



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA
INFORME MONOGRÁFICO**



**TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EDAD EN
RESTOS ÓSEOS HUMANOS**

Autores:

González, María
Rojas, Christian
Salas, Anjhi

Tutor:

Núñez, José

NAGUANAGUA, ABRIL DEL 2021



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA
INFORME MONOGRÁFICO



CONSTANCIA DE APROBACION

Los suscritos miembros del jurado designado para examinar el informe monográfico titulado:

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EDAD
EN RESTOS ÓSEOS HUMANOS

Presentado por los bachilleres:

González, María C.I.: 26.719.546

Rojas, Christian C.I.: 26.487.598

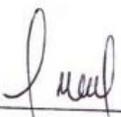
Salas, Anjhi C.I.: 26.843.111

Hacemos constar que hemos examinado y aprobado la misma, y que, aunque no nos hacemos responsable de su contenido, lo encontramos correcto en su calidad y forma de presentación.

Fecha 01-11-2021



Profesor
Asdrubal Tavara



Profesor
Alicia Arguello



Profesor
Jesus Caicedo



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA
INFORME MONOGRÁFICO**



**TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EDAD
EN RESTOS ÓSEOS HUMANOS**

Autores: González, María
Rojas, Christian
Salas, Anjhi
Año: 2021

Resumen

La estimación de la edad de un individuo, es un estudio que se lleva a cabo en los restos óseos humanos, el cual nos permite conocer y establecer un rango de la edad biológica de un individuo vivo o fallecido. Esto se realiza mediante diversos métodos y pasos que se emplean para estudiar las estructuras histológicas y morfológicas de los huesos. En el presente trabajo monográfico, se describirán las técnicas histológicas y procedimientos que ayudarán a dar una estimación de la edad en restos óseos humanos, siendo la histomorfometría, una de las técnicas más estudiadas que tiene gran utilidad cuando los restos óseos se encuentran fragmentados y los métodos convencionales no son viables, basándose en investigaciones ya existentes, resaltando los cambios biológicos, histológicos y morfológicos de los componentes óseos que se aprecian a nivel microscópico y las limitantes y márgenes de error a considerar dentro del procesamiento. Por consiguiente, es necesario dar a conocer dicho estudio que nos brinda la tecnología avanzada, sirviendo de gran aporte en las ciencias forenses y criminalísticas, lo cual a corto, mediano y largo plazo podría ser una metodología que acorde al tiempo de estudio posea una validez y confiabilidad científica.



Palabras clave: edad biológica, histomorfometría, técnicas histológicas, restos óseos morfológica.



**UNIVERSITY OF CARABOBO
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
SCHOOL OF BIOMEDICAL SCIENCES
HIGHER TECHNICIAN IN HISTOTECHNOLOGY
A CASE REPORT**

**HISTOLOGICAL TECHNIQUES FOR THE DETERMINATION OF AGE IN
HUMAN BONE REMAINS**

Authors: González, María
Rojas, Christian
Salas, Anjhi
Year: 2021

Abstract

The estimation of the age of an individual is a study that is carried out in human skeletal remains, which allows us to know and establish a range of the biological age of a living or deceased individual. This is done through various methods and steps used to study the histological and morphological structures of bones. In the present monographic work, the histological techniques and procedures that will help to give an estimate of the age in human bone remains are described, with histomorphometry being one of the most studied techniques that is very useful when the bone remains are fragmented and conventional methods are not viable, already in existing investigations, highlighting the biological, histological and morphological changes of the bone components that are appreciated at the microscopic level and the limitations and margins of error to be considered within the processing. Therefore, it is necessary to publicize said study that advanced technology provides us, serving as a great contribution in forensic and criminal sciences, which in the short, medium and long term could be a methodology that, according to the study time, has validity and scientific reliability.

Key words: biological age, histomorphometry, histological techniques, human bone remains, morphology.

ÍNDICE

	pp
	•
Constancia de aprobación	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
Introducción	1
Desarrollo	3
Características óseas del tejido óseo y sus cambios con la edad	6
Protocolo para el procesamiento del tejido óseo	8
Características morfométricas utilizadas para la determinación de la edad biológica en restos óseos humanos	9
Conclusiones	10
Recomendaciones	12
Referencias	13

INTRODUCCIÓN

Tras el deceso de una persona surgen diversas interrogantes, la principal recae en determinar ¿quién es la víctima?, una pregunta que desde las diversas ciencias forenses se debe responder para establecer la identidad de la persona. Cuando se trabaja con restos óseos humanos se realiza la experticia de identificación bioantropológica de cadáveres, esta se conoce como el perfil biológico del individuo, el cual incluye el sexo, la edad, la estatura, su afinidad biogeográfica y su composición física¹.

En el caso particular de la edad, se establece como un indicador de madurez esquelética y biológica de un individuo, esto es diferente a la cronológica que se calcula utilizando la fecha de nacimiento. Para calcular la edad biológica se han utilizado diversos métodos tanto en personas vivas como ocurre con las radiografías de las manos y la erupción dental, así como métodos en personas fallecidas². No obstante, en la determinación de la edad en restos óseos se trabaja con la aparición, crecimiento y fusión del centro de osificación de los huesos largos para niños y adolescentes, mientras que en el adulto los métodos se basan en los cambios morfológicos macro y microscópicos³.

Es decir, cuando se trabaja con esqueletos inmaduros o adultos el uso de las características morfológicas macroscópicas y el uso de tablas de referencias favorecen la determinación de la edad. La mayor complejidad se presenta cuando los huesos se encuentran fragmentados, mezclados y carbonizados. En estos casos la histomorfometría ha sido una herramienta de utilidad⁴, porque permite determinar la edad biológica de esos fragmentos. Al respecto, Ubelaker y Khosrowshahi⁵ explican que la histomorfometría es utilizada por pocos antropólogos forenses, debido a la capacitación especializada que requiere.

Es decir, la preparación de las muestras y la interpretación de las estructuras tisulares para su estudio morfométrico requiere de entrenamiento previo. Es justo en este punto, cuando los profesionales de la histotecnología pueden coadyuvar al sistema de justicia al procesar los restos óseos y aportar información relacionada con la edad biológica de una persona. En este sentido, la presente investigación tiene como objetivo general describir las técnicas histológicas para la determinación de la edad biológica en restos óseos humanos.

Para tales fines, como objetivos específicos se tienen, explicar las características histológicas del tejido óseo y sus cambios con la edad, seguidamente, establecer un protocolo para el procesamiento del tejido óseo con base en las limitaciones de las técnicas actuales y, por último, especificar las características morfométricas utilizadas para la determinación de la edad biológica en restos óseos humanos. Este estudio se realizó por medio de una investigación documental bajo la modalidad de trabajo monográfico.

Con base en lo anterior, este aporte contribuye con los profesionales de las ciencias forenses, por tratarse de una investigación aplicada. En especial a los peritos del Servicio Nacional de Medicina y Ciencias Forenses (SENAMECF), porque se plantea una metodología que permitirá determinar la edad biológica de fragmentos de huesos humanos para contribuir con el perfil bioantropológico de una persona y de esta manera lograr establecer su identidad. Por lo cual, propone un nuevo enfoque de trabajo cuando resulte imposible utilizar los métodos convencionales de la antropología forense.

En el mismo orden de ideas, el aporte a la sociedad se reflejará en la resolución de los casos con base en la verdad procesal desde el conocimiento científico. Siendo los familiares de las víctimas los principales beneficiados, al establecer la identidad de estas personas. Lo anterior conlleva a una mejor percepción del sistema de justicia venezolano, así como del rol de los profesionales de la histotecnología dentro de las investigaciones penales, cada profesional puede aportar soluciones desde su praxis.

DESARROLLO

La mayoría de los métodos de estimación de la edad de los individuos se basan en estudios macroscópicos de los huesos^{1,6} y piezas dentales⁷⁻⁹, tanto en personas vivas como fallecidas. Pero los cambios físicos que experimentan estas estructuras se producen durante los primeros años de vida y la adolescencia, disminuyendo en los individuos subadultos y cesando en los adultos, por lo cual la precisión de la edad se dificulta a medida que la persona envejece⁵.

Además, la fragmentación de restos óseos le agrega complejidad al caso. Por ejemplo, personas que fallecieron por traumatismos (explosiones) la fragmentación de huesos es común, incluso eventos *postmortem* como exposición a la intemperie, efecto de la fauna local, entre otras causas ocasionan fragmentos¹⁰. En tal sentido, se deben individualizar y establecer la identidad a través de fragmentos y los métodos convencionales no son útiles en estos casos. Por ende, surge la necesidad de trabajar con otros métodos que permitan aportar información sobre las características bioantropológicas de los fragmentos.

La histomorfología o histomorfometría es un método cuantitativo de las estructuras internas del hueso, así como de su geometría. Es decir, se cuenta y miden las variables microestructurales del tejido óseo para determinar el recambio o su remodelación, porque es un proceso que ocurre durante toda la vida, permitiendo asociar el número de osteonas y la edad biológica¹¹⁻¹³. A continuación se presentan algunos trabajos que han utilizado este método con fines forenses.

Uno de los trabajos más recientes realizado por Lagacé et al.¹⁴ realizaron un análisis de cuatro métodos histomorfométrico para la distinción entre fragmentos de huesos humanos y no humanos. Dentro de sus principales hallazgos se destaca que algunos de estos métodos no se pueden utilizar como se presentan en los artículos originales, se deben realizar correcciones a las unidades de medidas, además se deben considerar un número mínimo de osteonas intactas para obtener un análisis estadístico confiable porque la variabilidad afecta la precisión de los métodos, especialmente cuando se trabaja con huesos fragmentados.

Este trabajo se vincula con la presente investigación porque plantea que el método presenta ciertas limitaciones en cuanto al análisis morfométrico y el uso de las fórmulas. Por tal razón, se debe considerar estos inconvenientes para minimizar el margen de error al momento de establecer la edad. En un segundo trabajo realizado por Maggio y Franlin¹⁵ estudiaron la edad que tenían las víctimas a través de la histomorfometría femoral en 33 estudios. Dentro de sus hallazgos se resalta que el número mínimo de individuos que se debe utilizar para establecer patrones de referencias oscila entre 100-150, con el propósito de garantizar una mayor precisión de los resultados, incluyendo su desviación estándar.

En consecuencia, los métodos deben garantizar un grado de confiabilidad para su utilidad dentro del contexto forense o como valor probatorio. En párrafos anteriores se ha comentado que la estimación de la edad a nivel macroscópico se basa en la maduración del esqueleto humano con la aparición y fusión de los centros de osificación de los huesos, pero a nivel microscópico el grado de modelación es el objeto de estudio. En ambos casos el método debe ser preciso y repetible¹⁶.

Por tal razón, en un tercer trabajo realizado por García et al.¹⁷ tras una revisión crítica de las técnicas histológicas para la estimación de la edad, encontrando que los principales errores de estimación pueden estar relacionados con factores intrínsecos y problemas metodológicos, es decir, se deben realizar estudios en las poblaciones de interés para ajustar los métodos a las variabilidades de cada población como parte de la validación previa a su uso con fines forenses. Al utilizar las fórmulas actuales en poblaciones distintas obtuvieron una subestimación de la edad con un aumento de la inexactitud en las personas mayores.

Siendo importante aclarar que la relación entre la edad biológica y la edad cronológica no es constante ni lineal, dado que los cambios biológicos no son uniformes en el tiempo y están influenciados por diferentes factores intrínsecos como los genes, el sexo y la ancestría, así como factores extrínsecos como la alimentación, el ambiente, la actividad física y las patologías. Por lo tanto, la variabilidad en las poblaciones humanas conlleva un cierto margen de error en la estimación de la edad biológica⁵.

A pesar de lo anterior, estas técnicas siguen siendo utilizadas para determinar la edad en fragmentos de restos óseos, porque la progresión de la remodelación ósea es un indicador preciso cuando se cuenta con estándares de comparación. Por tal razón, existen diversos métodos que han variado durante los años para darle mayor aplicabilidad, por ejemplo, a nivel de las fórmulas utilizadas y la desviación estándar de las mediciones, tipo de uso utilizado, cantidad de hueso requerido, así como las estructuras microscópicas observadas¹⁸.

Ahora bien, se habla de un método porque engloba una serie de pasos y etapas, dentro de las cuales se encuentra la técnica histológica o el procesamiento tisular del material óseo, los trabajos anteriores se fundamentaron en el método per se. No obstante, Ubelaker y Wu¹⁰ plantean que la técnica presenta limitaciones en cuanto al límite de material a utilizar, al tratarse de fragmentos, estos no se pueden agotar en su totalidad a través del uso de la técnica, porque tiene prioridad desde el punto de vista forense las experticias genéticas en caso de material exiguo.

Lo anterior ocurre porque la obtención de un preparado histológico para un estudio histomorfométrico se considera un método destructivo al limitar la cantidad de material genético para su posterior estudio. Con base en estas premisas se desarrollan los objetivos específicos para abrir paso a nuevas investigaciones en el campo forense a través de métodos y técnicas que sirvan de alternativa en ciertos casos de interés criminalístico, al final, todo dependerá del conocimiento de cada perito la elección del mejor método que garantice la integridad de la evidencia y la obtención de resultados.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL TEJIDO ÓSEO Y SUS CAMBIOS CON LA EDAD

Para comprender el fundamento de la técnica como una de las etapas del método, se requiere explicar las características histológicas que conforman al tejido óseo, es decir, el reconocimiento de estas estructuras es la base para cualquier cálculo posterior. Al respecto, Boskey¹⁹ explica que la mayoría de las células óseas son de origen celular mesenquimatoso, estas células se diferencian a partir del mesodermo para dar origen a las células que posteriormente conformarán al tejido óseo.

Dentro de estas células tenemos los condrocitos que son los responsables del depósito de la placa de crecimiento y su posterior remodelación, mientras que los osteoblastos sintetizan la matriz ósea y facilitan el proceso de mineralización, asociado al desarrollo y crecimiento de los huesos. Durante el proceso de maduración de estas células se obtienen los osteocitos, los cuales responden a la carga biomecánica del cuerpo humano y regulan la resorción y formación ósea¹¹.

En consecuencia, son los osteocitos los que se rodean de minerales (fosfato y carbonato de calcio) que les confieren la dureza y resistencia, estas células constituyen el 90% de las células presentes en el hueso con un tiempo de vida útil entre 1 a 50 años (tiempo de vida media de 25 años). Además, con la edad disminuyen el número de divisiones de los osteoblastos por lo cual los osteocitos son los que sufren cambios. Por otro lado, los osteoclastos son de origen hematopoyético y son células gigantes multinucleadas responsables de eliminar el hueso (resorción), siguiendo las señales de los osteoblastos y osteocitos²⁰.

La osteona se forma por un conjunto de laminillas concéntricas de tejido óseo compacto que rodea a un conducto central denominado canal de Havers, por este canal pasan los vasos sanguíneos¹⁹. Aunque en la presente investigación se están omitiendo otros elementos o características histológicas a nivel óseo, es en este punto donde recae el interés

de la técnica histológica para la determinación de la edad. Con los años, el proceso de envejecimiento conduce al incremento del número de osteonas.

Al respecto, Sobol et al.⁴ señalan que las osteonas incrementan de diámetro por un incremento en el diámetro del canal de Havers, debido a la actividad de los osteoclastos durante la resorción ósea. En este proceso de remodelación, se obtienen las osteonas fragmentarias por la tensión biomecánica y la reparación del daño causado por múltiples agresiones; en consecuencia, en un mismo preparado histológico se encontrarán osteonas completas o intactas y osteonas fragmentarias, este patrón óseo varía a lo largo del esqueleto humano¹⁰.

PROTOCOLO PARA EL PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ÓSEO

Como se trata de un proceso legal, el profesional de la histotecnología deberá recibir el material con su respectiva cadena de custodia, partirá de un reconocimiento técnico de la evidencia a través del uso de la lupa estereoscópica con el propósito de describir las características macroscópicas de los fragmentos (tamaño, forma y color), además se deberá reportar el número de fragmentos. Como se plantea la inquietud de la destrucción del material genético, se determinará si el tamaño de la muestra permite realizar un procesamiento histológico o no.

Es decir, si el fragmento es muy pequeño no se realiza el procesamiento histológico y se enviará al laboratorio de genética forense y en caso de quedar material disponible se podría procesar. El fragmento de hueso se puede cortar con una herramienta rotativa o dremel (grosor de 1 mm) o se puede raspar, la muestra se incluye en resina epóxica en un molde, el bloque obtenido a las 16 horas se devasta manualmente con el dremel y frotándolo sobre una lija de banda fina hasta obtener cortes de 75-100 μm de espesor, luego se montan en un vidrio portaobjeto con un pegamento para preparaciones histológicas^{4,21}.

Se deja secar el corte durante 4 días y se pule durante 10 minutos, se realiza un lavado con xilol para eliminar los restos y se procede a cubrir con un cubreobjetos. Existen herramientas especializadas para tales fines, por ejemplo, el uso de un micrótopo de sierra o un ultramicrotopo, pero todo dependerá de la disponibilidad del laboratorio, porque es un proceso distinto al procesamiento de la técnica de la parafina, donde se descalcifica el material duro para su posterior corte con un micrótopo. Los preparados se pueden visualizar con un microscopio de luz transmitida y luz polarizada²².

CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EDAD BIOLÓGICA EN RESTOS ÓSEOS HUMANOS

Una vez obtenido el preparado histológico, se procede a su visualización. La observación permite evaluar las características morfológicas de las osteonas y posterior cuantificación con un analizador de imagen. Dentro de los parámetros utilizados se tiene el número total de osteonas intactas (N.On.In), el número de osteonas fragmentarias (N.On.Fg), diámetro promedio de los canales de Havers (Can.Hav), porcentaje de osteonas fragmentarias (%On.Fg) y la densidad poblacional osteonal (OPD), además del área cortical (B.Ar) y el porcentaje de hueso osteonal (On.B), área media de las osteonas secundarias completas al 100% (On.Ar), número de osteonas secundarias completas al 100% (N.On)²³.

Fórmulas para osteonas secundarias:

$$\text{OPD} = \text{N.On.In} + \text{N.On.Fg} / \text{B.Ar}$$
$$\text{Ln Edad} = 2,343 + 0,050877 (\text{OPD}) \pm 3,9 \text{ años}^{24} \text{ para costilla}$$

$$\text{On.B} = [(\text{On.Ar} \times \text{N.On}) / \text{B.Ar}] \times 100$$
$$Y = 75,93 \times (\text{On.B}/100) + 25,966 \pm 8,5 \text{ años}^{25} \text{ para tibia}$$
$$Y = 1,285 (\text{N.On}/\text{B.Ar}) + 23,22 \pm 8,5 \text{ años}^{26} \text{ para tibia}$$

Con base en los parámetros anteriores, diversos estudios plantean el uso de un modelo lineal para estimar la edad al momento de la muerte, centrado en el supuesto de que las osteonas primarias son reemplazadas por osteonas secundarias en un proceso continuo de recambio que ocurre en un tiempo predecible, por otro lado, el número de osteonas intactas y fragmentarias por unidad de área cortical es el mejor indicador de la edad biológica¹². En tal sentido, se trabaja con la densidad de la población de osteonas por área cortical, algunos autores consideran el uso de las osteonas con un canal de Havers mayor de 70 μm de diámetros, pero todo dependerá del material disponible⁴.

Además, se deben considerar otras variables como el sexo, actividad física, patologías, dieta, entre otras, para ajustar los cálculos. Por tal razón, es un área que requiere mayor investigación para obtener información de comparación y métodos estandarizados. Hasta el momento, el número de osteonas fragmentarias incrementa con la edad (mayores de 50

años) y es un valor predictivo que se puede correlacionar con el número de osteonas intactas y la densidad población que se esperaría en personas jóvenes (menores de 50 años)¹⁸.

CONCLUSIONES

La estimación de la edad en restos óseos humanos requiere de la utilización y aplicación de métodos y técnicas confiables. En este sentido, los métodos disponibles han permitido observar que, a nivel macroscópico, la estimación de la edad se basa en la maduración del esqueleto humano con la aparición y fusión de los centros de osificación de los huesos, mientras que, a nivel microscópico, el objeto de estudio es el grado de modelación. De acuerdo a las características de la evidencia se debe elegir el método. Cuando se trata de huesos fragmentados los métodos anteriores no son viables, en tal caso se utiliza un método histomorfométrico en las medidas de las posibilidades.

En relación a esto, los estudios poblacionales de interés constituyen una fuente para ajustar los métodos a la variabilidad de cada población, como parte de la validación previa para su utilización con fines forenses y probatorios. Por otra parte, la utilización de las fórmulas actuales en poblaciones distintas ha dado como resultado estimaciones de la edad con un aumento de inexactitud en personas mayores. Apreciándose entonces, que la progresión de la modelación ósea es un indicador preciso cuando se cuenta con estándares de comparación.

Aunque planteamientos existentes limitan las técnicas histológicas en cuanto a la cantidad de material a usar para determinar la edad en restos óseos fragmentados, por considerar el preparado histológico como un proceso destructivo del material óseo, ésta técnica constituye una etapa del método y la misma se fundamenta en las características histológicas del tejido óseo y de sus cambios producidos por la edad, pues, el reconocimiento de éstas estructuras, constituye la base para cálculos posteriores. Siendo en esta parte, donde se evidencia su utilidad para la determinación de la edad. Resultando que en un mismo preparado histológico se encuentran tanto las osteonas intactas como las fragmentarias.

En este contexto, la técnica histológica también cuenta con un protocolo para el procesamiento del tejido óseo, en el cual se determina si la muestra recibida es suficiente para realizar el preparado histológico; de resultar insuficientes, los restos óseos fragmentados serán enviados al laboratorio de genética forense. Además, la técnica histológica evalúa a través de la observación del preparado histológico, las características morfológicas de las osteonas para su cuantificación. Considerando que el número de osteonas intactas y fragmentarias por unidad de área cortical es el mejor indicador de la edad biológica. Del mismo modo, se debe tomar en cuenta variables como el sexo, actividad física, patologías, dieta, entre otras, para ajustar los cálculos y obtener información de comparación y métodos estandarizados.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios experimentales con una población de restos óseos que permitan obtener estándares de comparación asociado a la población venezolana, porque pueden existir variabilidades en cuanto a la dieta y el estado de salud que tenía la persona antes de fallecer, entre otros factores. Además, esto aportará mayor nivel de precisión al método y propondrá variaciones a la técnica histológica según se presentan los resultados y necesidades de mejora.

Por tal razón, es importante un estudio previo que permita estandarizar la técnica para el procesamiento tisular y el uso de las fórmulas para garantizar un método al servicio del sistema de justicia al determinar la edad biológica a través de fragmentos óseos. También, se recomienda la formación de personal calificado para realizar estos estudios dentro de las instituciones en materia penal o la incorporación de profesionales de la histotecnología dedicados a estas funciones.

REFERENCIAS

1. Nuñez J, Rodríguez L. estrategia didáctica para el aprendizaje de la antropología forense en Latinoamérica. *Revista Científica de FAREM-ESTELÍ*. 2020;35:3-14. Doi: 10.5377/farem.v0i35.10273
2. Manzoor A, Hassan N, Ahmed A. Bone age assessment methods: A critical review. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2014;30(1):211-215. Doi: 10.12669/PJMS.301.4295
3. Austin D, King R. The biological profile of unidentified human remains in a forensic context. *Academic Forensic Pathology*. 2016;6(3):370-390. Doi: 10.23907/2016.039
4. Sobol J, Ptaczyńska I, Charuta A, Okłota M, Żaba Cz, Niemcunowicz A. Estimation of age at death: examination of variation in cortical bone histology within the human clavicle. *Folia Morphologica*. 2015;74(3):378-388.
5. Ubelaker D, Khosrowshahi H. estimation of age in forensic anthropology: historical perspective and recent methodological advances. *Forensic Sciences Research*. 2019;4(1):1-9. Doi: 10.1080/20961790.2018.1549711
6. Tiol A. Dentomaxillary anthropology as a method of forensic identification. *Revista Mexicana de Medicina Forense*. 2018;3(2):80-90.
7. Gupta S, Venkateswara G, Rayapudi N, Korlepara R. Evaluation of skeletal and dental age using third molar calcification, condylar height and length of the mandibular body. *Journal of Forensic Dental Sciences*. 2015;7(2):121-125. Doi: 10.4103/0975-155077
8. Alshihri A, Kruger E, Tennant M. dental age assessment of Western Saudi children and adolescents. *Saudi Dental Journal*. 2015;27(3):131-136. Doi: 10.1016/j.sdentj.2015.01.002
9. Ugalde C, Olivares J, González E, Moncada G, Oliveira O. Métodos de odontología forense para estimar la edad cronológica de los individuos. Revisión de tema. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*. 2017;29(1):173-186.

10. Ubelaker D, Wu Y. Fragment analysis in forensic anthropology. *Forensic Sciences Research*. 2020;5(4):260-265. Doi: 10.1080/20961790.2020.1811513
11. Crowder C, Stout S. *Bone histology: An anthropological perspective*. United States: CRC Press. 2012.
12. Andronowski J, Crowder C, Soto M. Recent advancements in the analysis of bone microstructure: New dimensions in forensic anthropology. *Forensic Sciences Research*. 2018;3(4):278-293. Doi: 10.1080/20961790.2018.1483294
13. Kranioti E, Michopolou E, Tsiminikaki K, Bonicelli A, Kalochristianakis M, Xhemali B, Paine R, García J. Bone histomorphometry of the clavicle in a forensic sample from Albania. *Forensic Sciences International*. 2020;313:110335. Doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110335
14. Lagacé F, Schmitt A, Martille L, Benassi J, Adalian P. Using histomorphometry for human and nonhuman distinction: A test of four methods on fresh and archaeological fragmented bones. *Forensic Science International*. 2020;313:110369. Doi: 10.1016/j.forsciint.2020.110369
15. Maggio A, Franklin D. Femoral histomorphometric age at death studies: The issue of sample size and standard error. *Medicine, Science, and the Law*. 2020;60(4):257-265. Doi: 10.1177/002580420945939
16. Bonicelli A, Zioupos P, Arnold E, Rogers K, Xhemali B, Kranioti E. Age related changes of rib cortical bone matrix and the application to forensic age at death estimation. *Scientific Reports*. 2021;11:2086. Doi: 10.1038/s41598-021-81342-0
17. García J, Bonicelli A, Scholl A, Lill C, Paine R, Kranioti E. Rib histomorphometry: A reliability and validation study with a critical review of histological techniques for forensic age estimation. *Legal Medicine*. 2021;49:101827. Doi: 10.1016/j.legalmed.2020.101827
18. Desántolo B, Inda A. Estimación microscópica de edad a partir de la zona cortical del fémur en individuos adultos: Revisión metodológica. *Revista Argentina de Antropología Biológica*. 2016;18(2):1-12. Doi: 10.17139/raab.2016.0018.02.04
19. Boskey A, Coleman R. Aging and bone. *Journal of Dental Research*. 2010;89(2):1333-1348. Doi: 10.1177/0022034510377791
20. De Buffrénil V, de Ricqlés A, Zylberberg L, Padian K. *Vertebrate skeletal histology and paleohistology*. United States: CRC Press. 2021.
21. Pfeiffer S, Heinrich J, Beresheim A, Alblas M. Cortical bone histomorphology of known-age skeletons from the Kirsten collection, Stellenbosch university, South

- Africa. *American Journal of Physical Anthropology*. 2016;160(1):137-147. Doi: 10.1002/ajpa.22951
22. Georgiadis M, Müller R, Scheneider P. Techniques to assess bone ultrastructure organization: Orientation and arrangement of mineralized collagen fibrils. *The Royal Society, Interface*. 2016;13(119):20160088. Doi: 10.1098/rsif.2016.0088
 23. Mohd F, Pastor R, Schutkowski H. Age at death estimation from bone histology in Malaysian males. *Medicine, Sciences and Law*. 2014;54(4):203-208. Doi: 10.1177/0025802413506573
 24. Stout S, Paine R. Histological age estimation using rib and clavicle. *American Journal of Physical Anthropology*. 1992;87(1):111-115.
 25. Thompson D. The core technique in the determination of age at death in skeletons. *Journal of Forensic Sciences*. 1979;24:902-915
 26. Thompson D, Galvin C. Estimation of age at death by tibial osteon remodeling in an autopsy series. *Forensic Sciences International*. 1983;22(2-3):203-211.