



Antropología Biológica

# Protocolo para la preparación de secciones delgadas sin descalcificar de tejido óseo humano

*Protocol for thin section preparation of non decalcified human bone tissue*

Tamara G. Navarro<sup>\*1</sup>, Marcos Jannello<sup>\*2,3</sup>, Ignacio A. Cerda<sup>\*1,3,4</sup>, Marien Béguelin<sup>\*3,4</sup>, Romina Vázquez<sup>\*3,4</sup>

<sup>\*1</sup>Museo Provincial Carlos Ameghino, Belgrano 1700, Paraje Pichi Ruca (predio Marabunta), Cipolletti, 8300, Río Negro, Argentina,

E-mail: 89tamaranavarro@gmail.com, E-mail: nachocerda6@yahoo.com.ar

<sup>\*2</sup>Grupo vinculado al IANIGLA-CONICET, Museo de Historia Natural de San Rafael, Av. Ballofet s/n, frente al parque Mariano Moreno, CP5600 San Rafael, Mendoza, Argentina, E-mail: marcosjannello@hotmail.com

<sup>3</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

<sup>4</sup>Instituto de Investigación en Paleobiología y Geología, Sede Alto Valle-Valle Medio-Universidad Nacional de Río Negro, Av. Roca 1242, CP8332, Gral. Roca, Río Negro, E-mail: mbeguelink@gmail.com

## Resumen

La obtención de cortes delgados de restos óseos correspondiente tanto a materiales fósiles como arqueológicos suele ser una tarea poco sencilla, lo cual conlleva generalmente un elevado costo y tiempos prolongados. Por otra parte, la formación de un laboratorio con las características necesarias para la realización de protocolos ya establecidos es sumamente costosa. En este trabajo se presenta un protocolo alternativo para la obtención de cortes delgados de muestras óseas humanas de sitios arqueológicos con el objetivo de aplicarlo al análisis microestructural. Los procedimientos de obtención de cortes delgados que aquí se detallan están al alcance de laboratorios de reciente formación. En primer lugar, se midió y se registró con imágenes digitales un fémur, una tibia y una primera costilla de un individuo adulto procedente de un cementerio contemporáneo. Luego se extrajeron fragmentos de 1 cm de hueso. Con el material se confeccionaron réplicas y por último se obtuvieron los cortes delgados. Los resultados obtenidos fueron óptimos para la observación de las características microestructurales del hueso. Con los ajustes adecuados (tiempo de fraguado, granulometría del abrasivo de acuerdo a la dureza del material, impregnación, etc.) este protocolo podría ser utilizado para diversos tipos de muestras actuales, arqueológicas e incluso fósiles.

**Palabras claves:** Protocolo; Corte delgado; Restos óseos humanos; Histología.

## Abstract

Making thin sections from fossil and archaeological materials is usually a highly time consuming and expensive task. Also, the creation of a laboratory with necessary characteristics for the development of established protocols is also expensive. This paper presents an alternative protocol for obtaining thin sections of human bone samples from archaeological sites with the aim of applying it to microstructural analysis. The procedures for obtaining thin cuts that are detailed here are within the reach of newly formed laboratories. In the first place a femur, a tibia and a first rib in adult individual from a contemporary cemetery was measured and recorded with digital images. Fragments of 1 cm of bone were then extracted. Molds and casts of the extracted samples were prepared before thin section preparation. The obtained results were optimal for the observation of the microstructural bone features. With the appropriate modifications (set time, abrasive grading according to the hardness of the material, impregnation, etc.) this protocol could be useful for several kinds of samples (extant, archaeological and even fossil ones).

**Keywords:** Protocol; Thin section; Human bone remains; Histology.

El estudio de la microestructura ósea de vertebrados ha cobrado una notoria importancia en las últimas décadas, fundamentalmente en el campo de la paleontología (Chinsamy Turan 2005). Este interés también se ha visto reflejado en los estudios arqueológicos (Assis et al. 2016; Desántolo y Bernal 2016). En estos últimos,

se ha profundizado el estudio microestructural tanto de restos humanos como no humanos. En el caso particular de restos humanos, los estudios osteohistológicos han permitido explorar y complementar líneas de evidencia vinculadas a patologías (Ubelaker 1998), estimación de edad de muerte de los individuos (Desántolo 2012; Robling

Recibido 22-05-2017. Recibido con correcciones 02-11-2017. Aceptado 04-02-2018

y Stout 2008; Rösing et al. 2007; Singh y Gunberg 1970), procesos diagenéticos y tafonómicos sobre la estructura microscópica del hueso (Hollund et al. 2012; Jans et al. 2002; Lander et al. 2014; Schultz 2001).

Si bien existen protocolos ya establecidos tanto para la obtención de secciones delgadas en formas actuales como fósiles (e.g. Chinsamy y Raath 1992; Maat et al. 2001; Tiesler et al. 2006; Boer 2013; Padiam y Lamm 2015), la mayor parte de ellos consideran el empleo de equipamientos de alta precisión, los cuales presentan un elevado costo y son difíciles de obtener en grupos de investigación de reciente formación. En el caso particular de nuestro país, la obtención de cortes delgados de tejidos duros no suele llevarse a cabo por los investigadores, sino que son obtenidos a partir de la contratación de servicios especializados. La alta demanda y relativa escasa oferta de para efectuar dichos servicios se traduce en que los mismos suelen implicar altos costos monetarios y prolongados tiempos de espera para la obtención final de los resultados. Por otro lado, en general los protocolos establecidos para la obtención de muestras no incluyen los pasos a seguir para la restauración de las piezas a estudiar. Por estas razones, se considera de suma importancia la confección de un protocolo de trabajo que garantice la obtención de cortes delgados de máxima calidad, reduciendo costos, minimizando la alteración de las piezas, y a su vez recuperando la morfología inicial de las mismas. El objetivo de este trabajo es brindar una alternativa para la preparación de cortes delgados en tejido óseo humano no descalcificado. La aplicación de dicho protocolo no sólo se limita a material óseo contemporáneo, sino también a restos arqueológicos e incluso material fósil. Por tratarse de equipamientos e insumos de fácil adquisición en nuestro país, se pretende que el protocolo aquí detallado facilite la realización de este tipo de estudios, disminuyendo tanto los tiempos como los costos que actualmente insumen estos procedimientos.

## Materiales

Para el desarrollo de este protocolo se emplearon un fémur, una tibia y una primera costilla humanos correspondientes a individuos adultos procedentes del cementerio de la Chacarita (Ciudad Autónoma de Buenos Aires), cedidos oportunamente para fines de investigación (año 2011, asentados en el folio N°63/11 bajo el registro N° 836/11). Los materiales empleados durante todo el procedimiento se detallan en la tabla 1. La selección de esos tres elementos se basa en la comparabilidad de los resultados. La mayor parte de los estudios histológicos sobre material óseo humano arqueológico se ha realizado utilizando secciones del fémur (Maggiano et al. 2016; Hollund et al. 2012; Maat et al. 2001; Singh y Gunberg 1970) y en menor medida de la tibia (Nacarino Meneses et al. 2012; Gosman y Ketcham 2009). Recientemente se ha comenzado a explorar la microestructura ósea de la primera costilla, un elemento asociado la morfología torácica que suele presentar buena preservación en contextos arqueológicos, comparada con otros elementos (García Martínez et al. 2017).

Procedimiento	Insumos
Registro y documentación	Calibre (precisión 0,01 mm) Tabla osteométrica Cámara fotográfica
Obtención de muestras	Sierra de precisión (Taller metalúrgico Martínez Hnos.)
Restauración	Plastilina Caucho de Silicona Catalizador Vaselina sólida Resina acrílica con base acuosa (Ecocryl)
Obtención de secciones delgadas	Resina epoxi de dos componentes Endurecedor Desbastadora automática (Taller metalúrgico Martínez Hnos.) Polvo abrasivo (óxido de Zinc) Alcohol etílico Porta objetos Sierra de precisión (Taller metalúrgico Martínez Hnos.)

**Tabla 1:** Insumos utilizados, en cada una de las etapas, para la obtención de cortes delgados.

**Table 1:** Inputs used, in each of the stages, for obtain the thin section.

En cuanto al equipamiento, las muestras fueron procesadas con una sierra de precisión y una desbastadora automática, desarrolladas exclusivamente para nuestro laboratorio en una metalúrgica de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Figura 1). Ambas máquinas están fabricadas sobre cuerpos de aluminio fundido. Dicho material permite absorber vibraciones, lo que genera alineaciones óptimas. Esta característica presenta una importante ventaja con respecto a las máquinas fabricadas a partir de chapa plegada, las cuales generan un mayor grado de vibración, disminuyendo rápidamente la alineación del equipamiento.

La sierra de precisión posee un tope que permite regular el ancho de la muestra a cortar y mantener su paralelismo. La transmisión es a correa y el eje de la sierra gira a 2400 RPM. Tiene un motor normalizado y blindado de 0.75 HP y 2800 RPM. El disco de corte empleado corresponde a un disco diamantado MK-303 (Figura 1 a). En cuanto a las medidas de seguridad personal, la maquinaria se operó utilizando tapones para oídos, guantes de vinilo, guardapolvo y gafas protectoras.

La desbastadora automática consta de un plato de fundición de hierro gris, de 27,5 cm de diámetro y se fija al eje central de la máquina por un acople rápido cónico, para fácil limpieza e intercambio. Sobre este plato se fijó, mediante sellador de vidrio de uso doméstico, un vidrio circular del mismo diámetro. El eje porta plato está montado sobre rodamientos cónicos blindados por retenes de doble efecto (para evitar el ingreso de agua y la pérdida de la grasa que los lubrica). El resto de la máquina está construida con una aleación de aluminio fundido y acero inoxidable. Las piezas que son de acero no inoxidable tienen un baño para protegerlas de la oxidación. Además, cuenta con un motor de 1 HP por 1500 revoluciones por minuto. Debido a todas estas características el plato gira sin producir ningún desbalanceo ni vibración (Figura 1 b).

## Métodos

### Registro y Documentación

Como en numerosas prácticas arqueológicas y paleontológicas (e.g. extracción de muestras para datación, análisis isotópico, excavación, etc.), este procedimiento altera de manera permanente al elemento óseo, o su disposición en el sitio. En este sentido, se elaboró un registro previo de la morfología original de la pieza. Ello involucró la medición de sus dimensiones según los parámetros estándar (perímetros, diámetros y longitudes -Buikstra y Ubelaker 1994- ) y la obtención de imágenes digitales 2D<sup>1</sup>.

Considerando que el objetivo último es la aplicación del protocolo a material arqueológico, se recomienda la confección de una base de datos que incluya parámetros como: *procedencia, lateralidad, edad, sexo y antigüedad*. Se sugiere incluir una columna de "observaciones", destinada a registrar otros datos relevantes como valores isotópicos y estado de preservación, entre otras. A cada muestra debe asignársele un número identificadorio, el cual permita seguir al espécimen durante todas las etapas del proceso. Este número debería estar constituido por la fecha, número de proyecto, código de pieza y código del sitio de procedencia.

Se registraron imágenes digitales 2D de todas las normas de la pieza (Figura 2a, 2b). A partir de este tipo de imágenes es posible realizar análisis métricos. A su vez, pueden utilizarse para reconstruir un modelo 3D del elemento original mediante técnicas de la fotogrametría (ensamblaje digital a partir de imágenes 2D para la construcción de modelos 3D, basado en las relaciones matemáticas de la geometría proyectiva (Hassett y Lewis-Bale 2017; Katz y Friess 2014).

### Obtención de la muestra

Siguiendo las recomendaciones establecidos en los protocolos propuestos por Buikstra y Ubelaker (1994) y Cambra Moo et al. (2012), tanto para el fémur como la tibia, se seleccionó el centro de la diáfisis como sitio de muestreo, más específicamente a la mitad de la longitud máxima. En el caso de la primera costilla se tomó la región

<sup>1</sup> Existen numerosas alternativas de registro por imágenes. Por ejemplo radiografías o tomografías computadas. El acceso a las mismas depende de varios factores cuya discusión excede los objetivos de este trabajo. En el caso de materiales arqueológicos se recomienda el registro más exhaustivo posible.



**Figura 1:** Equipo: A Sierra de precisión. B Desbastadora automática.

**Figure 1:** Equipment: A Precision saw. B Automatic Picker.

inmediatamente posterior al tubérculo proximal debido a que es un landmark fácilmente reconocible y de buena preservación. Se extrajo, mediante el empleo de la sierra de precisión, un disco completo de aproximadamente 1 cm de ancho (Figura 2c). Para esto se efectuaron dos cortes transversales al eje longitudinal de la diáfisis. Luego se señaló con marcador indeleble la cara proximal para identificar de manera inequívoca el lado proximal y distal en la sección de hueso. El disco diamantado utilizado para cada corte permitió realizar una sección limpia y perder una cantidad de material despreciable (aproximadamente 1 mm), lo cual facilitó su restauración. Los elementos óseos no fueron tratados con ningún consolidante antes de efectuar los cortes.

### Restauración de la pieza

Con el objetivo de recuperar la integridad y el aspecto original de la pieza cortada y evitar la pérdida de landmarks valiosos, se realizaron tareas de restauración de los elementos óseos utilizados. Es importante considerar este aspecto desde el inicio de la planificación de un trabajo invasivo, ya que son actividades que generan cambios irreversibles en el material. El tipo de restauración está sujeto a numerosos factores que involucran las características del material a restaurar, los insumos, el equipamiento y el tiempo disponible para llevar a cabo las actividades.

Por ejemplo, un fémur perteneciente a un adulto es una pieza de gran tamaño que debe ser muestreada sólo en una porción, por lo que la restauración implica solamente el reemplazo del fragmento muestreado. Por su parte, el reducido tamaño de una falange hace imposible la extracción de una muestra, por lo que debe hacerse una restauración completa del elemento. Los materiales óseos utilizados en esta parte del trabajo difieren tanto en forma como en tamaño.

Se confeccionaron diferentes tipos de molde, de una y dos caras, adecuando su construcción a las características del elemento óseo calcado (huesos apendiculares y costilla, respectivamente). En el caso de la costilla, la réplica de dos caras tiene por objeto reproducir el elemento completo. Tal como se mencionó anteriormente, esto es particularmente útil en el caso de piezas de tamaño reducido. En el caso del fémur y la tibia, una vez realizada la extracción, se confeccionó un molde para calcar la forma del fragmento óseo extraído en cada caso.

Para el molde de dos caras se montó una base de plastilina donde se incluyó una de las caras del elemento, hasta lograr una inmersión del 50% de la pieza (Figura 2e). A su vez, se fabricó con plastilina una contención periférica para evitar el derrame de la silicona (Figura 2d). Luego de esto, se efectuaron una serie de perforaciones sobre la superficie de la plastilina que queda entre la pieza a muestrear y la contención periférica. El diámetro de dichas perforaciones osciló entre 5 y 10 mm con una profundidad similar (nunca atravesando por completo la base de plastilina). Su función consiste en generar una serie de protuberancias en una

de las caras del molde, las cuales servirán posteriormente como encastre para la segunda cara.

El producto utilizado para fabricar los moldes es un caucho de silicona RTV de dos componentes de consistencia semilíquida. Se utilizó un catalizador para fraguado y consolidación, en una proporción de 100 partes en peso de silicona a 4 partes de peso de catalizador. Por ejemplo, para el molde de una sección de fémur de 1cm de espesor se utilizó 50 g de silicona y 2 g de catalizador. Se lo mezcló lentamente para permitir la homogeneización de los materiales, evitando la generación de burbujas. Luego de un reposo de 15 minutos se vertió en el contenedor desde una altura mayor a 5 cm en una de las esquinas, para lograr una capa homogénea y sin burbujas, sobre la muestra. Se fraguó 24 horas y se repitió el procedimiento con la segunda cara. Para ello se utilizó como base la misma silicona consolidada y se pinceló sobre la superficie un desmoldante (en este caso, vaselina sólida), para evitar que ambas caras de la silicona queden adheridas entre sí. Debe derretirse previamente la vaselina para distribuirla correctamente sobre la superficie del molde y la muestra. Antes de verter el caucho de silicona para confeccionar la segunda cara del molde, se construyó una estructura cónica con plastilina, la cual quedó unida a una parte del elemento (Figura 2e). Dicha pieza cumple la función de generar el molde de un conducto, el cual, una vez finalizada la construcción del molde de toda la pieza, permite verter la sustancia que rellenará el molde y constituirá la réplica (e.g. yeso). Luego del fraguado del molde, se extrajo la pieza calcada (Figura 2f, 2g).

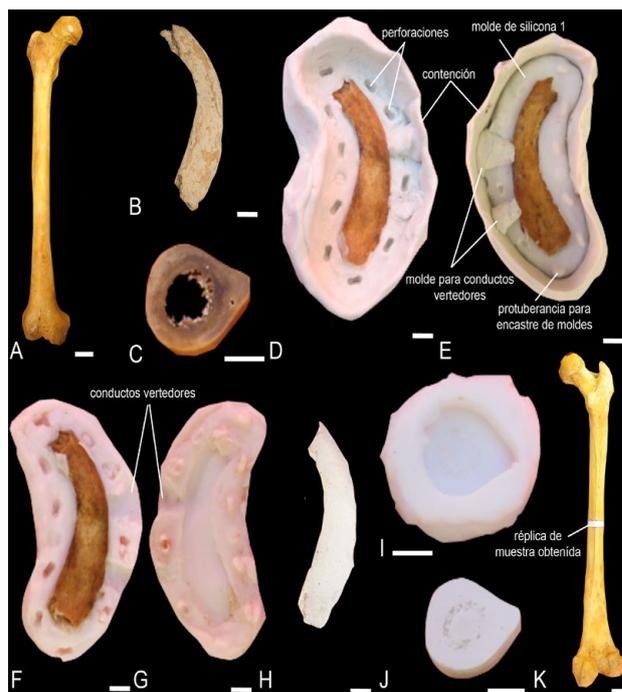
En el caso del fémur y la tibia, se desarrolló el mismo procedimiento, pero calcando el fragmento de forma completa (Figura 2i, 2j). Esto se logró apoyando la pieza en la base de plastilina y cubriendo con el caucho al 100%.

Para la confección de la réplica de la muestra obtenida a partir del fémur y de la tibia se empleó resina acrílica de base acuosa (marca Ecocryl) de dos componentes. Se mezclaron 2,5 partes de resina (versión en polvo) con una parte del componente líquido. Se removió lentamente hasta obtener una mezcla cremosa, homogénea y sin estrías. Luego se vertió la mezcla en el molde y se fraguó 24 horas antes del desmolde. En el caso de la costilla, se utilizó yeso (aunque es posible utilizar otros productos, como resina poliéster). El mismo fue vertido en a través de los bebederos confeccionados durante la fabricación del molde.

Finalmente, la réplica obtenida para el fragmento de fémur fue adherida a los dos fragmentos óseos con masilla epoxi de dos componentes para lograr la restauración de la pieza original (Figura 2k). Además de garantizar una adhesión firme y duradera, la masilla epoxi permite completar fácilmente la porción de la muestra eliminada durante el corte con la sierra de precisión (1 mm en este caso).

#### Inclusión en resina

Las muestras óseas se embebieron en resina epoxi de dos componentes (resina-DICAST LY 554 y endurecedor



**Figura 2:** Pasos de la obtención de réplicas de los elementos muestrados. A Fémur. B Costilla 1. C Muestra de diáfisis de fémur. D Base de plastilina con pieza a calcar (costilla en este caso). E Molde de caucho de silicona obtenido a partir de la base mostrada en D. F y G Moldes de dos caras con sus dos partes. H Réplica de costilla realizada en yeso. I Molde de una cara efectuado a partir de la muestra de fémur. J Réplica en resina de la muestra de fémur. K Fémur restaurado. Las escalas representan 3 (A, K) y 1 cm (B-I).

**Figure 2:** Steps of obtaining replicas of the sampled elements. A Femur. B Rib 1. C Femur diaphysis sample. D Base of plasticine with piece to trace (rib in this case). E Mold of silicone rubber obtained from the base shown in D. F and G Mold two faces with their two parts. H Replica of rib made in plaster. I One sided mold made from the femur sample. J Replica in resin the femur sample. K Restored femur. Scale represent 3 (A, K) and 1 cm (B-I).

DICURE HY 554) libre de solventes, de viscosidad media. Se utilizó una proporción de 20% del peso de la resina en endurecedor y se preparó en una temperatura no inferior a 20 °C. Para esto último se emplearon distintas fuentes de calor (e.g. estufa eléctrica).

Se dispuso cada muestra en un contenedor confeccionado con papel aluminio y se vertió la resina evitando en todo momento del procedimiento la formación de burbujas. La resina alcanzó su máxima dureza a 25-30°C en un período entre 24 y 36 horas. Para ello se utilizó la misma fuente de calor que para la preparación de la resina. El resultado final de este procedimiento es la obtención de una pastilla que contiene la muestra ósea inmersa en la resina consolidada (Figura 3)

#### Pulido y montaje

Mediante el empleo de la desbastadora automática, se pulió la cara de la pastilla que quedaría adherida al



**Figura 3:** Pastilla obtenidas a partir de la inclusión de la muestra en resina. Se muestran las caras pulidas.

**Figure 3:** Tablet obtained from the inclusion of the resin sample. The faces polished are shown.

portaobjetos. Para ello se empleó carburo de silicio de grano 400. Si el corte presentara muchas rugosidades es conveniente comenzar con una granulometría de 180. En el caso de cambiar la granulometría, es necesario lavar todas las partes, tanto de la desbastadora como el fragmento de hueso con detergente y cepillo. Esto impide la contaminación por diferente granulometría de polvo y evita de esta forma, microsurcos indeseados. Se utilizó un vaporizador de agua para humedecer la pasta y evitar que los materiales se secan. El movimiento de la pastilla se realizó desde el centro del plato hacia uno de sus extremos, para lograr un pulido homogéneo.

El empleo de una máquina desbastadora presenta la ventaja de reducir sensiblemente la duración de esta parte del procedimiento. Sin embargo, el pulido puede ejecutarse de forma manual sobre un vidrio, con movimientos “en forma de 8”.

Una vez realizado el paso anterior, se utilizó una mezcla de 40% resina + 10% endurecedor y 50 % alcohol para impregnar la pastilla. Se pinceló el material con sucesivas capas de la mezcla hasta saturarlo por completo, logrando que la resina penetre en todos los poros del material, confiriéndole mayor resistencia para el resto del procedimiento. Esta última tarea, así como el preparado inicial de la pastilla de resina, puede ser optimizada mediante el empleo de una bomba de vacío, la cual garantiza la ausencia de aire (burbujas) en el interior del preparado y acelera los tiempos de penetración de la resina al material.

Una vez impregnada la muestra, se desbastó nuevamente la superficie que quedaría adherida al portaobjeto para eliminar los restos de resina derramados en la impregnación. Se montó esa cara sobre un portaobjeto confeccionado especialmente para tal fin a partir de fragmentos de vidrio común (~3,5mm). Como adhesivo se colocaron de 3 a 4 gotas de la mezcla de resina epoxi y endurecedor sobre el vidrio y se aplicó presión a la pastilla evitando que se formen burbujas entre el vidrio y

la pastilla. Se prensó con broches del tipo aprieta papeles rebatibles metálicos (*binder clips*) para asegurar el montaje. El procedimiento finalizó cuando fraguó la resina, entre 24 y 36 horas después.

#### *Obtención de sección delgada*

Las muestras fueron seccionadas transversalmente mediante la sierra de precisión equipada con un disco diamantado, buscando obtener un espesor mínimo (en este caso, entre 1,5 y 3mm) para optimizar el tiempo dedicado al siguiente paso de reducción de espesor. Nuevamente se colocó el preparado en la desbastadora con una granulometría de 180 de polvo de carburo de silicio. En algunos caso el espesor final de la muestra se logró utilizando polvo de carburo de silicio de 400. En este punto, es importante, aplicar presión de manera homogénea sobre toda la superficie del preparado. De esta manera el acabado del preparado es uniforme.

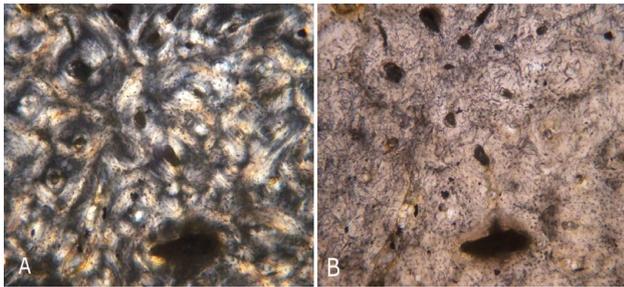
Al igual que en el desbaste previo al montaje, se vaporizó con agua durante el procedimiento. Se desbastó hasta alcanzar un espesor apropiado para estudios histológicos, observando el corte en repetidas oportunidades al microscopio de luz normal (Figura 4 b) y polarizada (Figura 4 a). El espesor óptimo depende de cada muestra y, como criterio general, es aquel que permite que la muestra sea atravesada completamente por la luz del microscopio. Por último se rotuló la muestra siguiendo el criterio explicitado anteriormente.

#### **Conclusión**

Los cortes obtenidos resultaron óptimos para la observación de las características microestructurales del hueso. La obtención de los mismos se efectuó sin utilizar equipamientos ni insumos muy costosos. Las dificultades encontradas residieron en el tiempo de fraguado de la resina al momento del embebido y de la impregnación de los materiales, extendiéndose más del esperado. En el primer caso, el problema fue resuelto aumentando la temperatura de la resina cuando ésta era mezclada con el endurecedor. En el segundo caso, la impregnación de resina y endurecedor con un 50% de alcohol facilitó la impregnación. No obstante, como se mencionó anteriormente, la mejor alternativa es el empleo de una bomba de vacío.

Este trabajo pone a disposición un protocolo completo para la obtención de cortes delgados de material óseo y su restauración, en un laboratorio de reciente formación, utilizando insumos y maquinaria completamente desarrollados en el país. Este procedimiento fue aplicado con éxito en muestras de material óseo humano procedentes de un cementerio actual.

El desarrollo de esta serie de pasos en una muestra actual permitió elaborar un protocolo que se podrá aplicar en muestras arqueológicas. No obstante, es necesario considerar las características de cada elemento (estado de preservación, fragilidad, etc.) y ajustar las proporciones



**Figura 4:** Corte delgado: A visto con luz polarizada. B Luz normal.

**Figure 4:** Thin section: A see with polarized light. B normal light.

de los insumos y/o la duración de cada paso.

La aplicación de este protocolo facilitará el desarrollo de estudios microestructurales de restos óseos humanos debido a su simpleza y bajo costo. Los datos histológicos ofrecen información valiosa para la evaluación de hipótesis relacionadas con procesos ontogenéticos, tafonómicos, demográficos, entre otros. En Argentina son una fuente de evidencia novedosa en los estudios bioarqueológicos que, en conjunto con otras líneas, permiten fortalecer la evaluación de hipótesis complejas.

Cipolletti, 22 de mayo de 2017

### Agradecimientos

A Alejandro Martínez, de "Metalúrgica Martínez y Hnos" por el asesoramiento con respecto a la maquinaria. A Jorge Bar (grupo Wikipaleo) y Alexandra Elbakyan por su contribución al acceso libre al conocimiento científico. A Carlos Muñoz por permitir el montaje de un laboratorio de cortes en instalaciones del Museo Provincial Carlos Ameghino de la ciudad de Cipolletti. A los revisores anónimos por sus valiosas contribuciones para mejorar este manuscrito. Los insumos para realizar este trabajo se financiaron mediante un Proyecto de Investigación PI-40-A-463 de la Universidad Nacional de Río Negro.

### Bibliografía

Assis, S., A. Santos y A. Keenleyside. 2016. Paleohistology and the study of human remains: past, present and future approaches. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 18(2), 1–17.

Buikstra, JE., DH. Ubelaker. 1994. Standards for data collection from human skeletal remains. Proceedings of a seminar at the Field Museum of Natural History. Organized by J. Haas. *Arkansas Archaeological Survey Research Series No. 44*

Cambra-Moo, O., CN. Meneses, MA. Rodríguez Barbero, O. García Gil, J. Rascón Pérez, S. Rello-Varona, MC. Martín y A. González Martín. 2012. Mapping human long bone compartmentalisation during ontogeny: A new methodological approach. *J. of Structural Biology* 178: 338-349.

Chinsamy, A., MA. Raath. 1992. Preparation of fossil bone for histological examination. *Palaeontologia Africana* 29: 39-44.

Chinsamy Turan, A. 2005. *The Microstructure of Dinosaur Bone*. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.

Desántolo B., V. Bernal. 2016. Los estudios de histología ósea en antropología biológica. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 18(2), 2015–2017.

Desántolo, B. 2012. "Validación metodológica para la estimación de edad en restos óseos humanos adultos: análisis histomorfométricos". Facultad de ciencias médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 187. Tesis Doctoral. SEDICI (Repositorio Institucional de la UNLP) <http://hdl.handle.net/10915/51327>.

Comparison of 3D Landmark and 3D Dense Cloud Approaches to Hominin Mandible Morphometrics Using Structure-From-Motion. *Archaeometry* 59 (1): 191-203

García-Martínez, D., García Gil, O., Cambra-Moo, O., Canillas, M., Rodríguez, MA., Bastir, M. y Gonzalez Martín, A. 2017. External and internal ontogenetic changes in the first rib. *American Journal Of Physical Anthropology* 1-13

Gosman, JH. y Ketcham, RA. 2009. Patterns in Ontogeny of Human Trabecular Bone From SunWatch Village in the Prehistoric Ohio Valley: General Features of Microarchitectural Change. *American Journal Of Physical Anthropology* 138:318–332

Hollund, H., M. Jans, M. Collins, H. Kars, I. Joosten y S. Kars. 2012. What happened here? Bone histology as a tool in decoding the postmortem histories of archaeological bone from Castricum The Netherlands. *International Journal of Osteoarchaeology* 22:537-548.

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

Katz, D., M. Friess. 2014. Technical Note: 3D From Standard Digital Photography of Human Crania-A Preliminary Assessment. *American Journal of Physical Anthropology* 154 (1): 152-158.

Lander, SL., D. Brits y M. Hosie. 2014. The effects of freezing, boiling and degreasing on the microstructure of bone. *HOMO-Journal of comparative human biology* 65, 131-142.

Maggiano IS., CM. Maggiano, JG. Clement, CDL. Thomas, Y. Carter, DML. Cooper. 2016. Three-dimensional reconstruction of haversian systems in human cortical bone using synchrotron radiation-based micro-CT: morphology and quantification of branching and transverse connections across age. *Journal of Anatomy* 228(5): 719-732.

Nacarino Meneses, C., O. Cambra-Moo, MA. Rodríguez Barbero y A. González Martín. 2012. Aportaciones de la paleohistología humana al estudio de los biomateriales. *Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio* 51 (6): 313-320.

Padian K., ET. Lamm. 2015. Bone histology of fossil tetrapods. Advancing methods, analysis, and Interpretation. University of California Press. 285 pp

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

Rösing, FW. M. Graw, B. Marré, S. Ritz-Timme, MA. Rothschild, K. Röttscher, A. Schmeling, I. Schröder y G. Geserick. 2007. Recommendations for the forensic diagnosis of sex and age from skeletons. *HOMO- Journal of comparative human biology*. 58. 75-89.

Schultz, M. 2001. Paleohistopathology of bone: a new approach to the study of ancient diseases. *Yearbook of Phys. Anthropology* 44, 106–147

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

Ubelaker, DH. 1998. *The evolving role of the microscope in Forensic Anthropology*. Reichs KJ, editor. Forensic osteology: advances in the identification of human remains. Springfield: CC. Thomas. P. 514-532.