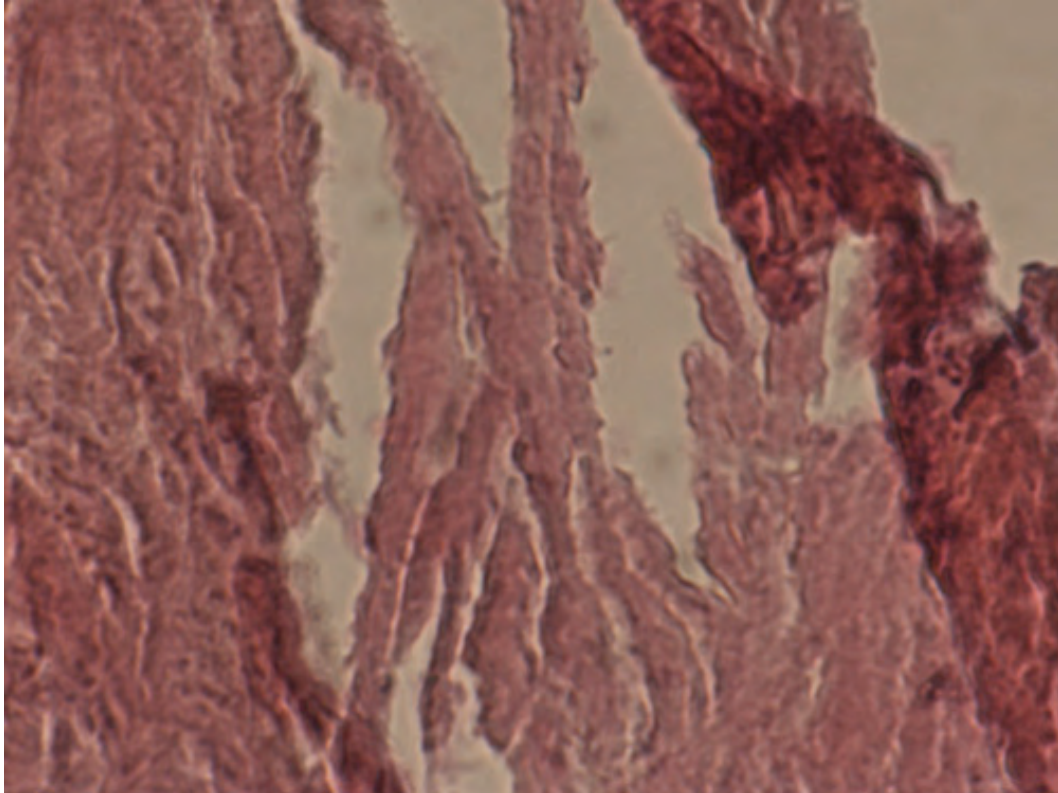


Imagen 66. Disposición de las fibras de colágeno en la matriz ósea. Azul de Toluidina 100x



**Imagen 67. Disposición de las fibras de colágeno en la matriz ósea.
Hematoxilina100x.**

Cuando se aumenta la temperatura a 200°C la estructura se vuelve mas compacta, mas sólida. La disposición de las fibras de colágeno adquieren un tono mas rígido y compacto dejando esa disposición acordonada de la fase anterior para pasar a una disposición en barra, confiriendo una disposición mas ordenada y paralela de las fibras (Imágenes 68 y 69)

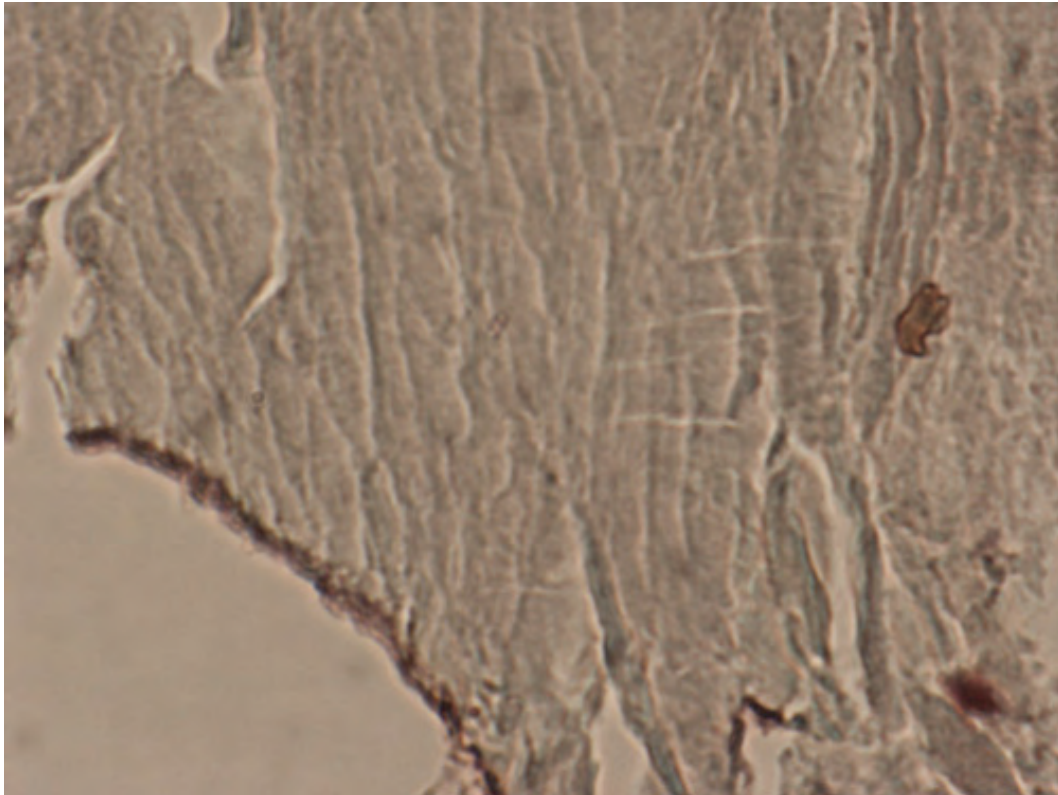


Imagen 68. Compactación del tejido. Tricromico de Goldner 100x

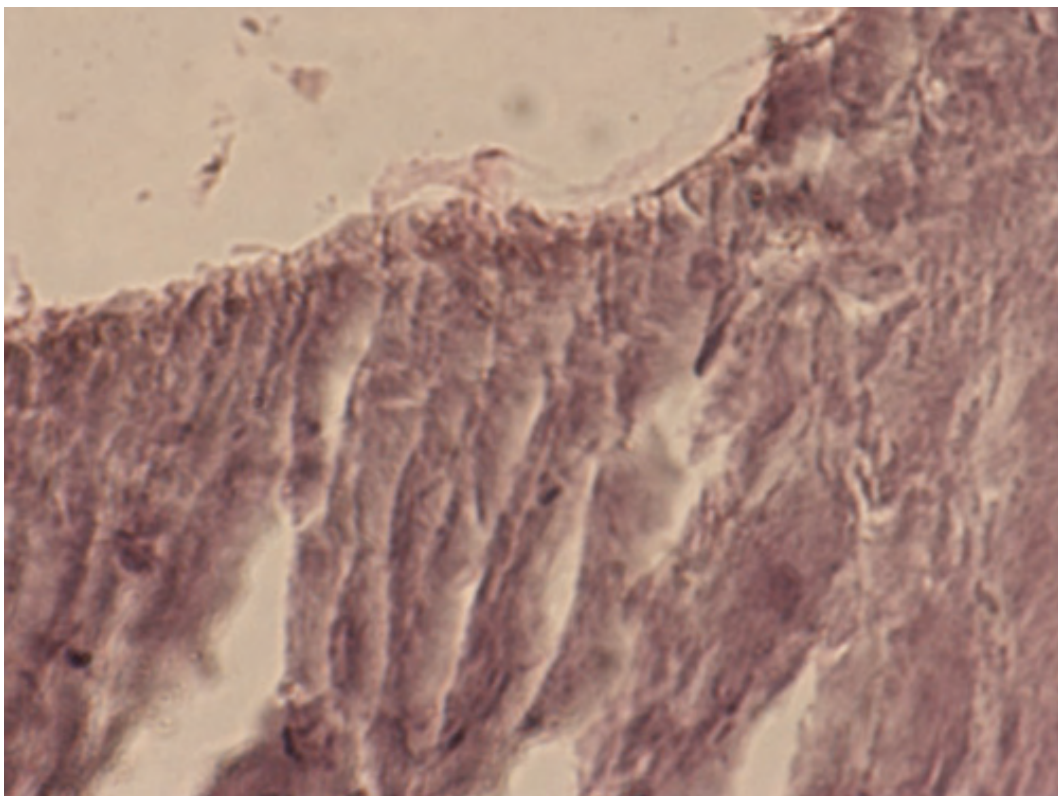
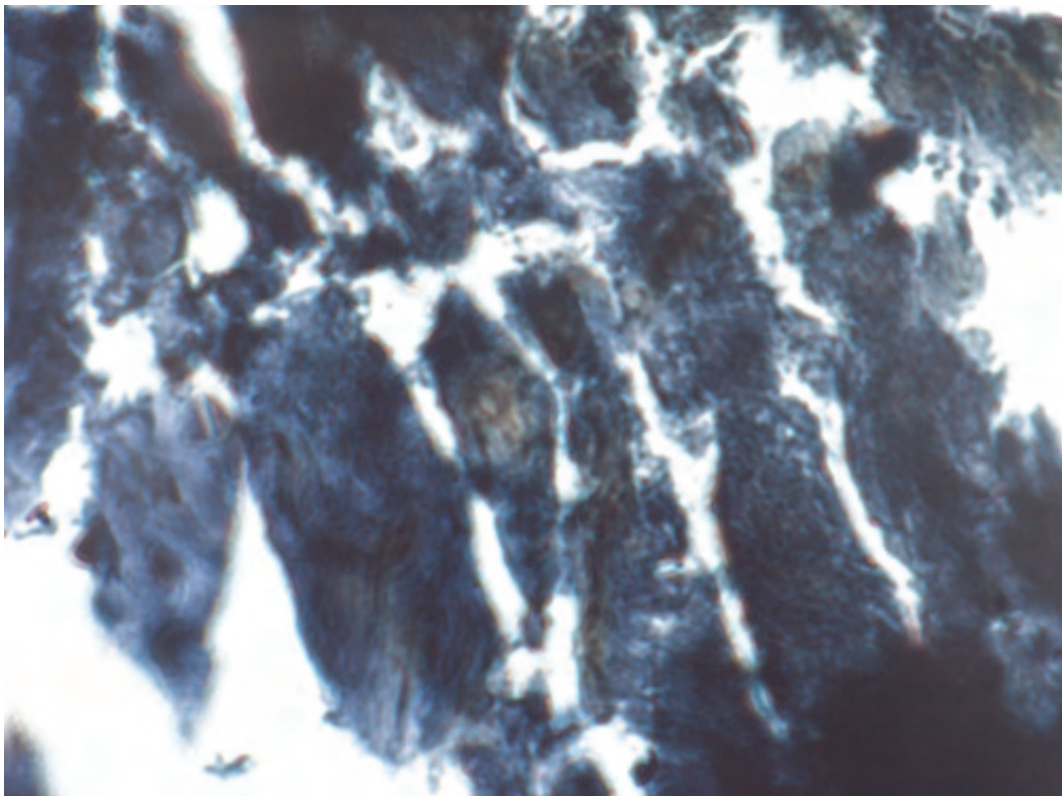
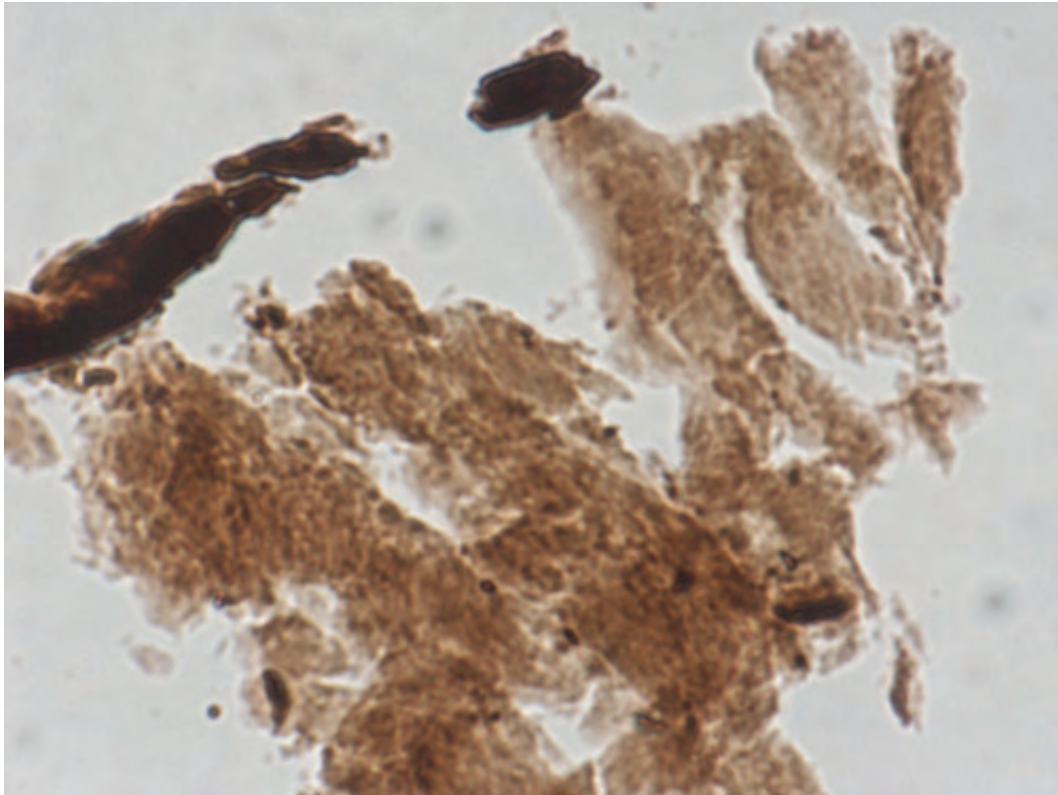


Imagen 69. Disposición en barra. Hematoxilina100x.

A 300°C Esta fase es muy característica y la diferencia radica en que la estructura comienza a fracturarse, la disposición acordonada desaparecen para dar lugar a una división y partición de las fibras (imágenes 70 y 71)

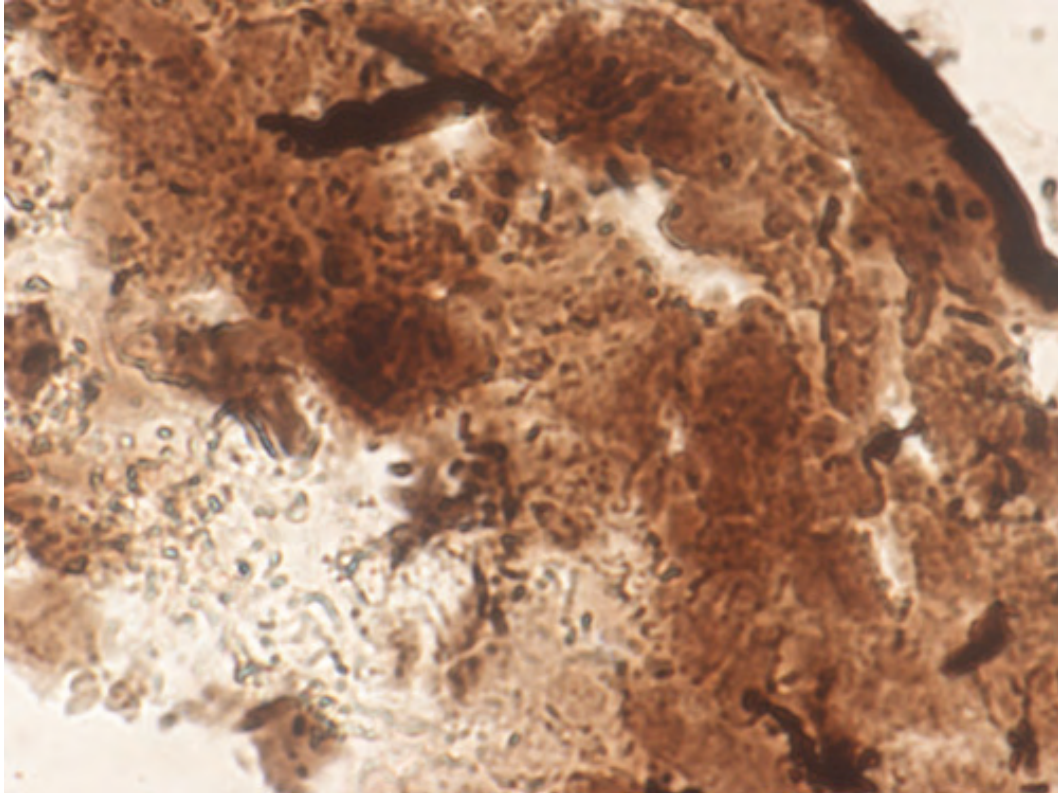


Imágen 70. Fractura de fibras. Azul de toluidina 100x

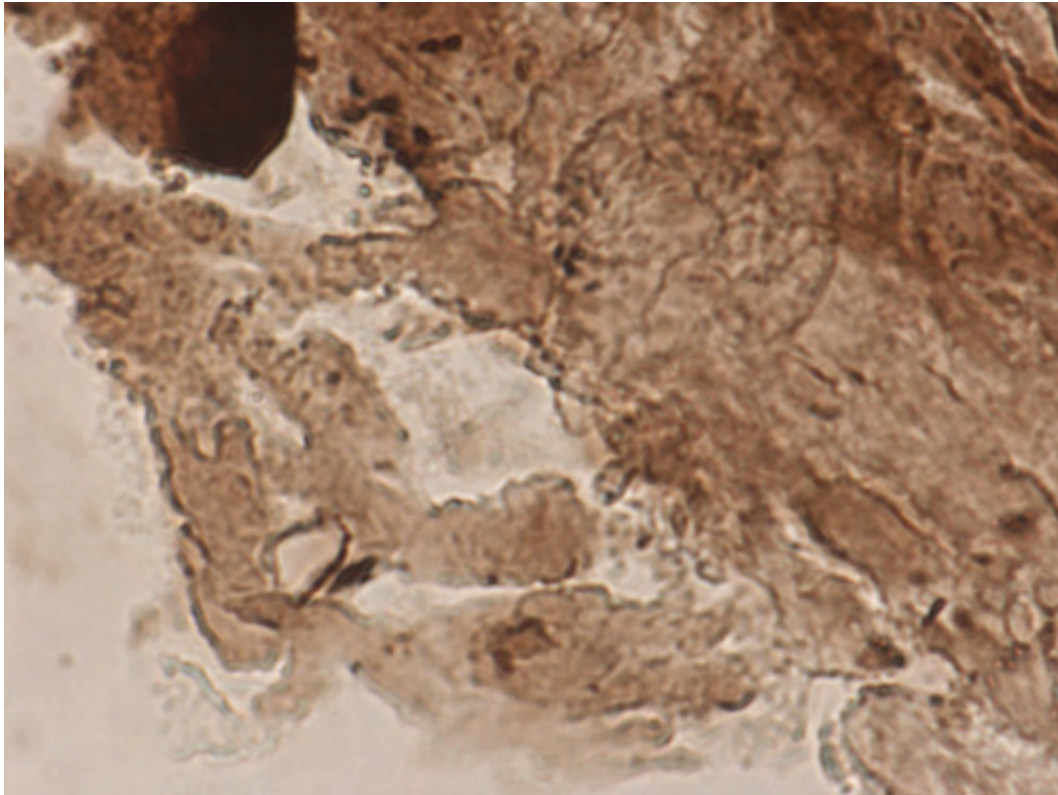


Imágen 71. Fractura de fibras. Hematoxilina 100x

A 400°C, las estructuras anteriores desaparecen por completo dando paso a una estructura con una disposición caótica donde va a dar comienzo un proceso de cristalización, se aprecia una deformación en general del tejido, las fibras se han compactado unas con otras dando lugar a una superficie irregular donde comienzan a apreciarse formaciones que mas tarde pasaran a ser estructuras cristalinas (Imágenes 72 y 73).

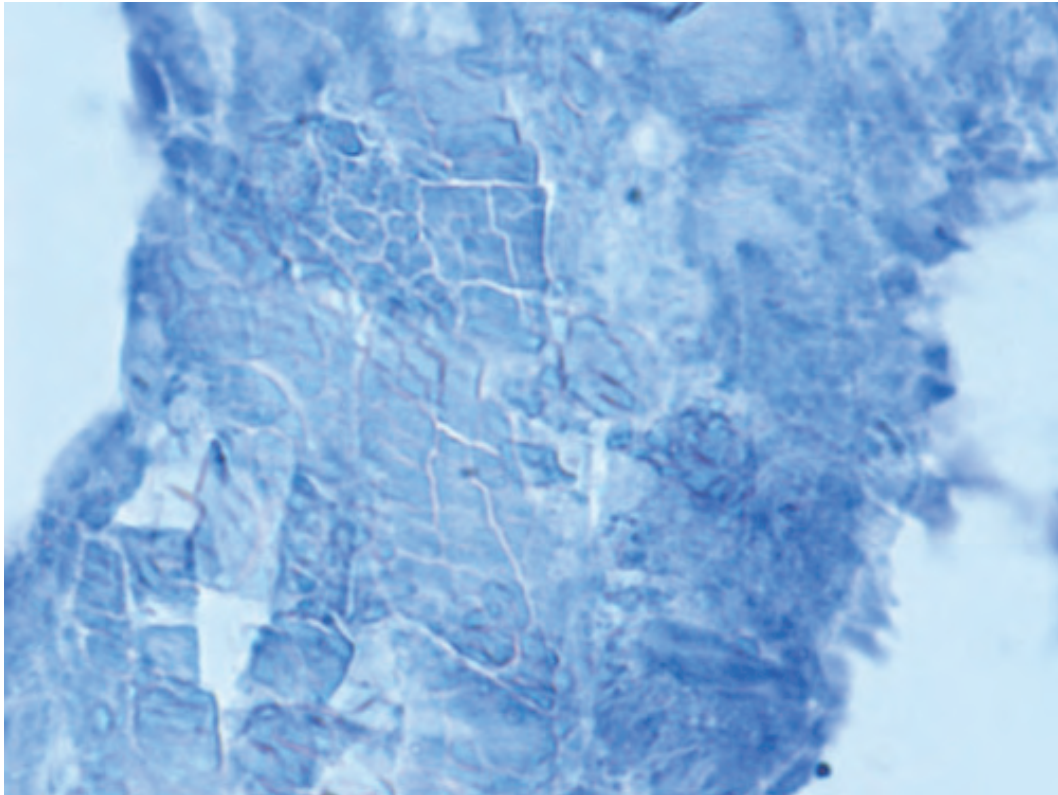


Imágen 72. Compactación de las fibras. Hematoxilina 100x

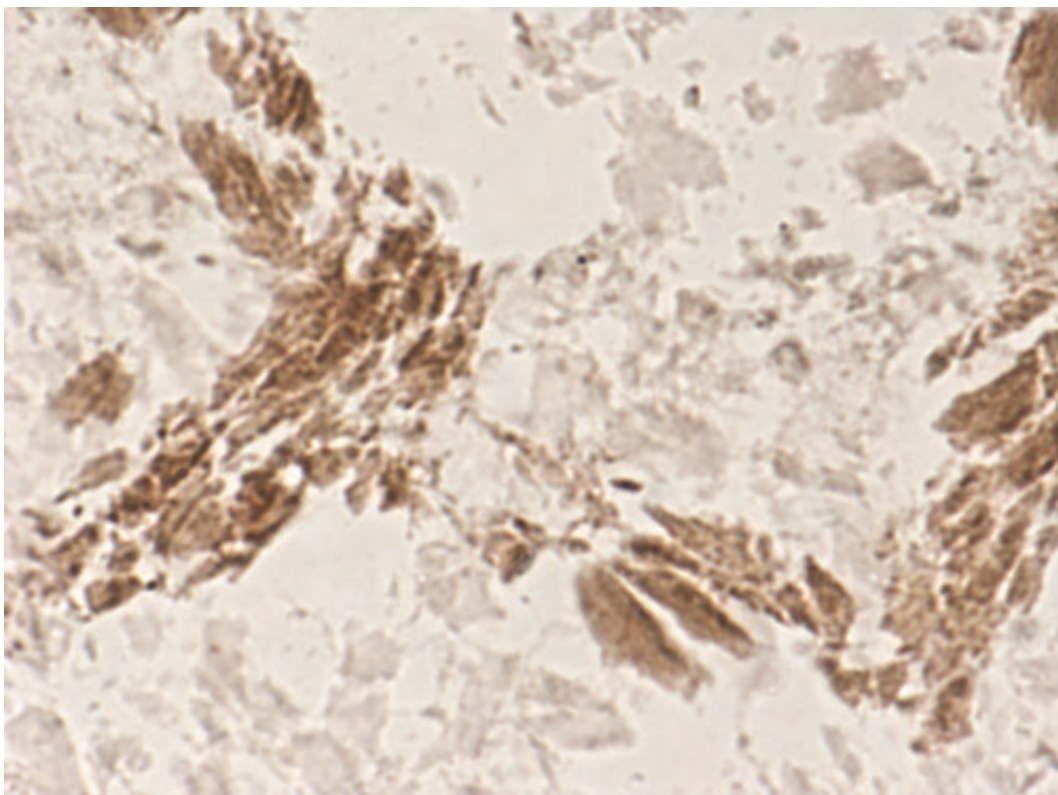


Imágen 73. Estructura caótica precristalina. Hematoxilina 100x

A 500°C comienza la fase de cristalización el tejido que anteriormente se tornaba caótico se vuelve cristalino, aparecen cristales en forma cúbica (Imagen 74), junto con la aparición en esta fase de polímeros cristalinos macromoleculares lineales (Imagen 75)



Imágen 74. Estructura cristalina. Azul de toluidina 100x



Imágen 75. Polímeros cristalinos. Azul de toluidina 100x

A 600°C desaparecen las formaciones cúbicas cristalinas y la matriz adquiere una estructura cristaloides irregular caracterizada por una superficie compacta de formas irregulares sin una distribución fija ni figuras geométricas (Imagen 76 y 77)

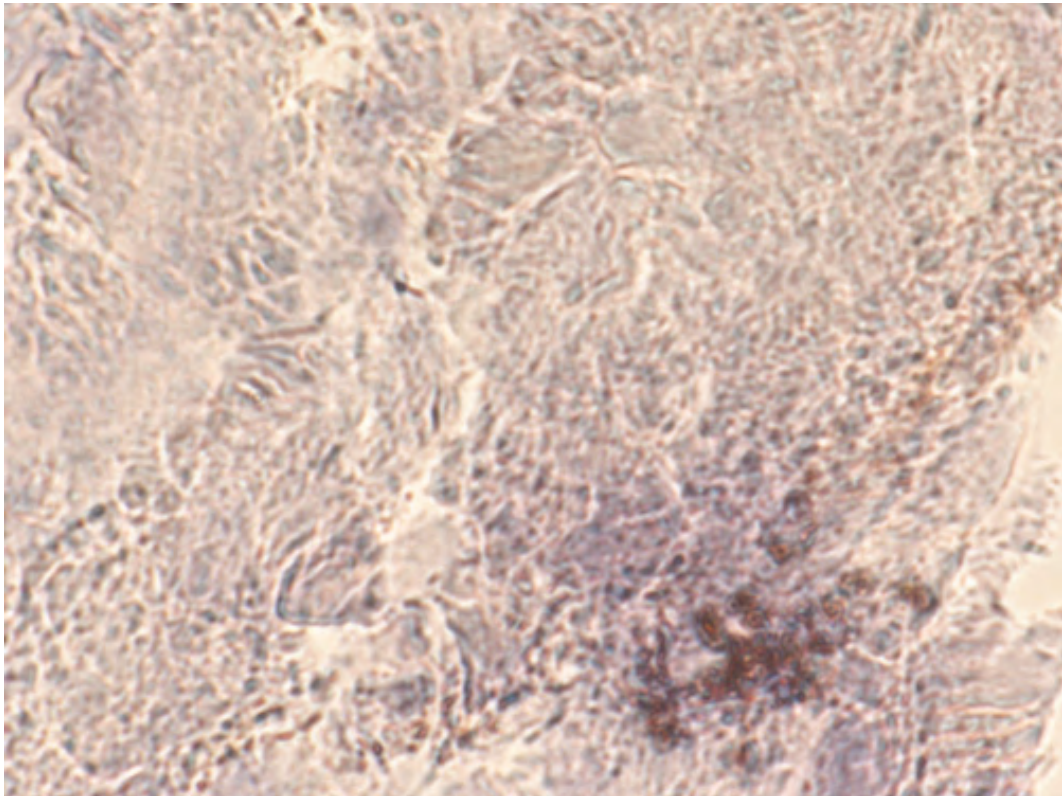


Imagen 76. Matriz cristalina compacta. Azul de toluidina 100x

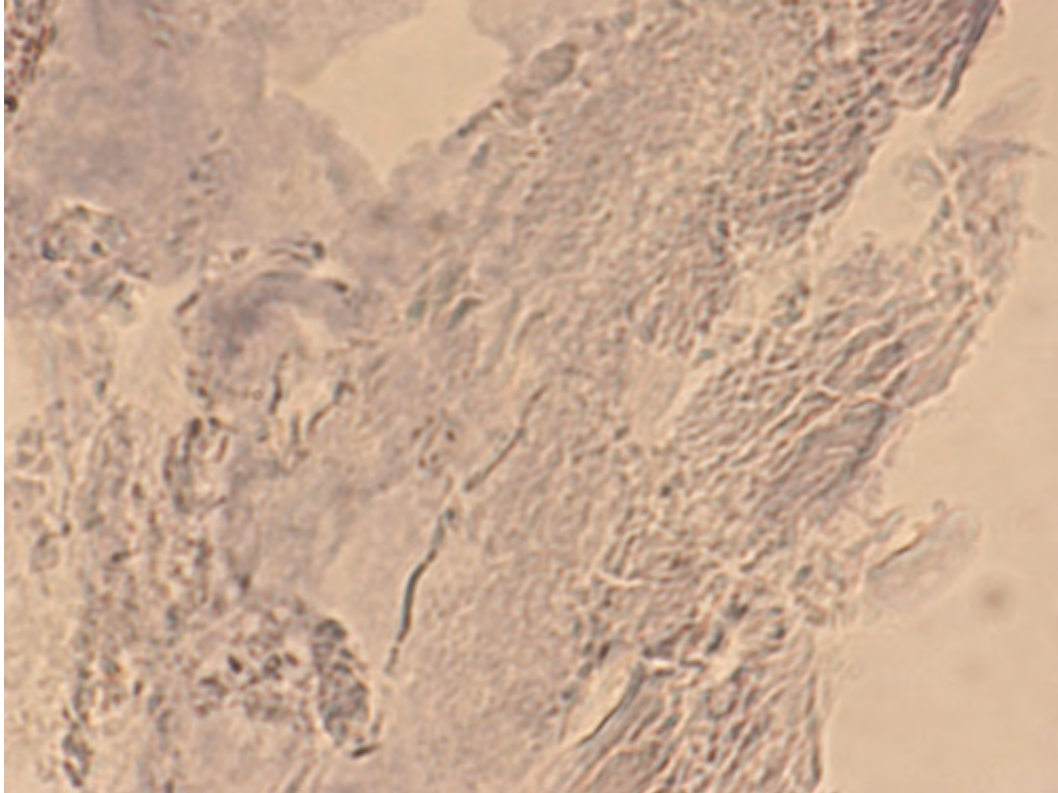


Imagen 77. Formaciones irregulares. Azul de toluidina 100x

Cuando el hueso es sometido a 700°C vuelven a aparecer formaciones cristalinas, esta vez son características las estructuras cristalinas de gran tamaño con predominio de las de forma redondeada (Imagen 78) con respecto a las de forma cubica (Imagen 79)

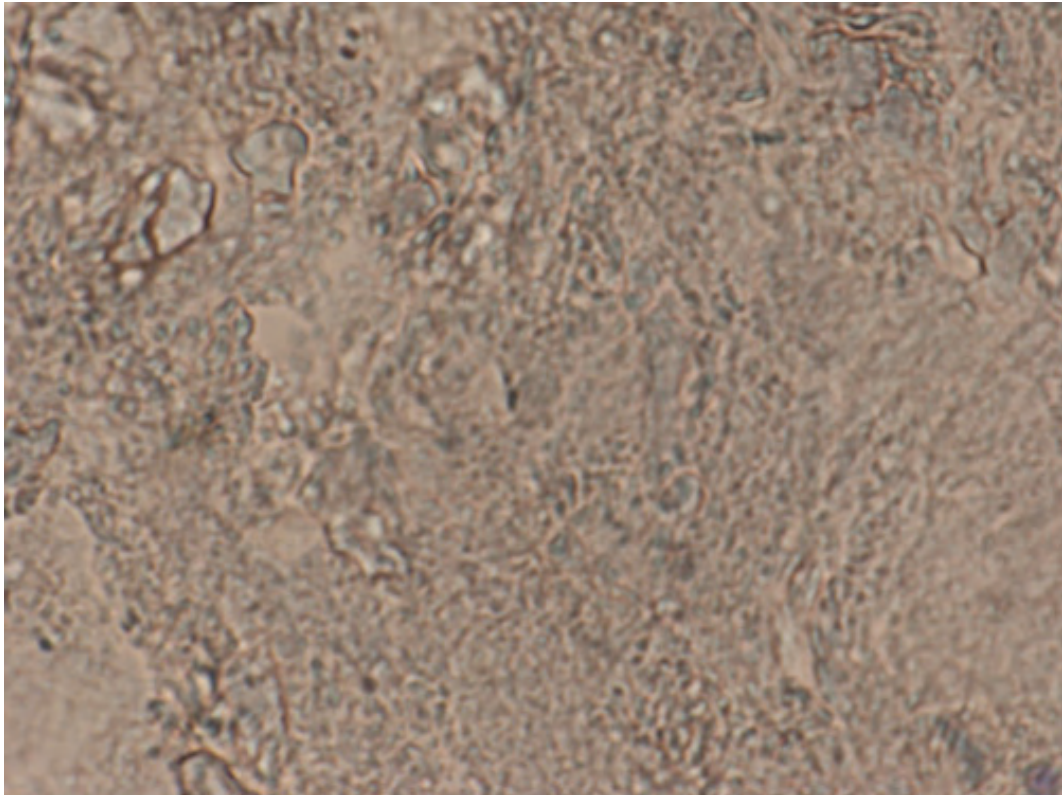


Imagen 78. Cristales redondeados. Toluidina 100x

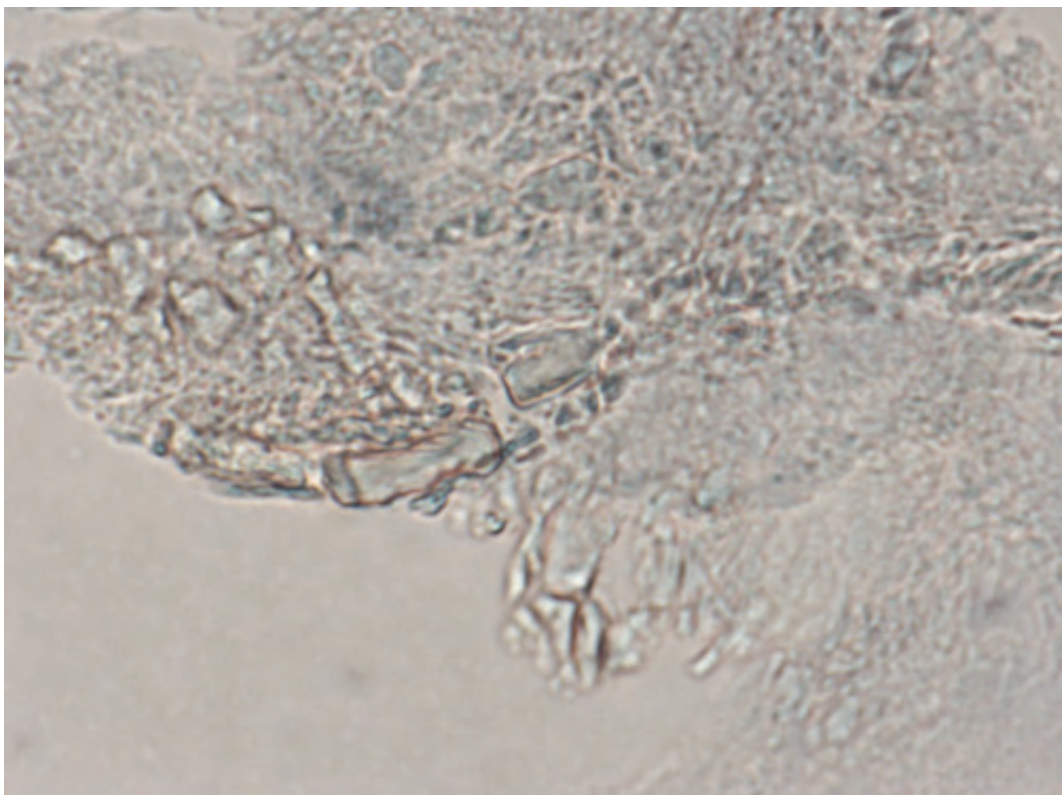


Imagen 79. Cristales cúbicos. Toluidina 100x

A 800°C los formaciones cristalinas que se habian empezado a formar en la etapa anterior adquieren un tamaño mas grande incluso empiezan a fundirse unas con otras (Imagen 80).

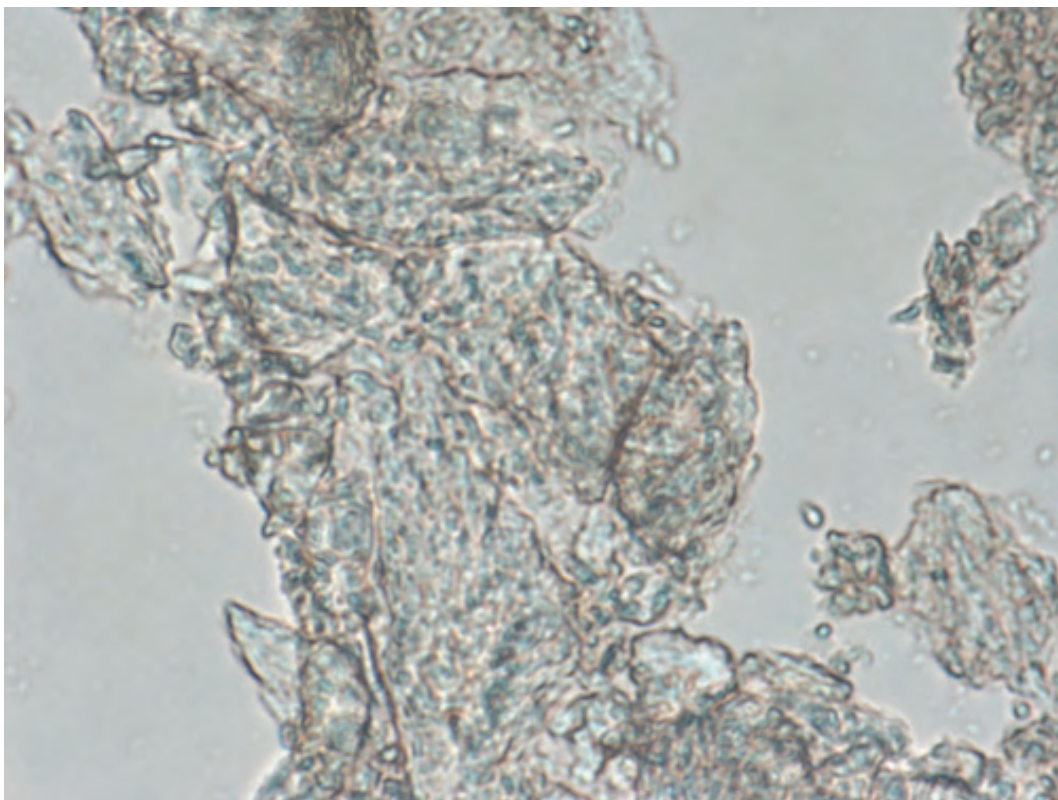


Imagen 80. Grandes formaciones cristalinas. Toluidina 100x.

A 900°C la estructura se compacta (Imagen 81), los grandes cristales de la fase anterior han dado paso a cristales mucho mas pequeños de forma redondeada (imagen 82).

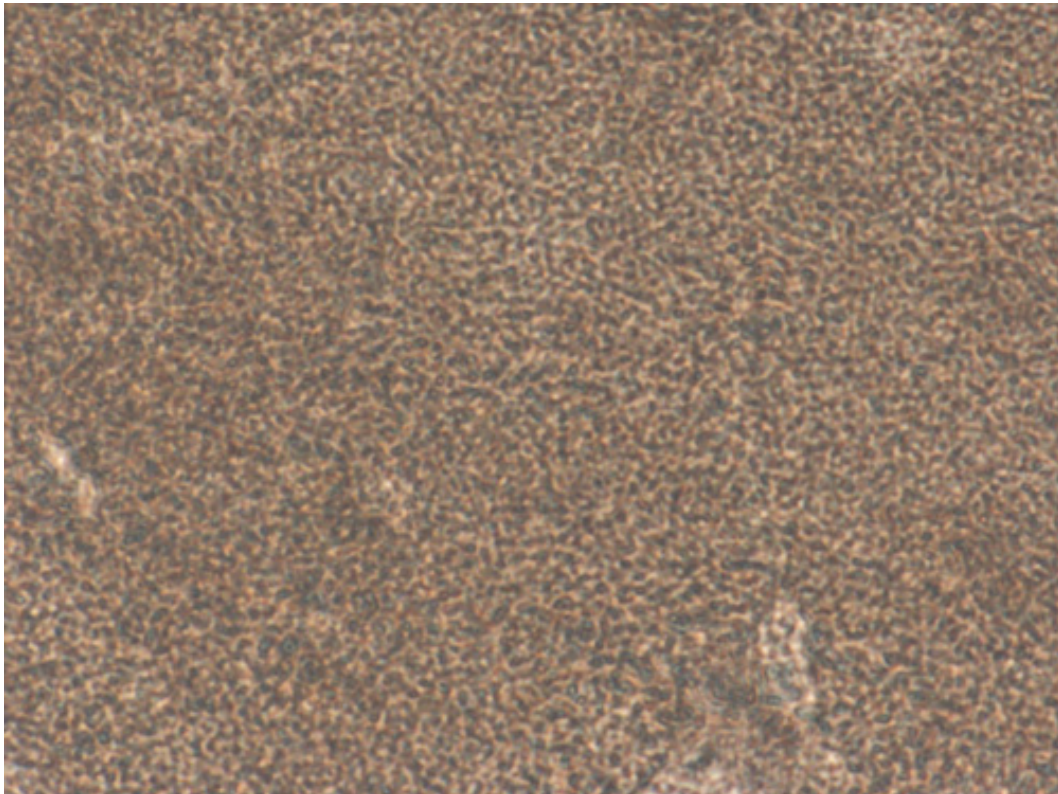


Imagen 81. Compactación de la matriz. Azul de toluidina 100x

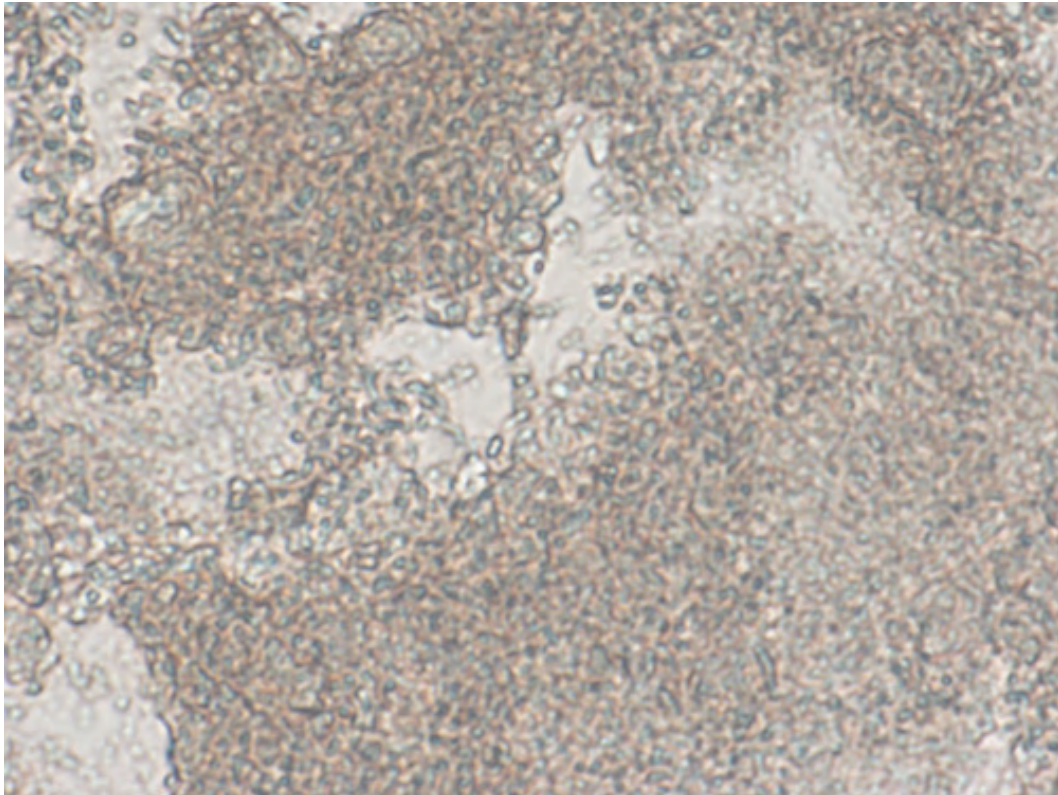


Imagen 82. Cristales de forma redondeada. Azul de toluidina 100x

A 1000°C los pequeños cristales en forma redondeada de la fase anterior desaparecen dando lugar a una superficie compacta practicamente puntillista formada por microcristales (Imagen 83).

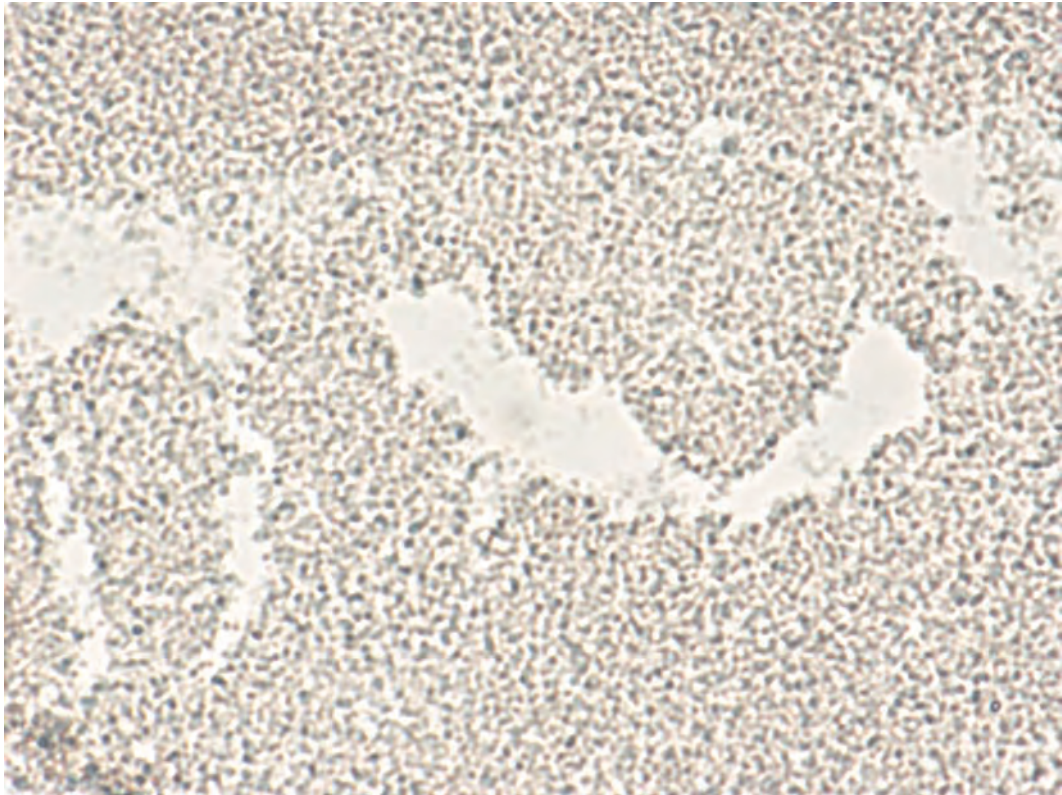


Imagen 83. Microcristales. Azul de toluidina.

A 1100°C los microcristales tienden a agruparse dejando la forma compacta anterior para formar figuras lineales de forma acordonada reticular, apareciendo grandes lagunas entre ellos (Imagen 84).

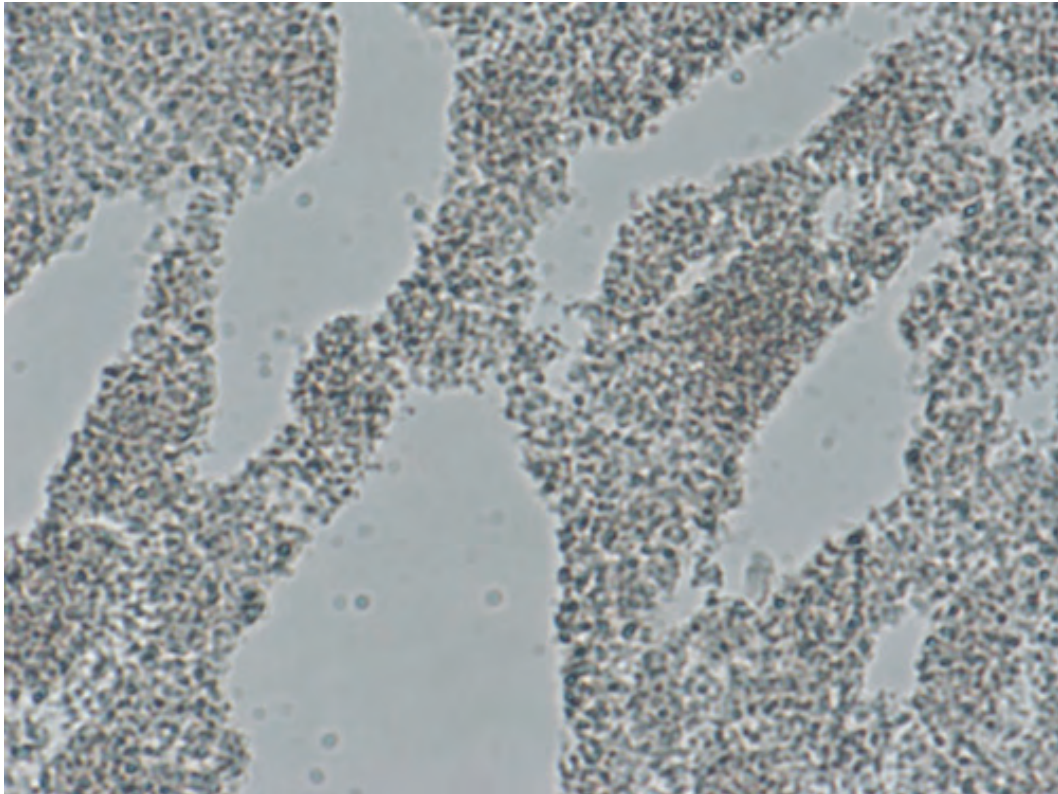


Imagen 84. Microcristales agrupados en forma acordonada. Azul de toluidina.

CAPITULO V

DISCUSION



CAPITULO V: DISCUSION

La biopsia ósea es sin duda la herramienta más potente y fiable para detectar las anormalidades estructurales del hueso. Es la prueba de oro para el conocimiento e interpretación de las lesiones histológicas óseas, por lo que habitualmente siempre se ha usado como método de estudio de las enfermedades óseas de tipo metabólico.

Generalmente se realiza en la cresta iliaca por resultar más fácilmente accesible, contiene hueso cortical y trabecular en la misma proporción que el resto del esqueleto además de tener un remodelado ágil, por lo que proporciona información cualitativa y cuantitativa de la estructura osea.

El empleo de criterios de selección para garantizar la normalidad de los datos es esencial. Han de excluirse las patologías ósea metabólicas que podrían alterar los resultados que se pretendían, en este sentido enfermedades como la osteogénesis imperfecta, caracterizada por diversos grados de fragilidad ósea alterarían los resultados debido a la disminución del colágeno tipo I, la osteomalacia se desarrolla por una inhibición en el proceso demineralización, observándose en el hueso grandes lagunas osteoides y un aumento de la superficie trabecular cubierta de osteoide con descenso en la tasa de formación ósea.

El hiperparatiroidismo secundario puede alterar la composición y arquitectura ósea, osteoporosis donde se produce aumento de la reabsorción ósea sin un aumento compensatorio de la formación ósea, produce disminución de la masa ósea y una alteración en la microarquitectura del hueso, enfermedad de Paget donde se produce un aumento del recambio óseo junto a una formación defectuosa, formándose hueso plexiforme, con una disposición trabecular anómala y un engrosamiento de la cortical, con el consiguiente aumento de fragilidad.

La elección de la cresta ilíaca como área representativa de los cambios que se producen en el esqueleto como consecuencia de la temperatura no ha sido arbitraria, durante el proceso de cremación, las llamas afectan a todos los músculos en un cuerpo expuesto, provocando el calentamiento y la disminución de las fibras musculares por lo que la postura final como resultado de las contracciones de músculos y ligamentos se conoce como postura pugilística (Knight B 1996) y comienza aproximadamente a los 10 minutos a temperaturas de 800°C (Bohnert 1998).

De esta manera, la contracción muscular se traducirá en una mayor exposición de algunas áreas anatómicas y protección de otras, no sólo en

función de la profundidad del tejido, sino también en función de cómo queden posicionadas esas áreas.

La cresta iliaca contiene en su cara dorsal tiene menor cantidad de tejidos blandos, que en su cara ventral por lo que esta mas expuesta (Imagen 85), sufriendo la acción directa del fuego (Correira PM, 2002).

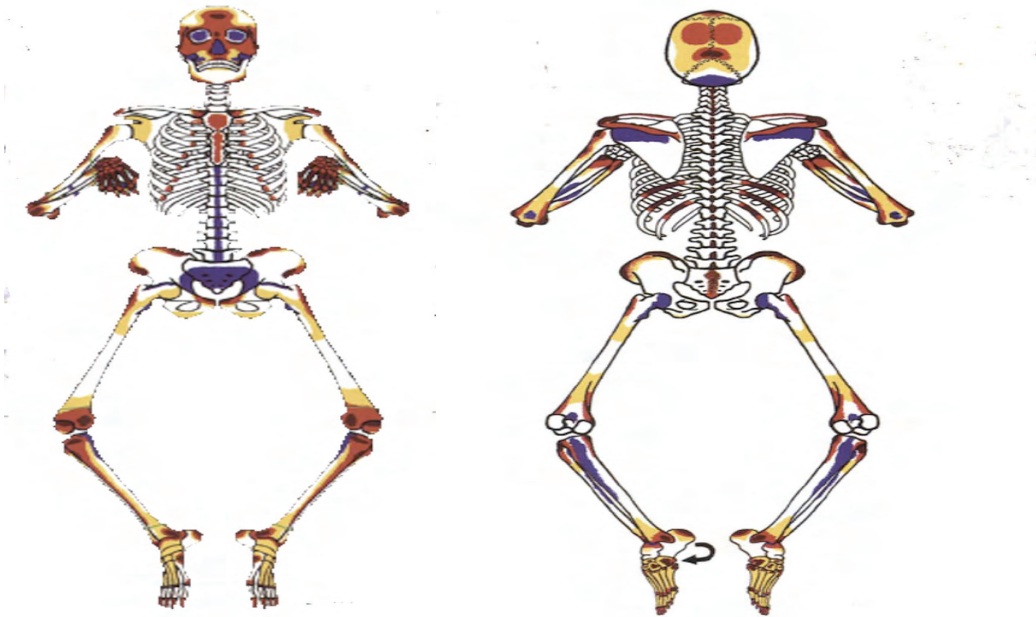


Imagen 85. Exposición al fuego de áreas anatómicas. En rojo las zonas mes expuestas

En cuanto a la técnica de inclusión de muestras histológicas se ha elegido el procesado sin descalcificar frente a la inclusión en parafina.

La técnica de procesado de las muestras sin decalcificar permite la conservación y diferenciación entre el hueso calcificado y no calcificado de cara a que sea posible observar y medir las alteraciones en el proceso de cremación de hueso a diferentes temperaturas.

Así mismo, permite la óptima conservación de la arquitectura ósea y de las células en general, evidenciando los cambios que se producen a nivel estructural evitando artefactos que pudieran llevar a error en las fases de análisis.

El obtener muestras sin decalcificar permite además obtener cortes histológicos más finos, que con la inclusión en parafina, donde las burbujas en la resina provocada por la reacción de calor, dañan los componentes de los tejidos aumentando considerablemente la dificultad para obtener secciones delgadas de buena calidad, en este aspecto el metacrilato además permite una polimerización lenta, sin desprender calor, y su dureza es parecida a la del hueso.

La evaluación histológica del hueso se ha visto limitada durante años por las dificultades técnicas, de tal manera que antes de 1960 únicamente se realizaban técnicas de decalcificación que permitían obtener un tejido lo suficientemente blando para incluirlo en parafina y procesarlo en microtomo, sin embargo la aplicación de estas técnicas al tejido calcificado presenta una serie de inconvenientes (Baron 1993):

- No se puede distinguir entre el hueso mineralizado y el no mineralizado y por lo tanto no es posible cuantificar el osteoide, o diferenciar el hueso inmaduro del maduro de manera precisa.

- En la mayoría de los casos se producen fenómenos de retracción de la interfase hueso mineralizado-médula ósea que dificultan la evaluación de las células que intervienen en el remodelado y por tanto la cuantificación histomorfométrica.

- Se imposibilita el estudio de la dinámica ósea mediante marcaje con fluorocromos, ya que distorsiona el depósito de calcio en la matriz amorfa.

En cuanto al color obtenido en el hueso como consecuencia de la cremación, los resultados muestran que la temperatura de la cremación que tienen efectos muy significativos en el color del hueso coincidiendo con varios autores.

A temperaturas inferiores a 200°C todas las muestras mostraron un oscurecimiento gradual de su color a marrón oscuro, esta coloración marrón se asocia con la hemoglobina (Gejvall 1969; Lisowski 1968).

Es evidente que aun a estas temperaturas los componentes orgánicos del hueso no han sido totalmente eliminados. De hecho el perióstio esta todavía presente, y como puede observarse en las imágenes 8 a 21 durante los procesos de 100 a 200°C, aun existen células óseas, restos de tejido muscular y abundante material orgánico.

A 300°C y 400°C hubo un cambio notable en el color de todas las muestras de marrón a negro como consecuencia de la carbonización de los componentes orgánicos que tiene lugar a estas temperaturas, (Herrmann 1970), perióstio, células y tejido muscular han sido consumidos por el fuego.

El resultado de la gama de grises de los 500 a 600°C se debe al proceso de pirólisis de los componentes orgánicos del hueso (Dokladal 1969, 1970; Shipman 1984), en este aspecto Holden et al. (1995) encontraron que cuando la temperatura llega a 600 ° C, la eliminación de las fibras de colágeno, las proteínas y las grasas en el tejido óseo es completa. Además el fosfato tricálcico se convierte en hidroxapatita.

El color blanco representa la última etapa de calcinación donde la textura del hueso representa una pérdida completa de la porción orgánica y la fusión de las sales del hueso debido a la recristalización extrema del hueso.

Es importante señalar que el color en los huesos cremados no es un indicador definitivo de la temperatura a la que fueron sometidos, en este estudio se ha obtenido una coloraciones de muestras sometidas a temperaturas controladas, pero cuando se produce el hallazgo de un cuerpo sometido a la acción del fuego, pueden encontrarse en el esqueleto varios colores en función del tiempo del fuego, el oxígeno disponible y las zonas del cuerpo expuestas como se puede apreciar en la imagen 85.

Los cambios que se producen a nivel estructural (cortical y trabecular) son directamente proporcionales a la temperatura y a los cambios que se van produciendo en la matriz ósea:

De 100 a 200°C el hueso cortical sufre un proceso de deformación y a los 300°C se empieza fracturar a partir de los canales de Havers, de 400°C a 600 se vuelve patenta la aglutinación del tejido cortical en formaciones cristalinas y de los 700°C a los 800 la estructura es cristalina pero es mas compacta. De 900 a 1100 la estructura es microgranulada y cristalina con total perdida de estructura ósea.

De momento esto nos deja una clasificación de 4 estadios perfectamente definidos en la cortical del hueso.

El esqueleto humano está compuesto de aproximadamente 20% de hueso trabecular y el 80% de hueso cortical, pero el hueso trabecular tiene un nivel superior a la remodelación del hueso cortical y a su vez es donde se producen los cambios mas espectaculares y llamativos con el proceso de restructuración ósea como consecuencia de la temperatura.

En este aspecto según los resultados obtenidos cuando el hueso trabecular es sometido a temperaturas de 100 a 200 grados la característica fundamental es la aparición de fracturas longitudinales, como se puede apreciar en la imagen 9 y 10 en cambio si se pueden apreciar las formaciones cristalinas que comienzan a formarse a partir de los 200 grados (Imagen 19).

A partir de los 300°C la materia orgánica desaparece, las fracturas se hacen mas patentes y el tejido conjuntivo del hueso tiende a deformarse (Imagen 22), así mismo se aprecian como las formaciones cristalinas aumentan de tamaño a esta temperatura (Imagen 23) y lo mismo ocurre a 400 Imagen (26).

Por otro lado a partir de los 500°C aparecen polímeros cristalinos macromoleculares lineales de colágeno y matriz extracelular (imagen 31 y 32 y 35) que muestran cambios metacromáticos indicando la existencia de sulfo y/o carboximucinas. Estos cristales se convierten por la acción del calor en fases de cristales líquidos (o isotropicos) que constituyen el humo (primer principio de la termodinámica).

De los 600 a los 800 (imágenes 36,44,47), sigue el aumento de formaciones cristalinas, tanto en tamaño como en numero, llegando al máximo a los 800 grados, así mismo el aspecto del hueso cambia de un patrón de laminar y una textura homogénea a una textura más cristalina hecho reportado por otros investigadores (Fratzl 1996; Guizzardi 1995; Thompson 2002)..

A partir de los 900 grados la estructura es totalmente cristalina, la estructura ósea desaparece (imágenes 52,54,56,58,61), esto se explica fundamentalmente por los fenómenos de fusión y recristalización de los compuestos derivados de la hidrólisis térmica de la hidroxiapatita (proceso de sinterización), que terminan en la retracción, fisuración, formación de vesículas en la matriz ósea, estallidos de conductos de Havers, y finamente formación de aglomerados.

Autores como Shipman 1984, Bonucci y Graziani 1975, McCutcheon 1992, Nicholson 1993, establecieron una clasificación del tejido óseo basado en 5 estadios, observando , mediante microscopía electronica de barrido, cambios en la morfología de las superficies óseas: carbonización, cristalización y recristalización final de la estructura cristalina, y los mismos estadios mediante contracción con microscopía de luz estándar

del hueso fueron establecidos por otros autores como: Brain 1993, Herrmann 1977, Nicholson 1993:

Estadio 1: (20 a 185°C): la textura de la superficie del hueso aparece ondulada pero intacta.

Estadio 2: (185 a 285°C): la superficie se torno cada vez más irregular, con pequeños poros y presencia de fisuras, pero la superficie sigue intacta.

Estadio 3: (285 a 440°C): la superficie del hueso se vuelve cristalina y suave, moderada aparición de grietas.

Estadio 4:(440 a 800°C): la superficie del hueso se torno en pequeñas partículas;

Estadio 5 (800 a 940°C), las partículas se funden y forman grandes estructuras poligonales.

Muchos de estos autores realizaron sus experimentos en restos animales, nos obstante aunque la clasificación se amplía a 5 estadios los parámetros observados son pobres, ya que según los resultados obtenidos en este trabajo de investigación muestran que son medibles y reorganizables muchos más datos, lo que permite clasificar los cambios morfológicos en cuatro estadios (Tabla 3):

Estadio/Temperaturas	Cambios Histológicos
1. De 100°C a 300°C	Fracturas longitudinales, presencia de células óseas y tejido orgánico. Primeras formaciones cristalinas poliédricas.
2. 400°C a 600°C	Presencia de formaciones cristalinas cúbicas. Polímeros cristalinos.
3. De 700°C a 800°C	La estructura del hueso se torna cristalina y pierda la homogeneidad.
4. Mayor de 900°C	Formación aglomerada con pérdida de estructura ósea

Tabla 3: Clasificación por estadios de los cambios morfológicos.

La matriz ósea esta compuesta por un componente inorgánico, fosfato cálcico en forma de cristales de hidroxiapatita y por un componente orgánico, fibras de colágeno.

Está demostrado que existe una íntima relación entre lo orgánico (proteico) y lo inorgánico (minerales) en las las fases que componen la matriz ósea, por lo tanto, la incineración de los huesos afecta tanto a la matriz inorgánica como a la matriz orgánica, aunque en este último caso lo hace de manera diferente (Landis 1996).

Como se puede observar a 100°C el primer cambio significativo es la separación en forma acordonada del colágeno, esto es debido a una desnaturalización del mismo (Paschalis 2001), cuya primera consecuencia es un enorme acortamiento de las fibras (Imagen 66 y 67) debido a que la estructura de triple hélice va adquiriendo mayor movilidad (Fratzl 2004).

La temperatura a la que se desnaturaliza el colágeno depende del contenido de prolina e hidroxiprolina: A mayor contenido, mayor es la temperatura necesaria. En este sentido, existe una gran diferencia en contenido de prolina y en la temperatura de desnaturalización entre el colágeno (Nuzzo 2002).

A los 200°C (Imágenes 68 y 69), la disposición de las fibras de colágeno aunque acordonada se vuelve mas rígido y compacto, debido a que la triple hélice que se encuentra en su estructura, pierde su estabilidad térmica al eliminar sus interacciones con con la hidroxiapatita que la rodea (Roschger 2003)

A 300°C la disposición de las fibras de colágeno se rompe y se aprecia que el color va tornándose mas oscuro a medida que la hidroxiapatita interactua menos con con la matriz del colágeno (imagen 70 y 71), por lo que se comprueba que la hidroxiapatita estabiliza el colágeno evitando la degradación térmica del mismo (Ruffoni 2007), esta degradación comienza a los 400°C donde el colágeno se ha compactado dando lugar a una superficie irregular (Imágenes 72 y 73).

Por otro lado a partir de los 500°C aparecen polímeros cristalinos macromoleculares lineales de colágeno (imagen 74 y 75), esta fase es debida a la disociación entre la hidroxiapatita que comienza su cristalinización y la destrucción térmica del colágeno, ya que a altas temperaturas , los polímeros se vuelven líquidos muy viscosos (Gupta 2006).

La hidroxiapatita ósea $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, aunque posee una estructura cristalográfica bien definida posee mala cristalinidad, los fenómenos de fusión y recristalización de la hidrólisis térmica de la hidroxiapatita y sus derivados, se conocen como sinterización y son los responsables de los cambios histológicos en el tejido óseo.

La principal característica de la hidroxiapatita de calcio de gran importancia para los estudios de la cremación es la presencia de agua en la periferia del cristal, lo que se conoce como capa de hidratación, o capa de agua absorbida. Dentro de esta capa de hidratación hay iones de fosfato de calcio suspendidas en una solución diluida de KCl.

El enlace del agua y otros iones polarizables es el resultado de la alta carga superficial en los cristales y es el medio por el cual se neutraliza esta carga.

Por debajo y más hacia el interior, en el cristal, se ubica la denominada capa de iones y compuestos absorbidos, en la que el catión Ca^{2+} puede ser sustituido por Na^+ , Mg^{2+} , e H_3O^+ , y el anión OH^- por F^- , Cl^- , etc.

La capa de hidratación ocupa el doble del volumen de los cristales de hidroxiapatita, y es en ella donde los iones son atraídos a la superficie del cristal de hidroxiapatita, debido a que estos iones se encuentran en constante movimiento de la capa de hidratación y el medio que les rodea .

La estructura de la hidroxiapatita promueve el intercambio de iones a diferentes ritmos.

El más rápido de estos intercambios es entre la capa de hidratación y la líquido extracelular.

El siguiente es el intercambio entre los fosfatos en la capa de hidratación y los iones fosfato en la superficie del cristal.

La tasa mas lenta de intercambio se sitúa entre los iones fosfato en la superficie del cristal y los iones en el interior del cristal.

Por lo tanto, las cuatro capas que componen la región de los cristales de hidroxiapatita incluyen el interior de cristal, la superficie del cristal, la capa de hidratación, y el líquido extracelular.

Los iones polarizables tienden a concentrarse en la capa de hidratación en lo que se conoce como capa de iones consolidados. Los iones de esta capa son iones hidratados, tales como el calcio, carbonato, citrato, magnesio y estroncio. Sin embargo, estos iones están en constante intercambio con los iones del líquido extracelular.

La red cristalina es capaz de albergar un ion extraño de tamaño similar al ion que va a reemplazar, ion que es un componente normal de hidroxiapatita, por lo tanto, es posible que otros iones de calcio, fosfato o grupos hidróxilo formen parte de la red cristalina de apatita biológica. Posteriormente, la composición química de apatita biológica variarán de acuerdo con los iones presentes en el líquido en el que se baña, dando como resultado cambios en sus propiedades, morfología, solubilidad, etc.

Conforme aumenta la temperatura la hidroxiapatita presenta mayor cristalinidad, mayor tamaño de partícula (Gross 2002), mayor contenido de Ca^{2+} , mayor presencia de grupos PO_4 , menor presencia de grupos HPO_4 , menor presencia de grupos OH^- , mayores distancias y ángulos de enlace de los grupos PO_4 . Es decir a medida que aumenta la temperatura la hidroxiapatita se adapta a las nuevas condiciones modificando su mala cristalinidad y con ello su solubilidad, debido a la corrección

estequiométrica de su formula $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, para formar cristales mas estables y de mayor tamaño.

Según los resultados y las imágenes obtenidas a 100x la transformación mas importante se produce a partir de los 600°C donde la cristalinidad del mineral óseo se incrementa produciendose una estructura vítrea (imágenes 76 y 77), el cambio consiste en la conversión del fosfato tricálcico a fosfato tricálcico tipo B, donde la estructura se torna vítrea y desorganizada (Melas 1984), esta estructura probablemente sea la que provoque (tal y como indicaba Herrmann 1973), que los restos óseos a los 600°C pierdan paulatinamente consistencia con el incremento de la temperatura de combustión.

Sin embargo, esta tendencia se invierte de los 700°C a 800°C donde las estructuras cristalinas se tornan de gran tamaño con predominio de las de formas redondeadas (Imagen 78) con respecto a las de formas cúbicas (Imagen 79 y 80), esto se debe a la recristalización y conversión del fosfato cálcico en fosfato tricálcico, provocando una mayor dureza y resistencia mecánica (Perinet 1988).

A 900°C la estructura se compacta (Imagen 81), los grandes cristales de la fase anterior han dado paso a cristales mucho mas pequeños de forma redondeada (imagen 82).

A una temperatura superior a los 900 °C el hueso presenta una estructura atípica formada por cristales poligonales, redondeados, de estructura compacta (Imagen 81 y 82) de tamaño que varía aproximadamente entre 0,2μ y 0,3μ. (Bonucci/Graziani 1975).

A partir de los 1000 -1100°C, Grevin (1990) constata la existencia de una descomposición parcial de la hidroxiapatita en alfa fosfato tricálcico y a beta fosfato tricálcico y por ultimo a óxido de calcio lo que indica que la fase original de la apatita es deficiente en calcio con contenidos de carbonato (Holden 1995).

Todo esto se se traduce en la perdida casi total de carbonatos y la fusion de los cristales formando superficies lisas y uniformemente fusionadas (Imágenes 83 y 84).

Por tanto, podemos clasificar también en cuatro estadios perfectamente diferenciados los procesos que como consecuencia del calor tienen lugar en la matriz ósea (Tabla 4).

Estadio/Temperaturas	Cambios Histológicos
1 : De 100°C a 300°C	Deformación del colágeno.
2: De 400°C a 600°C	Formaciones cristalinas vítreas. Polímeros cristalinos.
3: De 700°C a 800°C	Presencia de cristales redondeados y cubicos, pérdida de la homogeneidad.
4: Mayor de 900°C	Superficies granulosas

Tabla 4: Clasificación por estadios de los cambios en la matriz ósea.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES



CAPITULO VI: CONCLUSIONES.

1º Las células óseas están presentes y son distinguibles, entre 100 y 200°C, así como unidades estructurales y frentes de mineralización, mientras que a temperaturas superiores desaparecen.

2º. El hueso trabecular y cortical comienza a fracturarse desde que toma contacto con la fuente de calor. Con el aumento de temperatura y los sucesivos cambios de cristalización y recristalización aumenta en porosidad y la estructura ósea queda irreconocible.

3º. La matriz ósea, sufre dos procesos diferenciados según temperatura: entre 100°C y 500°C se produce la polimerización del colágeno y entre 600 y 1100°C los procesos de cristalinización de la hidroxiapatita.

4. Hemos elaborado dos escalas con cuatro estadios que permiten medir los cambios que se producen a nivel histológico y que determinan la temperatura a la que un cuerpo ha sido sometido, según los cambios que se producen en la matriz ósea, y los cambios morfológicos que tienen lugar en el hueso trabecular y hueso cortical.

BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

A

Aeillo L, Christopher D. (1990). An Introduction to Human Evolutionary Anatomy. London: Academic Press pp. 112-117.

Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF. (2001). Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis* 37: 1267-1276.

Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, Erceg L. (2001). DNA typing from skeletal remains : evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bones and teeth samples. *Croatian Medical Journal* 42:260–266..

B

Baby R.S. (1954). Hopewell cremation practices. The Ohio Historical Society Papers in Archaeology 1, pp. 1-7.

Banks LM, Lees B, MacSweeney J.E. (1994). Effect of degenerative spinal and aortic calcification on bone density measurements in postmenopausal women: links between osteoporosis and cardiovascular disease? *Eur J Clin Invest* 24: 813–817.

Baron R, Vignery A, Neff L, Silverglate A, Santa María A. (1993). Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. En: Becker RR, eds. Bone histomorphometry: techniques and interpretation. CRC Press; p. 13-37.

Bass W.M. Jantz R.J. (2004). Cremation weights in East Tennessee. *Journal of Forensic Sciences* 49(5), 1-4.

Binford L.R. (1963). An analysis of cremations from three Michigan sites. *Wisconsin Archaeologist* 44(2), 98-110.

Bohnert M, Rost T, Pollak S. (1998). The degree of destruction of human bodies in relation to the duration of fire. *Forensic Sci Int* 95:11–21.

Bonucci E, Graziani G. (1975). Comparative Thermogravimetric, X-ray and Electron Microscope Investigations of Burnt Bone from Recent, Ancient and Prehistoric Age. *Atti Memorie Accademia Nazinale die Lincei Scienze, Fisiche, Matematiche Naturali, Ser. 8 Sec. 2A (Roma)* 59: 517-534

Brain C.K. (1993). The Occurrence of Burnt Bones at Swartkrans and their Implications for the Control of Fire by Early Hominids. In: Brain, C. K., (Ed., *Swartkrans: A Cave's Chronicle of Early Man*. Transvaal Museum Monograph, Pretoria, pp. 229-242.

Buikstra J.E, Goldstein L. (1973). *The Perrins Lodge Crematory* . Illinois State Museum Reports of Investigation 28, Illinois Valley Archaeological Program Research Papers, 8, Illinois State Museum, Springfield, IL.

Buikstra JE, Swegle M. (1989). Bone Modification Due to Burning: Experimental Evidence. In R Bonnischen and MH Sorg (eds.): Bone modification. Orono: Peopling of the Americas Publications, Center for the Study of the First Americans, Institute for Quaternary Studies, University of Maine, pp. 247-258.

C

Carter D.H, Barnes J.M, Aaron JE. (1989). Histomorphometry of Fresh Frozen Iliac Crest Bone Biopsies. *Calcif.Tissue* 44:1387-392.

Cattaneo C, DiMartino S, Scali S, Craig O.E, Grandi M, Sokol R.J. (1999). Determining the human origin of fragments of burnt bone: a comparative study of histological, immunological and DNA techniques, *Forensic Sci. Int.* 102:181–191.

Cattaneo C, Gelsthorpe K, Phillips P, Sokol R.J. (1995). Differential survival of albumin in ancient bone, *J. Archaeol. Sci.* 22 (1995) 271–276.

Chandler N.P. (1987). Cremated teeth, *Archaeol. Today* 8: 41–45.

Cho H, Stout S.D, Madsen R.W, Streeter, M.A. (2002). Population Specific Histological Age-Estimating Techniques: A Model for Known African-American and European American Skeletal Remains. *Journal of Forensic Sciences.* 47(1):12-18.

Christensen A.M. (2002). Experiments in the combustibility of the human body, *J. Forensic Sci.* 47:466–470.

Civjan S, Selting L.B, de Simon, G.C. Battistone, Grower M.F. (1971). Characterization of Osseous Tissues by Thermogravimetric and Physical Techniques. *Journal of Dental Research* 51:539–542.

Correia P.M. (1997). Fire modification of bone: a review of the literature. In: Haglund WD, Sorg MH, editors. *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains.* Boca Raton, FL: CRC. 275–293.

Correia P.M, Beattie O. (2002). A critical look at methods for recovering, evaluating, and interpreting cremated human remains. In WD Haglund & MH Sorg (eds) *Advances in forensic taphonomy: method theory, and archaeological perspectives.* CRC Press, 435-450

Couttenye M, D'haese P, Verschoren W. (1999). Low bone turnover in patients with renal failure. *Kidney Int* 56: S70-S76.

D

DeHaan J.D, Campbell S.J, Nurbakhsh S. (1999). Combustion of animal at and its implications for the consumption of human bodies in fires. *Science and Justice* 39(1):27–38.

DeHaan, J.D. (2002). *Kirk's Fire Investigation*, fifth edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, p. 638

Dirkmaat D.C. (2002). Recovery and interpretation of the fatal fire victim: the role of forensic anthropology, in: W.D. Haglund, M.H. Sorg (Eds.), *Advances in Forensic Taphonomy: Method, Theory, and Archaeological Perspectives*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 451–472.

Dokládal, M. (1969). Über die Heutigen Möglichkeiten der Personenidentifikation auf Grund von VerbranntenKnochen. In *Aktuelle Kriminologie*, pp. 223–246. Kriminolog Verlag, Hamburg.

Dokládál M. (1971). A Further Contribution to the Morphology of Burned Bones. In *Proceedings of the Anthropological Congress Dedicated to Ales Hrdlicka*, edited by N. Novotny, pp. 561–568. Czechoslovak Academy of Sciences, Prague.

Drueke TB. (2000). Aspects of cardiovascular burden in pre-dialysis patients. *Nephron* 85(Suppl)1: 9–14.

Dudar J.C, Pfeiffer S, Saunders S.R. (1993). Evaluation of Morphological and Histological Adult Skeletal Age-at-Death Estimation Techniques Using Ribs. *J. Forensic Sci.* 38(3): 677-685.

Duffy J. (1989). Potential for postmortem gender identification from human tooth pulp. *Canadian Society of Forensic Science Journal* 22(2):109–117.

Dzierzykray-Rogalski T. (1967) New Methods of Investigation of Bone Remains from Cremation Graves. *Anthropologie (Brno)* 4:41–45.

E

Eckert W.G, James S, Katchis S. (1988). Investigation of cremations and severely burned bodies. American Journal of Forensic Medicine and Pathology 9(3), 188-200.

Emmanual J, Hornbeck C, Bloebaum RD. (1987). A polymethyl methacrylate method for large specimens of mineralized bone with implants. Stain Technol 62: 401-10.

Evans, F.G. (1973). Mechanical Properties of Bone . Charles C Thomas, Springfield, IL. Foisey, R.P.

F

Faugere M.C. Malluche U.U. (1983). Comparison of different bone biopsy techniques for qualitative and quantitative diagnosis of metabolic bone diseases. J.Bone Jt.Surg. 65 A: 1314-1319.

Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. (1999). Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32: S112–S119.

Fournier A, Oprisu R, Said S, Sechet A. (1997). Invasive versus non-invasive diagnosis of renal bone disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6: 333-348.

Fratzl P, Gupta H, Paschalis E, Roschger P. (2004). Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *Journal of Material Chemistry* 14:2115–23.

Fratzl P, Schreiber S, Boyde A. (1996). Characterization of bone mineral crystals in horse radius by small-angle X-ray scattering. *Calcified Tissue Int* 58:341–6.

Freemont A. J. (1998). Bone. *Current Orthopaedics*. 12:181-192.

G

Gejvall N.G. (1969). Cremations. In Science in Archaeology. 2nd ed., edited by D. Brothwell and E. Higgs, pp. 468–479. Praeger, New York.

Glassman D.M, Crow R.M. (1996). Standardization model for describing the extent of burn injury to human remains. *Journal of Forensic Sciences* 41(1):152–154.

Goldner J.A. (1938). Modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am.J. Path.* 14:237-243.

Grevin G, Baud O, Susini A. (1990). Étude anthropologique et paléopathologique d'un adulte inhumé puis incinéré provenant du site de Pincevent (*Seine-et-Marne*), *Bulletins et Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, n.s. ,t. 2, n.3-4, Paris, 77-88.

Gross K.A, Berndt C.C. (2002). Biomedical application of apatites, in: M.J. Kohn, J. Rakovan, J.M. Hughes (Eds.), Phosphates: Geochemical, Geobiological and Material Importance, Reviews in Mineralogy and Geochemistry, vol. 48, Mineralogical Society of America, Washington, DC, 2002, pp. 631–672.

Gruber H.E, Stauffer M.E, Thompson E.R, Baylink D.J (1981). Diagnosis of bone disease by core biopsies. *Semin Hematol* 18: 258-78.

Grupe, G., B. Herrmann. (1983). Über das Schrumpfungsverhalten Experimentell Verbrannter Spongioser Knochen am Beispiel des Caput Femoris. *Zeitschrift für Morphologie und Anthropologie* 74:121–127.

Grupe G, Hummel S. (1991). Trace element studies on experimentally cremated bone. I. Alteration of the chemical composition at high temperatures, *J. Archaeol. Sci.* 18:177–186.

Günther H, Schmidt O. (1953). Die zerstörung des menschlichen gebisses im verlauf der einwirkung hoher temperaturen. *Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin* 42:180–188.

Gupta H.S, Seto J, Wagermaier W, Zaslansky P, Boesecke P, Fratzl P. (2006). Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17741-17746.

Guizzardi S, Raspanti M, Martini D, Scandroglio R, Govoni P, Ruggeri A. (1995). Low-temperature heat-deproteinated compact bone to heal large bone defects. *Biomaterials* 16:931–6.

H

Hall B. K. (2005). Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology. Elsevier Academic Press (USA) Ltd.

Haris A, Sherrard D.J, Hercz G. (2006). Reversal of adynamic bone disease by lowering of dialysate calcium. *Kidney Int* 70: 931- 937.

Herrmann B. (1973). Möglichkeiten histologischer Untersuchungen an Leichenbranden. Mitteilungen der Berliner Gesellschaft für Anthropologie, Ethnologie und Urgeschichte 2, Berlin, 164-167.

Herrmann B. (1976). Neuere Ergebnisse zur Beurteilung menschlicher Brandknochen. *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 77:191–200.

Herrmann B. (1977). On Histological Investigations of Cremated Human Remains. *Journal of Human Evolution* 6:101-103.

Hiller JC, Thompson TJU, Evison MP, Chamberlain AT, Wess TJ. (2003). Bone mineral change during experimental heating: an X-ray scattering investigation. *Biomaterials* 24:5091–5097.

Holager J. (1970). Thermogravimetric Examination on Enamel and Dentin. *Journal of Dental Research* 49:546–548.

Holck P. (2005). Cremated Bones. Oslo: Anatomical Institute, University of Oslo. pp. 113- 119.

Holden JL, Phakey PP, Clement JG. (1995). Scanning electron microscope observations of heat-treated human bone, *Forensic Sci. Int.* 74: 29–45.

Holden J.L. Pharkey J.G (1995). Age and temperature related changes to the ultrastructure and composition of human bone mineral. *J. Bone and Mineral Research* 10(9): 1400-1409

Holland T.D. (1989). Use of the cranial base in the identification of fire victims, *J. Forensic Sci.* 1989;2:458–460.

Holland T.D. (1992). Estimation of Adult Stature from Fragmentary Tibias. *Journal of Forensic Sciences* 37:1223–1229.

Hunger H.D. Leopold. (1978). Identifikation . Springer, New York

J

Jablonski N.G, Shum B.S.F. (1989). Identification of unknown human remains by comparison of antemortem and postmortem radiographs. *Forensic Science International* 42:221–230.

Johanson, G, Saldeen T. (1969). A new method for the radiological detection and identification of fragments of teeth and bone recovered from burnt victims. *Journal of Forensic Medicine* 16:26–28.

K

Kalsbeek N, Richter J. (2006). Preservation of burned bones: an investigation of the effects of temperature and pH on hardness. *Stud Conserv* 2006;5:123–37

Kerley E.R, Ubelaker D.H. (1978). Revisions in the Microscopic Method of Estimating Age at Death in Human Cortical Bone. *Am J Phys Anthropol.* 49: 545-546.

Knight B. (1996). Burns and scalds. In: B. Knight, *Forensic Pathology.* 2nd edn., Edward Arnold, London. pp. 305–317.

Krogman W.M. (1939). A guide to the identification of human skeletal material. *FBI Law Enforcement Journal* 8(8), 1-29.

Krogman W.M. (1943a). Role of the physical anthropologist in the identification of human skeletal remains, Part I. *FBI Law Enforcement Bulletin* 12(4), 17-40.

Krogman W.M. (1943b). Role of the physical anthropologist in the identification of human skeletal remains, Part II. FBI Law Enforcement Bulletin 12(5), 12-28.

Krumbein C.N. 1934. Anthropologische Untersuchungen und urgeschichtlichen Leichenbräunnden. Forschungen und Fortschritte 10:411–412.

L

Landis W.J, Hodgens K.J, Arena J, Song M.J, McEwen B.F. (1996). Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. Microsc Res Tech 33:192-202.

Lisowski F.P. (1968). The Investigation of Human Cremated Remains. Anthropologie und Humangenetik 4:76–83.

M

Malinowski A. Porawski R. (1969). Identifikationsmöglichkeiten Menschlicher Brandknochen mit Besonderer Berücksichtigung Ihres Gewichts. Archivio di Medicina Legale, Sociale Criminologica, Roma. *Zacchia*, 5 Ser. 3(3):1–19.

Malluche H.H, Meyer W, Suerman D, Massry S.G. (1982). Quantitative Bone Histology in 84 Normal American Subjects - Micromorphometric analysis and evaluation of variance in iliac bone. *Calcified Tissue Int.* 34:449-455.

Matshes E, Burbridge B, Sher B, Adel M, Bernhard J. (2005). Human Osteology and Skeletal Radiology: An Atlas and Guide. Boca Raton: CRC Press.

Mayne P.M. (1990). The Identification of Precremation Trauma in Cremated Remains. M.A. Thesis. University of Alberta. Edmonton, AB.

Mayne Correia P.M. (1997). Fire Modification of Bone: A Review of the Literature. In WD Haglund and MH Sorg (eds): Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains. Boca Raton: CRC Press, pp. 275-293.

McCutcheon P. (1992). Burned archaeological bone. In (J. K. Stein, Ed.) Deciphering a Shell Midden. San Diego: Academic Press, pp. 347–368.

Melas M. (1984). The origins of the Aegean cremation, *Anthropo/ogika* 5, 21-35.

Melsen F. Melsen B, Mosekilde L. (1978). An evaluation of the quantitative parameters applied in bone histology. *Acta Pathol Microbiol Scand* 86:63-9.

Merbs C.F. 1967 Cremated Human Remains from Point of Pines, Arizona: A New Approach. *American Antiquity* 32:498–506.

Merz WA, Schenk RK. (1970). A quantitative histological study on bone formation in human cancellous bone. *Acta Anat* 76: 1-15.

Mincer H.H, Berryman H E, Murray G.A, Dickens R.L. (1990). Methods for physical stabilization of ashed teeth in incinerated remains. *Journal of Forensic Sciences* 35(4):971–974

Murray K.A, Rose J.C. (1993), The analysis of cremains: a case study involving the inappropriate disposal of mortuary remains, *J. Forensic Sci.* 38: 98–103.

McKinley J.I. (1994). Bone fragment size in British cremation burials and its implications for pyre technology and ritual, *J. Archaeol. Sci.* 21; 339–342.

N

Newesely H. (1988). Chemical Stability of Hydroxyapatite under Different Conditions. In *Trace Elements in Environmental History*, edited by G. Grupe and B. Herrmann, pp. 1–16, Springer-Verlag, Berlin.

Nicholson R. (1993). A morphological investigation of burnt animal bone and an evaluation of its utility in archaeology. *Journal of Archaeological Science* 20, 411–428.

Nuzzo S, Peyrin F, Cloetens P, Baruchel J, Boivin G. (2002). Quantification of the degree of mineralization of bone in three dimensions using synchrotron radiation microtomography. *Med Phys* 29:2672–81.

O

Ott S. (2002). Histomorphometric analysis of bone remodeling. In: Bilezikian, J., Raisz, L., Rodan, G (Eds). *Principles of Bone Biology*, 2ed. Academic Press, United States, pp. 303-320.

Owsley D.W, Mires A.M, Keith M.S. (1985). Case Involving Differentiation of Deer and Human Bone Fragments. *Journal of Forensic Science*. 30(2):572-578.

P

Paine R.R, Brenton B.P. (2006). Dietary health does affect histological age assessment: an evaluation of the Stout and Paine (1992) age estimation equation using secondary osteons from the rib. *Journal of Forensic Sciences*, 51 (3), 489-492.

Paschalis E.P, Verdelis K, Doty S.B, Boskey A.L, Mendelsohn R, Yamauchi M. (2001). Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *J Bone Miner Res* 16:1821-1828

Perinet G. (1988). Determination par diffraction des rayons X de la temperature de cuisson des ossements du Dolmen de la Haute-Suane, *Bulletin de la Société Préhistorique Française* 5, 147-149.

Piga G, Thompson TJ, Malgosa A, Enzo S. (2009). The potential of X-ray diffraction in the analysis of burned remains from forensic contexts. *J Forensic Sci.* 54(3):534-539.

Piga G. , Malgosa, A. Thompson, T.J.U. Enzo, S. (2008). A new calibration of XRD technique for the study of archaeological burned human remains. *Journal of Archaeological Science*, 35:2171-2178.

Piontek, J. (1975). Polish Method and Results of Investigations of Cremated Bones from Prehistoric Cemeteries. *Glasnik Anthropoloskog Drustva Jugoslavise Sveska* 12:23–34.

Pope E.J. (2007). Burned human remains: myths in forensic science. *Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences* 13, 379-380.

Puzas JE. (1996). Osteoblast cell biology-Lineage and functions. En: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism* (3rd ed). Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers. pp. 11-16.

Q

Quarles LD. (2003). FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E1-E9.

R

Raggi P, Bellasi A, Ferramosca E. (2007). Pulse wave velocity is inversely related to vertebral bone density in hemodialysis patients. *Hypertension* 49: 1278–1284.

Recker R.R. (1983). Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation. CRC Press. Boca Ratón.

Richards N.F. (1977). Fire investigation—destruction of corpses. Medicine, Science and the Law 17: 79–82.

Roschger P, Gupta HS, Berzlanovich A. (2003). Constant mineralization density distribution in cancellous human bone. Bone 2003;32:316–23.

Rootare H.M, Craig R.G. (1977). Vapor Phase Adsorption of Water on Hydroxyapatite. Journal of Dental Research 56:1437–1448.

Ross M. H, Romrell, L. J, Kaye G. I. (1995). Bone. In: Histology: A Text and Atlas, 3ed, Williams & Wilkens, Philadelphia, pp. 150-187.

Ruffoni D, Fratzi P, Roschger P, Klaushofer K, Weinkamer R. (2007). The bone mineralization density distribution as a fingerprint of the mineralization process. Bone 40:1308–19.

S

Shipman P, Foster G, Schoeninger M. (1984). Burnt bones and teeth: an experimental study of color, morphology, crystal structure and shrinkage, *J. Archaeol. Sci.* 11:307–325.

Scheuer L, Black S. (2000). *Developmental Juvenile Osteology.* San Diego: Academic Press pp. 85–90.

Schultz J.J, Warren M.W, Krigbaum J.S (2008). Analysis of human cremains: gross and chemical methods, in: C.W. Schmidt, S.A. Symes (Eds.), *The Analysis of Burned Human Remains*, Academic Press, London, pp. 75–94.

Schurr M.R, Hayes R.G, Cook D.C. (2008). Thermally induced changes in the stable carbon and nitrogen isotope ratios of charred bones, in: C.W. Schmidt, S.A. Symes (Eds.), *The Analysis of Burned Human Remains*, Academic Press, London, pp. 95–108.

Spitz W.U. (1993). Thermal injuries. In: Spitz, W. U., editor. *Medicolegal Investigations of Death*, third edition. Springfield IL: Charles C. Thomas, p. 413–443.

Sprague SM. (2000). The role of bone biopsy in the diagnosis of renal osteodystrophy. *Semin Dial* 13: 152-155.

Steele D.G. (1970). Estimation of Stature from Fragments of Long Limb Bones. In *Personal Identification in Mass Disasters*, edited by T.D. Stewart, pp. 85–97. National Museum of Natural History, Washington, D.C.

Steele D.G, McKern T.W. (1969). A Method for the Assessment of Maximum Long Bone Length and Living Stature from Fragmentary Long Bones. *American Journal of Physical Anthropology* 31:215–28.

Stewart T.D. (1979). *Essentials of Forensic Anthropology*. Charles C Thomas, Springfield, IL.

Stout S. D. (1989). Histomorphic analysis of human skeletal remains. In: İşcan, M.Y., Kennedy, K.A.R. (Eds). *Reconstruction of Life From the Skeleton*. Wiley-Liss, pp. 41-52

Susini A, Baud C.A, Tochon-Danguy H.J. (1988) Identification d'un Traitment Thermique des os Prehistoriques Humain. Actes des 3 Journees Anthropologiques, Notes et Monographies Techniques 24:43 67.

Symes S.A, Smith O.C, Berryman H. (1996). Bones: bullets, bums, bludgeons, blunders, and why (Workshop). Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences 2, 10-11.

Thompson T.J.U. (2002). The assessment of sex in cremated individuals: some cautionary notes. Can Soc J Forensic Sci 35:49–56.

T

Thompson T.J.U. (2005). Heat-induced dimensional changes in bone and their consequences for forensic anthropology, J. Forensic Sci. 5:1008–1015.

Tortora Gerard J, Anagnostakos Nicholas P. (1990). Principles of Anatomy and Physicology. New York: Harper and Row Publishers.

Trotter M, Gleser G.C. (1952). Estimation of Stature from Long Bones of American Whites and Negroes. American Journal of Physical Anthropology 10:463–514.

U

Ubelaker D, Owsley D, Houck M. (1995). The role of forensic anthropology in the recovery and analysis of Branch Davidian compound victims: recovery procedures and characteristics of the victims. Journal of Forensic Sciences 40(3), 335-340.

V

Van Vark G.N. (1970). Some Statistical Procedures for the Investigation of Prehistoric Human Skeletal Material, Rijksuniversiteit te Groningen, Groningen.

Van Vark G.N. (1974). The investigation of human cremated skeletal material by multivariate statistical methods. I. Methodology, Ossa 1:63–95.

Villanueva A.R. (1980). Basic preparation and staining of undecalcified bone. En: Sheehan DC, Hrapchack B, editors. Theory and practice of histotechnology. 2nd ed. St Louis: C V Mosby Company 96-107.

Villanueva A.R, Sypitkowski C, Parfitt A.M. (1986). A new method for identification of cement lines in undecalcified plastic embedded sections of bone. Stain Technol 61: 83-8.

Villanueva A.R, Lundin K.A (1989). A versatile new mineralized bone stain for simultaneous assessment of tetracycline and osteoide seams. Stain Technol 64: 129-38.

W

Warren M.W, Falsetti A.B, Hamilton W.F, Levine L.J (1999). Evidence of arteriosclerosis in cremated remains, Am. J. Forensic Med. Pathol. 20: 277–280.

Warren M.W, Schultz J.J. (2002). Post-cremation taphonomy and artifact preservation, J. Forensic Sci. 47:656–659.

Y

Yeung EC, Law SK. (1987). Serial sectioning techniques for a modified LKB historesin. Stain Technol 62: 147-53.

Young MF. (2003). Bone matrix proteins: more than markers. Calcif Tissue Int. 72;2-4.