



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **O Escrutínio Ósseo**

Uma abordagem histomorfométrica na  
estimativa da idade em Antropologia Forense

Ricardo Filipe Afonso de Melo Pessoa Gomes

---

2012



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## O Escrutínio Ósseo

### Uma abordagem histomorfométrica na estimativa da idade em Antropologia Forense

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Evolução e Biologia Humanas, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Eugénia Cunha (Universidade de Coimbra).

Ricardo Filipe Afonso de Melo Pessoa Gomes

2012



# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

RESUMO E PALAVRAS-CHAVE

ABSTRACT AND KEYWORDS

AGRADECIMENTOS

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<i>1.1. A Antropologia Forense no contexto Europeu</i>	6
<i>1.1.1. O caso português</i>	8
<i>1.2. Objectivos</i>	11
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
<i>2.1. Biologia do Tecido ósseo</i>	13
<i>2.1.1. Estrutura macroscópica do osso</i>	14
<i>2.1.2. Histomorfologia do tecido ósseo</i>	17
2.1.2.1. Células do tecido ósseo	18
2.1.2.2. Matriz extracelular	21
2.1.2.3. Remodelação óssea	24
<i>2.2. Estimativa da idade à morte em Antropologia Forense</i>	28
<i>2.2.1. Métodos morfológicos para a estimativa da idade em adultos</i>	32
<i>2.2.2. A microscopia na estimativa da idade de indivíduos adultos</i>	37

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<i>3.1. Caracterização da amostra</i>	47
<i>3.2. Material e Tratamento da Amostra</i>	50
3.2.1. <i>Maceração</i>	51
3.2.2. <i>Preparação para histologia</i>	56
3.2.3. <i>Análise histológica</i>	58
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
<i>4.1. Análise Microscópica</i>	65
<i>4.2. Análise com recurso ao scâner</i>	69
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>79</b>
<i>5.1. O problema da amostra</i>	80
<i>5.2 Análise microscópica</i>	83
<i>5.3. Análise com recurso ao scâner</i>	89
<i>5.4. Apreciação Global</i>	97
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>101</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>103</b>

**APÊNDICE A**

**APÊNDICE B**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b>	Alguns componentes principais usados para a estimativa da idade à morte com base na histomorfometria óssea: (1) osteónio completo; (2) osteónio do tipo 2; (3) fragmento de osteónio; (4) baía de reabsorção; (5) canal não Haversiano; (6) osso lamelar circunferencial e (x) tipo de osteónio que não pode ser descrito sem um campo de visualização mais alargado. (Adaptado de Erickson, 1991: 174).	40
<b>Figura 3.1.</b>	Representação do número de indivíduos estudados (contexto de autópsia e CEI/XXI) por classes etárias e sexo.	50
<b>Figura 3.2.</b>	Clavícula esquerda (CVL 4), em norma superior antes de submetida ao processo de maceração. É de destacar que não se consegue distinguir a presença de osso, à vista desarmada, uma vez que está completamente coberto por tecidos moles.	Estampa I
<b>Figura 3.3.</b>	Clavícula esquerda (CVL 4), em norma superior, após submissão ao processo de maceração. Toda a extensão do osso é observável, não existindo qualquer tipo de tecidos moles associados.	Estampa I
<b>Figura 3.4</b>	Clavícula esquerda humana, em norma posterior. (A) Localização aproximada da área de recolha da amostra; (B) Tuberosidade costal.	55
<b>Figura 3.5.</b>	Exemplo dos 4 campos de visualização microscópica capturados para cada uma das amostras.	59
<b>Figura 3.6</b>	Corte transversal de uma clavícula humana, pertencente a um indivíduo jovem. É possível observar as estruturas (A) osso lamelar circunferencial, (B) canal não Haversiano e (C) osteónio completo. Ampliação a 100x. Adaptado de Ingraham (2004: 5).	Estampa II
<b>Figura 3.7.</b>	Corte transversal de uma clavícula humana, pertencente a um indivíduo mais velho. É possível observar (A) reduzidas quantidades de osso lamelar circunferencial, (B) osteónio completo e (C) fragmento de osteónio. Ampliação a 100 x. Adaptado de Ingraham (2004: 5)	Estampa II
<b>Figura 4.1.</b>	Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x	Estampa III
<b>Figura 4.2</b>	Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.	Estampa III
<b>Figura 4.3</b>	Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.	Estampa III
<b>Figura 4.4.</b>	Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.	Estampa IV

<b>Figura 4.5</b>	Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.	Estampa IV
<b>Figura 4.6</b>	Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.	Estampa IV
<b>Figura 4.7.</b>	Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.	Estampa IV
<b>Figura 4.8.</b>	Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x	Estampa V
<b>Figura 4.9</b>	Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.	Estampa V
<b>Figura 4.10.</b>	Primeiro campo microscópico da amostra do indivíduo CVL 5, pertencente à faixa etária dos $\geq$ de 60 anos. Note-se a existência de inúmeras linhas transversais que impossibilitaram a selecção de qualquer tipo de estrutura. Ampliação de 50x.	Estampa V
<b>Figura 4.11</b>	Segundo campo microscópico da amostra do indivíduo CVL 5, pertencente à faixa etária dos $\geq$ de 60 anos. Note-se a existência de inúmeras linhas transversais que impossibilitaram a selecção de qualquer tipo de estrutura. Ampliação de 50x.	Estampa VI
<b>Figura 4.12.</b>	Terceiro campo microscópico da amostra do indivíduo CVL 5, pertencente à faixa etária dos $\geq$ de 60 anos. É o único exemplar passível de análise já que não apresenta estruturas impeditivas de análise. Ampliação de 50x.	Estampa VI
<b>Figura 4.13.</b>	Quarto campo microscópico da amostra do indivíduo CVL 5, pertencente à faixa etária dos $\geq$ de 60 anos. Note-se a existência de inúmeras linhas transversais que impossibilitaram a selecção de qualquer tipo de estrutura. Ampliação de 50x.	Estampa VI
<b>Figura 4.14.</b>	Distribuição da percentagem de osso não remodelado pelas 4 faixas etárias previamente estabelecidas. N= 4	67
<b>Figura 4.15.</b>	Distribuição da percentagem de osso não remodelado por faixa etária, tendo também em consideração a análise do observador número 1 em dois momentos diferentes e a análise do observador número 2.	68
<b>Figura 4.16.</b>	Distribuição da área cortical relativa, em percentagem, pelas diferentes faixas etárias. N=18	70
<b>Figura 4.17.</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 9 correspondente ao indivíduo mais jovem (29 anos; ♂). É possível observar a selecção da área total (122,23 mm <sup>2</sup> ) pelo observador número 1, num primeiro momento.	Estampa VII
<b>Figura 4.18.</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 9 correspondente ao indivíduo mais jovem (29 anos; ♂). É possível observar a selecção da área medular (41,54 mm <sup>2</sup> ) pelo observador número 1, num primeiro momento.	Estampa VII

<b>Figura 4.19.</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 5 correspondente ao indivíduo mais idoso (92 anos; ♀). É possível observar a selecção da área total (127,58 mm <sup>2</sup> ) pelo observador número 1, num primeiro momento.	Estampa VII
<b>Figura 4.20.</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 5 correspondente ao indivíduo mais idoso (92 anos; ♀). É possível observar a selecção da área medular (50,59 mm <sup>2</sup> ) pelo observador número 1, num primeiro momento.	Estampa VII
<b>Figura 4.21</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 13 (43 anos; ♂) correspondente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a selecção da área total (103,06 mm <sup>2</sup> ) pelo observador número 1, num primeiro momento.	Estampa VIII
<b>Figura 4.22.</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 13 (43 anos; ♂) correspondente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a selecção da área medular (35,25 mm <sup>2</sup> ) pelo observador número 1, num primeiro momento.	Estampa VIII
<b>Figura 4.23.</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 1 (56 anos; ♀) correspondente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a selecção da área total (76,03 mm <sup>2</sup> ) pelo observador número 1, num primeiro momento	Estampa VIII
<b>Figura 4.24.</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 1 (56 anos; ♀) correspondente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a selecção da área total (76,03 mm <sup>2</sup> ) pelo observador número 1, num primeiro momento.	Estampa VIII
<b>Figura 4.25.</b>	Distribuição da área cortical relativa masculina e feminina, em percentagem, pelas várias faixas etárias. N♂= 10 e N♀= 8.	72
<b>Figura 4.26.</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 3 (72 anos) pertencente a um indivíduo do sexo masculino, alocado na faixa etária dos ≥ 60 anos. É possível observar a selecção da área total (125,88 mm <sup>2</sup> ) elaborada pelo observador número 1, num primeiro momento.	Estampa IX
<b>Figura 4.27.</b>	Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 10 (71 anos) pertencente a um indivíduo do sexo feminino, alocado na faixa etária dos ≥ 60 anos. É possível observar a selecção da área total (113,14 mm <sup>2</sup> ) elaborada pelo observador número 1, num primeiro momento.	Estampa IX
<b>Figura 4.28.</b>	Distribuição da área cortical relativa, em percentagem, por faixa etária, tendo em consideração a análise do observador número 1 em dois momentos diferentes e a análise do observador número 2.	76
<b>Figura 5.1.</b>	Linha de regressão linear que cruza a variável idade (eixo yy) com o logaritmo da percentagem de osso não remodelado (eixo xx). Adaptado de Ingraham (2004: 19).	86
<b>Figura 5.2.</b>	Associação entre a área cortical relativa (Ct.Ar/Tt.Ar) e a idade à morte em African-American (A-A) e European-American (E-A). Não importa tanto constatar as interacções entre os grupos, mas sim a relação da área cortical com a idade. Adaptado de Cho e colaboradores (2006: 15)	92
<b>Figura 5.3.</b>	Distribuição da área cortical relativa, em percentagem, pelas diferentes faixas etárias, com a linha de tendência linear, meramente informativa e não vinculativa, que mostra graficamente a tendência dos dados. N=18	94



## ***ÍNDICE DE TABELAS***

<b>Tabela 4.1.</b>	Aplicação da fórmula desenvolvida por Ingraham (2004) aos resultados da percentagem de osso não remodelado obtidas pelos dois observadores, com o devido desvio padrão associado.	69
<b>Tabela 4.2</b>	. Distribuição das áreas corticais, medulares e totais pelas faixas etárias. Atende-se ainda para a média de idades por intervalo etário, bem como o número de indivíduos que se aloca em cada um deles.	71
<b>Tabela 4.3.</b>	Distribuição das áreas corticais, medulares e totais pelas faixas etárias, em indivíduos do sexo masculino. Atende-se ainda para a média de idades por intervalo etário, bem como o número de indivíduos que se aloca em cada um deles.	75
<b>Tabela 4.4.</b>	Distribuição das áreas corticais, medulares e totais pelas faixas etárias, em indivíduos do sexo feminino. Atende-se ainda para a média de idades por intervalo etário, bem como o número de indivíduos que se aloca em cada um deles.	75



## **RESUMO**

A idade à morte é um dos parâmetros a ser estimado pelo antropólogo forense, aquando da construção do perfil de um determinado indivíduo. O objectivo de tal análise é tentar estabelecer uma relação entre a idade cronológica e a idade biológica dos resquícios ósseos. São várias as metodologias utilizadas, sendo que a abordagem morfológica, se apresenta como mais recorrente, pois é, de certa forma, mais intuitiva. Contudo, os métodos microscópicos podem, em determinadas situações, revelar-se de extrema utilidade. A estimativa da idade em adultos baseia-se na observação da senescência intrínseca ao indivíduo. Este processo fisiológico tem bases celulares, logo não é de estranhar que a histologia tenha vindo a ser usada como ferramenta para aceder às microestruturas, que permitem estabelecer uma relação com a idade. O ponto fulcral deste projecto é testar a aplicabilidade da histomorfometria óssea na estimativa da idade, através do uso de metodologias práticas e de fácil execução. Esta investigação pretende, com base numa amostra forense de clavículas provenientes de 18 indivíduos, 10 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, estabelecer uma relação entre a idade à morte e dois componentes histológicos, a percentagem de osso não remodelado e aérea cortical relativa.

Os resultados obtidos foram altamente condicionados pelo número da amostra tendo um carácter preliminar. Não foi possível estabelecer uma relação entre a percentagem de osso não remodelado e a idade, devido a um conjunto de situações condicionantes. Em relação à área cortical relativa, foi possível observar que esta exhibe uma tendência para diminuir em indivíduos mais velhos, já que segundo os resultados obtidos, as principais diferenças encontram-se nos dois extremos etários. Os indivíduos mais jovens apresentam uma área cortical relativa superior (63,66%) quando comparados aos indivíduos mais velhos (57,96%). Esta variável parece ser ainda influenciada pelo sexo, chegando mesmo a existir, no grupo etário dos 40 aos 49 anos, uma diferença de aproximadamente 16%. Sempre que possível, os resultados obtidos, ou a falta destes, foram analisados criticamente, sendo que o condicionamento da amostra revelou-se um grande impedimento ao presente estudo. Um balanço geral da metodologia usada, quer ao nível da preparação para a histologia, quer na análise microscópica e com recurso ao scâner. Esta última revelou-se de mais fácil aplicação, embora careça de resultados mais fidedignos. O desenvolvimento de investigações, que visem a aplicação da histologia na estimativa da idade, é um processo premente e basilar, dado existirem empiricamente menos estudos na área, comparativamente aos métodos morfológicos. Deste modo, pensa-se que apesar dos resultados obtidos, novos projectos poderão ser alcançados, com base na temática em estudo.

**Palavras-Chave:** Histomorfometria; idade à morte; biologia do esqueleto; clavícula; ciência forense.



## ***ABSTRACT***

Age at death is one of the key objectives that need to be estimated by the forensic anthropologist, when building the profile of an individual. The aim of this analysis is to establish a relationship between chronological age and the age observed in human skeletal remains. Several methods are used for this purpose, and the morphological approach seems to be the most recurrent, because somehow it is more intuitive. However, the microscopic methods can, under certain circumstances, be extremely useful. The age estimation in adults is based on the observation of the natural senescence, inherent to the individual. This physiological process has a cellular basis, so it is not unpredictable that histology has been used as a tool to access these microstructures, which ultimately may be related with age. The main goal of this project is to test the applicability of bone histomorphometry in the estimation of age at death, through the use of methods that are, at its core, practical and easy to perform. The current investigation is based on forensic samples of clavicles from 18 individuals (10 females and 8 males). It was intended to establish a relationship between age at death and two histological components, the percentage of unremodeled bone and the relative cortical area.

The results were highly conditioned by the sample. Therefore emphasis is placed in the preliminary character of those. It was not possible to establish an association between the percentage of unremodeled bone and age at death, due to a set of circumstances that restricted all the analysis. Regarding the analysis of the cortical relative area, it was possible to verify that this component presents a downward trend in older individuals, since the main differences were found in extreme ages. Thereby younger individuals present a higher value of cortical area (63,66%) when compared with older individuals (57,96%). This variable seems to be sex-related, since in the age group of 40 to 49 years, it was possible to verify about 16% of difference between sexes. Whenever possible, all the results, or the lack of them, were critically analyzed. It is important to state that the sample size was a major drawback to this study. Nevertheless it was still possible to come up with some hypotheses that may in theory explain the results. A general deliberation of the methodology used was performed both in terms of the preparation for histology as well as towards the analysis of the microstructures per se. The examination that used the scanner proved to be easier to implement, although it lacks of reliable results. The development of investigations concerning the application of histology in age at death estimation is an urgent and fundamental process, since there are empirically fewer studies in the area when compared to macroscopic approach. Thus, in spite of the results we think that a path was opened to the enlargement of future studies that use histology as a tool for age estimation in a Portuguese sample.

**Key-words:** Histomorphometry, age at death; skeletal biology; clavicle; forensic science.



## **AGRADECIMENTOS**

*Os percursos que seguimos nem sempre são aqueles com os quais sonhamos, mas gosto de acreditar que tudo acontece por um motivo. Por este mesmo facto creio que as pessoas que fui conhecendo ao longo da minha vida me fizeram quem sou hoje. A todas elas, e em especial àquelas que nunca desistiram de mim e sempre me encorajaram, posso dizer que sem vocês não estaria a realizar esta nova etapa da minha vida, só me resta dizer **MUITO OBRIGADO!!***

Em primeiro lugar cabe-me agradecer à *Professora Doutora Eugénia Cunha* por ter embarcado comigo na aventura que foi a realização deste projecto. Agradeço-lhe o facto de me ter dado a conhecer verdadeiramente o fascinante mundo da Antropologia Forense, e sobretudo por me inspirar, quiçá, um dia poder vir a ser um excelente profissional como ela própria.

A todos os professores do “Departamento de Antropologia”. Perdoem-me mas não posso deixar de salientar os docentes do Mestrado em Evolução e Biologia Humanas, porque todos eles sem excepção me ajudaram neste percurso através da partilha de conhecimento. Um obrigado especial à Professora Ana Maria Silva, Ana Luísa Santos e Cláudia Umbelino.

Não podia deixar de agradecer ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF, IP) nas pessoas do Professor Doutor Jorge Costa por gentilmente ter autorizado o meu pedido para a recolha de material cadavérico; à Professora Doutora Cristina de Mendonça por que sempre se demonstrou disponível para a resolução de qualquer questão logística; à Dra Ana Cátia Sequeira e ao Dr. Carlos Pontinha porque meteram realmente as “*mão na massa*” para me ajudarem na execução deste estudo.

Ao Professor George Maat agradeço a amabilidade e a disponibilidade com que sempre me ajudou.

Agradeço ao Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra, à Professora Doutora Ana Luísa Carvalho e à Técnica Superior Luísa Cortês, porque gentilmente me cederam o microscópico para o meu estudo, e me esclareceram um manancial de dúvidas.

A todos os Doutores ou futuros Doutores em Antropologia, Vítor Matos, Francisco Curate, Sandra Assis e Carina Marques, muito obrigado por me mostrarem que é possível sonhar com um futuro em Antropologia. Agradeço especialmente à Carina, porque mesmo completamente absorta conseguiu dar-me sugestões de uma enorme mais-valia!

À D. Lina e à D. Célia, porque me aturam há cinco anos nas minhas incessáveis pesquisas bibliográficas. Muito obrigado pela simpatia, e carinho que fez com que a Biblioteca do Departamento fosse durante muito tempo a minha segunda casa!

Ao Gonçalo Carnim e ao David Navega agradeço além da companhia nas viagens, a troca de conhecimento (científico ou não) que em muito influenciou o rumo que o presente projecto tomou, e porque me ensinaram que “*A Antropologia Forense não se ensina, aprende-se*”!!

A todos os *Juliomatenses* Anita, Christina, Inês, Liliana e Tiago muito obrigado pelas imensas horas que partilhamos, com intermináveis brincadeiras, com a partilha de conhecimento, mas sobretudo pela amizade, e por se terem tornado pessoas muito importantes para mim, das quais atrevo-me a dizer já sinto falta!! Além de vos agradecer só vos posso desejar toda a sorte do mundo!!!

À Ana Cláudia, à Beta e à Vânia agradeço a companhia ao longo destes 5 anos, e porque sempre estiveram lá para mim, e sempre me apoiaram, e porque sei que as levarei comigo para o resto da minha vida. Ana, muito obrigado pelas nossas conversas sabes como gosto delas; Betinha obrigado pela amizade, pela compreensão e por sempre me teres encorajado; Vânia porque adoro teimar contigo e ter razão!

À Ivone e ao Richard, agradeço o companheirismo, a amizade e a ajuda. Sim porque nunca me vou esquecer de ti Ivone, por tudo que és, fazes e dizes, terás sempre um lugar aqui, e muito obrigado por sempre conseguires arrancar um sorriso de mim. Aquela aula de Antropologia Dentária tem um lugar especial na minha memória... Richard, chimpanzés *track-track*!!

Agradeço muito às minhas “*macaquinhas*” preferidas. Joana e Renata vocês provaram-me que não são precisos anos de convivência para uma amizade ser forte. Obrigado pro toda a ajuda neste processo, pela partilha não só do conhecimento mas de histórias de vida. Renata obrigado por seres das poucas que partilha a minha visão do mundo aprendi muito contigo e com a pessoa fantástica que és! Joana só posso dizer obrigado por me compreenderes na íntegra!!

Cátia, obrigado por tudo! Pelos momentos que passamos, pelas coisas que vivemos, e por teres entrado na minha vida, fizeste de mim uma outra pessoa, e sei que posso contar com a tua amizade, sempre! Não sei muito bem o que nos reserva o futuro, só sei que te levarei comigo para onde for!!

Sindia, se fosse agradecer tudo o que já fizeste por mim não chegariam as páginas todas desta tese. Obrigado por nunca teres desistido de mim, por me acompanhares numa jornada que dura há 13 anos. Não tenho palavras para descrever o quão me ajudaste neste processo, e me tens ajudado ao longo da minha vida. Agradeço-te a eterna amizade, a paciência para lidar comigo nos dias menos bons e a sinceridade de sempre me dizeres o que pensas. Obrigado por tudo o que vivemos, bom e mau, que sem dúvida nos talhou nas pessoas que somos hoje, e principalmente obrigado por existires!!

À minha família, avós, e principalmente aos meus pais, que entenderam as minhas ausências em momentos importantes, e fizeram tudo ao seu alcance para eu poder escrever estes agradecimentos e encontra-me nesta fase da minha vida! Obrigado por me terem dado todas as oportunidades que conseguiram e por me apoiarem em todas as minhas decisões. Não sei o que seria de mim sem vocês!!

Agradeço a todos aqueles de quem eu possa eventualmente ter-me esquecido, porque a sanidade já não me o permitiu, peço desculpas!!

***Hic Locus est ubi mors  
gaudet succurrere viate***

“Aqui é o lugar onde a morte  
se alegra em ajudar a vida”



**1**

**Introdução**



A Antropologia é, como a define Soares (2008), a “*arte antiga*” de conhecer o homem. Definir a Antropologia não será com certeza tarefa fácil, contudo a necessidade sistêmica das ciências parece obrigar os antropólogos a exprimirem a aplicação dos seus conhecimentos, de forma a elucidar qual o cerne da sua ciência. Optando por uma abordagem mais purista, e com base na própria origem etimológica da palavra (*anthropos* e *logos*, ou seja a ciência do homem) a Antropologia é restringida ao estudo do homem e dos grupos humanos contemplando a sua dimensão biológica, social e cultural (Beauthier *et al.*, 2008; Kranioti e Paine, 2011). Esta ciência mergulha assim num oceano muito vasto. Se por um lado é classificada como um “*ofício recente*” (Soares, 2008), por outro as provas da sua relevância são incontornáveis. Esta disciplina tem vindo a aplicar grandes esforços para responder a um sem número de questões, que desde sempre consternaram aqueles que deram o seu nome à fé que é a ciência. De Aristóteles até hoje, a preocupação em definir o homem como ser vivo, em saber qual a sua origem, quais as normas que o regem e de que forma encara a imprevisibilidade, é uma necessidade intrínseca a todas as áreas do conhecimento. A Antropologia nasce então de um acumular de saberes dos mais diversos campos e tem-se vindo a afirmar no meio académico e científico.

O homem, a sua origem e evolução, os seus caracteres físicos, psíquicos e comportamentais, as suas relações com o meio, as práticas sociais adquiridas e transmitidas, fazem com que áreas com especificidades naturalmente distintas se interliguem de uma forma paradoxalmente harmoniosa e controversa. Desta forma, a antropologia dá resposta a uma das grandes questões da humanidade, que não é mais do que o seu reflexo no espelho (Colleyn, 2008; Soares, 2008; White *et al.*, 2012). Assim, é totalmente perceptível que a disciplina tenha sofrido ao longo dos tempos, fortes

rupturas e estranhas acoplagens, dotando a Antropologia de um grande poder metamórfico.

Optando por uma divisão clássica e estanque, a Antropologia pode ser dividida em dois grandes campos de acção, entre eles destacam-se a Antropologia Social e Cultural, e a Antropologia Física ou Biológica. A primeira tem claras preocupações etnográficas, onde a questão gira em torno da alteridade com que se olha o mundo. A segunda foca-se nas características biológicas e somáticas, com um interesse particular na evolução e na variação humana (Adams, 2007; Soares, 2008; Kranioti e Paine, 2010; White *et al.*, 2012; Quintais, 2009). Cabe ao investigador perceber que a não interligação destas “*subáreas*” é pura ilusão, e que por mais que se tente, nunca se conseguirá dissociar o ser humano em duas entidades distintas. Existimos como seres biológicos e culturais, somos o produto de milhões de anos de evolução e filhos do acaso (Cunha, 2010).

Apesar de toda esta questão ser bastante pertinente, não é objectivo do presente trabalho abordar as problemáticas de uma Antropologia dita moderna, interessa perceber que existe um passado, uma história e uma raiz, que não podem ser esquecidas. Dito isto, o presente projecto debruça-se num dos campos que, sem dúvida, sofreu um exponencial destaque na última década, a Antropologia Forense (Ubelaker, 2006).

A investigação da morte e todo o processo médico-legal que lhe está intrínseco, envolve indubitavelmente a colaboração de várias áreas do conhecimento. Consoante o tipo de situação com que o médico patologista se depara, pode surgir a necessidade de pedir a colaboração de diferentes especialistas que irão auxiliar ao nível da linha de investigação (Kemkes-Grottenhaler, 2001; Cunha e Mendonça, 2002; Pinheiro *et al.*, 2004; Pinheiro, 2006). A análise de restos humanos esqueletizados é um problema chave para os médicos forenses e é para tentar responder a estas necessidades, que a Antropologia Física se alia ao mundo médico-legal (Kemkes-Grottenhaler, 2001)

Seguindo este fio condutor, e na opinião de vários autores, considera-se que a Antropologia Forense tem as suas raízes intimamente conectadas à Antropologia Física, de tal modo que, muitos a consideram como uma subdisciplina desta (Snow, 1982; Krogman e Iscan, 1986; Reichs, 1998; Stanford *et al.*, 2006; Komar e Buikstra, 2008; Byers, 2010). Uma das primeiras definições da aplicação dos conhecimentos da osteologia humana ao contexto médico-legal é delineada por T. Dale Stewart quando diz “*forensic anthropology is the applied branch of physical anthropology that deals*

*with the identification of more or less skeletonized human remains for legal purposes*” (Stewart, 1979: 169).

Os primeiros passos da disciplina estão intimamente ligados ao anatomista Thomas Dwight, que em 1878 escreve *The Identification of the Human Skeleton: A Medico-Legal Study*, sendo por este motivo considerado por muitos como o pai da Antropologia Forense. Porém, só com o desenrolar da Segunda Guerra Mundial a disciplina começa a ganhar um sentido de organização, e é nesta altura que os patologistas começam a perceber a utilidade dos conhecimentos do antropólogo. Na realidade o reconhecimento formal da Antropologia Forense surge na América do Norte, quando em 1972 é implementada dentro da *American Academy of Forensic Sciences* (AAFS) a secção de Antropologia Física (Snow, 1982; Reichs, 1998; Ubelaker, 2006; Ubelaker, 2008; Byers, 2010).

Nas últimas duas décadas, desde a criação da secção de Antropologia Física na AAFS, a Antropologia Forense tem sofrido mudanças e reestruturações bastante significativas. Um dos principais factores responsáveis pelo evoluir desta disciplina, prende-se com uma mudança de pensamento por parte da comunidade médico-legal, que compreende cada vez melhor qual o papel do antropólogo forense e em que medida este pode vir a ser útil ao longo do percurso da investigação (Simmons e Haglund, 2005; Beauthier *et al.*, 2008; Byers, 2010). Este reconhecimento por parte do mundo médico-legal deve-se sobretudo, quando num período recente, a Antropologia Forense reitera o seu lugar enquanto ciência e dá provas do seu valor em situações cujo impacto é indiscutível. Circunstâncias como: crimes de guerra, caracterizados por uma forte índole social; contextos de violação de direitos humanos, como o caso do Ruanda, de Timor e da Serra Leoa; contextos associados aos desastres massivos provocados por terrorismo, como o mediático ataque sob as torres gémeas em Nova Iorque; e ainda aqueles provocados por causas naturais, como o tsunami Asiático ou o furacão Katrina, ressaltam a clara necessidade da presença do antropólogo, possuidor de conhecimentos fulcrais para a investigação forense (Reichs, 1998; Stanford *et al.*, 2006; Black, 2008; Cattaneo, 2007; Ubelaker, 2010b).

Deste modo, é possível afirmar que a Antropologia Forense trabalha em paralelo com a Patologia, no que aos vestígios humanos concerne. Se por um lado o médico forense lida com cadáveres humanos provenientes de cenas de crime, por norma com

um grau de preservação razoável, ou seja com uma quantidade considerável de tecidos moles, por outro, o antropólogo forense lida com os remanescentes ósseos, sendo estes por vezes as únicas evidências físicas da existência de um indivíduo (Klepinger, 2006; Cattaneo, 2007). A grande diferença, associada de certa forma ao estado de preservação do cadáver com que cada um dos profissionais interage, pauta-se segundo autores como Krogman e Iscan (1986) ou Stanford e colaboradores (2006), pelo facto de o antropólogo forense estar imbuído de uma perspectiva altamente focada nos tecidos duros. Assim, os antropólogos têm uma perspectiva mais abrangente da variação humana, inclusive no que respeita à própria osteologia. A noção de selecção natural, já que a morfologia do esqueleto, humano ou não, está amplamente relacionada com a sua função durante a vida e com a história evolutiva do indivíduo, está muito presente para a maioria destes profissionais. Tudo isto enfatiza a capacidade dos antropólogos na reconstrução de acontecimentos passados a partir dos elementos, em teoria menos informativos de um indivíduo, os resquícios ósseos.

Na opinião de Cunha e Cattaneo (2006) existem várias áreas onde a presença do antropólogo é necessária, e até mesmo indispensável, particularmente em situações onde seja imperativo proceder à recuperação de restos humanos e à sua posterior identificação. Na verdade, a própria definição desta ciência, já quando avançada por Stewart em 1979, remete para a questão da identificação e da identidade. Desde a sua aurora, que a Antropologia Forense tem como questão central a identificação, com base nos seus restos esqueléticos. Logo, o seu principal objectivo é, em última instância, fornecer aos organismos competentes, um perfil que possa ser confrontado com uma lista de desaparecidos, limitando o número de casos a examinar (Black, 2008; Byers, 2010).

Este perfil que o antropólogo analisa, consiste na observação de determinadas características esqueléticas que permitam fornecer dados para uma identificação positiva ou pelo menos que permitam uma exclusão segura. Classicamente são analisados num esqueleto quatro grandes parâmetros, o sexo, a idade, a estatura e a afiliação populacional, que em conjunto designam o perfil biológico do indivíduo (Krogman e Iscan, 1986; Schwartz, 1993; Reichs, 1998; Cunha e Cattaneo, 2006; Stanford *et al.*, 2006; Knudson e Stojanowski, 2008; Komar e Buikstra, 2008; Ubelaker, 2008; Pickering e Bachman, 2009; Byers, 2010; Ubelaker, 2010b; White *et al.*, 2012).

De ressaltar que apesar de se atribuir a este conjunto o nome de perfil biológico, este não é mais do que uma investigação da morfologia de determinadas características ósseas, por norma só acessíveis ao conhecimento do antropólogo, e que o auxiliam no processo de identificação.

Embora o processo de estabelecimento do perfil biológico e a subsequente identificação do indivíduo sejam um dos pontos-chave do trabalho do antropólogo forense, não são o único. Apesar de já em 1986 Krogman e Iscan discutirem as potencialidades da Antropologia Forense, muito para além da identificação, só na última década esta disciplina tem sido capaz de responder a um novo conjunto de questões e necessidades. Por um lado a introdução de novos conceitos, como a implementação dos métodos de recolha da arqueologia forense, o contexto tafonómico envolvente, entre outros, fez com que os antropólogos começassem a auxiliar na descoberta da cena de crime e em todo o processo de recuperação dos restos humanos (Cunha e Cattaneo, 2006; Cattaneo, 2007; Dirkmaat *et al.*, 2008; Komar e Buikstra, 2008; Ubelaker, 2010b).

Ainda de acordo com os autores supracitados, outra contenda a que os antropólogos se propõem está relacionada com o tempo decorrido desde a morte, é sabido que quanto mais antigos os remanescentes, mais difícil é avançar com uma resposta sobre a estimativa do intervalo *post mortem* (PMI<sup>1</sup>). Esta é de facto uma das questões mais difíceis de responder em Antropologia Forense, uma vez que há empiricamente uma ausência de métodos para estimar este parâmetro. Para além de poder dizer se os restos esqueléticos em análise são modernos ou arqueológicos, o antropólogo pode ainda elaborar uma crítica tafonómica, para ajudar a estimar este parâmetro. Como áreas auxiliares à determinação do PMI, entram então as análises químicas e a Entomologia Forense.

Além da grande importância que o conhecimento da tafonomia e da arqueotanatologia (Duday, 2006) forneceram à disciplina, existe um outro contexto que tem vindo a alargar o campo de acção desta ciência. A análise dos traumatismos ósseos tem-se apresentado como uma fonte de informação relevante para a investigação forense, que não estando ao acesso de todos, coloca os antropólogos numa excelente posição para a realização deste tipo de estudos (Byers, 2010). Assim, e de acordo com

---

<sup>1</sup> *Post mortem* interval

<sup>2</sup> ARF - Acrónimo para as palavras em inglês *activation, resorption e formation*.

Komar e Buikstra (2008), os antropólogos forenses trabalham lado a lado com os patologistas para auxiliar na determinação da causa de morte através da análise de determinado tipo de traumas e fracturas esqueléticas.

Mais recentemente a Antropologia vê-se envolvida na investigação de uma nova realidade. Casos de determinação da idade de indivíduos indocumentados, circunstâncias relacionadas com a questão da imputabilidade e ainda contextos de pedopornografia parecem ser os campos de maior actuação do antropólogo forense, a este nível (Cunha e Cattaneo, 2006; De Angelis e Poppa, 2006; Cattaneo, 2007).

O papel do antropólogo é, hoje em dia, portador de uma grande responsabilidade acrescida. A necessidade de manter uma integridade científica na investigação, e a consciência das convicções legais subjacentes à sua investigação, sobretudo porque o seu trabalho se desenrola em prole de uma sociedade, não pode ser descurada, uma vez que existem pesadas responsabilidades que de tal facto crescem (Simmons e Haglund, 2005). Em verdade, é por este motivo que o presente projecto tem no seu âmago a centelha da Antropologia Forense. Existe uma linha de investigação que precisa ser estudada, com o intuito de contribuir para um melhoramento no modo de fazer ciência, tendo em vista a comunidade e sobretudo o indivíduo. Para tal, é necessário estar bem situado relativamente às diversas formas como esta disciplina é praticada por todo o globo, nomeadamente na conjuntura Europeia, já que é nesta que o presente estudo se desenrola.

### ***1.1. A Antropologia Forense no contexto Europeu***

A Antropologia Forense sofreu algumas alterações ao longo dos últimos anos, contudo o seu desenvolvimento não se deu de forma homogénea a nível mundial. De um modo geral, não é incorrecto dizer que o palco por excelência da Antropologia Forense, tal como se conhece nos dias de hoje, é a América do Norte, mais concretamente os Estados Unidos da América (Ubelaker, 2006). É ainda a *American Academy of Forensic Sciences*, um dos organismos mais solenes no que ao mundo das ciências forenses diz respeito, que actualmente avança com uma das definições de Antropologia Forense mais difundidas- "*Forensic anthropology is the application of the*

*science of physical or biological anthropology to the legal process. Physical or biological anthropologists who specialize in forensics primarily focus their studies on the human skeleton”* (<http://www.aafs.org/>).

Uma questão que precisa ser respondida, quando se fala em assimetrias globais na prática de uma dada disciplina, prende-se com os praticantes dessa mesma disciplina. É necessário saber quem são e como agem, ou seja, é necessário saber quem é o antropólogo forense. Segundo Cattaneo (2007) não importa tanto definir, ao nível do *background* (Medicina, Antropologia, Biologia, entre outras), quem adopta as práticas antropológicas na análise de restos humanos provenientes de contextos forenses, desde que se tenha em consideração a abordagem multidisciplinar que esta ciência exige. A acrescentar ao ponto defendido pela autora, na opinião de Cunha e Cattaneo (2006) não se pode descartar a noção de que a definição de antropólogo forense está intimamente ligada com a região do globo em que esta disciplina é praticada, uma vez que cada país é portador da sua própria realidade, moldando o ambiente de trabalho destes profissionais.

Apesar da Antropologia Forense na Europa se iniciar com a figura do anatomista francês Jean-Joseph Sue, em 1755, com a publicação de um conjunto de medidas tomadas, tanto em cadáveres de fetos como de jovens adultos, era apenas com o intuito de proporcionar aos artistas medições mais correctas para as suas obras. É apenas com Paul Broca, em 1859, que, não tanto a Antropologia Forense, mas a Antropologia Física, ganha destaque na comunidade científica Europeia com a criação da *Société d'Anthropologie de Paris* (Ubelaker, 2006).

A história continua o seu curso, mas só recentemente, no que concerne à Antropologia Forense como hoje é conhecida, a comunidade científica Europeia começou a discutir e a comparar notas sobre os casos e contextos que envolvem esta disciplina, evidenciando a necessidade de estabelecer uma associação para lidar com este tipo de questões (Cattaneo, 2007; Brickley e Ferllini, 2007). A *Forensic Anthropology Society of Europe* (FASE) vem no seguimento destas mesmas necessidades. Fundada em 2003 é a primeira subsecção da *International Academy of Legal Medicine* (IALM) e conta já com um número considerável de *workshops*, *advanced courses* e *meetings* realizados um pouco por toda a Europa. Além disto a FASE tem como principais objectivos promover a educação e a investigação, realçando

sobretudo a necessidade de definir em pormenor o papel dos antropólogos forenses, uma vez que existe grande heterogeneidade entre os diferentes países (Baccino, 2005). De resto, segundo um levantamento elaborado por Kranioti e Paine (2011), a formação base dos vários praticantes de Antropologia Forense na Europa varia entre, anatomistas, arqueólogos, patologistas forenses e antropólogos físicos. Tendo em conta este facto, é indispensável criar um fio condutor para que a prática da disciplina se torne mais uniformizada, ao mesmo tempo que aumenta a cooperação entre os seus praticantes, levando a conclusões mais produtivas.

### *1.1.1. O caso português*

“A história da Antropologia Portuguesa é digna de ser estudada, mas como semelhante estudo constituiria obra demorada e de certa dificuldade” (Tamagnini e Serra, 1942: 3) e não sendo este o objectivo do presente projecto, optou-se sim por abordar de forma breve, mas de modo a tornar perceptível, as origens da Antropologia Forense em Portugal.

A Antropologia Forense tem em Portugal as suas raízes claramente vinculadas na prática da Antropologia Física. Deste modo, não é tanto em Coimbra mas em Lisboa que começa, nas últimas décadas do século XIX, uma importante renovação científica, destacando como figura central o médico e antropólogo Francisco Ferraz de Macedo. A sua inclinação dita “*naturalista*” fez com que a Antropologia se começasse a preocupar com questões “*físicas e somáticas*”, entre elas a morfologia descritiva, a craniometria e a osteometria. Todo este processo tem uma clara influência da escola francesa, uma vez que Ferraz de Macedo foi instruído pelo incontornável nome da ciência antropológica francesa, Paul Broca (Santos, 2005). É nesta linha de pensamento que, em 1882, Ferraz de Macedo começa a investir na recolha de crânios humanos, constituindo a primeira colecção de material osteológico em Portugal, não perdurando porém na actualidade (Santos, 2000; Cardoso, 2006b).

Nesta época começa-se já a assistir a uma preocupação com o ensino da “História Natural” e com a inserção da Antropologia em tal contexto, sobretudo através da figura do Visconde de Montessão (Areia *et al*, 1991). Todavia, só a 2 de Julho de 1885, com o

grande impulso de Bernardino Machado, é assinada, por D. Luís, uma carta-lei que decreta a génese da cadeira de *Anthropologia, Paleontologia Humana e Archaeologia Pré-histórica* na Universidade de Coimbra (Areia e Rocha, 1985; Tamagnini e Serra, 1940). De realçar que segundo Areia e colaboradores (1991), de um ensino essencialmente teórico vigente na altura, destacam-se as aulas de Antropologia pela forte componente teórico-prática que apresentavam.

Um facto curioso, segundo Sousa (2003), é que simultaneamente a estes avanços na área da Antropologia, no ano de 1889, a Organização Médico-Legal portuguesa foi legitimamente instituída, acompanhando de certa forma uma tendência generalizada a nível mundial. Se a história da Antropologia é de longo curso, a da Medicina Legal remete para tempos ainda mais pretéritos, referenciando-se aqui apenas alguns momentos-chave. Ao nível da sua génese, alguns autores consideram o cirurgião francês Ambrosio Paré o pai da Medicina-Legal, já que em 1575, este começa uma verdadeira revolução científica. O “*período de ouro*” da Medicina Forense reside, no entanto, nos finais do século XIX. Além da inclusão de certas disciplinas como a Toxicologia e a Histologia, o ensino desta disciplina começou a ser cada vez mais disseminado, não só mas também, pelo papel sociopolítico da Patologia Forense (Pinheiro, 2006).

As primeiras incursões da Antropologia no universo forense, à semelhança de outros países, remetem para algumas investigações feitas no âmbito da Criminologia. A Antropologia Criminal passa a ser considerada um campo de acção dentro do próprio Instituto de Criminologia. O Instituto de Antropologia em Coimbra, por exemplo, participou em várias investigações do fórum criminal durante os anos de 1903 a 1927, mas só em 1911/1912 a criação do posto Antropométrico, destinado a este fim, é oficialmente legislado. O grande contributo residia sobretudo nas práticas antropométricas, com uma clara influência de Alphonse Bertillon e o seu “*L’homme criminel*” (Rocha, 1985; Cunha e Pinheiro, 2007).

Na época, o contacto entre a Antropologia e a Criminologia destinava-se a fornecer material para os estudos antropométricos que por sua vez iriam tentar traçar o perfil típico do “*homem criminoso*” (Rocha, 1985). Segundo Snow (1982), este contexto criminal em que a Antropologia se enlaça, tendência verificada não só em Portugal, em nada se assemelha com o contexto actual da Antropologia Forense, sendo necessário ter presente a noção desta dissemelhança.

Apesar de toda esta questão, a ligação entre as duas disciplinas não se quebrou, pelo contrário, de certa forma adaptou-se a uma nova realidade. A Antropologia continua a auxiliar o universo médico-legal português através do que se denomina hoje, de Antropologia Forense. Segundo Cunha (2008), a prática da Antropologia Forense tal como é conhecida presentemente, demorou um certo tempo a ser praticada em Portugal. Só nos finais do século XX (1997) as perícias do antropólogo forense começam a ser feitas de modo mais sistemático. Até então, os casos que contemplavam restos humanos esqueletizados eram analisados por médicos nos vários Institutos Médico-legais distribuídos pelo país.

Para entender como esta disciplina é praticada em Portugal é necessário explicar de que forma se enquadra no sistema médico-legal português (Cunha, 2008). Portugal tem uma das melhores organizações de Medicina Legal da Europa, já que a Comunidade Económica Europeia elegeu, em 2003, o então Instituto Nacional de Medicina Legal (INML) como o melhor sistema Europeu (Pinheiro, 2006).

Segundo Cunha (2008), o actual Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF, I.P.) é um sistema administrativo autónomo sob a custódia do Ministério da Justiça, com sede na cidade de Coimbra. Existem três delegações nacionais principais, Sul (Lisboa), Centro (Coimbra) e Norte (Porto), e, espalhados por todo o país encontram-se 31 Gabinetes Médico-legais (GML). As três delegações incluem na sua divisão interna quatro departamentos, são estes os serviços de Patologia, de Toxicologia e de Genética Forenses e ainda a secção da Clínica Médico-legal. A unidade de Antropologia está incluída no serviço de Patologia Forense, ou seja o Instituto português não contempla uma unidade individualizada de Antropologia Forense (Pinheiro, 2006; Cunha, 2008). Segundo os autores mencionados, quando existe um caso que careça da presença do antropólogo, em qualquer local do país que não numa das três cidades que abrigam as delegações, este ficará a cargo do GML da zona, que por sua vez terá que remeter o caso para a delegação correspondente.

O INMLCF, I.P. tem protocolos com algumas instituições, nomeadamente com o Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, cuja coordenadora científica tem formação na área de Antropologia Física e Biológica, sendo consultora nacional de Antropologia Forense nesta instituição, desde 1997. Convém referir que desde 2004 é também responsável por todos os casos de Antropologia que se

apresentem na Delegação Sul, onde possui gabinete próprio. O antropólogo é requisitado sempre que o patologista assim o entende, sobretudo em casos em que a decomposição do cadáver esteja já avançada. Mesmo nos casos em que os restos humanos já se encontrem esqueletizados, apesar de o antropólogo ter autonomia para realizar a análise sozinho, o certificado de óbito será sempre assinado pelo médico legista responsável (Cunha e Mendonça, 2002; Pinheiro 2006; Cunha, 2008).

## **1.2. Objectivos**

O propósito, por excelência, do presente trabalho prende-se com a aplicação da histologia óssea como auxiliar do processo de identificação em remanescentes esqueléticos. Apesar da investigação da identidade de um indivíduo constituir um processo de elevada complexidade, a necessidade de o fazer é vital, sendo em última análise, um dos grandes desígnios da Antropologia Forense. A estimativa da idade à morte é, de resto como já mencionado, um dos parâmetros essenciais a ser analisado pelo antropólogo forense. Pretende-se portanto, se possível, desenvolver uma metodologia que permita aos antropólogos forenses estimar a idade à morte através de uma presumível relação entre o comportamento de alguns integrantes celulares e a idade cronológica de um determinado indivíduo.

Com o intuito de granjear tal propósito, pretende-se utilizar a percentagem de osso não remodelado e ainda a área cortical relativa, ambas obtidas da parte média da diáfise de clavículas pertencentes a indivíduos portugueses, já que o contexto populacional é um condicionante da microestrutura óssea (Stout, 1998; Cho *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2006; Robling e Stout, 2008). A hodierna hipótese de trabalho é delineada para responder a questões, que, na verdade, não são mais do que os derradeiros objectivos deste projecto.

Assim, convém definir taxativamente, de forma clara e concisa os objectivos deste projecto:

- Ponderar se a histologia fornece bons indicadores da idade cronológica do indivíduo;

- Verificar se na realidade a histologia é um processo demorado e, de certa forma, tão complexo quanto se julga;
- Avaliar a necessidade prévia de conhecimentos e experiência na área da microanatomia óssea, para proceder à interpretação dos resultados histológicos;
- Averiguar se a eleição da clavícula como material ósseo, dado que serve de amostra à presente análise, é de facto uma opção viável para aplicação em estudos futuros;
- Indagar se a percentagem de osso não remodelado e a área cortical relativa fornecem bons indicadores para estimar a idade à altura da morte.

Em suma, o grande propósito da presente investigação é mostrar que a histologia pode ser um processo prático, rápido e de fácil aplicação. De resto, convém ressaltar que a escolha dos métodos histológicos a todos os níveis, ou seja a nível da preparação da amostra para microscopia e da escolha das características ósseas a analisar, foi realizada de modo a agilizar o mais possível todo o processo, com o intuito de apresentar a histologia como uma ferramenta útil à prática diária do antropólogo forense.

**2**

**Revisão da Literatura**



## 2.1. *Biologia do Tecido ósseo*

O trabalho e a própria pesquisa que o antropólogo forense realiza assentam na prática, e de uma forma taxativa, na investigação de restos esqueléticos. É através destes, que se tenta inferir determinadas informações que permitam aceder aos padrões de vida do(s) indivíduo(s) já padecido(s). Para conseguir granjear tal conteúdo é peremptório que estes profissionais estejam extremamente familiarizados com a biologia do esqueleto, e que possuam conhecimentos suficientes para conseguir interpretar o sistema esquelético ao nível do desenvolvimento, da patologia, e mesmo do grau adaptativo deste (Gosman e Stout, 2010).

Deste modo, é necessário apreender que o sistema esquelético humano, à semelhança de muitos outros vertebrados, é composto por um tecido altamente especializado destinado a cumprir funções de suporte, conexão e manutenção, desempenhando também um papel fundamental na génese das células sanguíneas (Scheuer e Black, 2000; Marks e Odgren, 2002; Young *et al.*, 2006).

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, e como já referido, a sua função de suporte para os tecidos moles e protecção para os órgãos vitais tornam-no num dos sistemas mais importantes do corpo humano. Possui uma alta vascularização e é metabolicamente muito activo (Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2008). O osso possui outras características que o tornam numa estrutura única, uma vez que além de um tecido, é também um órgão. Segundo Gan (2005), é o único tecido capaz de se auto-renovar tanto ao nível físico como biológico.

Ao fazer parte do sistema músculo-esquelético o osso funciona como o elemento de ligação entre músculos, tendões e ligamentos, operando como um sistema integrado que possibilita a movimentação, ou seja, transforma as contracções musculares em movimento útil. Outra função, que é muitas vezes descurada, está relacionada com o facto de o osso funcionar como um depósito de cálcio, fosfato, e outros iões, armazenando ou libertando-os em concentrações controladas para manter a homeostasia (Gan, 2005; Junqueira e Carneiro, 2008; White *et al.*, 2012). O osso desempenha ainda uma função importante ao nível da hematopoiese, dado que ao alojar e proteger a medula óssea assegura todo o processo de formação dos elementos sanguíneos (Mazur e Cohen, 1989; Matos, 2007; Curate, 2010). Outra das propriedades que torna o osso tão

interessante e tão diferente de outros tecidos conjuntivos é a sua rigidez, que lhe permite resistir à deformação através da dissipação da energia. Esta característica deve-se à própria biologia e fisiologia do tecido, uma vez que é possuidor de um agregado de células e fibras que se encontram imersas numa matriz extracelular impregnada com sais inorgânicos e outras substâncias, como bicarbonato, citrato, magnésio, sódio e potássio (Mays, 1998; Jee, 2001; Walsh *et al.*, 2003; Gonçalves e Bairros, 2010).

Com exceção das extremidades articulares, os ossos possuem um revestimento exterior constituído por um tecido conjuntivo denso, o perióstio. A adesão deste tecido ao osso fica a cargo de um conjunto de fibras de colagénio que se dispõem de forma perpendicular à superfície do osso, as fibras de Sharpay, que em regiões de inserção tendinosa se prolongam com as próprias fibras colagénicas do tendão. Por sua vez, a superfície interna dos ossos longos é revestida pelo endóstio. Este, ao contrário do anterior, é constituído por uma fina camada de tecido conjuntivo. Ambos, perióstio e endóstio possuem na sua constituição células osteoprogenitoras que são, como o próprio nome indica, precursoras das células formadoras de osso. Estas estruturas são portanto fundamentais para o processo de manutenção e reparação óssea (Van Wynsberghe, *et al.*, 1995; Junqueira e Carneiro, 2008; Gonçalves e Bairros, 2010; Mescher, 2010). As propriedades referidas anteriormente, têm bases fisiológicas ao nível microscópico e celular, com consequências morfológicas ao nível macroscópico. Ambas devem ser conhecidas para alcançar uma melhor compreensão deste sistema, que é por excelência o material de estudo do antropólogo.

### *2.1.1. Estrutura macroscópica do osso*

O osso é um dos órgãos que maior variabilidade apresenta, nomeadamente no que à forma concerne. As maiores diferenças encontram-se entre indivíduos dissemelhantes, porém, dentro do mesmo organismo podem-se encontrar amplas variações morfológicas. Uma tal inconstância levaria a pensar que a classificação dos ossos quanto à sua forma seria uma árdua tarefa, todavia os ossos podem ser facilmente distribuídos em três grandes categorias, com base em algumas destrições elementares da sua morfologia macroscópica (White *et al.*, 2012).

As peças ósseas constituintes dos membros superiores e inferiores, e ainda de alguns ossos da mão e do pé são denominados de ossos longos. Por definição, os ossos longos têm uma medida que se sobrepõe em tamanho a todas as outras. A sua forma é tubular e as extremidades encontram-se expandidas. Deste modo, a porção correspondente à zona tubiforme é denominada por diáfise, enquanto as extremidades são conhecidas como epífises. Nos ossos adultos encontra-se, por norma, uma linha epifisária entre a diáfise e a epífise, que não é mais do que um remanescente de todo o processo de crescimento e maturação óssea. Os ossos longos funcionam como um sistema de alavancas para equilibrar o peso do tronco, e em última instância, proporcionam o movimento. De resto, a própria geometria destes ossos é ideal para suportar cargas de flexão e torção, já que o tecido ósseo se encontra afastado do eixo neutral localizado na região do canal medular (Mays, 1998; Gan, 2005; Gartner e Hiatt, 2007; White, *et al.*, 2012).

Ossos como os da caixa craniana, da cintura escapular (com excepção da clavícula), da pélvis, e da caixa torácica, ao nível do esterno e das costelas, são relativamente finos, com duas dimensões semelhantes e uma terceira relativamente reduzida. Estes ossos são denominados por ossos chatos, e a sua função é sobretudo de protecção, contudo fornecem também vastas superfícies para inserções musculares (Ross e Pawlina, 2011; Gan, 2005; Drake *et al.*, 2006; White *et al.*, 2012).

Os outros ossos existentes, cuja forma não se enquadra nas duas categorias previamente apresentadas, como é o caso dos ossos do carpo, do tarso, e das vértebras são considerados ossos irregulares (White *et al.*, 2012). Alguns autores como Ross e Pawlina (2011) enquadram os ossos do carpo e do tarso numa categoria isolada que classificam como ossos curtos, uma vez que o seu comprimento equivale em média ao seu diâmetro. A função deste tipo de ossos prende-se sobretudo com o fornecimento de força e compacidade a zonas onde os movimentos são ligeiros e limitados (Gan, 2005).

Alguns autores como Gartner e Hiatt (2007) consideram ainda um outro tipo de osso, os sesamóides, sendo o exemplo mais clássico a rótula. Estes desenvolvem-se no interior dos tendões, fornecendo através de uma articulação, uma vantagem mecânica ao nível do músculo interveniente.

Macroscopicamente podem distinguir-se dois tipos de tecido ósseo, o tecido compacto ou cortical e o tecido ósseo esponjoso ou trabecular. O osso cortical constitui

aproximadamente 80% do sistema esquelético (Gan, 2005; Curate, 2010) e tem um aspecto sólido e homogéneo uma vez que não se observam, à vista desarmada, espaços intersticiais. Distribui-se sobretudo em camadas ao longo da porção mais externa dos ossos. A sua função está primordialmente ligada à sustentação e à protecção, dado que é portador de uma elevada densidade (Van Wynsberghe, *et al.*, 1995; Mays, 1998; Jee, 2001; Gonçalves e Bairros, 2010; Ross e Pawlina, 2011; White *et al.*, 2012). Por sua vez, o osso trabecular é, como o próprio nome deixa transparecer, constituído por trabéculas irregulares que se ramificam e se unem formando uma rede tridimensional de lâminas ósseas delgadas e achatadas. Estas demarcam um abrangente sistema de espaços em comunicação, onde se aloja a medula óssea. As trabéculas estão organizadas de modo a potenciar a força do tecido ósseo adquirindo maior resistência às forças de tensão e compressão, reduzindo as hipóteses de dobragem. Este tecido representa cerca de um quinto do sistema esquelético, e ao contrário do anterior é metabolicamente mais activo. Não possui uma grande irrigação sanguínea e a sua nutrição é feita a um nível mais superficial, não sendo por este motivo um tecido particularmente denso (Van Wynsberghe, *et al.*, 1995; Ortner e Turner-Walker, 2003; Curate, 2010; Gonçalves e Bairros, 2010; White *et al.*, 2012).

Estas duas formas de apresentação macroscópica do tecido ósseo não se encontram estritamente separadas ou delimitadas, apresentam-se porém, de uma forma concomitante. Nos ossos longos o tecido cortical apresenta-se principalmente na periferia e em toda a extensão tubular do osso, ou seja ao longo da diáfise, revestindo a porção interna, que em vida é ocupada pela medula óssea. Por sua vez, o tecido esponjoso ocupa uma posição mais interna, tendo como zonas de excelência as epífises e as metáfises. Os ossos chatos possuem um centro de osso trabecular designado por *diploe*, e são recobertos em toda a sua extensão por uma camada de osso cortical, formando a tábua interna e a tábua externa, consoante a posição que ocupam. Por fim, os ossos curtos possuem uma fina camada externa formada por tecido ósseo cortical, e o preenchimento da zona central fica a cargo do osso trabecular (Mays, 1998; Waldron, 2009; Gan, 2005; Gartner e Hiatt, 2007; Gonçalves e Bairros, 2010).

### 2.1.2. Histomorfologia do tecido ósseo

A análise do esqueleto pode, em boa verdade, ser feita a vários níveis seguindo uma espécie de hierarquia, variando desde uma análise macroscópica onde o tecido é encarado como o órgão e a unidade base, até ao nível molecular onde o tecido é o instrumento que permite chegar à unidade básica. Situada a um nível intermédio destas duas abordagens, está a histologia, que ao nível ósseo representa, como Frost brilhantemente descreveu, a “*Skeletal Intermediary organization*” (Stout e Crowder, 2012).

Por definição, a histologia é o estudo dos vários tecidos presentes num determinado corpo, todavia para além de examinar os tecidos analisa também a forma como estes interagem e se organizam para constituir a rede de órgãos, que tornam o organismo num ser funcional. A histologia envolve todos os aspectos da biologia dos tecidos, contudo foca-se primordialmente nas estruturas celulares, tanto ao nível da sua estruturação e distribuição, como ao nível das suas funções específicas, que diferem de tecido para tecido. Em última análise, a principal função da histologia é ajudar o investigador a perceber a microanatomia das células, dos tecidos e dos órgãos para conseguir atingir uma correlação com a sua estrutura e função (Junqueira e Carneiro, 2008; Mescher, 2010; Ross e Pawlina, 2011).

No caso particular do tecido ósseo, devido à sua estrutura mineralizada, o produto da actividade celular está encriptado na anatomia microscópica do osso, ou seja na sua histomorfologia. Os antropólogos têm-se apercebido da utilidade destas técnicas, já que estas contribuem para um conhecimento mais profundo da biologia do esqueleto. Cada vez mais profissionais se servem das técnicas histomorfométricas tanto na análise de restos humanos recentes, provenientes sobretudo de um contexto forense, como de ossos pertencentes a populações pretéritas (An e Guber, 2003; Hall, 2005; Stout e Crowder, 2012).

Segundo os autores, de um modo lato entende-se por histomorfometria, a quantificação de determinadas microestruturas, ou por sua vez, a quantificação de certas características presentes nestas, com uma expressão numérica expressa por unidade, área ou tamanho. A adaptação desta metodologia ao contexto ósseo proporciona um tipo de informação quantitativa, por exemplo ao nível da microarquitectura óssea e dos

processos de remodelação, que não seriam acessíveis se outras abordagens fossem utilizadas. Para compreender de que forma esta informação biológica está codificada na histomorfologia do osso, é necessário possuir um conhecimento básico dos processos biológicos subjacentes à formação de determinadas estruturas. O metabolismo ósseo, seja ele no sentido do desenvolvimento, adaptação ou homeostasia, envolve todo um conjunto celular que é necessário dominar minimamente.

#### 2.1.2.1. Células do tecido ósseo

Desta forma, reconhecem-se então três tipos principais de células diferentes no tecido ósseo, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Alguns autores (Jee, 2001; Everts *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2003; Waldron, 2009; Gonçalves e Bairros, 2010) consideram ainda importante referir determinados componentes celulares como as “*bone lining cells*” ou células de revestimento ósseo.

Para uma melhor compreensão das interações que se verificam a nível celular, um breve resumo da fisiologia de cada célula será apresentado.

Com base em estudos histológicos, sobretudo ao nível da morfologia, toda a linhagem que produz as células osteoblásticas pode, de certa forma, ser apresentada numa sequência linear. Os passos que levam à completa diferenciação dos osteoblastos e células relacionadas não são no entanto, ainda completamente conhecidos (Aubin e Turksen, 1996; Curate, 2010). Assim, as células osteoprogenitoras são células estaminais do mesênquima, que se encontram nas zonas mais profundas do periósteeo e do endósteeo, e são morfologicamente difíceis de distinguir dos fibroblastos, uma vez que partilham uma origem em comum. Estas são também, por sua vez, precursoras inactivas dos osteoblastos (Rodan e Martin; 1981; Jee, 2001; Gartner e Hiatt, 2007; Gonçalves e Bairros, 2010; Ross e Pawlina, 2011).

Seguidamente o pré-osteoblasto, caracterizado por ser uma célula imatura que procede directamente das células progenitoras, é de difícil distinção do osteoblasto já totalmente formado, até porque é o seu precursor imediato. A distinção é sobretudo possível devido à localização, pois os pré-osteoblastos localizam-se nas camadas celulares mais próximas às zonas de formação óssea. A nível morfológico parâmetros

como o volume do citoplasma, e as dimensões do retículo endoplasmático, que é substancialmente menor nos pré-osteoblastos, devem ser levadas em consideração (Van Wynsberghe *et al.*, 1995; Aubin e Turksen, 1996; Jee, 2001; Curate, 2010; Ross e Pawlina, 2011).

Os osteoblastos são células individualizadas, mononucleares, altamente polarizadas e proliferativas. Possuem uma disposição cubóide e distribuem-se lado a lado ao longo da periferia das zonas de tecido ósseo em formação, comunicando entre si através de *gap junctions*. É-lhes reconhecida a capacidade de formar tecido ósseo mineralizado, ou seja quando estão maduros são os responsáveis pela génese da componente orgânica da matriz óssea, sintetizando uma substância designada por osteóide, ao mesmo tempo que participam na calcificação desta mesma matriz. Os osteoblastos actuam como células propulsoras no transporte dos iões de cálcio e fósforo, tanto do interior para o exterior do tecido ósseo, como o contrário. De referir que cerca de 10-20% destas células se incorporam numa matriz mineralizada, e à medida que vão sendo rodeadas por esta ficam como que presas num compartimento, as *lacunae*. Neste momento, deixam de ter a designação de osteoblastos e passam a denominar-se de osteócitos (Van Wynsberghe *et al.*, 1995; Aubin e Turksen, 1996; Yasuda *et al.*, 1998; Jee, 2001; Walsh *et al.*, 2003; Hall, 2005; Yong *et al.*, 2006; Junqueira e Carneiro, 2008; Waldron, 2009; Curate, 2010; Gonçalves e Bairros, 2010; Gosman e Stout, 2010; Ross e Pawlina, 2011; White *et al.*, 2012).

Os osteócitos representam o estágio final da diferenciação osteoblástica, são por isso as células ósseas mais abundantes e mais especializadas presentes no tecido esquelético (Aubin e Turksen, 1996; Noble e Reeve, 2000; Jee, 2001). Encontram-se no interior da matriz óssea, completamente individualizados por esta. Cada *lacunae* contém apenas um osteócito, contudo estas estruturas comunicam entre si através de pequenos canalículos citoplasmáticos, estabelecendo junções de comunicação que permitem a passagem de iões e pequenas moléculas (Noble e Reeve, 2000; Walsh *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2006; Junqueira e Carneiro, 2008; Gonçalves e Bairros, 2010; Gosman e Stout, 2010).

Regra geral, quando visualizados ao microscópio, os osteócitos são relativamente mais pequenos e mais achatados que os seus percursoros, uma vez que o seu citoplasma peri-nuclear sofreu uma redução, sendo por este motivo metabolicamente pouco activos

(Van Wynsberghe *et al.*, 1995; Aubin e Turksen, 1996; Gartner e Hiatti, 2007; Ross e Pawlina, 2011).

A nível funcional, os osteócitos podem sintetizar nova matriz ou reabsorvê-la, pelo menos até um determinado nível. São então responsáveis pela manutenção da qualidade óssea, através da coordenação dos sinais provenientes de estímulos mecânicos. A morte de algumas células, quer devido a um episódio traumático, quer devido a processos de apoptose, é também disciplinada por estas células. Os osteócitos são portanto peças fundamentais para todo o processo de manutenção do tecido esquelético (Aubin e Turksen, 1996; Noble e Reeve, 2000; Jee, 2001; Ortner e Turner-Walker, 2003; Hall, 2005; Young *et al.*, 2006; Bonewald e Johnson, 2008; Junqueira e Carneiro, 2008; Curate, 2010; Emerton *et al.*, 2010; Waldron, 2009; Ross e Pawlina, 2011; White *et al.*, 2012).

Os osteoclastos são células multinucleares, gigantes, móveis e extensamente ramificadas (Van Wynsberghe *et al.*, 1995; Jee, 2001; Junqueira e Carneiro, 2008; White *et al.*, 2012). Sabe-se actualmente que estas células provêm de uma linhagem hematopoiética de células estaminais, e o seu caminho de diferenciação é comum ao dos macrófagos e das células dendríticas. Para o seu desenvolvimento é necessário o contacto entre elas e as células precursoras hematopoiéticas, como o RANK-L (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), as colónias de factor estimulante, as hormonas paratiróideia e vitamina D e ainda calcitonina (Lacey *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 1998; Väänänen *et al.*, 2000; Jee, 2001; Boyle *et al.*, 2003; Xing e Boyce, 2007; Waldron, 2009; Curate, 2010).

Os osteoclastos são encontrados por norma, em locais onde o osso é reabsorvido durante o seu processo normal de desenvolvimento, e é nestas mesmas áreas que se encontram porções dilatadas de osteoclastos colocadas em depressões da matriz, que são conhecidas como as lacunas de Howship. Estas células fixam-se solidamente às trabéculas ósseas, por prolongamentos que delimitam um espaço compreendido entre o corpo celular do osteoclasto e a superfície óssea designada por câmara de reabsorção. Neste local é criado uma espécie de microambiente com um pH de aproximadamente 4,5. A esta altura, a membrana plasmática do osteoclasto apresenta invaginações que lhe confere um aspecto de bordo enrugado (Boyle *et al.*, 2003; Walsh, *et al.*, 2003; Hall,

2005; Young *et al.*, 2006; Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2008; Curate, 2010; Gonçalves e Bairros, 2010; Mescher, 2010).

Os osteoclastos são as únicas células capazes de dissolver o tecido ósseo, devido principalmente à segregação de ácido hidrolórico. Porém, o citoplasma destas células contém enzimas lisossômicas, proteinases e fosfatases que são lançadas para a câmara de reabsorção, degradando o colagénio e as proteínas não colagénicas da matriz óssea. Em situações anatómicas normais, estas células conseguem remover 500 mg de cálcio, por dia (Waldron, 2009; Curate, 2010; Gonçalves e Bairros, 2010).

O tecido ósseo é então mantido em equilíbrio, em parte, graças à acção dos osteoclastos e dos osteoblastos, e por este mesmo motivo existe uma estreita relação entre estes dois tipos de células ósseas. Os osteoblastos regulam a diferenciação e a formação dos osteoclastos, uma vez que são estes os responsáveis pela segregação do RANK-L. Este factor liga-se ao RANK dos macrófagos para os estimular a assumirem o fenótipo de osteoclastos. Este processo pode ser interrompido se o osteoblasto segregar osteoprotegerina (OPG) que compete com a RANK-L na ligação com a RANK (Yasuda *et al.*, 1998; Väänänen *et al.*, 2000; Jee, 2001; Boyle *et al.*, 2003; Waldron, 2009; Curate, 2010; Gosman e Stout, 2010).

#### 2.1.2.2. *Matriz extracelular*

Quando se examina de perto a matriz extracelular é possível discernir que esta é constituída por dois vastos componentes, uma fracção orgânica e outra mineral, que conferem ao osso um conjunto de propriedades que o tornam num dos tecidos mais ímpares de todo o organismo.

A componente orgânica representa aproximadamente 30-35% (Jee, 2001; Walsh *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2006; Curate, 2010) do peso seco do osso, e é constituída por colagénio, proteínas não colagénicas e proteoglicanos. O principal constituinte desta é o colagénio do tipo I que patenteia cerca de 80% do colagénio total do tecido ósseo, enquanto os outros tipos, III, IV e VI, correspondem a aproximadamente 10%. Em suma, o colagénio representa cerca de 90% da matriz, portanto a grande maioria de toda

a porção orgânica (Young *et al.*, 2006; Waldron, 2009; Gonçalves e Bairros, 2010; Ross e Pawlina, 2011).

As proteínas não colagénicas, como a osteocalcina, a osteonectina, a osteopontina, a sialoproteína óssea, a osteoprogerina e o factor estimulante de colónias de macrófagos, dizem respeito ao restante da fracção orgânica. Todavia, o papel destas ainda não foi completamente descodificado, embora se considere que estejam envolvidas na regulação da mineralização óssea. Os proteoglicanos estão presentes no tecido ósseo numa proporção muito menor do que, por exemplo, na cartilagem. São constituídos essencialmente por sulfato de condroitina e ácido hialurónico, e possuem uma proteína central curta com algumas cadeias laterais de glicosaminoglicanos. A sua função parece estar associada com o controlo de água no tecido ósseo e com a regulação da formação de fibras de colagénio, de uma forma que permita posteriormente a mineralização da matriz (Young *et al.*, 2006, Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2008; Waldron, 2009; Curate, 2010; Gonçalves e Bairros, 2010; Mescher, 2010).

O cálcio e fósforo existentes no osso apresentam-se sobretudo na forma de cristais de hidroxiapatite  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ . Estes cristais têm aproximadamente 40 nm de comprimento, por 1,5 a 3 nm de espessura depositados regularmente de 60 em 60 nm ao longo da fibra de colagénio. Em redor de cada cristal de hidroxiapatite existe um revestimento aquoso, a concha de hidratação, que facilita a troca de iões entre os cristais e o fluido extracelular. Contudo, cerca de 20% da componente mineral permanece no estado amorfo e a função desta estrutura parece estar associada à homeostase do cálcio no organismo (Mays, 1998; Jee, 2001; Walsh *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2006; Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2008; Waldron, 2009; Curate, 2010; Gonçalves e Bairros, 2010; Mescher, 2010; Ross e Pawlina, 2011).

A organização microscópica da matriz extracelular do tecido ósseo permite identificar dois tipos de osso, o osso primário ou fibroso e o osso secundário ou lamelar. O tecido ósseo fibroso, pode ser considerado como um tipo de osso “*desorganizado*” e encontra-se presente especialmente no desenvolvimento embrionário, sendo este a primeira forma de osso presente. É gradativamente substituído por osso lamelar e a sua frequência é também notada nas zonas de metáfise ao longo dos processos de maturação esquelética. A sua presença em indivíduos adultos é relativamente pouco frequente, no entanto pode ser registada em determinados locais, como nas regiões próximas às

suturas cranianas, nos alvéolos dentários, e em alguns pontos de inserção de tendões. Deve referir-se que a presença deste tipo de osso está também associada a patologias, nomeadamente ao nível da reparação de fracturas ósseas e ainda no caso de algumas neoplasias e reacções inflamatórias (Van Wynsberghe *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 2003; Gartner e Hiatt, 2007; Matos, 2007; Curate, 2010; Gonçalves e Bairros, 2010). Este tipo de tecido é principalmente caracterizado por uma distribuição irregular das fibras de colagénio, uma dispersão aleatória das células ósseas, uma quantidade inferior de minerais, e ainda pelo facto de a sua formação se dar a uma velocidade consideravelmente superior à verificada no osso lamelar (Walsh *et al.*, 2003; Junqueira e Carneiro, 2008; Waldron, 2009; Gonçalves e Bairros, 2010; Mescher, 2010; Ross e Pawlina, 2011).

O tecido lamelar é predominante nos adultos, pode ser encontrado em várias zonas funcionais e estruturais sendo portador de uma grande organização e densidade (Walsh *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2006; White *et al.*, 2012). Uma das principais características deste tipo de tecido reside nas suas fibras de colagénio, que se encontram altamente organizadas, dispendo-se em lamelas de 3 a 7  $\mu\text{m}$  de espessura, que se conciliam paralelamente umas às outras em camadas concêntricas (Van Wynsberghe *et al.*, 1995; Junqueira e Carneiro, 2008; Curate, 2010; Gonçalves e Bairros, 2010).

Este arranjo, em camadas dispostas em torno do canal central formando uma estrutura concêntrica, é designado por sistema de Havers ou osteónio. Estas subunidades têm uma configuração de cilindro longo, apresentando por vezes uma bifurcação. Cada um destes elementos é constituído por 4 a 20 lamelas ósseas, dispostas então de forma concêntrica em redor de um canal vascular central de trajecto longitudinal, paralelo ao eixo do osso. O limite exterior de cada osteónio é marcado por uma fina linha onde a matriz mineralizada é mais pobre em fibras colagénicas, a linha cimentante (Ortner e Turner-Walker, 2003; Junqueira e Carneiro, 2008; Yong *et al.*, 2006; Gonçalves e Bairros, 2010; Ross e Pawlina, 2011; White *et al.*, 2012).

A este nível convém referir que nos estádios iniciais de vida são formados os osteónios primários, que ao longo do desenvolvimento vão sendo substituídos por osteónios secundários devido ao processo de remodelação, já que neste caso se observa uma reabsorção óssea seguida de nova deposição de tecido. Os osteónios secundários resultantes são então, o que se entende comumente pelos sistemas de Havers. Para

além do tamanho e da existência da linha cimentante, toda a configuração morfológica dos osteónios secundários permite uma rápida distinção. Entre cada uma destas estruturas, situadas em zonas angulares, existem restos de sistemas de Havers pré-existentes, as lamelas intersticiais, que foram alvo de erosão pela acção dos osteoclastos no processo de remodelação, não observáveis nos osteónios primários (Abou-Arab *et al.*, 1995; Waldron, 2009; Gonçalves e Bairros, 2010; Gosman e Stout, 2010; White *et al.*, 2012).

No centro de cada sistema existe um canal que contém vasos sanguíneos e algumas células nervosas, o canal de Havers. Esta estrutura comunica com os seus homólogos, com a cavidade medular e com a superfície externa através de um conjunto de canais oblíquos, os canais de Volkman. Estes canais acolhem no seu interior vasos sanguíneos, que se destinam sobretudo à nutrição e manutenção dos canais de Havers. Ao oposto destes, os canais de Volkman não se encontram cingidos por lamelas concêntricas (Jee, 2001; Walsh, *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2006; Junqueira e Carneiro, 2008; Gonçalves e Bairros, 2010; Mescher, 2010; Ross e Pawlina, 2011).

Em última análise, esta organização lamelar do osso compacto, bem como a elevada organização na distribuição das lacunas e respectivos canalículos relativamente aos canais de Havers e de Volkman, representam o acordo biológico entre a firmeza e a resistência do tecido ósseo. Toda esta estrutura é mantida para garantir o vital funcionamento da componente celular, mesmo estando esta aprisionada por uma matriz altamente mineralizada (Gonçalves e Bairros, 2010).

### 2.1.2.3. Remodelação óssea

O osso é um tecido fisiologicamente dinâmico, cujas funções, já referidas, consistem em fornecer um sistema de suporte para actividade muscular, proteger fisicamente órgãos e tecidos funcionando ainda como um reservatório mineral homeostático. A estrutura que resulta de todas estas interacções, o esqueleto, é altamente influenciada por princípios mecânicos ao nível da sua arquitectura. O tecido ósseo chega mesmo a atingir, estruturalmente, propriedades paradoxais, uma vez que, por um lado necessita de ser altamente rígido e resistente, porém a sua elasticidade,

flexibilidade e leveza são fulcrais para que consiga cumprir na perfeição todas as suas funções. Embora o esqueleto seja resultado de uma adaptação evolutiva, deve ser notado que este tem a capacidade de se adaptar dependendo das alterações que se verificam nas actividades diárias (Goldstein, 1987; Cullinane e Einhorn, 2002; Seeman, 2008).

A primeira descrição formal da relação dinâmica entre a estrutura e a função do osso, face à carga mecânica que suporta, data do século XIX, e é desde então conhecida como a Lei de Wolff, que preconize o seguinte, “*every change in the form and function of bone or of their function alone is followed by certain definite changes in their internal architecture, and equally definite alteration in their external conformation in accordance with mathematical laws*” (Frost, 1998b: 282).

A lei de Wolff tornou-se largamente aceite pela comunidade científica e a sua premissa tornou-se no princípio básico da regulação óssea. Contudo, esta lei baseia-se principalmente em modelos matemáticos que tentam expressar a biologia óssea, o que em certa medida pode ser redutor. Mais recentemente, o paradigma que diz que a estrutura otimiza a força do próprio osso, e que as alterações estruturais são levadas a cabo pelas células ósseas como resposta a um estímulo externo, tem vindo a sofrer algumas modificações (Goldstein, 1987; Forwood e Turner 1995; Frost, 1996; Martin, 2000; Cullinane e Einhorn, 2002; Seeman, 2008; Stout e Crowder, 2012).

Um dos principais nomes associados à revisão da Lei de Wolff é o ortopedista Harold Frost, que conceptualizou de uma outra forma os mecanismos que controlam a massa óssea. Para o autor, a estrutura do osso encontra-se sob o controlo de um sistema biomecânico, designado por mecanostato. Este irá controlar, em última análise, a modelação do osso e, por sua vez, controlará também a sua organização espacial, a sua capacidade de carga e a sua eficiência na dissipação de forças. A hipótese do mecanostato preconiza o seguinte, à nascença muitas das características da arquitectura esquelética e os mecanismos biológicos responsáveis pela sua alteração, já existem, na forma de “*condições base*”. Depois do nascimento, estas condições adaptam o esqueleto aos constrangimentos mecânicos, e por sua vez o esqueleto responde, utilizando elementos celulares como os osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos e condroblastos (Frost, 1996; Frost, 1998a; Frost, 1998b; Frost, 2000; Jee, 2001; Frost, 2003; Curate, 2010; Gosman e Stout, 2010; Stout e Crowder, 2012).

Ainda na linha de pensamento dos autores, este sistema funciona como tantos outros no organismo, por um círculo de feedback, ou seja, um eventual dano na integridade mecânica do osso, produzido por um qualquer motivo, aumenta a pressão exercida sobre esse mesmo osso. Como resposta surge a formação óssea, ou a diminuição da reabsorção a este nível. Este mecanismo permite que os ossos se adaptem voluntariamente às restrições mecânicas, de forma a impedir que durante a vida o indivíduo fique desprotegido face a algum episódio de fractura. Assim, pode-se extrapolar e pensar que, se o osso não for alvo de nenhum tipo de constrangimento biomecânico, o que acontece, por exemplo, no caso de indivíduos imobilizados, irá constatar-se uma perda significativa de densidade óssea. Esta situação verifica-se de facto, demonstrando a autenticidade do mecanostato. Embora de modo reverso, as microfissuras registadas no osso que ocorrem durante a vida, estimulam a remodelação óssea, logo propiciam uma espécie de auto-remodelação que permite a preservação óssea.

Segundo Parfitt (2003), as estruturas celulares envolvidas neste mecanismo não são, ainda, completamente conhecidas, porém os osteócitos e as citoquinas parecem desempenhar um papel relevante em todo o processo. Todavia, apesar de não se conhecerem quais os mecanismos celulares subjacentes ao mecanostato, conhece-se quase na íntegra, o aparato celular intrínseco à modelação e remodelação do osso, processos que por sua vez, são essenciais a este sistema.

Deste modo, a incessante actividade óssea acontece essencialmente através do processo de remodelação óssea, onde se verifica a remoção de osso pelos osteoclastos, seguida de uma deposição do mesmo assegurada pelos osteoblastos. A remodelação óssea é então garantida por um conjunto de estruturas anatómicas conhecidas como *basic multicellular unit* (BMU). Um conjunto completamente desenvolvido de BMU consiste num grupo de osteoclastos que formam o cone de corte, e na retaguarda segue-se um grupo de osteoblastos que forma o cone de encerramento. Os locais de reabsorção óssea são relativamente pequenos, não excedendo os 50 µm de profundidade, porém num esqueleto humano adulto, no mesmo instante podem estar a actuar milhares de BMU em simultâneo (Jee, 2001; Ortner e Tuner-Walker, 2003; Waldron, 2009; Gosman e Stout, 2010; Stout e Crowder, 2012).

Genericamente, o processo de remodelação óssea engloba três fases, a activação, a reabsorção e a formação, muitas vezes denominadas por ARF<sup>2</sup>. A fase de activação começa quando o osso é alvo de um constrangimento, como por exemplo, as microfracturas. Em resposta a tal, as células do revestimento ósseo retiram-se e intumescem. Este processo expõe a fina camada de osso não mineralizado, o osteóide. Neste momento, as células de revestimento, através de sinais químicos, activaram já os precursores da linhagem osteoclástica, que são recrutados ao local onde se fundem, formando células multinucleadas e perfeitamente diferenciadas, os osteoclastos. Segue-se a reabsorção óssea que é então realizada por estas células, através do uso de uma combinação de ácido que dissolve a componente mineral, com enzimas proteolíticas que se encarregam de degradar a matriz orgânica. À medida que a BMU viaja ao longo da superfície em reabsorção, novos osteoclastos estão continuamente a ser activados, no entanto, aqueles que não se encontram nesta frente activa, acabam por morrer. Numa fase mais posterior, porém antes da fase de formação, os osteoclastos retiram-se para serem substituídos por macrófagos. Estes vão suavizar o interior da cavidade de reabsorção, através de uma camada de ligação que cimenta a deposição de osso novo a esta superfície. Por fim, a fase de formação fica a cargo dos osteoblastos que foram já atraídos para a área reabsorvida, devido à libertação de factores de crescimento e algumas outras substâncias, produzidas pelos osteoclastos. Os osteoblastos segregam camadas sucessivas de proteínas formadoras de osso, predominantemente colagénio do tipo I, juntamente com osteocalcina. Num prazo médio de 150 dias, a cavidade de reabsorção já se encontra totalmente preenchida e inicia-se a mineralização do osteóide mas apenas quando este atingir uma determinada espessura (Jee, 2001; Cultinane e Einhorn, 2002; Ortner e Tuner-Walker, 2003; Steiniche e Hauge, 2003; Seeman, 2008; Waldron, 2009; Curate, 2010; Gosman e Stout, 2010; Stout e Crowder, 2012).

Apesar de o processo se desenrolar de forma similar, tanto no osso trabecular como no osso cortical, o produto final é ligeiramente distinto. No osso cortical, as BMU são observáveis histomorfologicamente na forma de osteónios. Porém, é importante fazer a distinção entre aquilo que pode ser designado de osteónios primários e osteónios secundários. Os primeiros, não são produtos dos processos de remodelação óssea, resultam da formação centrípeta de osso lamelar em torno de um canal central, sem

---

<sup>2</sup> ARF - Acrónimo para as palavras em inglês *activation, resorption e formation*.

precederem da sequência ARF que define a remodelação. Estas estruturas encontram-se mais facilmente junto da superfície do endóstio, onde alguns espaços vazios são preenchidos pelos osteoblastos durante a compactação trabecular (Ortner e Turner-Walker, 2003; Waldron, 2009; Stout e Crowder, 2012).

No tecido cortical, as BMU como resultado do ciclo de remodelação, formam uma estrutura cilíndrica, designada de osteónio secundário. Devido ao facto de estas estruturas se apresentarem extremamente bem definidas, em cortes transversais do tecido ósseo, a maioria dos estudos antropológicos escolhe o tecido cortical como zona de excelência, para estudos histomorfométricos relacionados com a remodelação óssea (Stout e Crowder, 2012).

## ***2.2. Estimativa da idade à morte em Antropologia Forense***

Não há provavelmente outro assunto que fascine tanto a mente do homem, como as questões relacionadas com a vida e a morte. Durante a vida, o envelhecimento é um companheiro constante. Mesmo que não desejado, este acaba por ser a leve lembrança da mortalidade certa e da sua iminência, que se sabe ser o destino final de quase todos os seres vivos. Por este motivo, a vida nunca pode ser separada do envelhecimento, são entidades mútuas que se completam. Em última instância, o envelhecimento é uma ferramenta ao serviço da morte que é sabido ser o facto mais irreversível da biologia de um indivíduo (Medina, 1996; Wickens, 1998).

Ainda de acordo com a opinião dos autores, devido ao facto de ser uma das consequências mais inevitáveis da vida, não é difícil perder a noção de que o envelhecimento é um processo biológico, enraizado nas leis da física e da química. A tentativa de definir envelhecimento nem sempre é fácil, uma vez que é uma condição *sine qua non* à vida humana. Além de ser experienciado por todos, o seu efeito é conhecido e passível de observação nos indivíduos mais próximos. De todas as formas, poderia tentar dizer-se que o envelhecimento é universal, inevitável, gradual, e culmina com o processo de morte (Bellamy, 1995; Medina, 1996; Wickens, 1998; Crews e Bogin, 2010).

Convém referir alguns problemas associados ao próprio léxico da palavra envelhecimento, uma vez que o seu uso poderá gerar eventualmente alguma confusão. No uso comum, envelhecer, significa simplesmente que os anos passam por um determinado indivíduo e nada tem a ver com o envelhecimento a nível biológico, este segundo alguns autores, designa-se de “*vigor em declínio*”. É habitualmente aceite que durante a fase de crescimento e desenvolvimento de um indivíduo, este não envelhece. O vigor em declínio está associado exclusivamente ao término dos processos de maturação, sendo o indivíduo já em adulto. Assim, uma criança ou um adolescente não envelhece, no sentido biológico do termo. Por esta mesma razão é preferível utilizar o termo senescência, para descrever os resultados do envelhecimento e do conseqüente declínio que este causa no organismo (Wickens, 1998).

A idade determina então, muitos dos aspectos da vida de um indivíduo, desde o parto até ao momento do feneçimento. As representações culturais da idade não são parcas, existindo, por exemplo, uma idade que marca o início da vida adulta perante a sociedade e perante o próprio indivíduo. À luz deste complexo cenário, é necessário uma dose de cautela quando se insere a variável idade nos estudos antropológicos, todavia, este é um dos parâmetros por excelência de qualquer investigação antropológica, seja ela de contexto arqueológico ou forense (Iscan, 1989; Cunha, 1996; Cox e Mays, 2000; Camariere *et al.*, 2009).

Como já foi referido previamente, e tendo em consideração o núcleo do presente trabalho, nos últimos dez anos o crescimento no número de livros e artigos científicos na área da Antropologia Forense tem sido exponencial. Os antropólogos têm vindo a expandir a variedade de técnicas aplicadas para a determinação dos quatro parâmetros básicos a analisar, quando se tenta definir a osteobiografia de um indivíduo. Porém, o estabelecimento de um perfil com base nos restos esqueléticos é vital para as interpretações antropológicas de um determinado acontecimento, sobretudo se este estiver associado ao contexto forense. Os padrões que emergem de uma boa análise dos restos ósseos podem isolar, tanto factores biológicos como sociais, que permitam a identificação do indivíduo padecido (Aykroyd, *et al.*, 1997; Baccino *et al.*, 1999; Ritz-Timme, *et al.*, 2000; Kemkes-Grottenthaler, 2001; Bethard, 2005; Littleton e Kinaston, 2008). A estimativa da idade à morte é por excelência um dos critérios a ser examinado,

uma vez que conforme foi explanado, está-lhe inerente uma forte componente social, que torna a avaliação deste numa árdua tarefa.

O problema da estimativa da idade à morte em Antropologia Forense vai para além desta questão, sendo um dos parâmetros mais difíceis de analisar na reconstrução do perfil do indivíduo em questão. De resto, é passível afirmar que não existe empiricamente, nenhuma possibilidade de determinar a idade que um indivíduo tinha aquando do seu padecimento, sem ter associada uma determinada margem de erro (Konisberg *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2009; Cattaneo, 2009; Cunha *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2010; Ubelaker, 2010a; Garvin *et al.*, 2012). Para perceber o porquê deste quesito, os processos básicos que estão no suporte deste procedimento, devem ser escrutinados. Começando pelo próprio termo, *estimativa*, que se aplica perfeitamente neste contexto, dado que a idade à morte é uma variável contínua, que pode potencialmente tomar um valor entre, por exemplo, zero e cem anos. No caso do sexo, já que se trata de uma variável discreta, pode-se usar o termo *determinar*, ou algum semelhante, que reflecta a natureza categorizada desta variável (Nawrocki, 2010).

Para além desta questão, há outra componente que introduz erro na estimativa da idade à morte, o facto de existir uma desigualdade entre a idade observável nos restos esqueléticos e aquela que o indivíduo tinha na realidade, ou seja uma diferença entre a idade biológica e a idade cronológica (Isan, 1989; Scheuer, 2002; Bethard, 2005; Introna e Campobasso, 2006; Cunha e Antunes-Ferreira, 2008; Pickering e Bachman, 2009; Nawrocki, 2010; White *et al.*, 2012).

Por definição, a idade biológica, morfológica ou fisiológica corresponde à idade que é fornecida pelos elementos ósseos estando dependente da singularidade de cada esqueleto. Por sua vez, e em contraste, a idade cronológica diz respeito à idade calendarizada, ou seja, é a medida em dias ou anos desde o nascimento de um indivíduo até ao seu decesso.

Assim, os indicadores etários que se observam nos remanescentes esqueléticos são o resultado de uma contínua adaptação do tecido ósseo ao stresse biomecânico, como preconiza a já referida hipótese do mecanostato. Esta questão faz com que em última análise, os indicadores etários no esqueleto se alterem ao longo da vida do indivíduo, verificando-se principalmente uma modelação do esqueleto de tal forma, que este se torna único perante todos os outros, inclusive com aqueles que partilham a mesma idade

cronológica (Cox e Mays, 2000; Buckberry e Chamberlain, 2002; Frost, 2003; Curate, 2010; Franklin, 2010; Nawrocki, 2010; White *et al.*, 2012).

Seguindo esta linha de pensamento, e apesar do referido, a idade biológica apresenta na verdade uma correlação com a idade cronológica, não apresentando no entanto, uma relação directa. Mais que isto, esta relação é variável ao longo da história de vida de um indivíduo. Note-se que à medida que o tempo decorre, as alterações biológicas e biomecânicas no esqueleto vão-se, de certa forma, acumulando, não necessariamente com uma configuração linear ou regular. Isto para dizer que, a estimativa da idade em indivíduos mais jovens será sempre mais fiável do que a estimativa da idade em indivíduos mais velhos (Buckberry e Chamberlain, 2002; Kemkes-Grottenthaler, 2002; Bethard, 2005; Jangjetriew *et al.*, 2007; Rösing *et al.*, 2007; Franklin, 2010).

Um dos primeiros passos aquando da avaliação deste parâmetro é efectuar uma primeira divisão em dois grandes grupos, adultos e não adultos, uma vez que, a apreciação da idade nos não adultos é substancialmente mais fidedigna e taxativamente mais fácil de analisar do que a dos adultos (Iskan, 1989; Mays, 1998; Zambrano, 2000; Brown, 2009; Cunha *et al.*, 2009). Tendo em consideração o que foi aludido, o esqueleto de um recém-nascido ou de uma criança não sofreu ainda a constrição biomecânica verificada nos adultos. Logo, é possível afirmar que apesar da singularidade garantida pela genética, esqueletos mais jovens terão à partida mais elementos em comum do que esqueletos que já sofreram a acção de vários factores intrínsecos e extrínsecos (Buckberry e Chamberlain, 2002; Franklin, 2010; Koester *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012).

Outra questão a ter em consideração, é o facto de os indicadores observados nos não adultos estarem associados aos processos de desenvolvimento e crescimento. Nos indivíduos mais velhos estes prendem-se com alterações resultantes da natural senescência do organismo ao nível esquelético. Seguindo este raciocínio, os indicadores esqueléticos de desenvolvimento e crescimento além de serem em maior número, apresentam uma distribuição mais linear, intra e inter indivíduo, fazendo com que a correlação entre a idade biológica seja mais elevada em indivíduos mais jovens e vá diminuindo à medida que estes vão envelhecendo (Marrafa, 1992; Santos, 1995;

Schmitt *et al.*, 2002; Berg, 2008; Cunha e Antunes-Ferreira, 2008; Brown, 2009; Manolagas e Parfitt, 2010; Martins *et al.*, 2012).

Uma vez que o cerne do presente projecto se prende com a estimativa da idade à morte em indivíduos adultos, não se achou pertinente explicar em detalhe quais os métodos utilizados para estimar a idade de indivíduos não adultos. Contudo, deve ficar bem claro, o porquê de tal tarefa ser taxativamente mais fácil nestes indivíduos. A relação entre a idade cronológica e a idade biológica de indivíduos mais velhos é mais imprecisa do que a de indivíduos mais novos, porque além de existirem empiricamente menos marcadores representativos da senescência óssea, a sua variabilidade é muito superior (Grynpras, 1993; Cox e Mays, 2000; Buckberry e Chamberlain, 2002; Rösing *et al.*, 2007; Franklin, 2010; Langley-Shirley e Jantz, 2010).

### *2.2.1. Métodos morfológicos para a estimativa da idade em adultos*

Em primeiro lugar, convém referir que para Crews e Bogin (2010), um “adulto humano” é um indivíduo que se encontra na fase reprodutiva, com um intervalo de idades compreendido entre os 20 e os 50 anos. Como se irá demonstrar, esta divisão no que à Antropologia Forense concerne, não é de todo tão linear, porém é importante atender à noção de envelhecimento e às implicações deste. Os autores mencionam que o período previamente referido, diz respeito à época da vida onde os seres humanos atingem o seu pico de saúde e bem-estar, já que as suas capacidades fisiológicas começam a entrar em declínio aproximadamente em torno dos 50 anos. A noção de que a maioria destes indivíduos vive em “*modern, culturally constructed niches*” (Crews, 2007: 367), faz com que estes consigam reter as capacidades somáticas necessárias para sobreviver até às 8 décadas de vida, ou por vezes mais. Curiosamente, outros indivíduos em idades precoces, encontram-se em risco devido a processos degenerativos como resultado de uma conjugação de factores intrínsecos, estilo de vida e o próprio meio envolvente.

Esta abordagem mostra como se torna difícil tentar estimar a idade de um indivíduo adulto, isto porque, além da grande variabilidade que existe, na maioria dos casos o antropólogo forense lida com restos esqueletizados. Em boa verdade, estes elementos

apesar de terem um grande valor informativo, perderam já muitos elementos que tornariam esta tarefa menos árdua.

Apesar de todas as condicionantes, e de alguns autores referirem este parâmetro como uma das tarefas mais difíceis que o antropólogo (Cattaneo, 2009) tem de realizar, e quiçá aquela que mais controvérsia já gerou (Littleton e Kinaston, 2008), a avaliação deste critério é essencial para todo o processo de identificação. Torna-se vital para fins policiais e jurídicos, no entanto, existe todo um conjunto de questões relacionadas com contendas económicas e financeiras, factores como o próprio rito funerário. E em última instância, a viabilidade psicológica das pessoas, que involuntariamente se vêem perante tal situação, extremamente dolorosa, uma vez que o processo de luto é feito sem algo “para chorar sobre” (Baccino e Schmitt, 2006: 260).

De acordo com vários autores, a maioria dos processos de estimativa da idade à morte em adultos, reside na observação de determinadas características cuja acção do tempo tenha marcado de uma forma específica (Baccino *et al.*, 1999; Ritz-Timme, 2000; Ubelaker, 2005; Baccino e Schmitt, 2006; Cattaneo, 2009; Cunha *et al.*, 2009). Deve ter-se em consideração que, para se estimar a idade é necessário ponderar quais os elementos ósseos disponíveis para análise (Cunha *et al.*, 2009; Franklin, 2010). Determinadas peças ósseas são mais discriminantes que outras, mas podem eventualmente não estar disponíveis, daí que sejam desenvolvidos vários métodos em diferentes tipos de ossos, para tentar ultrapassar esta problemática (Cunha *et al.*, 2009, Rougé-Maillart *et al.*, 2009).

Assim, serão apresentadas de forma genérica, as zonas anatómicas mais preponderantes para a estimativa da idade à morte, e consequentemente os métodos que lhes estão associados. Devido à grande panóplia de métodos desenvolvidos, apenas serão apresentados aqueles que, segundo Garvin e Passalacqua (2012) são os mais utilizados pelos investigadores, em combinação com alguns outros, que pelo seu destaque e relevância, ou pelo facto de por exemplo, terem sido desenvolvidos em amostras portuguesas, se demonstrem essenciais para a presente abordagem.

O crânio é um dos elementos usados na estimativa da idade à morte, especialmente ao nível das suturas cranianas e dos dentes. A maioria dos ossos do crânio encontra-se individualizada e em conexão através de articulações imóveis, designadas de suturas cranianas (Ubelaker, 1996; Cox e Mays, 2000; Mays, 1998; Santos, 2005; White *et al.*,

2012). Nos adultos à medida que a idade avança, as suturas tendem a obliterar, sendo este mesmo encerramento analisado para estabelecer uma relação com a idade cronológica do indivíduo. Todd e Lyon (1924, 1925), foram dos primeiros a desenvolver métodos para relacionar a idade com a obliteração das suturas cranianas, seguiu-se-lhes McKern e Stewart (1957); Meindl e Lovejoy (1985); Masset (1989) e mais recentemente Nawrocki (1998). Ao que tudo indica, a metodologia mais empregue pelos investigadores é a desenvolvida por Meindl *et al* (1985). Porém, na prática diária o uso da obliteração das suturas é um dos métodos menos utilizados (Garvin e Passalacqua, 2012). Esta questão pode estar relacionada com o facto de existirem vários autores, que preconizam que este só deve ser utilizado como auxiliar, em conjunto com outros procedimentos, ou quando não existir virtualmente nenhuma outra alternativa para estimar a idade (Mays, 1998; Schmitt, 2008; Bethard, 2005; Klepinger, 2006; Scheuer e Black, 2007; Purves *et al.*, 2011).

Ao nível dos dentes, é pertinente referir que não existe uma grande variedade de metodologias morfológicas para estimar idade de adultos, todavia a avaliação do desgaste dentário é uma das aplicações mais usadas para este fim. Estas não são abordagens morfológicas no sentido estrito do termo, mas sim maioritariamente métricas. Optou-se por explicar brevemente o método desenvolvido por Lamendin *et al.* (1992), que é amplamente usado por vários profissionais, e ainda o método de Camariere *et al.* (2009), relevante pelo facto de ter sido testado em amostras portuguesas. Desde a sua erupção na cavidade oral, os tecidos dentários estão sujeitos a um lento processo de envelhecimento, a perda destes durante a vida do indivíduo é conhecida por desgaste dentário. O grau de desgaste depende, sem qualquer dúvida, do tempo de utilização das peças dentárias, por este motivo encontra-se de certa forma relacionado com a idade do indivíduo. No entanto, existem poucos estudos elaborados em amostras com idades conhecidas, tornando difícil observar a relação entre o desgaste e a idade (Buikstra e Ubelaker, 1994; Ubelaker, 1996; Mays, 1998; Hillson, 2000; Wasterlain, 2006). A maioria dos métodos para estimativa da idade, com base no desgaste das peças dentárias, consiste num exame incompto do padrão em que o desgaste se procedeu (Kim *et al.*, 2000).

A metodologia desenhada por Lamendin *et al.* (1992) foi desenvolvida a partir de uma amostra Europeia, de origem francesa. A idade é estimada a partir das medições da

transparência radicular e da periodontose (distância entre a coroa dentária e a zona de ligação do tecido periodontal) de dentes monoradiculares. Uma desvantagem do presente método, prende-se com o facto de a sua utilização ser contra-indicada para indivíduos com idades inferiores a 40 anos e superiores a 80 anos, já que o erro associado pode enviesar os resultados (Bethard, 2005; Baccino e Schmitt, 2006; Klepinger, 2006; Beach, *et al.*, 2010; White *et al.*, 2012). Por fim, o método concebido por Cameriere e colaboradores (2004), e mais tarde testado em contexto português (Camarriere *et al.*, 2009), analisa através de imagiologia, a razão entre a área da cavidade pulpar e a área total do dente, determinando qual a sua relação com a idade que o indivíduo tinha aquando do seu fenecimento.

Como já indicado, a estimativa da idade em adultos ao nível morfológico é elaborada com base no grau de degeneração de determinadas articulações, uma delas é efectuada ao nível das costelas. Segundo Garvin e Passalacqua (2012), o procedimento desenvolvido por Iscan *et al.*, (1984) e actualizado por Iscan e Loth (1986) é o mais utilizado. Este, avalia o perfil da articulação osteocondral da costela, tanto ao nível da profundidade como do contorno das suas margens. As alterações são registadas em oito fases quando previamente comparadas com moldes tipo. Utiliza-se preferencialmente a quarta costela, o que no caso de restos mal preservados pode constituir um problema (Krogman e Iscan 1986; Iscan, 1989; Ubelaker, 1996; Mays, 1998; Cox e Mays, 2000; Baccino e Schmitt, 2006; Keplinger, 2006; Scheuer e Black, 2007; Cattaneo, 2009; Franklin, 2010; White *et al.*, 2012). Mais recentemente, o método construído por Iscan e Loth (1986) foi testado por Dedouit e colaboradores (2008) com uma abordagem um pouco diferente e os resultados pareceram ser favoráveis.

Outro osso com grande relevância para a estimativa da idade à morte, bem como para a determinação de outros parâmetros, nomeadamente o sexo, é o osso coxal. A este nível observam-se, principalmente, duas zonas articulares, a superfície auricular e a sínfise púbica.

Um dos primeiros métodos desenvolvidos para estimar a idade, a partir da metamorfose da superfície auricular, foi levado a cabo por Lovejoy e colaboradores (1985). A análise consiste em observar a senescência ao nível do ápex e verificar factores como a granulidade, a densidade e a micro ou macro porosidade. Após o exame, com o apoio de imagens padrão, a superfície é classificada em uma das 8 fases

existentes, que correspondem a uma idade média (Murray e Murray, 1991; Buikstra e Ubelaker, 1994; Ubelaker, 1996; Bacciono *et al.*, 1999; Cox e Mays, 2000; Cattaneo, 2009; White *et al.*, 2012). Mais recentemente, Buckberry e Chamberlain (2002), procederam a uma revisão do método de Lovejoy e colaboradores (1985) de modo a tornarem a sua aplicação mais fácil e mais intuitiva, e sobretudo com o intuito de eliminar o erro inter e intra observador encontrado. Mulhern e Jones (2004) e Hens e Belcastro (2012) testaram os dois métodos, e demonstram que ambos têm vantagens e desvantagens. Por este mesmo motivo, os autores afirmam que a utilização destas metodologias deve ser feita apenas em determinadas circunstâncias, desaconselhando a sua aplicação como indicadores isolados.

Ainda ao nível do osso coxal, mais especificamente na zona de articulação entre os dois ossos, ou seja na sínfise púbica, foram ao longo do tempo desenvolvidos vários métodos, que relacionam a morfologia desta zona com a idade que o indivíduo tinha aquando da sua morte. O aspecto da zona da sínfise púbica, quando o indivíduo é jovem, possui uma certa quantidade de sulcos dando um aspecto estriado como que se de ondas se tratasse. À medida que o indivíduo envelhece, as rugosidades começam a desaparecer e a superfície começa a tornar-se plana e uniforme, as margens começam a ficar delineadas por uma espécie de crista óssea, verificando-se um desgaste ao nível da zona central (Meindl *et al.*, 1985; Ubelaker, 1994; Santos, 1995; Ubelaker, 1996; Baccino *et al.*, 1999; Baccino e Schmitt, 2006; Cattaneo, 2009; Franklin, 2010; White *et al.*, 2012).

O primeiro a delinear um método que relacionasse a senescência desta zona com a idade à morte foi Tood (1920). A aplicação consistia em atribuir uma de dez fases, com base em representações gráficas e nas descrições destas. A metodologia permaneceu intacta até ser revista por Brooks (1955), que afirmou uma falha nesta, dizendo que havia uma tendência de sobrestimar, principalmente, em idades mais avançadas. O próximo desenvolvimento ficou a cargo de McKern e Stewart (1957), que de certa forma simplificaram o método observando apenas três componentes, contudo a amostra dos autores era exclusivamente masculina, o que causaria um problema na estimativa de indivíduos do sexo feminino.

A metodologia seguinte foi delineada por Suchey e Brooks (1990) e é de resto, segundo Garvin e Passalacqua (2012), o método por excelência usado na prática diária

de vários antropólogos. A utilização deste procedimento é de uso simples, devido à disponibilização de moldes e fotografias padrão, tendo também uma forte componente descritiva. Porém, está sujeita a um viés devido à subjectividade do observador, sendo o intervalo de idades por vezes demasiado amplo. Ultimamente, estudos como os de Pasquier e colegas (1999), de Hartnett (2010) e de Martins e colaboradores (2012), têm vindo a melhorar a aplicação da sínfise púbica para estimar a idade com base nos restos esqueléticos. Ao que tudo indica, esta é a região anatómica que os profissionais preferem, quando na sua prática diária, se vêem confrontados com a necessidade de estimar a idade de um indivíduo padecido (Garvin e Passalacqua, 2012).

Por fim, convém referir que, segundo alguns autores como Baccino e colaboradores (1999), Cox e Mays (2000) e Cattaneo (2009), a opção mais correcta quando se tenta estimar a idade à morte é optar por uma abordagem multivariada. Uma vez que o cerne do presente trabalho não se prende com esta questão, dar-se-á apenas um exemplo, que devido à sua preponderância, se achou pertinente ver aqui referido. O “two-step procedure” (TSP) foi desenvolvido por vários autores (Baccino e Zerilli, 1997; Baccino *et al.*, 1991), e é apresentado como sendo um método vantajoso e com uma boa relação entre fiabilidade e simplicidade. De uma forma genérica, o método combina o modelo de Suchey-Brooks, com o método de Lamendin<sup>3</sup>.

Apesar da grande variabilidade de métodos apresentados, e de muitos outros que têm vindo a ser desenvolvidos, segundo Saunders e colaboradores (1992), não há nenhum indicador esquelético de idade à morte que reflecta eficazmente todos os factores que influenciam a idade cronológica.

### 2.2.2. A microscopia na estimativa da idade de indivíduos adultos

Na opinião de Rösing e colaboradores (2007), os métodos de estimativa da idade à morte podem ser divididos em duas categorias, aqueles que são simples mas pouco exactos, e aqueles que são mais complexos, mas cujos resultados apresentam taxas de fiabilidade muito mais aceitáveis. Nestes últimos, os autores incluem a determinação da

---

<sup>3</sup> Devido às *nuances* da combinação dos dois métodos, o TSP não foi aqui explicado em pormenor, contudo este encontra-se detalhadamente descrito em Baccino e Schmitt (2006).

idade com base na racemização do ácido aspártico, histologia dentária e óssea, e a contagem de camadas de crescimento do cemento dentário. Deve-se ter em mente que, os métodos definidos como “simples” devem ser usados, principalmente, numa primeira fase da análise, enquanto os métodos mais “avançados” devem constituir uma fase mais tardia da investigação.

Como a questão principal do presente projecto se prende com a análise histológica para estimar a idade à morte, de material osteológico, irá ser estabelecido sumariamente o estado da arte deste tipo de exame, neste contexto particular.

A histomorfometria óssea tem vindo a ser usada para auxiliar os profissionais na estimativa da idade à morte, mostrando a sua relevância, por exemplo, em situações onde os restos humanos se encontram num grau elevado de fragmentação, ou tenham sido também atingidos pela acção do fogo (Singh e Gunberg, 1970; Cattaneo *et al.*, 1999; Mays, 1998; Cattaneo *et al.*, 2009). A aplicação das características microscópicas do osso para estimar este parâmetro, foi notada por Balthazard no início do século XX, aquando da sua publicação sobre a correlação observada entre a idade de um indivíduo e o diâmetro médio dos osteónios, neste caso particular, ao nível da diáfise da tíbia. Contudo, 50 anos passaram até que o valor da histologia neste contexto fosse totalmente reconhecido (Wallin *et al.*, 1994; Robling e Stout, 2008; Crowder, 2011).

A introdução do primeiro método histológico para apreciação da idade à morte foi desenvolvido por Kerley (1965). O autor observou na sua pesquisa a quantidade absoluta de osteónios secundários, intactos e fragmentados; a percentagem de osso lamelar circunferencial e o número de canais não Haversianos, em fémures, tíbias e fíbulas de indivíduos de ambos os sexos (Crowder e Pfeiffer, 2010; Crowder, 2011; Pfeiffer e Pinto, 2012; Streeter, 2012).

Desde a introdução do método de Kerley (1965), muitos outros se seguiram, nomeadamente uma revisão do mesmo por Kerley e Ubelaker (1978). Todavia, autores mais cépticos como Crowder e Pfeiffer (2010) admitem que a fiabilidade da análise quantitativa da histologia óssea ainda não está completamente demonstrada. Apesar da corrente defendida pelos autores ser legítima, ao longo do tempo, têm vindo a ser realizados inúmeros estudos utilizando diferentes ossos e diferentes componentes histológicos.

Na opinião de White e colaboradores. (2012), análises como as de Bouvier e Ubelaker (1977), Simmons (1985), Ericksen (1991), Alciati e colaboradores (1994) entre outros, mostram como uma abordagem histológica pode trazer vantagens para a estimativa da idade à morte, sobretudo em determinados contextos, como o de ossos cremados. O autor salienta também, o facto de os métodos microscópicos serem evasivos e implicarem a destruição do osso, o que torna em muitas situações impossível realizar tal processo. Contudo, na opinião de Purves e colaboradores (2011), a recolha de material osteológico para a análise genética é também um processo destrutivo, mas amplamente realizado pela maioria dos profissionais.

Outra das desvantagens apontadas à aplicação da histomorfometria óssea ao presente contexto prende-se, segundo Ubelaker, (1996), Robling e Stout (2008) e Crowder (2011), com o facto de o desenvolvimento e a interpretação dos métodos carecerem de um extensivo e profundo conhecimento da microanatomia e da fisiologia do tecido ósseo.

Assim, é peremptório que se faça uma breve alusão às principais características analisadas, quando se aplica a histomorfometria óssea na estimativa idade de um indivíduo. Quanto à terminologia utilizada, Parfitt e colaboradores (1987), procederam à estandardização da nomenclatura a utilizar. Ressalva-se o facto de esta se encontrar em língua inglesa. Como já foi mencionado, a histomorfometria quantifica uma determinada microestrutura, logo dimensões como, perímetros e áreas de alguns componentes ósseos, são vulgarmente utilizadas pelos investigadores. É importante referir sim, determinadas componentes que, não são de definição, tão intuitivas quanto estas.

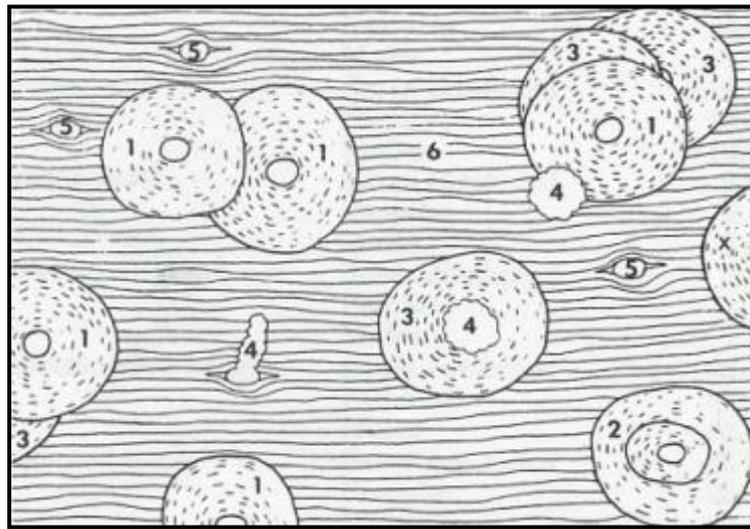
Os canais não Haversianos (figura 2.1) são uma destas estruturas, a sua formação ocorre durante os processos de remodelação, quando alguns vasos sanguíneos presentes no perióstio se incorporam nas lamelas circunferenciais produzindo no córtex um conjunto de canais vasculares primários, designados de canais não Haversianos (Lynnerup *et al.*, 2006; Maat *et al.*, 2006a; Robling e Stout, 2008). A densidade populacional de osteónios (OPD<sup>4</sup>) é formada pela densidade de osteónios intactos (número de sistemas de Havers completos, não remodelados) e a densidade de osteónios fragmentados (número de sistemas de Havers fragmentados, correspondentes aos

---

<sup>4</sup>OPD – Osteon population density

segmentos de osteónios com linha cimentante, mas sem o canal de Havers) (Iwaniec *et al.*, 1998; Crowder e Rosella, 2007; Kim *et al.*, 2007; Martrille *et al.*, 2009; Streeter, 2010). De uma forma sumária, estas são as principais medições que se fazem ao nível da histologia óssea. No entanto, existem outras como a percentagem de osso não remodelado, mas que de uma forma ou de outra implicam o conhecimento das estruturas e das medições previamente referidas.

Outra estrutura a salientar são os osteónios do tipo 2 (figura 1.1), que ao que tudo



**Figura 2.1.** Alguns componentes principais usados para a estimativa da idade à morte com base na histomorfometria óssea: (1) osteónio completo; (2) osteónio do tipo 2; (3) fragmento de osteónio; (4) baía de reabsorção; (5) canal não Haversiano; (6) osso lamelar circunferencial e (x) tipo de osteónio que não pode ser descrito sem um campo de visualização mais alargado. (Adaptado de Erickson, 1991: 174).

indica, são o resultado de um episódio de reabsorção ao longo de um trecho limitado de um canal de Havers, pertencente a um osteónio maduro. O novo evento de reabsorção acontece num espaço relativamente pequeno e é eventualmente envolvido por uma linha de cemento que é repleta com novas lamelas, formando como que um osteónio dentro de um osteónio.

Importa ainda referir, os espaços ou baías de reabsorção (figura 2.1) que correspondem ao primeiro passo na formação de um sistema de Havers. A sua função é destruir osso já formado, para dar lugar à deposição de osso novo.

Convém ainda constatar que, a avaliação de características como a espessura, volume, peso e densidade corticais (Thompson, 1980 Cho *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2006), apesar de na prática assentarem nos mesmos pilares da análise

histomorfométrica, não são, segundo Robling e Stout (2008) uma prática histológica na totalidade.

Devido à vasta quantidade de métodos desenvolvidos e face à grande variabilidade de estruturas analisadas quer a nível histomorfológico, quer tendo em consideração o tipo de osso utilizado, optou-se por seguir a estrutura apresentada por Robling e Stout (2008). Apresenta-se assim, um compêndio que sumariza os principais métodos, a configuração da amostra, os locais anatómicos de recolha desta, as estruturas microscópicas analisadas e ainda um pequeno comentário feito pelos autores dos próprios métodos e ainda por Robling e Stout (2008)<sup>5</sup>.

Independentemente desta questão julga-se necessário, que alguns métodos devido à sua relevância para o presente estudo, ou ainda devido à sua recente divulgação, devam aqui ser abordados de forma mais exaustiva. Começa-se por referir um estudo elaborado por Henning e Cooper (2011), que observa o erro associado a uma grande panóplia de métodos histológicos para a estimativa da idade, fazendo uma revisão sistemática dos métodos existentes e do grau de fiabilidade de cada um deles. Os autores ressaltam a necessidade de elaborar análises com uma amostragem mais ampla, essencialmente em termos de número.

Recentemente têm surgido estudos interessantes na área, como é o caso de uma observação efectuada por Lynnerup e colaboradores (2006), que usa microrradiografias em vez da histologia clássica. Outro estudo desenvolvido por Villa e Lynnerup (2010), inova sobretudo na interligação de conceitos, como a serologia e a densidade populacional de osteónios. É de referir ainda autores como Boel e colaboradores. (2007) Chan *et al.* (2007), Keough *et al.* (2009), Cannet *et al.* (2011), entre outros, que têm vindo a desenvolver trabalhos na área, com resultados minimamente satisfatórios. Devem ainda ser aludidas mais duas abordagens que fogem um pouco à norma “clássica” da estimativa da idade com base na histologia, são elas o estudo realizado por Castillo *et al.* (2011), que faz a estimativa com base em osso trabecular e o estudo de Dorandeu e colaboradores (2009), que realiza técnicas de histologia na sutura fronto-esfenoidal.

Apesar de não muito actuais, os estudos de Stout e Paine (1992) e Stout e colaboradores (1996) revelam-se de extrema importância para o presente projecto, uma

---

<sup>5</sup> Esta informação pode ser consultada no apêndice A.

vez que analisam a histologia da clavícula. O objectivo dos autores foi, sem dúvida, encontrar ossos cuja constrição biomecânica não influenciasse a estrutura interna do osso, acabando por seleccionar a clavícula e a costela, esta última já analisada por Stout (1986). O método de Stout e Paine (1992) analisa 40 indivíduos provenientes de contexto forense, e a amostra a nível etário difere de outros estudos, já que se encontra vocacionada para indivíduos mais jovens. Não se verificaram diferenças significativas entre os sexos, embora dos 40 indivíduos estudados apenas 8 eram do sexo feminino. A metodologia foi validada numa nova amostra, e os resultados entre a idade prevista e a idade conhecida não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Mais tarde Stout e colaboradores (1996), aplicaram a equação previamente desenvolvida para a clavícula numa amostra com aproximadamente o dobro dos indivíduos, provenientes de um cemitério Suíço do século XIX. Os resultados obtidos não correspondem aos desenvolvidos anteriormente, já que estes se mostraram falíveis, principalmente para indivíduos com idades superiores a 40 anos. Os autores pensam que tal falha se deve ao facto de a amostra ter condicionamentos diferentes, sobretudo no que ao intervalo etário diz respeito, excluindo portanto a inserção de indivíduos do sexo feminino como causa de enviesamento.

Ainda a este nível mas mais actual, surge o trabalho de Ingraham (2004) que analisa 40 clavículas provenientes de contexto de autópsia. O autor opta pela análise de uma única variável, a percentagem de osso não remodelado. A amostra varia entre os 10 e os 90 anos, e é recolhido o terço medial da diáfise da clavícula sem recorrer à descalcificação. Ao nível dos resultados, ao que tudo indica a análise do autor apresenta uma forte correlação com a idade, porém este ressalva afirmando que o presente método não se destina a substituir nenhum outro já existente, mas deve ser utilizado sim, como método complementar.

Como se pode observar, salvo excepções como Castillo e colaboradores (2011), a maioria das abordagens histológicas para a estimativa da idade têm em comum o tipo de osso utilizado, regra geral, o osso cortical. A escolha deste tipo de osso não é aleatória, uma vez que a sua resistência e subsequente durabilidade tornam-no perfeito para este tipo de análise. Como foi referido, o osso sofre processos contínuos de remodelação, e são estes processos que vão alterando a morfologia microscópica das peças ósseas. Em última instância, são estas alterações que permitem fazer a distinção entre os vários

grupos etários, uma vez que intuitivamente se percebe que pessoas mais velhas terão, à partida, experienciado mais episódios de remodelação óssea (Ortner, 1975; Stewart *et al.*, 2012).

Por fim convém ainda referir, que existem determinados factores que podem condicionar a análise histológica do tecido ósseo. A variação associada ao dimorfismo sexual é referida por alguns autores como Robling e Stout (2008) e Crowder (2011), que afirmam que algumas análises histomorfológicas relevaram diferenças significativas entre os dois sexos. No entanto, os estudos de Kerley (1965), Ahlqvist e Damsten (1969), Stout e Paine (1992), Thomas e colaboradores (2000; 2005), Ingraham (2004), entre outros não indicam a presença de diferenças significativas para este parâmetro. Segundo Robling e Stout (2008), não existem dados suficientes que permitam excluir o sexo como uma variável dependente da estimativa da idade, com base na microscopia óssea.

Factores como a actividade física, a variação populacional, determinado tipo de patologias, nomeadamente metabólicas, e ainda a própria dieta podem afectar também toda a análise histológica (Paine e Brenton, 2006). Ao nível da variação populacional, pesquisas como as de Cho e colaboradores (2002) realçam que o desenvolvimento dos métodos deve ser específico de uma dada população, ou seja, apenas devem ser aplicados na população em que foram desenvolvidos. É plausível então afirmar que, a variação populacional é um factor preponderante a considerar na avaliação da idade à morte baseada na histologia óssea (Robling e Stout, 2008; Britz *et al.*, 2009; Crowder, 2011; Streeter, 2012).

Em suma, e de uma forma geral, pode dizer-se que a histologia tem vindo a ser utilizada em alguns estudos no âmbito da estimativa da idade. Contudo, nada que se compara às imensas publicações que se podem encontrar no âmbito da análise macroscópica (Ritz-Timme, 2000). É necessário continuar a investir neste campo, sobretudo ao nível de uma abordagem holística, entre as várias técnicas histológicas e os diversos elementos osteológicos passíveis de análise.



**3**

**Material e Métodos**



A realização do actual projecto carece da necessidade do conhecimento da idade cronológica dos indivíduos, uma vez que só assim é possível, através de ferramentas estatísticas, estabelecer uma relação entre a idade estimada pela análise histológica e a idade real do indivíduo.

De facto existem duas formas de responder a esta necessidade. A primeira está ligada com a recolha da amostra a partir de colecções identificadas, como é o caso da Colecção de Esqueletos Identificados de Coimbra (Cunha e Wasterlain, 2007) e a Colecção de Esqueletos Identificados do Museu Bocage (Cardoso, 2006a), entre outras. Estas colecções contêm indivíduos de origem portuguesa, e o valor histórico e científico destas é irrefutável. Como a histologia é uma técnica invasiva, que implica a destruição de uma parte do osso, a aplicação neste tipo de material está altamente condicionada.

Ainda a acrescentar a este facto, importa referir que estas colecções datam dos séculos XIX e XX, o que em última análise pode constituir um problema a nível de enviesamento da amostra. Em Antropologia Forense, ao contrário do que acontece nos estudos paleobiológicos de populações pretéritas, a necessidade de uma amostragem recente é peremptória. Para autores como Klepinger (2001) e Purves e colaboradores (2011), apesar de estas colecções datarem do século XX, ainda vigora a ideia de que estas continuam a ser contemporâneas. Todavia, a verdade é que actualmente não se pode afirmar que o sejam de facto. A verificação de algumas tendências seculares, devidas essencialmente à alteração dos valores socioeconómicos, fez com que a aplicação de colecções, hoje em dia históricas, não seja recomendada para o desenvolvimento de determinados estudos, particularmente tendo em consideração as necessidades actuais ao nível jurídico, da Antropologia Forense.

Ao contrário do que se poderia pensar existem na verdade colecções identificadas, reunidas unicamente para o estudo de componentes histológicas. Entre elas destacam-se as colecções do *National Museum of Health and Medicine* (NMHM) sediadas no Instituto de Patologia das Forças Armadas Norte Americanas. Na realidade, esta colecção é um aglomerado de várias colecções que juntas contêm mais de dez mil exemplares de elementos ósseos e ligamentares, descalcificados, com e sem patologias. Dentro desta colecção é pertinente ressaltar a Kerley Collection, constituída por elementos ósseos não descalcificados, com e sem coloração, humanos e não humanos. A colecta do material ósseo começou com o trabalho do Doutor Ellis Kerley, na pesquisa da relação entre a microanatomia óssea e a idade à morte (Spatola *et al.*, 2012; <http://www.medicalmuseum.mil>).

Apesar do grande valor desta colecção, os seus exemplares datam também eles do século XX o que, como já foi referido, pode constituir um problema de peso em casos de Antropologia Forense. Porém, segundo Thomas e Clement (2012), a *Melbourne Femur Collection* (MFC) para além de ser uma das colecções mais completas, é também uma das mais bem documentadas, no que diz respeito a material ósseo humano contemporâneo. De resto, este material foi colectado, na sua maioria, em contexto de autópsia, sobretudo de indivíduos que morreram repentinamente ou inesperadamente. Possui contudo, alguns exemplares doados por pacientes que foram intervencionados cirurgicamente. Por conseguinte esta colecção seria ideal para desenvolver o presente estudo, todavia são vários os motivos que impossibilitam a sua utilização, sendo o mais flagrante, o facto de esta se localizar na Austrália, impossibilitando por completo a sua aplicação.

Uma das alternativas para contornar estas questões prende-se, à semelhança de muitos outros estudos (Stewart *et al.*, 2012; Cannet *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2011; Jo e Kim, 2011; Dorandeu *et al.*, 2009; Ingraham, 2004; Maat *et al.*, 2005; Stout e Paine, 1992; Kerley e Ubelaker, 1978), com a utilização de amostras recolhidas de indivíduos sujeitos a procedimentos de autópsia, onde variáveis como a idade, sexo e outras são conhecidas.

### 3.1. Caracterização da amostra

Deste modo, e tendo em consideração o que foi referido, a amostra populacional utilizada para realizar o presente estudo é constituída na sua maioria por exemplares recolhidos em contexto de autópsia. O material cadavérico foi recolhido com a colaboração do Instituto Nacional de Medicina Legal, ao nível da delegação Sul, com autorização prévia do Director desta, o Professor Doutor Jorge Costa Santos.

A recolha de osso humano, neste caso particular a clavícula, foi executada pelos profissionais desta delegação e a presença do investigador nunca foi de extrema importância nesta componente do projecto. Porém, foi estabelecido um protocolo detalhado que descrevia com exactidão o material cadavérico necessário e as variáveis a ter em consideração, aquando da colheita do mesmo.

Numa primeira fase, a solicitação da amostra ao INMLCF, I.P. consistiu no seguinte, indivíduos de ambos os sexos, preferencialmente com um *ratio* sexual semelhante, com o objectivo de analisar a existência de diferenças significativas entre os sexos. A afiliação populacional era conhecida de antemão, já que ao que tudo indica, exerce uma certa influência na avaliação histomorfométrica dos componentes ósseos (Stout, 1998; Cho *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2006; Robling e Stout, 2008). Outro factor de exclusão por excelência é a existência, ou presumível existência, de patologias metabólicas, lesões traumáticas e/ou outras, que em teoria possam alterar a normal composição do osso, inserindo portanto, um viés na investigação. Por fim, por uma questão de convenção optou-se que apenas seriam recolhidas as clavículas esquerdas.

O registo das idades dos indivíduos era conhecido, e tinha um limite mínimo previamente definido, sendo portanto, sempre superior a 30 anos, dado que em média esta é a idade de finalização do processo de fusão da extremidade esternal da clavícula. Quer isto dizer que, só próximo desta idade é que o osso se encontra completamente formado (McKern e Stewart, 1957; MacLaughlin, 1990; Buikstra e Ubelaker, 1994; Cunha *et al.*, 2009). Contudo, não se notou necessidade de limitar empiricamente um limite máximo de idade. Finalmente, e devido às condicionantes estatísticas, foi solicitado um número mínimo de amostras necessárias, não devendo este ser inferior a 30. A distribuição da amostra quanto à idade é talvez a questão mais importante, uma vez que o hodierno estudo prende-se com a estimativa deste mesmo parâmetro. Por este

motivo, numa primeira instância, a distribuição etária pretendida consistia no agrupamento de 5 indivíduos em 6 intervalos etários, com uma amplitude de 5 anos (30 a 34; 35 a 39; 40 a 44; 45 a 49; 50 a 54;  $\geq 55$ ).

Importa ressaltar o compromisso feito perante o INMLCF, I.P., acautelando os procedimentos como a consulta prévia do RENNDA<sup>6</sup>, em cada um dos casos elegíveis para recolha do material requerido. Enquanto investigador, foi levado a cabo o estrito cumprimento das normas legais e éticas em vigor na instituição. Cada osso encontrava-se devidamente individualizado em sacos de plástico. Os exemplares estavam identificados através de etiquetas, e apenas se tinha informação do número de processo, da idade, do sexo e da afiliação populacional do indivíduo.

Por motivos alheios ao desenvolvimento do presente estudo, o número de exemplares necessários, seguindo a estrutura apresentada anteriormente, não estava a ser conseguido, devido a questões relacionadas com o funcionamento das colheitas, o que tornou o processo mais moroso que o esperado.

Para contornar esta problemática foram tomadas duas medidas, a primeira prendeu-se com a solicitação ao INMLCF, I.P. em deixar de considerar a divisão em faixas etárias, aquando do processo de recolha. Apesar de tal facto poder vir a baralhar a análise posteriormente, decidiu-se que esta seria a melhor abordagem para conseguir um maior número de exemplares, dado que normalmente (Henriques e Rodrigues, 2008) são encontradas na sala de autópsia pessoas com idades mais avançadas. Deste modo, e apesar desta medida, desde o deferimento de autorização que data de 10 de Janeiro de 2012 até 03 de Julho do mesmo ano foram apenas recolhidas pelo INMLCF, I.P. 12 amostras para o presente estudo.

A segunda medida tomada, esteve relacionada com a oportunidade de recolher material de uma nova colecção identificada, que está actualmente a ser composta no Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra. Devido às características da mesma, que serão explanadas de seguida, foi possível incluí-la no actual estudo.

A “*Colecção de Esqueletos Identificados do Século XXI*”, também conhecida como “*Colecção de Santarém*” ou “*CEI/XXI*”, é das mais recentes colecções osteológicas identificadas, de proveniência portuguesa. Os indivíduos nela inseridos provêm do

---

<sup>6</sup> Registo Nacional de Não Dadores

cemitério dos Capuchos em Santarém. Esta colecção resulta de um protocolo de cooperação, por iniciativa da Professora Doutora Ana Maria Silva com a Câmara Municipal de Santarém. O protocolo é assinado em 2005, com o intuito de estudar a série osteológica do Largo Cândido Reis. Mais tarde, em 2008 é feita uma adenda ao protocolo desta, feita por diligência da Professora Doutora Eugénia Cunha. Aprovada em 2009 leva à cedência de 77 esqueletos.

De um modo sucinto, e segundo o autor, convém referir que a Colecção de Santarém é constituída por indivíduos de contexto português, falecidos entre 1995 e 2001. As informações biográficas incluem o boletim de óbito, que por sua vez apresenta De um parâmetros como o nome, a idade, o estado civil, a idade à morte, a filiação, a naturalidade, a residência e até a hora e a data da inumação, bem como o número do coval onde foram enterrados (Curate, 2010).

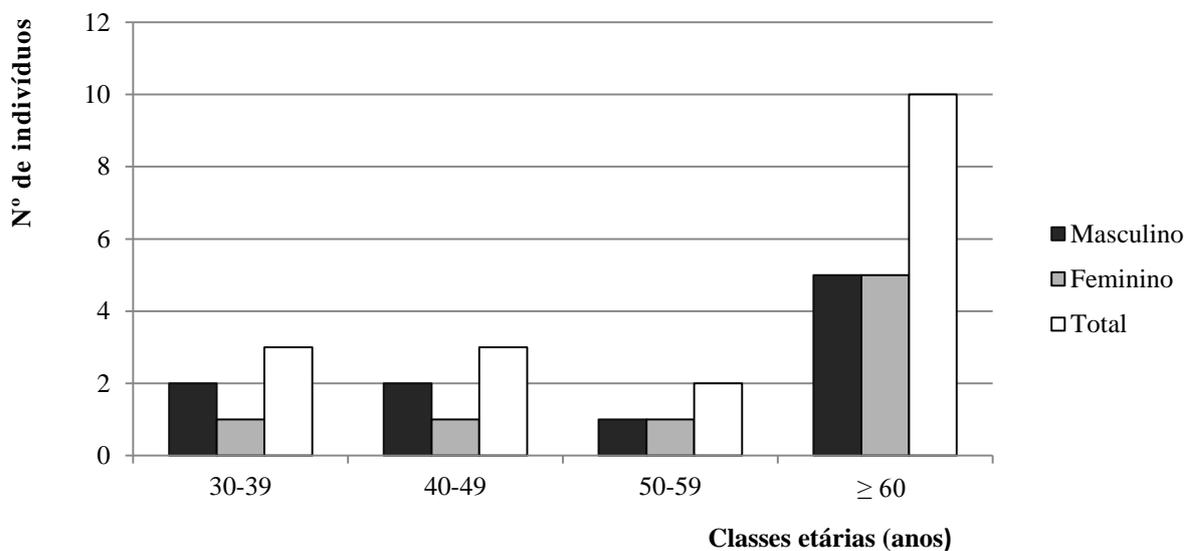
A distribuição dos sexos na presente colecção é equitativa, existem 39 indivíduos do sexo feminino e 38 do sexo masculino. Porém, a questão mais importante está relacionada com a idade, uma vez que nesta colecção a maioria dos elementos constituintes faleceu depois dos 80 anos. Assim, existem apenas cinco indivíduos com idade à morte inferiores a 50 anos, tendo o indivíduo mais novo falecido com apenas 33.

Como é expectável, tal facto influenciou a amostragem necessária ao presente estudo. Isto porque, apesar de esta colecção ter sido disponibilizada para a análise histológica pela sua curadora, unicamente os exemplares fracturados, devido a processos tafonómicos, foram de facto utilizados. Como se pode perceber, a histologia implica a destruição irreversível do osso, logo foi plausível não ter sido concedida a autorização de realizar cortes em ossos sem qualquer alteração, que podem eventualmente ser relevantes para futuros estudos.

Assim, dos 77 indivíduos existentes apenas 12 apresentavam fracturas *post mortem* na clavícula, sendo portanto os únicos passíveis de análise. Para otimizar o número amostral, ao contrário da opção tomada para os casos colhidos em contexto de autópsia, a lateralidade não foi considerada como um factor de exclusão, ou seja, foram recolhidas amostras tanto de clavículas esquerdas como de direitas. Ainda que tenham sido seleccionados 12 indivíduos passíveis de análise, nem todos resistiram ao corte histológico. A tafonomia actuou nestes ossos de forma diferencial. Se por um lado existiam ossos com preservação suficiente para permitir o corte e uma posterior

preparação para microscopia, por outro existiram outros exemplares que aquando da tentativa de corte acabaram por fracturar, inviabilizando a sua inclusão na amostra. Deste modo, apenas 6 exemplares da Colecção de Santarém foram de facto úteis para o propósito do estudo em causa.

Em suma, a amostra é constituída por um total de 18 indivíduos, 12 recolhidos em contexto de autópsia e 6 provenientes da CEI/XXI. A média das idades ronda os 63 anos ( $\bar{x}= 63,12$ ), sendo que amplitude da amostra vai dos 29 aos 92 anos.



**Figura 3.1.** Representação do número de indivíduos estudados (contexto de autópsia e CEI/XXI) por classes etárias e sexo.

### **3.2. Material e Tratamento da Amostra**

A escolha da clavícula para realizar tal procedimento está muito relacionada com o âmago do projecto, sobretudo porque segundo Ingraham (2004), os protocolos comuns de autópsia ditam que a clavícula tem de ser cortada para aceder à cavidade torácica. Este facto evita dissecações desnecessárias que iriam complicar todo o processo de preparação mortuária. Mesmo que a abordagem da autópsia não passe pelo corte deste osso, ao que tudo indica a sua colheita não é particularmente difícil, de forma a agilizar o mais possível todo o processo. Ainda de referir que, o estudo histológico de ossos longos requer cortes de peças esqueléticas que, à partida, são utilizadas em análises

osteométricas padrão, existindo assim uma relutância em submeter estes materiais a técnicas invasivas (Stout e Paine, 1992).

Além deste facto, a própria anatomia e fisiologia da clavícula tornam-na num excelente candidato para estudos histológicos. A clavícula é na verdade um osso longo, mas apresenta algumas vantagens face a outros ossos longos como o fémur, a tibia ou a fíbula. Além de ser de mais fácil colheita ao nível da autópsia, todos os procedimentos subsequentes são mais fáceis de aplicar, uma vez que as dimensões da clavícula são mais reduzidas, em comparação a outros ossos longos usados nos processos histológicos.

Assim, a parte média da diáfise da clavícula escolhida para realizar o presente estudo, além de ser uma zona com fraca inserção muscular, não é constituída por osso particularmente denso e pesado, facilitando o corte e a própria preparação da amostra para microscopia (Cunha e Morais, 1961; Stout e Paine, 1992; Culham e Peat, 1993; Voisin, 2006).

### 3.2.1. Maceração

Em primeiro lugar, toda a análise deve ser feita em *blind-test*. Para tal, foi atribuído a cada espécime o seguinte acrónimo de trabalho, CVL seguido de uma sequência numérica. As clavículas recolhidas em contexto de autópsia tiveram de ser desprendidas dos tecidos moles associados (figura 3.1), tendo sido usado para tal, o processo comumente conhecido no meio, como maceração.

Não existe em teoria, nenhum método estandardizado para se proceder à remoção dos tecidos moles em restos humanos, existem sim variadas publicações relativas a diversas metodologias que se destinam a este fim. Em última instância, cabe ao investigador escolher o método que considera mais adequado, consoante o tipo de estudo que está a realizar (Byers, 2010; Lee *et al.*, 2010).

Na presente análise, a técnica de maceração foi feita seguindo a publicação de Fenton e colaboradores (2003). A escolha que recaiu sobre este processo de remoção dos tecidos, deveu-se principalmente ao facto de os autores o descreverem como um método, rápido, barato e seguro. Isto porque, não requer a aplicação de determinados

componentes químicos, como por exemplo, o hipoclorito de sódio (lixívia), que poderia eventualmente alterar a estrutura interna do osso (Mann e Berryman, 2012).

Deste modo, como sugerido por Fenton e colaboradores (2003), e especialmente porque tal procedimento exige uma certa dose de experiência *a priori*, antes de se iniciar o processo em osso humano, foi efectuado um ensaio em osso animal, para perceber as precauções a ter aquando da realização do processo de maceração.

Para a remoção dos tecidos moles, seja em osso humano ou não, é por norma quase sempre necessário a presença de uma fonte de calor. Esta tem como finalidade Para aquecer um líquido, neste caso água corrente, de modo a “cozinhar” as partes moles, com o intuito de facilitar a sua destituição. Para o efeito foi utilizada uma placa eléctrica, e sobre esta foi colocado um recipiente metálico com capacidade para 4,7 L.

O conteúdo inserido no receptáculo, a “*tried and true formula*” como é descrita pelos autores, consiste no seguinte:

1. Água corrente para submergir os espécimes;
2. Detergente para a roupa, preferencialmente na forma granular. Não foi utilizada nenhuma marca em particular, optou-se sim por utilizar detergente da roupa para lavagem manual. Os autores aconselham que a cada 2 L de água sejam adicionados 20 mL de detergente;
3. Carbonato de sódio, também este na forma granulada. Este componente é de amplo uso em determinados países, como auxiliar do processo de remoção de nódos aquando da lavagem. Porém em Portugal, a sua distribuição está extremamente limitada e não foi possível encontrar tal produto nos estabelecimentos habituais. Para contornar a questão, este foi substituído por tira nódos com oxigénio activo, adicionando também 20 mL por 2 L de água.
4. Por fim o último passo, este de carácter opcional, consiste no desengorduramento da amostra através da submersão numa mistura de água corrente com amoníaco (na falta deste pode ser utilizado lava-tudo doméstico que tenha na sua constituição amónia). Neste caso devem ser adicionados 150 mL por 2 L de água.

As amostras devem então ser “cozinhas” nesta mistura, a uma temperatura baixa, sempre acautelando que o ponto de ebulição não é atingido, embora a temperatura ideal seja muito perto deste.

De referir que apenas um disco eléctrico estava à disposição, e portanto um só recipiente pôde ser utilizado, logo as clavículas não foram maceradas separadamente, mas sim em conjunto de forma a agilizar e apressar o processo. Como se procedeu à mistura do material ósseo no recipiente metálico, teve de se garantir que cada um dos ossos continuava identificado. Para tal, decidiu-se acoplar na diáfise de cada um deles a ponta de um cordel de algodão, na ponta oposta e do lado exterior do recipiente, colocou-se uma etiqueta com o acrónimo de cada osso.

Durante a fase de cozedura, os complexos enzimáticos quebram as ligações dos tecidos moles induzindo a libertação destes, expondo ao mesmo tempo o material esquelético.





**Figura 3.2.** Clavícula esquerda (CVL 4), em norma superior antes de submetida ao processo de maceração. É de destacar que não se consegue distinguir a presença de osso, à vista desarmada, uma vez que está completamente coberto por tecidos moles.



**Figura 3.3.** Clavícula esquerda (CVL 4), em norma superior, após submissão ao processo de maceração. Toda a extensão do osso é observável, não existindo qualquer tipo de tecidos moles associados.



Por razões relacionadas com o constrangimento biomecânico, a zona das epífises, sobretudo a epífise esternal, devido à existência de uma cartilagem mais forte, é de todo o osso, a zona que mais dificuldade apresenta na remoção da componente mole. Assim, os espécimes tiveram de ser “cozinhados” em várias sequências, devido à saturação do preparado. Podem ser feitas tantas preparações quanto necessárias, porém, neste caso concreto, não foram necessários mais que 3 eventos. A cada episódio de substituição, as amostras foram lavadas em água corrente e alguns dos tecidos que se encontravam já desprendidos, foram removidos manualmente.

O processo foi dado por terminado, quando se percebeu que os tecidos remanescentes já não se iriam despegar do osso pela acção enzimática do preparado. Nesta fase optou-se pela remoção manual destes. Foi necessário uma dose elevada de cautela neste estágio, uma vez que a remoção dos tecidos foi efectuada com ajuda de materiais pontiagudos, que podiam danificar o perióstio. Para facilitar o processo, o osso foi lavado com uma mistura de água corrente e amoníaco. Foi sobretudo nesta fase, que o procedimento experimental levado a cabo em osso não humano, se revelou extremamente útil, uma vez que forneceu a experiência necessária, para danificar o osso o menos possível. A última etapa consistiu na secagem dos espécimes. Esta ocorreu à temperatura ambiente, com o cuidado de não expor o material à radiação solar. No final de toda esta etapa, o osso encontrava-se então completamente desprendido de tecidos moles, pronto a ser analisado (figura 3.2).

Após a clavícula estar então livre de tecidos moles, efectuaram-se algumas medidas nesta, nomeadamente o comprimento máximo, o diâmetro ântero-posterior e o diâmetro transverso. Antes de se retirar da zona lateral à tuberosidade costal (figura 3.3), uma porção de osso, que não ultrapassou os de 5 mm finais de espessura, todos os exemplares foram devidamente fotografados.



**Figura 3.4.** Clavícula esquerda humana, em norma posterior. (A) Localização aproximada da área de recolha da amostra; (B) Tuberosidade costal.

### 3.2.2. *Preparação para histologia*

O procedimento que se segue é o tratamento para a histologia. Para realizar este passo adoptou-se a metodologia desenvolvida por Maat e colegas (2001; 2006b), embora com ligeiras alterações, de forma a otimizar todo o método. O autor gentilmente cedeu um guia com imagens detalhadas do procedimento, de modo a facilitar a replicação deste. De referir que, segundo Maat e colaboradores (2001; 2006b) depois de se adquirir alguma prática, todo o processo não se prolonga por mais de 20 minutos, afirmação tal que se pretende aqui testar. Assim, e de modo a tornar mais perceptível todo este processo, irão ser descritas as etapas realizadas:

1. Para a concretização deste procedimento, é necessário possuir um bloco de vidro como suporte, para o desgaste do osso. Deste modo, o primeiro passo consistiu em adquirir um bloco de vidro, que ao contrário do que se possa pensar, foi um processo relativamente fácil. Por uma questão de convenção, as medidas do bloco são iguais às observadas em Maat e colaboradores (2001; 2005), 13,8 x 22,8 cm, com 1 cm de espessura;

2. De seguida, foi cortada uma folha de papel impermeável abrasivo, do vulgo lixa de água. Para este caso específico foi utilizada uma lixa de água com uma gramagem de P220. O papel abrasivo foi recortado consoante as medidas do bloco de vidro, necessitando transpor as margens deste, em 1 cm, para garantir que nenhuma água chegasse à vaselina;

3. A placa de vidro foi coberta com um creme tipo vaselina. Esta foi bem revestida, no entanto sem exageros. Por fim, colocou-se o papel abrasivo já recortado sobre a placa de vidro, agora uniformemente coberta com vaselina;

4. Seguidamente cortou-se uma amostra do osso através de dois talhes paralelos, com uma espessura nunca superior a 5 mm. Para tal, colocou-se o osso num torno de bancada e apertou-se o mesmo até o osso ficar seguro e estável. Este processo envolveu algum cuidado, particularmente em espécimes mais frágeis. Numa primeira fase foi utilizada uma serra eléctrica, neste caso específico, uma serra do tipo tico-tico Einhell STE 350, com uma lâmina de corte para metal. Todavia, optou-se por recolher também uma amostra colhida com o auxílio de uma serra manual, também esta própria para cortes de material metálico. De referir que os exemplares mais frágeis, essencialmente

os da Colecção de Santarém, tiveram de ser obrigatoriamente talhados com a serra manual, uma vez que a serra eléctrica produziu fracturas que inviabilizaram a posterior análise do material;

**5.** A parte central do papel abrasivo foi humedecida com uma mistura de água corrente e umas gotas de detergente comum da loiça. Algumas das amostras apresentavam uma clara oleosidade, comum em amostras forenses. Por este motivo começaram a ser polidas no papel abrasivo, de forma suave, com as mãos, efectuando um movimento rotativo;

**6.** Seguiu-se a elaboração do "*Frost's gripping device*". Quando o papel abrasivo foi cortado, sobraram deste algumas porções que foram utilizadas para a elaboração deste dispositivo. Assim, foi recortada uma tira de papel com cerca de 2 cm de largura, que se colocou transversalmente a uma lâmina de microscópio. As extremidades do papel serviram para fixar o dispositivo, o dedo indicador foi colocado no meio, apoiando a lâmina, enquanto o polegar e o terceiro dácilo seguraram as extremidades;

**7.** Os dois lados do espécime foram desgastados simultaneamente, aplicando pouca a média força, consoante a espessura. O processo foi realizado através de um movimento de rotação. O desgaste iniciou-se na parte central da placa, dado que neste local a abrasão não era tão forte. À medida que o desgaste foi ocorrendo, a amostra foi conduzida até às extremidades, devido ao aumento do grau de abrasão nestas;

**8.** O processo de desgaste ou polimento acabou na área central da placa. Nesta fase, foi necessária uma certa dose de cautela, para perceber quando a amostra estaria efectivamente pronta. Segundo Maat e colegas (2001), o processo de polimento acaba quando a amostra se tornar translúcida, mas tal definição nem sempre é de fácil aplicação. É necessário extremo cuidado para não quebrar o espécime, pois se o desgaste não for parado a tempo, a amostra pode fracturar e o processo carece de repetição.

**9.** A amostra foi mantida sempre húmida para impedir que engulhasse. Após o desgaste a mostra teve de ser limpa. Este passo consistiu na submersão da amostra em água destilada com umas gotículas de detergente da loiça. A transladação do espécime da placa de vidro para o goblé, foi feita com a ajuda de um pincel, sempre com o máximo cuidado para esta não fragmentar;

**10.** Depois de limpa através de um processo de centrifugação manual, a amostra foi

retirada do goblé, mais uma vez com a ajuda de um pincel suave. Seguidamente foi colocada numa placa de Petri, revestida com papel de filtro. Este foi previamente amarrotado, para facilitar o levantamento da amostra. Para ajudar na secagem da amostra além da utilização do papel de filtro, submergiu-se o espécime num último banho de água, com uma pequena percentagem de álcool etílico a 90%;

**11.** Por fim, limpou-se com álcool uma lâmina, que se colocou posteriormente sobre um fundo preto. Foram aplicadas algumas gotas de meio de montagem Dako no centro da lâmina. A amostra foi retirada da placa de Petri e foi colocada sobre o meio de montagem com a ajuda de fórceps. Esta foi disposta numa posição central, e quando tal não aconteceu a mesma foi corrigida com a ajuda de uma agulha. Sem esperar, mergulhou-se uma lamela em xileno (aguarrás) e o excesso foi removido com papel de filtro. A lamela foi lentamente colocada sob a amostra. O meio de montagem espalhou-se, sendo necessário algum cuidado para evitar a formação de bolhas de ar. Porém, nem sempre foi fácil evitar a formação destas e quando tal aconteceu seguiu-se o procedimento descrito em Maat e colaboradores (2001) que prevêm esta situação;

**12.** Nem sempre foi possível observar imediatamente a amostra, quando tal se verificou, esta foi deixada a repousar ao ar livre durante pelo menos um dia. Depois de secas, as amostras foram individualizadas e armazenadas em bolsas herméticas.

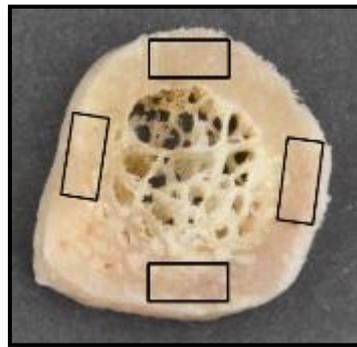
Importa referir que se optou por não descalcificar, nem fixar, o material ósseo. Apesar de a descalcificação ajudar o corte, e a fixação auxiliar ao nível da preservação das estruturas celulares, a inclusão de substâncias químicas no osso, além de influenciar a actividade enzimática e inibir no osso imunoradioactividade, pode principalmente, influenciar a preservação morfológica deste, inviabilizando a sua análise histológica. Além deste facto, este processo é substancialmente moroso, indo contra os objectivos do presente projecto, já que põe em causa a aplicação fácil e prática do método (Fink, 1986; Aaron e Carter, 1987; Kawamoto e Shimizu, 2000; Skinner, 2003).

### *3.2.3. Análise histológica*

A metodologia correspondente à análise microscópica foi adaptada de Ingraham (2004) aquando da realização de um estudo semelhante.

Desta forma, foram examinados quatro campos de análise em cada amostra de clavícula recolhida, especificamente na zona central, localizada entre a superfície do endóstio e do perióstio (figura 3.5). Neste caso foi apenas utilizado um exemplar por intervalo etário.

Preferencialmente, a análise seria realizada num microscópio de luz polarizada, ou adaptado, (Maat *et al.*, 2001) com uma câmara fotográfica digital associada, para conseguir fotografar a microestrutura do osso. Neste caso, não se encontrava disponível um microscópio com filtro de polarização, e as observações foram feitas usando a sugestão de Maat e colegas (2001; 2006b), que consistiu na colocação de porções de papel Polaroid na lente da ocular do microscópio e na fonte de luz do mesmo.



**Figura 3.5.** Exemplo dos 4 campos de visualização microscópica capturados para cada uma das amostras.

O microscópio disponível, cedido pelo Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra, foi um Axioskop 2plus da Carl Zeiss, que infelizmente não possuía um campo de imagem com ampliação de 100x. Esta, além de ser a recomendada por Maat e colegas (2001; 2006b) e Ingraham (2004) é a mais utilizada neste tipo de estudos (Kerley., 1965; Feik *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2007; Keough *et al.*, 2009). Deste modo, as imagens foram recolhidas com a objectiva PlanNeofluar 5x e com a PalnNeofluar 20x, ambas da Carl Zeiss. O uso da primeira ampliação serviu apenas para referência. Como o campo da imagem era de facto muito grande, o que impossibilitava a medição de todas as estruturas, foi recortado um quadrado com área conhecida, 15 x 15cm, em cada um dos campos fotografados, para facilitar a contagem das estruturas. As figuras foram guardadas no formato ZVI e JPEG, com o acrónimo atribuído a cada amostra.

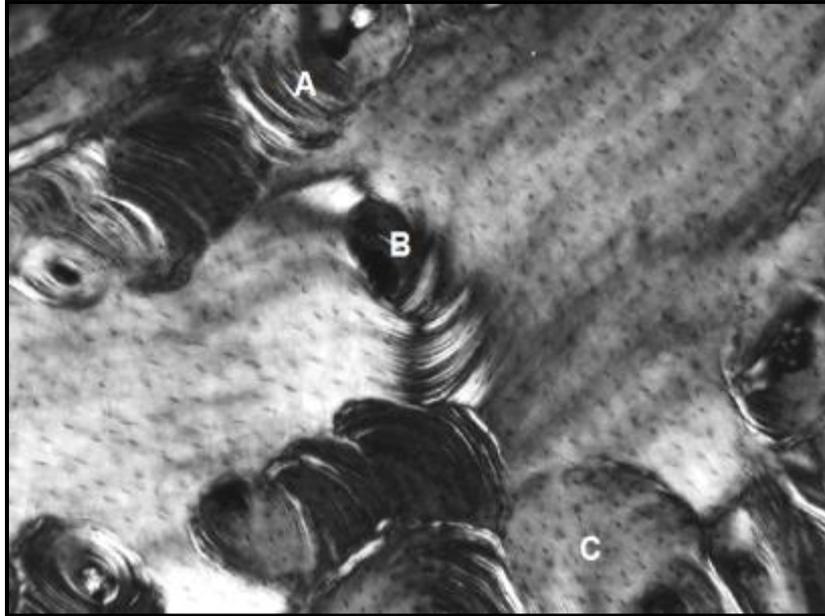
Em relação à análise das microestruturas ósseas, para calcular a área de osso não remodelado, é necessário identificar estruturas que não tenham sofrido remodelação. Surgiu então a necessidade de fazer uma distinção microscópica, a nível de morfologia, entre osteónios primários, considerados osso não remodelado, e osteónios secundários. Para tal usou-se a seguinte descrição de Kerley (1965), “ [...] quando observados ao microscópio de luz polarizada, os osteónios primários distinguem-se dos secundários através do osso lamelar que os envolve. Estes não possuem qualquer tipo de linha distintiva que os defina, e a lamela que os envolve dobra suavemente em redor dos seus limites. Em exemplares mais jovens, ou zonas de forte inserção muscular, a ligação entre as lamelas concêntricas e o osso envolvente é indigente e difusa. Nos osteónios secundários a lamela que os envolve corre ao longo da linha reversa e pára abruptamente nos locais onde os osteoclastos exerceram a sua acção” (Kerley, 1965:153).

Ao nível da identificação das estruturas, as extremidades superior, inferior e laterais, das imagens já recortadas, não foram consideradas, exceptuando situações onde a identificação das estruturas não levantava qualquer dúvida. Ainda nesta linha de pensamento, não foram consideradas as componentes histomorfológicas que por algum motivo, suscitasse alguma incerteza quanto à sua identificação. Depois de identificadas, as estruturas foram delineadas com recurso ao software Adobe Photoshop CS5. Em alguns casos usou-se a ferramenta *quick selection tool*. Esta ferramenta detecta automaticamente as diferenças de relevo e contraste e selecciona os componentes pretendidos. Contudo, em alguns casos não foi possível utilizar esta ferramenta, e quando tal se verificou optou-se por utilizar o *magnetic lasso tool* que à semelhança do anterior também detecta os relevos, mas permite ao utilizador um maior controlo, no momento de seleccionar a estrutura desejada. Após seleccionar a área pretendida, esta foi preenchida com o intuito de distinguir a área já seleccionada. Para esta situação utilizou-se a ferramenta *gradient tool*, disponível no Adobe Photoshop CS5.

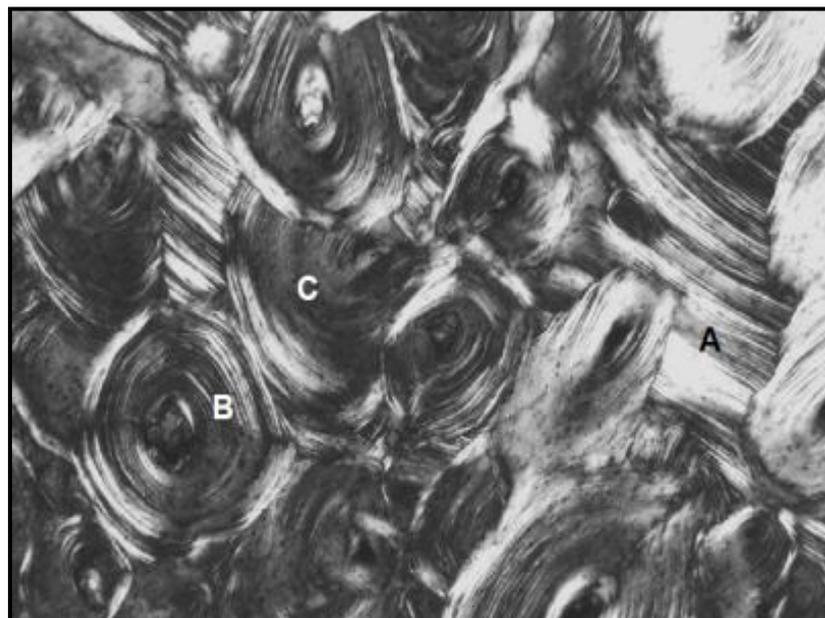
A área total da percentagem de osso não remodelado foi calculada com base no somatório das áreas correspondentes aos canais não haversianos, aos osteónios primários e ao osso circunferencial lamelar, mais comuns em indivíduos mais jovens, como se pode observar nas figuras 3.6 e 3.7 (Ingraham, 2004). Este somatório foi efectuado, para cada um dos 4 campos de imagem capturados para cada amostra.

Posteriormente foi calculado um somatório final. Este diz respeito à soma das áreas já identificadas como osso não remodelado, nos 4 campos de imagem, obtendo-se assim o valor da área deste osso para cada amostra. Este valor foi dividido pela área total das imagens. O valor da área total é calculado da seguinte forma, a área total das imagens em análise corresponde ao quadrado utilizado para fazer o corte, nas imagens inicialmente recolhidas. Como referido, cada quadrado tem uma área de 15 x 15 cm, o que equivale a 320356 pixéis. Desta feita, a área total para cada amostra corresponde aos 320356 pixéis vezes os 4 campos analisados, perfazendo um total de 1281424 pixéis.





**Figura 3.6.** Corte transversal de uma clavícula humana, pertencente a um indivíduo jovem. É possível observar as estruturas (A) osso lamelar circunferencial, (B) canal não Haversiano e (C) osteônio completo. Ampliação a 100x. Adaptado de Ingraham (2004: 5).



**Figura 3.7.** Corte transversal de uma clavícula humana, pertencente a um indivíduo mais velho. É possível observar (A) reduzidas quantidades de osso lamelar circunferencial, (B) osteônio completo e (C) fragmento de osteônio. Ampliação a 100 x. Adaptado de Ingraham (2004: 5).



Assim, as imagens apresentam a mesma área total, já que todas elas provêm da selecção feita com recurso do quadrado 15 x 15 cm. É atinente referir, que todas as medidas foram tomadas em pixéis, uma vez que evitou a transformação das unidades, ao mesmo tempo que o resultado final não se altera, dado este ser expresso em percentagem.

Por uma questão que foge ao âmbito metodológico do projecto, e que será explanada à posteriori, optou-se por analisar também uma outra variável da microanatomia óssea, a área cortical relativa. Esta é, segundo Cannet e colaboradores (2011), uma variável intrínseca à porção cortical do osso.

Como já foi mencionado, o osso cortical é, relativamente ao osso trabecular, o mais utilizado para estudos desta natureza. A área cortical relativa é definida “*pela quantidade de osso cortical que está presente numa determinada secção de osso*” (Stewart, 2012: 1). Em verdade, a medição da área cortical relativa não é directa. Para se conseguir calcular este parâmetro, é necessário fazer as medições da área total do espécime (Tt.Ar) e da área da cavidade medular (En.Ar). Depois basta subtrair o valor da área medular à área total, obtendo-se assim a área cortical (Ct.Ar). Por fim, basta dividir a área cortical pela área total e obtém-se assim a área cortical relativa (Ct.Ar/Tt.Ar) (Cho *et al.*, 2002):

$$\text{Ct.Ar/Tt.Ar} = \frac{\text{Tt.Ar} - \text{En.Ar}}{\text{Tt.Ar}}$$

Recentemente, Stewart e colaboradores (2012) levaram a cabo uma pesquisa comparativa para determinar qual o melhor método para analisar a área cortical relativa. Entre eles, destaca-se aquele que, devido à sua fácil aplicabilidade, se tornou no método a seguir para a determinação deste parâmetro.

Deste modo, para a determinação da área cortical relativa utilizaram-se os espécimes já preparados anteriormente. Todavia, ao invés das amostras serem observadas ao microscópio foram digitalizadas. Para este fim usou-se um digitalizador acoplado a uma impressora multifunções HP Deskjet F4180. A digitalização foi ajustada em termos de luminosidade e contraste, de modo a tornar cada exemplar o mais nítido possível. Todas as imagens foram seleccionadas para uma definição de 2400 PPI

(*pixels per inche*) e guardadas com a extensão .TIF. De referir que a totalidade das imagens possuía uma escala com unidade de medida, o centímetro, necessária à posterior análise no programa informático.

Mais uma vez, o software informático utilizado foi o Adobe Photoshop CS5, no entanto aqui, a análise foi um pouco mais complexa, não pondo em causa porém a fácil aplicação desta metodologia. O programa informático de análise de imagem apresenta a escala de medida previamente definida em pixéis. Para ultrapassar esta questão foi necessário escolher no menu de ferramentas a opção *Analyse*, dentro deste separador seleccionou-se *Set Measurement Scale* e depois *Custom*. Ao marcar esta opção surgiu automaticamente uma janela que permitiu seleccionar o número de pixéis que correspondiam a 1 cm, portanto a 10 mm (unidade de medida escolhida), com base na escala que já tinha sido previamente digitalizada com a amostra.

Após este procedimento delineou-se a área total, com a ajuda das ferramentas *quick selection tool* e *magnetic lasso tool* consoante as situações, como já mencionado anteriormente. De seguida, seleccionou-se a opção *Record Measurement*. Ao contrário do realizado para o exame microscópico, não foi avaliada exclusivamente a área das estruturas. Assim, avaliaram-se parâmetros como o perímetro, a circularidade, a altura, a largura e a densidade integrada de todos os exemplares. O processo foi repetido para a área da cavidade medular e os dados foram exportados para uma folha de cálculo Excel Microsoft Office 2010. Já na folha de cálculo foi calculada a área cortical e de seguida a área cortical relativa.

O cálculo do erro intra e inter observador foi realizado para as duas abordagens analíticas, com o objectivo de perceber se as metodologias utilizadas são de facto fiáveis. A análise deste parâmetro permite perceber se a identificação das estruturas histológicas está a ser feita correctamente. Se forem verificadas diferenças consideráveis nas análises, significa que o método em questão carece de fiabilidade, já que os resultados obtidos variam conforme o observador, inserindo na análise um erro notável. Nesta situação, o erro intra observador foi calculado pelo mesmo observador, em dois momentos diferentes, com duas semanas de intervalo. O erro inter observador foi determinado pela análise de um segundo observador, sem conhecimentos de histologia, mas com alguma experiência na área de Antropologia Forense.

**4**

**Resultados**



No presente capítulo procede-se à apresentação dos resultados obtidos, após efectuada a análise histológica dos componentes ósseos previamente referidos. Importa, antes de dar seguimento à exposição dos resultados, ressaltar uma situação em particular, que se revelou uma forte condicionante do processo de estudo, e que em última instância influencia a estrutura de apresentação dos mesmos.

Assim, refere-se o facto da impossibilidade de aplicar a análise estatística aos dados granjeados, uma vez que a amostra revelou não suportar tal abordagem. Por este motivo, os resultados são apresentados caso a caso, de forma a extrair o máximo de informação possível, em prol dos objectivos propostos.

O esquema de apresentação segue a mesma ordem exposta na metodologia, até porque a interligação entre os dois métodos, relativamente ao seu uso, é consequencial. Deste modo, são apresentados em primeiro lugar, os resultados referentes à análise microscópica seguidos dos obtidos na análise com recurso ao scâner.

#### ***4.1. Análise Microscópica***

Para uma melhor compreensão do estudo realizado, são apresentadas as imagens obtidas na análise microscópica. Estas incluem a área de interesse seleccionada, neste caso o osso não remodelado. Por motivos explanados oportunamente, utilizaram-se apenas exemplares provenientes de contexto de autópsia, com apenas um representante por faixa etária. É de realçar que os grupos etários foram alargados, comparativamente aos definidos anteriormente. Assim existe um total de 4 classes etárias com uma amplitude de 10 anos. Ou seja, de 30 a 39 anos; de 40 a 49 anos; de 50 a 59 anos e maiores de 60 anos.

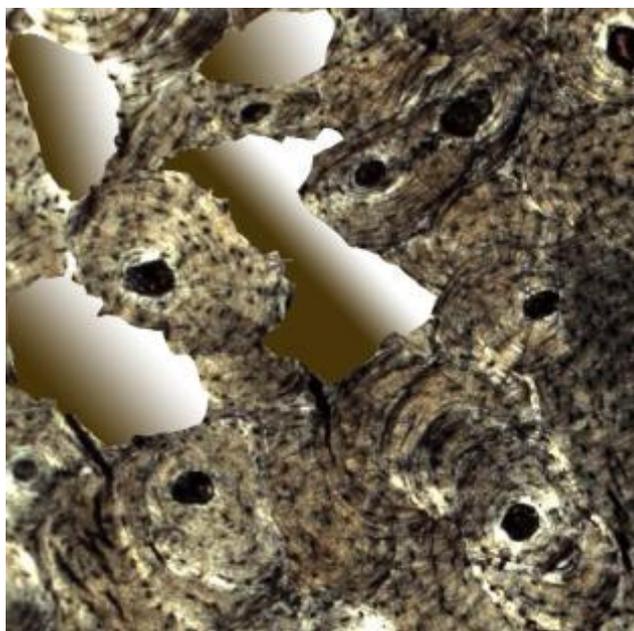
Como já mencionado, foram capturadas de zonas distintas, quatro imagens por amostra, todas elas na porção cortical do osso. Por uma questão logística, sobretudo no que à discussão dos resultados concerne, opta-se por apresentar para cada caso os resultados obtidos pelo investigador principal (observador número 1), em dois momentos distintos, seguidos dos resultados alcançados por um segundo observador (observador número 2). Esta forma de apresentação permite uma abordagem comparativa mais imediata. Tendo em consideração este facto, e com o intuito de não tonar a apresentação das figuras, relativas à análise microscópica, demasiadamente planturosa optou-se por se apresentar apenas um dos quatro campos de observação (por convenção apenas o primeiro campo é aqui exposto). Os restantes campos de análise podem ser consultados no Apêndice B.

Assim, o primeiro caso a ser apresentado alude a um indivíduo do sexo masculino, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos (35 anos), com o acrónimo CVL 4. As figuras 4.1 e 4.2 representam respectivamente o exame feito pelo observador número 1 em dois momentos distintos. A figura 4.3 ilustra as imagens obtidas pelo segundo observador. Todas elas recolhidas no primeiro campo de análise.

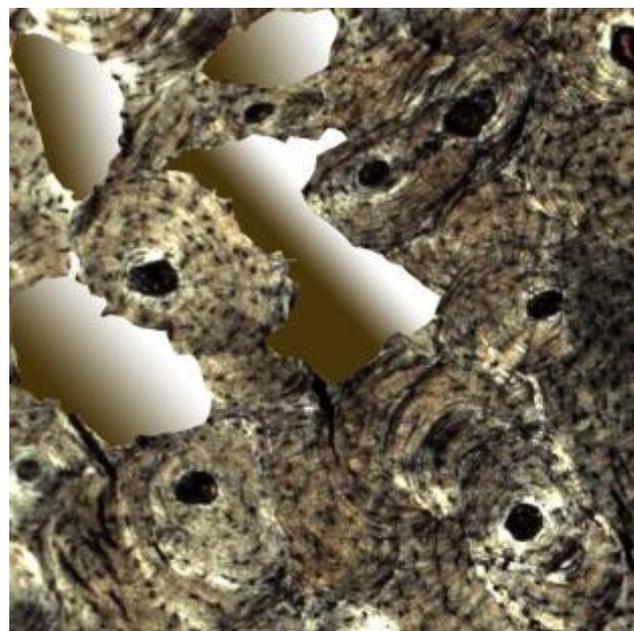
De seguida, apresentam-se os resultados correspondentes ao indivíduo do próximo intervalo etário, dos 40 aos 49 anos, tendo este mais concretamente, 42 anos de idade, também do sexo masculino (CVL 2). À semelhança do ponto anterior, começa por se apresentar a análise feita no primeiro campo de análise, pelo primeiro observador, uma primeira vez (figura 4.4) e uma segunda vez (figura 4.5). E ainda pelo observador número 2 (figura 4.6).

A próxima situação refere-se a mais um indivíduo do sexo masculino, com 50 anos, pertencente portanto ao grupo etário dos 50 aos 59 anos (CVL 7). Mais uma vez seguindo o raciocínio anterior, as figuras 4.7 a 4.8 correspondem respectivamente à análise feita pelo primeiro observador numa primeira e segunda situação e ainda por um outro observador.

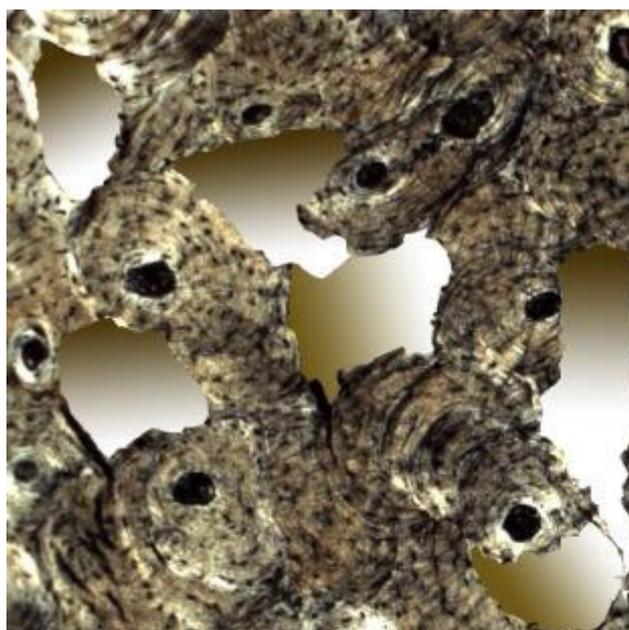
Por fim, no indivíduo pertencente à faixa etária dos  $\geq 60$  (92 anos; CVL 5), o único do sexo feminino, apresentam-se apenas imagens por analisar, devido à fraca qualidade que estas ostentam. As figuras 4.10 a 4.13 são representativas da impossibilidade de examinar alguns componentes histológicos, neste caso particular.



**Figura 4.1.** Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

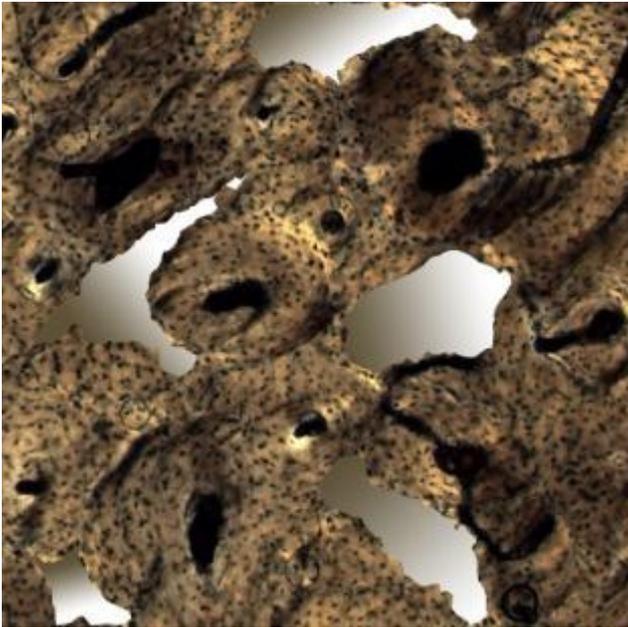


**Figura 4.2.** Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.



**Figura 4.3.** Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.





**Figura 4.4.** Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

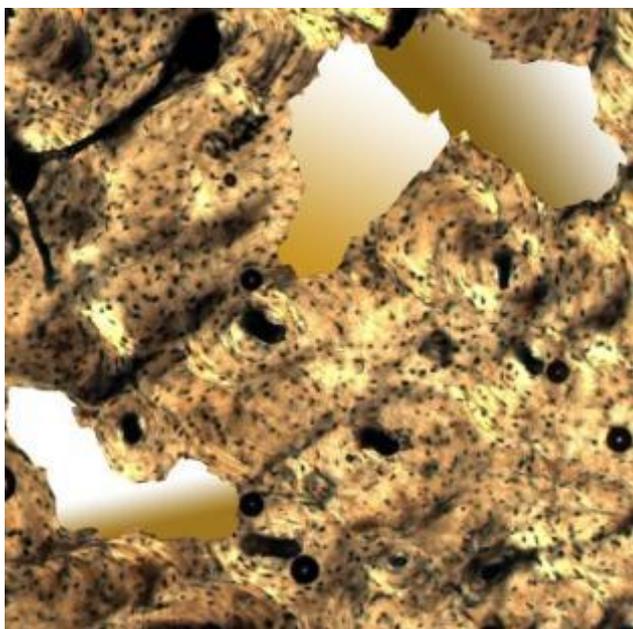


**Figura 4.5.** Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

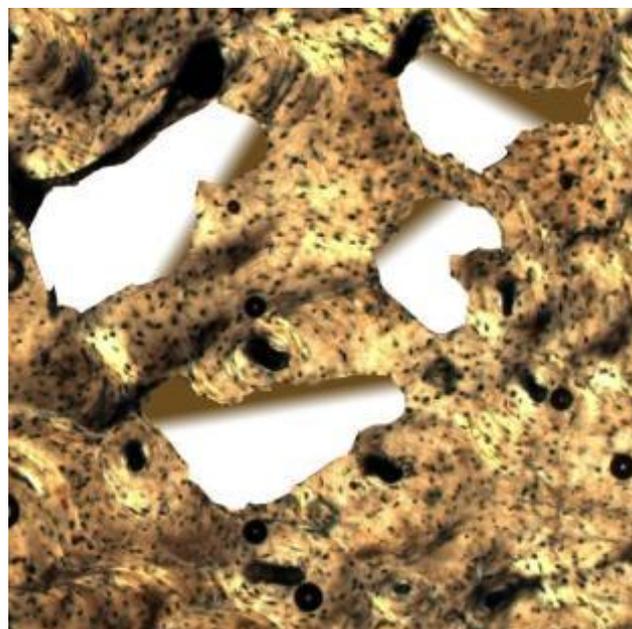


**Figura 4.6.** Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.

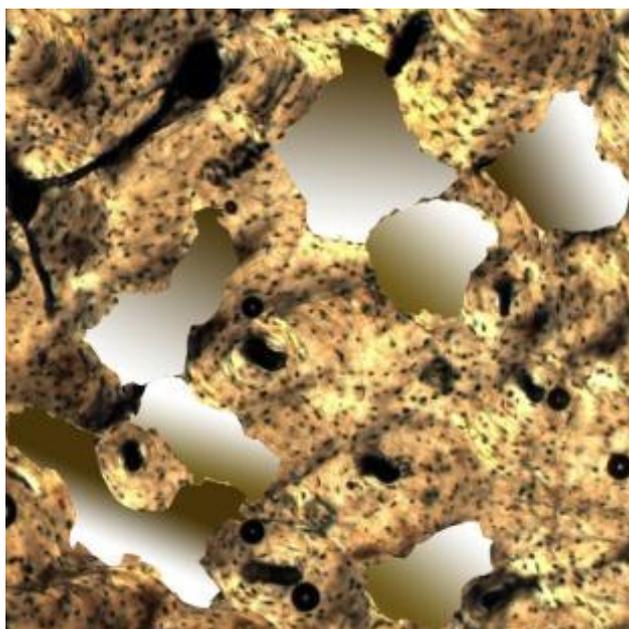




**Figura 4.7.** Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

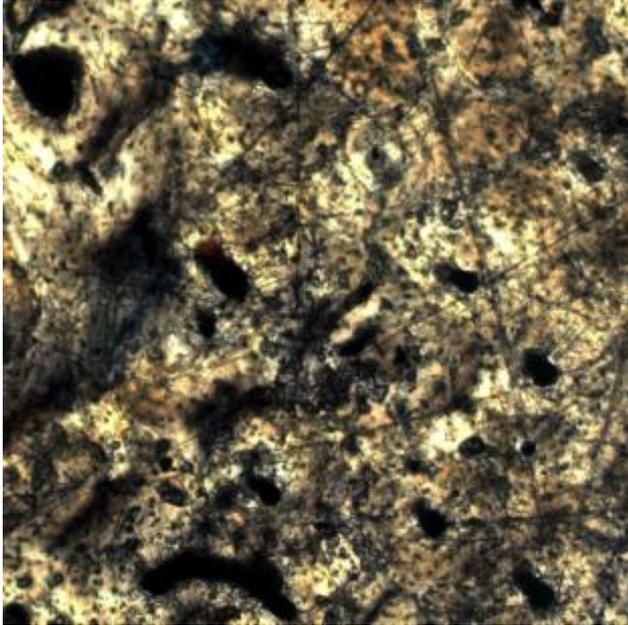


**Figura 4.8.** Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

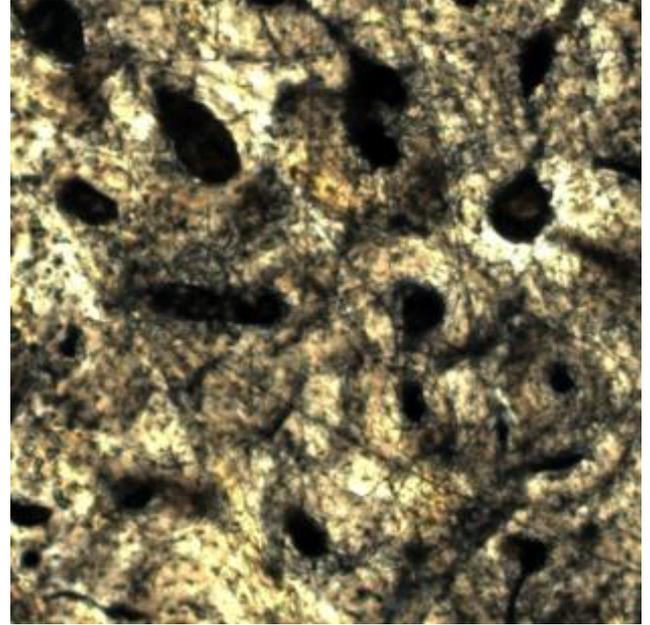


**Figura 4.9.** Primeiro campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.

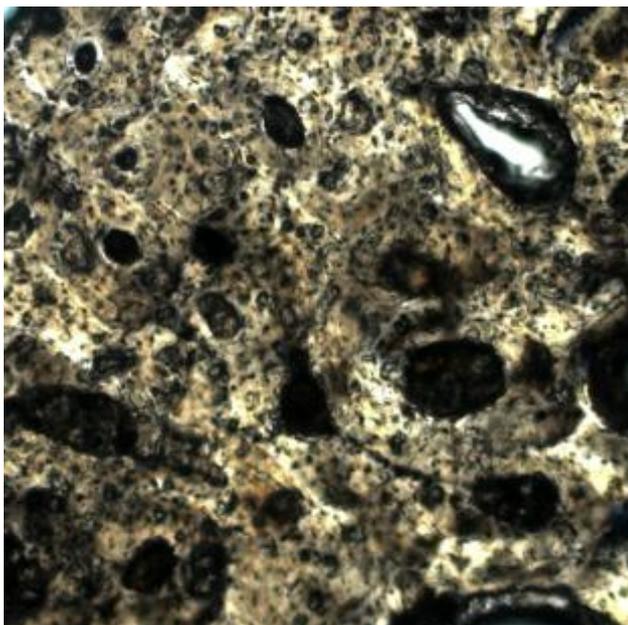




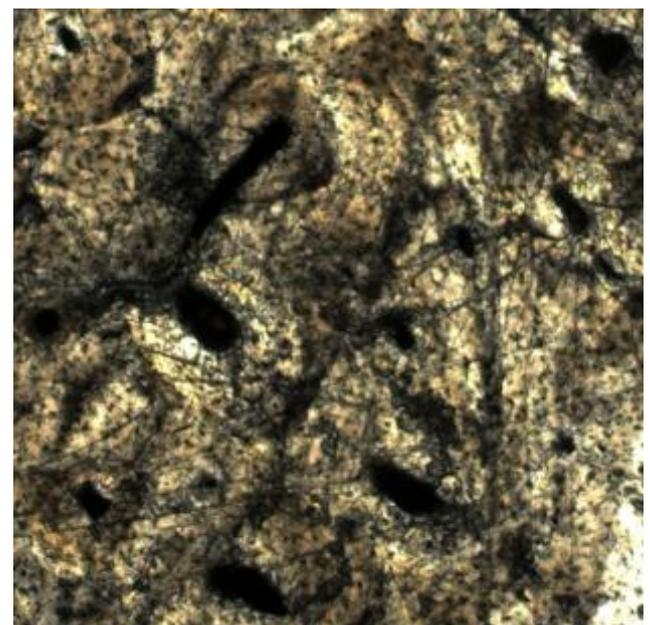
**Figura 4.10.** Primeiro campo microscópico da amostra do indivíduo CVL 5, pertencente à faixa etária dos  $\geq$  de 60 anos. Note-se a existência de inúmeras linhas transversais que impossibilitaram a selecção de qualquer tipo de estrutura. Ampliação de 50x.



**Figura 4.11.** Segundo campo microscópico da amostra do indivíduo CVL 5, pertencente à faixa etária dos  $\geq$  de 60 anos. Note-se a existência de inúmeras linhas transversais que impossibilitaram a selecção de qualquer tipo de estrutura. Ampliação de 50x.



**Figura 4.12.** Terceiro campo microscópico da amostra do indivíduo CVL 5, pertencente à faixa etária dos  $\geq$  de 60 anos. É o único exemplar passível de análise já que não apresenta estruturas impeditivas de análise. Ampliação de 50x.



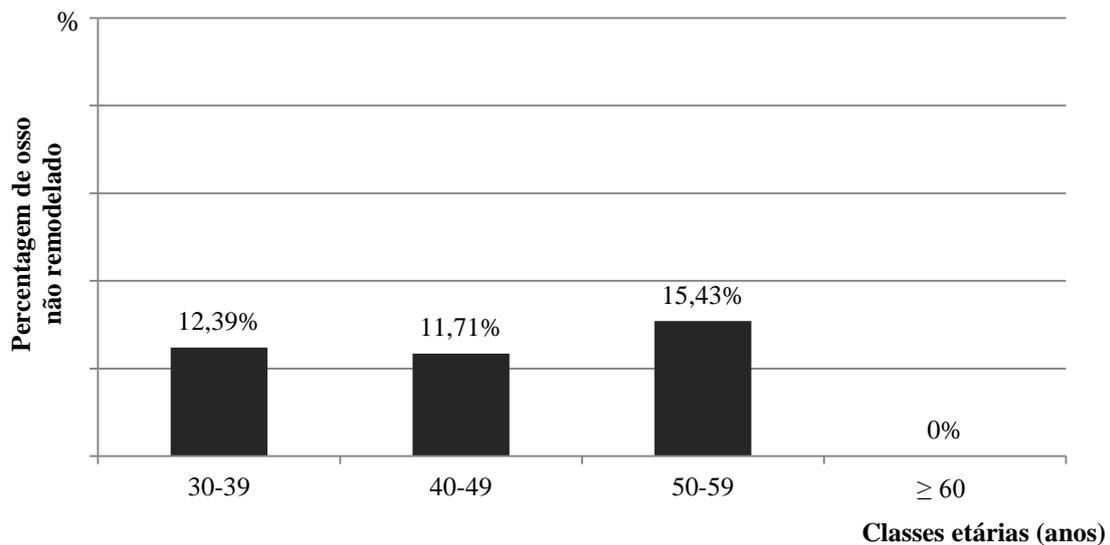
**Figura 4.13.** Quarto campo microscópico da amostra do indivíduo CVL 5, pertencente à faixa etária dos  $\geq$  de 60 anos. Note-se a existência de inúmeras linhas transversais que impossibilitaram a selecção de qualquer tipo de estrutura. Ampliação de 50x.



A área seleccionada nas figuras 4.1 a 4.13 diz respeito às estruturas que foram identificadas pelos observadores, como osso não remodelado. Após elaborar o somatório da área, seleccionado nos 4 campos de observação (Apêndice B), obtém-se a área de osso não remodelado, para cada amostra.

Para calcular a percentagem de osso não remodelado, para cada exemplar, é necessário dividir o valor da área calculada para este, pelo somatório do valor da área total das imagens referentes aos quatro campos de análise. Como já mencionado, as figuras tinham uma área total previamente definida, de 1281424 pixéis.

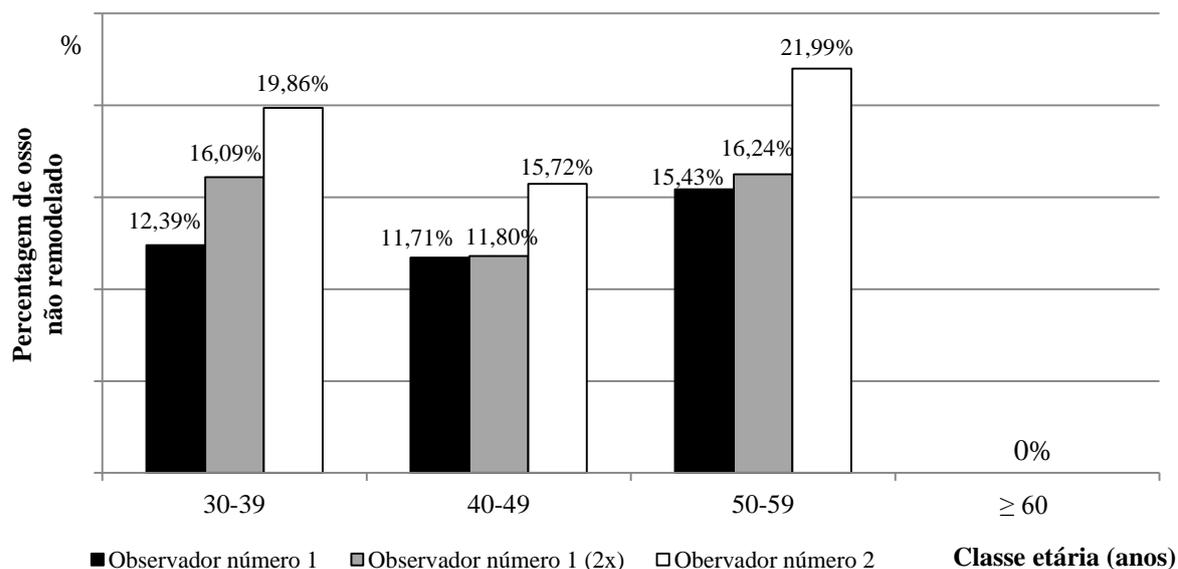
Depois do cálculo acima referido, é possível apresentar uma distribuição da percentagem de osso não remodelado entre as diferentes classes etárias (figura 4.14).



**Figura 4.14.** Distribuição da percentagem de osso não remodelado pelas 4 faixas etárias previamente estabelecidas. N= 4

De referir que, a classe etária dos  $\geq 60$  não possui nenhum indivíduo devido a dificuldades analíticas. Por sua vez, o intervalo etário dos 50 aos 59 anos ostenta a maior percentagem de osso não remodelado, seguido da primeira faixa etária. O indivíduo entre os 40 e os 49 anos de idade apresenta a menor percentagem de osso não remodelado.

Ao nível da presente análise do tecido ósseo, considerou-se ainda a possível existência de diferenças na identificação das estruturas histológicas, tanto ao nível do mesmo observador, como no exame de um segundo observador (figura 4.15).



**Figura 4.15.** Distribuição da percentagem de osso não remodelado por faixa etária, tendo também em consideração a análise do observador número 1 em dois momentos diferentes e a análise do observador número 2.

Como se pode observar na figura 4.15, verificam-se diferenças entre as três observações efectuadas. Destaca-se que, o segundo observador tende a identificar uma percentagem de osso não remodelado superior às análises do observador número 1. Esta distinção é visível, principalmente, no grupo etário dos 50 aos 59 anos. As divergências entre o primeiro e o segundo exame do observador número 1 não são consideráveis. Na faixa etária dos 40 aos 49 anos registam-se valores que diferem apenas em centésimas. A maior disparidade constata-se ao nível da primeira faixa etária (30-39 anos), com aproximadamente 4 pontos percentuais de diferença (obs nº1 = 12,39% vs. obs nº1 (2x) = 16,09%).

Por uma questão meramente pragmática, resolveu-se aplicar a equação desenvolvida por Ingraham (2004) para estimar a idade com base na percentagem de osso não remodelado, de clavículas de indivíduos hispânicos. Assim:

$$\text{Idade} = 98.25 - 50.25 * \log \% \text{ osso não remodelado}$$

De ressaltar que a informação apresentada (tabela 4.1), é mais informativa do que qualitativa, devido a um conjunto de razões que serão esclarecidas quando oportuno.

**Tabela 4.1.** Aplicação da fórmula desenvolvida por Ingraham (2004) aos resultados da percentagem de osso não remodelado obtidas pelos dois observadores, com o devido desvio padrão associado.

Indivíduo	Idade real	Idade estimada 1º obs 1x	Idade estimada 1º obs 2x	Idade estimada 2º obs
CVL 4	35	43,32 ± 6,8	37,62 ± 6,8	33,06 ± 6,8
CVL 2	42	44,56 ± 6,8	44,39 ± 6,8	38,08 ± 6,8
CVL7	50	38,53 ± 6,8	37,42 ± 6,8	30,80 ± 6,8

Como se pode visualizar na tabela 4.1, existe, em certa medida, um nível de aproximação entre a idade estimada e a idade real. A segunda análise feita pelo observador número 1 parece ser a que, no geral, mais se aproxima. Particularmente no indivíduo mais jovem, afastando-se todavia, no indivíduo mais velho. É importante referir o facto de que todos os observadores, num ou noutro momento, acabaram sempre por subestimar a idade do indivíduo mais velho, sendo que o observador número 2 leva a situação ao extremo, atribuindo-lhe a idade de  $30,80 \pm 6,8$ , quando na realidade este tem 50 anos. Denote-se com base na figura 4.15, e de resto como esperado, quando se aplica a fórmula desenvolvida por Ingraham (2004) para estimar a idade do indivíduo, verifica-se a existência de uma diferença importante entre as análises feitas pelo observador 1 e 2.

#### **4.2. Análise com recurso ao scâner**

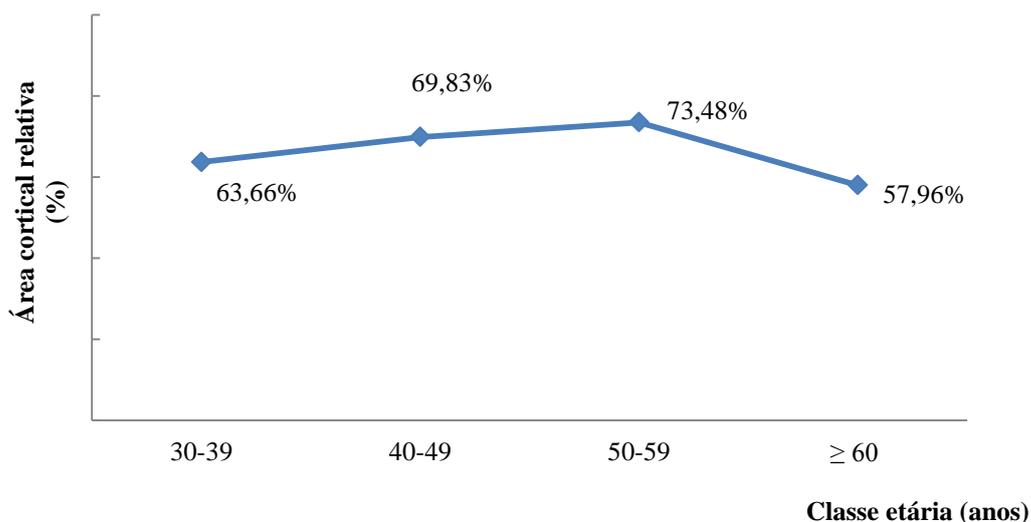
Para a apresentação da análise dos resultados, da determinação da área cortical relativa com recurso ao scâner, opta-se por seguir a estrutura já definida para o exame microscópico. No entanto, convém referir que ao contrário do reduzido número de indivíduos examinados na análise microscópica, a investigação feita com o digitalizador foi aplicada a um total de 18 indivíduos.

Como referido, o cálculo da área cortical relativa é feito, através da medição da área total de um determinado espécime à qual se subtrai a área medular do mesmo. Assim,

por cada amostra analisada existem duas figuras, uma representativa da área total, e outra da área medular. À semelhança do estudo realizado no microscópio, também no presente tópico, se estatuiu considerar a potencialidade de existirem diferenças na análise entre um primeiro e um segundo observador, e entre o exame feito pelo mesmo observador em dois momentos diferentes.

Uma vez que a amostra utilizada para trabalhar esta questão, é substancialmente superior à utilizada na análise microscópica, não serão aqui expostas todas as figuras. Apenas serão apresentadas aquelas que por motivos específicos, se revelem importantes para o presente estudo.

Dito isto, começa por se apresentar a distribuição da área cortical relativa pelas 4 faixas etárias, estabelecidas previamente, como se pode observar na figura 4.16.



**Figura 4.16.** Distribuição da área cortical relativa, em percentagem, pelas diferentes faixas etárias. N=18

Importa salientar que as principais diferenças encontram-se nos dois extremos etários, sendo que, indivíduos mais jovens apresentam uma área cortical relativa superior (63,66%), quando comparados aos indivíduos mais velhos (57,96%).

Deve-se ter em mente que, a área cortical resulta da subtração da área medular à área total. Por sua vez a área cortical relativa é o produto da área cortical a dividir pela área total, já que só relativizando este valor, se torna passível de comparação. Por este motivo optou-se também por exemplificar a distribuição da área cortical e da área medular pelos diferentes intervalos etários (tabela 4.2).

Os valores mais díspares relativamente à área cortical encontram-se entre a segunda e a última faixa etária. Porém, é importante referir que estes valores estão dependentes da área total ( $\bar{x}=113,87$ ), que neste caso é superior nos indivíduos dos 40 aos 49 anos ( $122,11 \text{ mm}^2$ ) face aos indivíduos  $\geq 60$  anos ( $111,60 \text{ mm}^2$ ). Logo, nada se pode concluir de uma comparação directa entre estes, e mais uma vez se reitera a exclusiva função informativa dos valores apresentados na tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Distribuição das áreas corticais, medulares e totais pelas faixas etárias. Atende-se ainda para a média de idades por intervalo etário, bem como o número de indivíduos que se aloca em cada um deles.

Faixa Etária	Média de Idades	Nº de Indivíduos	Área Cortical ( $\text{mm}^2$ )	Área Medular ( $\text{mm}^2$ )	Área Total ( $\text{mm}^2$ )
<b>30-39</b>	31,7	3	78,40	45,30	123,71
<b>40-49</b>	44,0	3	84,15	37,64	122,11
<b>50-59</b>	53,0	2	70,82	26,46	95,68
<b>60 +</b>	78,7	10	64,47	47,49	111,60

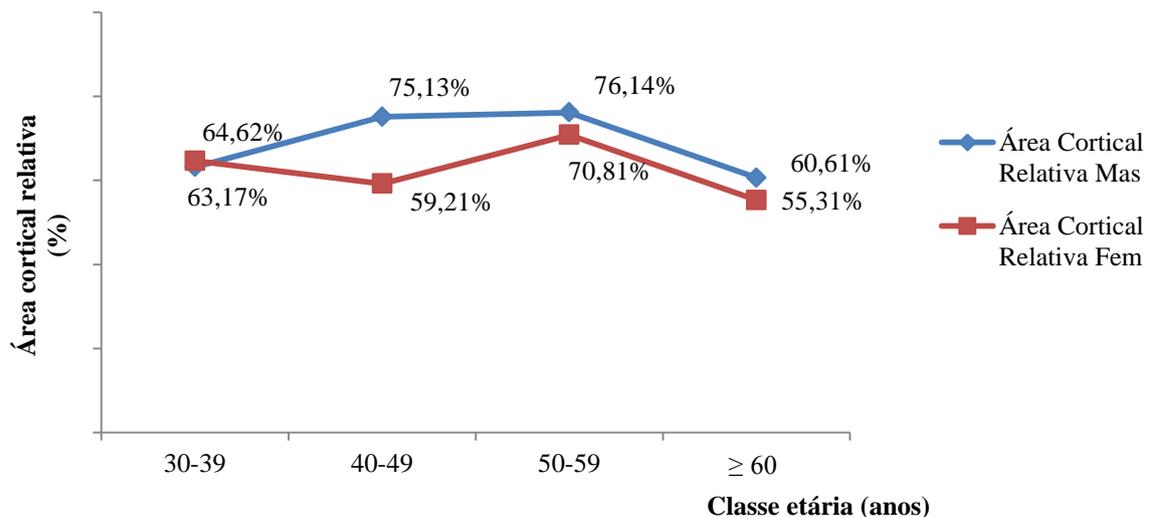
Fazendo alusão ao observado na figura 4.16 e conseqüentemente na tabela 4.2. achou-se pertinente ilustrar, em que medida se consegue na análise imagiológica fazer a distinção entre a área cortical e área medular, e em que medida é possível observar uma diferença entre os grupos etários. Para tal, resolveu-se apresentar um conjunto de figuras exemplificativas. Por conseguinte, as primeiras duas figuras (4.17 e 4.18) dizem respeito ao indivíduo CVL 9 (sexo masculino), sendo este o indivíduo mais novo de toda a série, excepcionalmente com uma idade de 29 anos. A selecção verificada nas figuras 4.17 e 4.18 diz respeito à análise da área total e da área medular, respectivamente, feita pelo observador número 1 num primeiro momento.

De seguida, procede-se à apresentação do indivíduo mais velho da amostra, CVL 5, com 92 anos, este do sexo feminino. À semelhança do anterior, a figura 4.19 remete para a análise da área total feita pelo primeiro observador, num primeiro momento, e a figura 4.20 ilustra a área medular analisada pelo mesmo observador.

É de destacar a diferença visível entre a área ocupada pela porção de tecido cortical face à área total. Em termos quantitativos, a área cortical relativa do indivíduo CVL 9 corresponde a 65, 91% da área total ( $122, 23 \text{ mm}^2$ ), enquanto no indivíduo CVL 5 esta diz respeito apenas a 51, 01% da área total ( $127,58 \text{ mm}^2$ ).

A acrescentar a esta informação, achou-se pertinente ilustrar a determinação das áreas medulares e totais para os grupos etários não mencionados, ou seja, os indivíduos entre os 40 e 49 anos e entre 50 e 59 anos. Assim, as figuras 4.21 e 4.22 representam, respectivamente, a área total e a área medular medidas no indivíduo CVL 13, com 43 anos de idade, do sexo masculino. Por sua vez, as figuras 4.23 e 4.24 são análogas às medições referidas anteriormente, estas elaboradas no indivíduo CVL 1, com 56 anos de idade, do sexo feminino. Deste modo, a amostra pertencente ao indivíduo CVL 13 apresenta uma área cortical relativa superior à do indivíduo mais jovem. Já a amostra CVL 1 apesar de menor, tem apenas menos de 1% de diferença.

Ainda em relação aos dois grupos etários intermédios, é de mencionar que um dos exemplares (CVL 2; sexo ♂;  $acr^7 = 86,13\%$ ) exhibe uma área cortical relativa superior à do indivíduo mais jovem (CVL 9; figuras 4.17 e 4.18; sexo ♂;  $acr = 65,91\%$ ). A amostra CVL 13 (figuras 4.21 e 4.22) e a amostra CVL 1 (figuras 4.23 e 4.24) apresentam uma área cortical relativa de 70,81% e 64,13%, respectivamente.



**Figura 4.25.** Distribuição da área cortical relativa masculina e feminina, em percentagem, pelas várias faixas etárias.  $N_{\text{♂}} = 10$  e  $N_{\text{♀}} = 8$ .

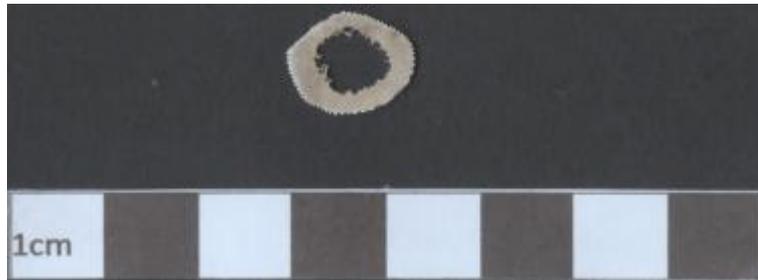
Com base na análise elaborada, acha-se pertinente expor uma possível relação entre a área cortical relativa e o sexo do indivíduo. A figura 4.25 representa a distribuição etária da área cortical relativa por faixa etária, atendendo ao sexo.

Como se pode depreender pela figura 4.25 existe uma única situação, referente ao

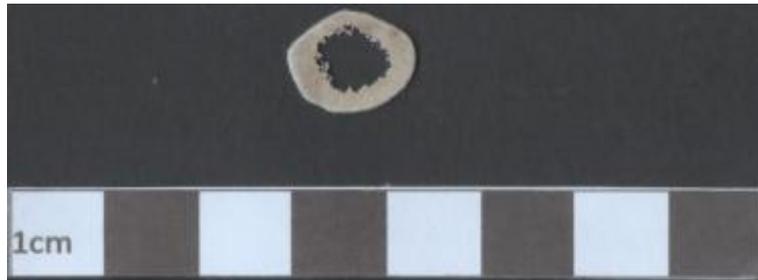
<sup>7</sup>  $acr$  – Abreviatura para área cortical relativa

intervalo etário entre os 30 e os 39 anos, onde a percentagem da área cortical relativa feminina excede o valor masculino, em pouco mais de um ponto percentual (1,45%). Convém atentar para o facto, de neste intervalo etário existirem 2 indivíduos do sexo masculino e apenas 1 do sexo feminino.





**Figura 4.17.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 9 correspondente ao indivíduo mais jovem (29 anos; ♂). É possível observar a selecção da área total ( $122,23 \text{ mm}^2$ ) pelo observador número 1, num primeiro momento.



**Figura 4.18.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 9 correspondente ao indivíduo mais jovem (29 anos; ♂). É possível observar a selecção da área medular ( $41,54 \text{ mm}^2$ ) pelo observador número 1, num primeiro momento.



**Figura 4.19.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 5 correspondente ao indivíduo mais idoso (92 anos; ♀). É possível observar a selecção da área total ( $127,58 \text{ mm}^2$ ) pelo observador número 1, num primeiro momento.



**Figura 4.20.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 5 correspondente ao indivíduo mais idoso (92 anos; ♀). É possível observar a selecção da área medular ( $50,59 \text{ mm}^2$ ) pelo observador número 1, num primeiro momento.





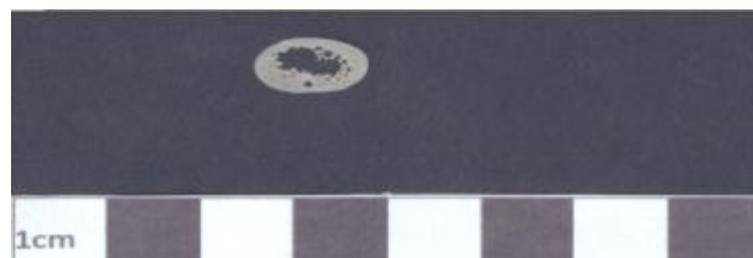
**Figura 4.21.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 13 (43 anos; ♂) correspondente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a selecção da área total (103,06 mm<sup>2</sup>) pelo observador número 1, num primeiro momento.



**Figura 4.22.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 13 (43 anos; ♂) correspondente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a selecção da área medular (35,25 mm<sup>2</sup>) pelo observador número 1, num primeiro momento.



**Figura 4.23.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 1 (56 anos; ♀) correspondente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a selecção da área total (76,03 mm<sup>2</sup>) pelo observador número 1, num primeiro momento.



**Figura 4.24.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 1 (56 anos; ♀) correspondente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a selecção da área total (76,03 mm<sup>2</sup>) pelo observador número 1, num primeiro momento.



Em todas as outras situações verifica-se uma dominância do sexo masculino, já que estes indivíduos apresentam nitidamente uma percentagem mais elevada de tecido ósseo cortical. A dissemelhança mais notória verifica-se ao nível da faixa etária dos 40 aos 49 anos, com uma diferença de aproximadamente 16%. Mais uma vez, se ressalva o facto de neste intervalo existir apenas um indivíduo feminino.

Tendo em mente tal facto, a faixa etária que apresenta, em princípio, os resultados mais credíveis é a que engloba os indivíduos com mais de 60 anos, uma vez que existem 5 indivíduos tanto masculinos como femininos. Neste caso, a diferença entre os sexos é de aproximadamente 5,3%, o que pode indicar de facto um vínculo entre as duas variáveis.

Para ilustrar esta possível distinção achou-se relevante apresentar tabelas descritivas de uma possível diferença entre a área total, consoante o sexo do indivíduo. A tabela 4.3 alude para a distribuição das áreas corticais, medulares e totais em indivíduos do sexo masculino.

**Tabela 4.3.** Distribuição das áreas corticais, medulares e totais pelas faixas etárias, em indivíduos do sexo masculino. Atende-se ainda para a média de idades por intervalo etário, bem como o número de indivíduos que se aloca em cada um deles.

<b>Intervalo Etário</b>	<b>Média de Idades</b>	<b>Nº de Indivíduos</b>	<b>Área Cortical (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área Medular (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área Total (mm<sup>2</sup>)</b>
<b>30-39</b>	32	2	85,03	50,11	135,14
<b>40-49</b>	44	2	80,54	26,13	106,67
<b>50-59</b>	50	1	87,74	25,65	115,24
<b>≥ 60</b>	75	5	71,33	46,27	117,61

A tabela 4.4 remete igualmente para a distribuição das áreas corticais, medulares e totais, contudo em indivíduos do sexo feminino.

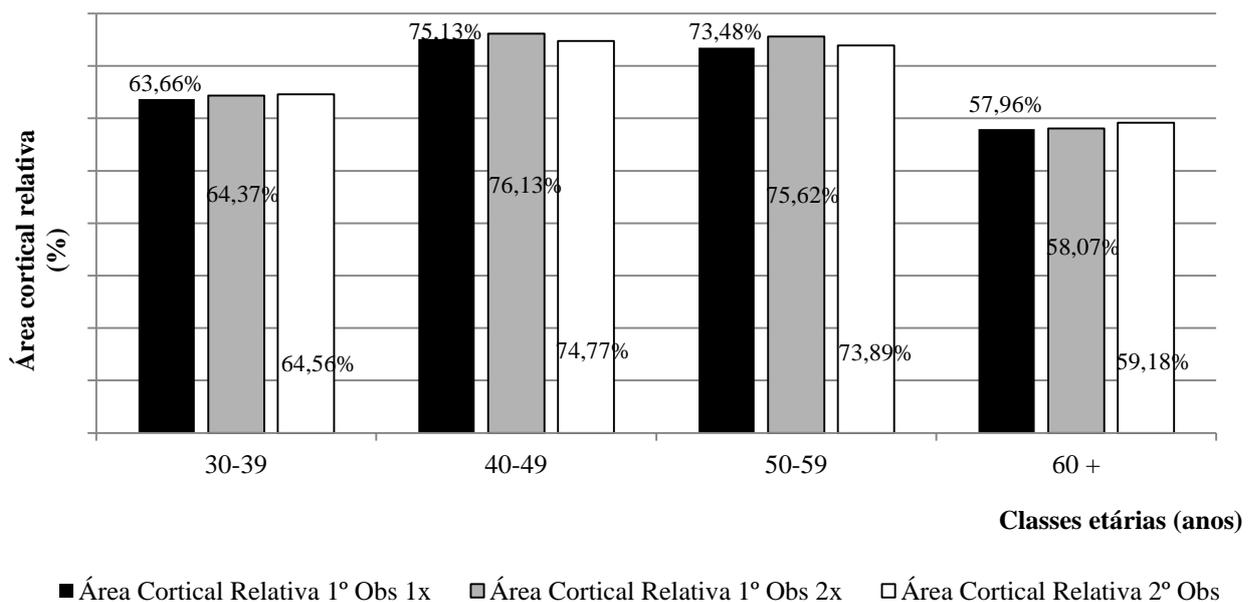
**Tabela 4.4.** Distribuição das áreas corticais, medulares e totais pelas faixas etárias, em indivíduos do sexo feminino. Atende-se ainda para a média de idades por intervalo etário, bem como o número de indivíduos que se aloca em cada um deles.

<b>Intervalo Etário</b>	<b>Média de Idades</b>	<b>Nº de Indivíduos</b>	<b>Área Cortical (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área Medular (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Área Total (mm<sup>2</sup>)</b>
<b>30-39</b>	31	1	65,16	35,68	100,84
<b>40-49</b>	47	1	91,36	62,77	153,14
<b>50-59</b>	56	1	53,90	22,22	76,12
<b>≥ 60</b>	83	5	55,60	50,71	105,94

Como se pode observar, salvo uma única excepção, os indivíduos do sexo masculino apresentam uma área cortical superior aos indivíduos do sexo feminino, tendo que  $\bar{x}_{\sigma} = 78,81 \text{ mm}^2$  enquanto  $\bar{x}_{\varphi} = 61,05 \text{ mm}^2$ . Todavia, este valor não se verifica com a mesma expressão na percentagem de área cortical relativa (figura 4.25), uma vez que a área total das amostras masculinas é superior à das amostras femininas ( $\bar{x}_{\sigma} = 119,07 \text{ mm}^2$  e  $\bar{x}_{\varphi} = 107,43 \text{ mm}^2$ ).

Além deste facto, apresentam-se também duas figuras pertencentes ao grupo etário correspondente a maiores de 60 anos, com idades próximas, com o intuito de tornar mais claro a possível distinção entre sexos. Portanto, a figura 4.26 ilustra a amostra CVL 3 que corresponde a um indivíduo do sexo masculino, com 72 anos. Por sua vez, a figura 4.27 remete para a análise do exemplar CVL 10 pertencente a um indivíduo do sexo feminino, com 71 anos. Neste caso concreto a percentagem de área cortical relativa, na amostra do sexo masculino (CVL 3, figura 4.26) é de 72,09%, em comparação com os 57,16% da amostra feminina (CVL 10, figura 4.27), ilustrando uma clara desigualdade entre sexos.

Por fim, à semelhança do realizado para a análise microscópica, considerou-se a possível existência de diferenças na selecção das estruturas necessárias para o cálculo da área cortical relativa, quer entre o mesmo observador, em dois momentos diferentes, quer na análise de um segundo observador (figura 4.28).



**Figura 4.28.** Distribuição da área cortical relativa, em percentagem, por faixa etária, tendo em consideração a análise do observador número 1 em dois momentos diferentes e a análise do observador número 2.

Analisando a figura 4.28 é possível afirmar, que não existem grandes diferenças entre as análises efectuadas, quer entre os diferentes observadores, quer entre o mesmo observador. A divergência mais notória regista-se na análise do observador número 1 na faixa etária dos 50 aos 59 anos, com uma diferença de 2,14% entre uma primeira observação e uma segunda, não sendo no entanto uma discrepância considerável. De um modo geral, a distribuição etária da área cortical apresenta uma configuração homogénea nas três situações de análise.





**Figura 4.26.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 3 (72 anos) pertencente a um indivíduo do sexo masculino, alocado na faixa etária dos  $\geq 60$  anos. É possível observar a selecção da área total ( $125,88 \text{ mm}^2$ ) elaborada pelo observador número 1, num primeiro momento.



**Figura 4.27.** Digitalização a 2400 ppi da amostra CVL 10 (71 anos) pertencente a um indivíduo do sexo feminino, alocado na faixa etária dos  $\geq 60$  anos. É possível observar a selecção da área total ( $113,14 \text{ mm}^2$ ) elaborada pelo observador número 1, num primeiro momento.



5

**Discussão**



No presente capítulo pretende-se discutir comparativamente os resultados obtidos, com estudos da mesma natureza, já realizados. Para este efeito, utilizam-se pesquisas que tenham no seu âmago a estimativa da idade com base na análise histológica de clavículas.

Não existe, em verdade, um grande número de publicações que opte pelo exame histológico deste osso. Destacam-se contudo os trabalhos de Stout e Paine (1992), Stout e colaboradores (1996), e principalmente o trabalho desenvolvido por Ingraham (2004). Este é, em teoria, aquele que mais se assemelha, a pelo menos uma das componentes práticas deste projecto, a análise microscópica para determinar a relação entre a idade à morte e a percentagem de osso não remodelado.

Devido a esta escassez de estudos comparativos, serão utilizados alguns que embora não passíveis de comparação directa, fornecem, em última instância, a possibilidade de estabelecer analogias úteis à interpretação dos resultados alcançados. Entre estes, ressaltam-se as investigações realizadas por Stein e colegas (1998), Cho e colaboradores (2002), Cho e Colaboradores (2006) e Peck e Stout (2007), entre outros que possam eventualmente surgir.

Importa referir que os resultados, no sentido estrito do termo, não são a única componente a ser aqui discutida. A metodologia utilizada na preparação dos espécimes e na sua posterior observação, será também aqui debatida. Isto porque, os métodos usados são inovadores e foram escolhidos com o propósito de comprovar que a histologia pode ser aplicada sem grandes esforços e longas demoras.

Por fim, pretende-se fazer um balanço geral, com o intuito de perceber se os objectivos inicialmente propostos foram cumpridos ou não, e porquê. Deste modo, importa perceber quais as circunstâncias intrínsecas ao não cumprimento de

determinadas directrizes, sendo de extrema importância destacar os pontos positivos e negativos de toda a pesquisa elaborada.

### **5.1. O problema da amostra**

A maioria dos estudos que utiliza a histologia para estimar a idade à morte de remanescentes ósseos, cria um modelo estatístico de regressão linear com um erro padrão associado (Ingraham, 2004). Não importa tanto, neste caso concreto, discorrer sobre as potencialidades estatísticas da análise histológica, dado que não foi possível aplicar nenhum tipo de teste neste estudo. Logo, antes de se dar início à discussão dos resultados convém referir o porquê desta condicionante.

Um dos objectivos comuns a quase todas as pesquisas científicas, reside na recolha de dados que sejam representativos da população. Os investigadores servem-se da informação colectada a partir de uma dada amostra, para extrapolarem as suas descobertas na população geral, dentro dos limites de um erro padrão (Bartlett *et al.*, 2001; Lucy, 2005).

O tamanho da amostra é então um dos elementos principais de qualquer estudo empírico, cujo objectivo seja fazer inferências sobre a população em geral, a partir de uma dada amostra. Na prática, o tamanho da amostra estará sempre condicionado com o tipo de recolha de dados, e principalmente com a investigação que se está a levar a cabo, já que esta condiciona o poder estatístico da amostra (Adam, 2010). Esta especificidade do tamanho amostral é um dos parâmetros que mais condiciona a análise estatística, já que influencia a detecção de diferenças significativas, de relações e interacções entre as variáveis (Bartlett *et al.*, 2001).

Tendo em consideração o referido, e segundo Bartlett e colaboradores (2001), a escolha de amostras com um tamanho mais reduzido nem sempre depende do investigador, e por vezes a sua recolha é necessária. Em algumas situações deste tipo, é provável que os intervalos de confiança sejam excessivamente amplos, ou por sua vez, o erro associado à hipótese estatística que se está a testar, pode aumentar de tal forma, que deixa de ser plausível aplicar qualquer tipo de ferramenta analítica (Motulsky, 1995).

Dito isto, pode-se então afirmar que a aplicação de uma análise estatística, como uma regressão linear, ou outra que tenha como requisito uma amostra com forte poder estatístico, está posta de lado no que a este projecto diz respeito. Note-se que, como mencionado anteriormente, a amostra total utilizada para o presente trabalho é de 18 indivíduos, número este que não garante sequer uma distribuição normal fazendo com que os resultados dos testes estatísticos careçam de fiabilidade, sejam eles paramétricos ou não-paramétricos.

Na realidade, não existe uma justificação peremptória que fundamente o facto de a amostra ter um número reduzido, existem apenas determinadas circunstâncias que em conjunto tornaram impossível a colecta de mais exemplares.

De uma forma mais objectiva, a decisão de recolher amostras cadavéricas não é contestável, como já mencionado. Em bom rigor, esta é a única forma de conseguir resultados viáveis. Como referem Keplinger (2001) e Purves e colaboradores (2011), existe uma tendência secular que se tem vindo a verificar e os resultados obtidos em estudos elaborados em colecções identificadas do século XX ou anteriores, introduzem um viés quando aplicados a populações presentes.

Mais uma vez se reitera, que o uso de material proveniente de contexto de autópsia mostrou ser a única alternativa para desenvolver a hodierna pesquisa. Até porque, o acesso ao corte histológico seria absolutamente negado nas colecções identificadas existentes em Portugal. O valor científico, cultural e até mesmo social destas é incontestável. A possibilidade de destruir deliberadamente algum dos exemplares, dado a histologia ser uma técnica invasiva, não seria aceite por nenhum dos curadores destas colecções. Depreende-se que, inclusive, algumas delas estão a ser fechadas a estudos unicamente macroscópicos, porque o seu simples manuseamento põe em risco a sua viabilidade futura.

Atente-se ainda para o facto de Portugal ter um dos melhores sistemas a nível da recolha de peças de contexto de autópsia para fins de investigação. A Lei n.º 12/99 de 15 de Março, autoriza o Governo a legislar a dissecação lícita de cadáveres e a extracção de peças para fins de ensino e de investigação científica, e o Decreto-Lei n.º 274/99 de 22 de Julho cita especificamente que, se “*adopta como princípio que os cidadãos nacionais, apátridas e estrangeiros residentes em Portugal que venham a falecer no País possam potencialmente ser sujeitos aos actos previstos na lei, salvo se*

*tiverem manifestado em vida, junto do Ministério da Saúde, a sua oposição [...]”*. Esta circunstância coloca os investigadores num papel privilegiado para realizarem pesquisas com recurso a material cadavérico, garantindo a aplicabilidade das análises no contexto actual.

Apesar do referido, a colheita do material não foi, provavelmente, feita de um modo tão agilizado quanto necessário. Os motivos subjacentes a este facto escapam à competência do investigador e não se deve portanto discorrer sobre eles. Pode-se apenas referir que o tempo disponível para a realização deste estudo tem prazos limites que têm de ser respeitados, e a espera, implícita ao aumento do tamanho da amostra, consequente da recolha cadavérica, iria por em causa estes mesmos prazos.

Quando se percebeu que a recolha do material cadavérico poderia ser mais morosa do que o inicialmente esperado, foram tomadas todas as medidas possíveis, como já citado ao nível da metodologia, para aumentar o número amostral, de acordo com o tempo disponível. Das medidas tomadas, convém destacar a inclusão da colecção de Santarém na amostra, que apesar de tudo contribuiu com o máximo potencial que podia oferecer.

Embora numa primeira instância se possa pensar que a inclusão desta colecção seria um problema, já que não foi recolhida em contexto de autópsia, tal não se verifica. Os indivíduos que a ela pertencem, seriam na actualidade considerados legalmente um caso forense, porque as datas de morte não ultrapassam os 15 anos, sendo este o tempo legal em Portugal para um caso deixar de ser considerado forense (Cunha, 2008).

Para concluir, faz-se referência a uma problemática que em certa medida poderá estar associada ao reduzido número da amostra, e ao alargamento das faixas etárias para a recolha de material cadavérico.

A amostra apresenta-se envelhecida, a idade média dos 18 indivíduos que a compõem é de aproximadamente 63 anos, tendo que a sua amplitude varia dos 29 aos 92 anos. O facto de aproximadamente metade (55,6%) da amostra apresentar uma idade superior a 60 anos vai de encontro a uma linha de raciocínio defendida por alguns autores como Henriques e Rodrigues (2008). Assim, segundo os autores, a maioria das mortes tende a concentrar-se nas idades mais avançadas, consequentemente os exemplares recolhidos apresentam também um perfil mais envelhecido. Tal facto limita a qualidade dos métodos desenvolvidos, uma vez que introduz um enviesamento na

análise. De resto, como será referido ulteriormente, tal ocorrência verificou-se inclusivamente neste estudo, mesmo que não tenha sido utilizada uma análise estatística de peso.

Para tornar o debate dos resultados mais perceptível, optou-se por, numa primeira instância, discutir em separado os resultados obtidos para a análise microscópica e para a análise com recurso ao scâner. Tendo que existe uma ordem lógica sucessiva entre os dois, será seguida também uma abordagem comparativa entre estes, e da sua utilidade diferencial no presente projecto.

## ***5.2 Análise microscópica***

Antes de passar à interpretação dos resultados obtidos na análise microscópica, opta-se por explicar desde já o motivo pelo qual apenas foram utilizados 4 indivíduos para esta análise, um por cada faixa etária. Na verdade, existe todo um conjunto de situações que explica esta questão, que serão aqui expostas em pormenor.

Como já foi citado no capítulo referente à metodologia, o microscópio utilizado para a este fim é um Carl Zeiss Axioskop2plus que foi cedido pelo Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra. Num primeiro contacto com o responsável do mesmo, foi expressa a necessidade de utilizar um microscópio com um filtro de luz polarizada. Na altura, a existência deste foi confirmada, todavia quando se foi efectuar uma primeira observação, verificou-se que este não possuía tal filtro, sendo no entanto possível adquiri-lo, para depois adaptar.

Numa primeira análise cogitou-se que tal quesito não constituiria um problema de maior, uma vez que segundo Maat (2001; 2006b), é possível acoplar na zona da fonte de luz e na zona da ocular, uma porção de papel polarizado que serve a mesma função. Na próxima observação que se efectuou testou-se esta mesma hipótese, e apesar de os resultados melhorarem não foram de todo os esperados.

O recurso à microscopia de luz polarizada é, segundo Cho (2012), uma das metodologias mais proveitosas a utilizar nas análises histomorfométricas. Como já foi referido, o osso compacto é constituído por colagénio e cristais de hidroxiapatite. A orientação destas estruturas varia segundo um padrão constante. Deste feito, o arranjo

padronizado da microestrutura óssea permite que a luz polarizada decomponha a estrutura anisotrópica, revelando a orientação das fibras de colagénio, invisíveis a olho nu. Por este motivo, a autora identifica este tipo de microscopia como o mais adequado para a observação da histomorfologia do osso, devido à sua capacidade de realçar o contraste entre as componentes ósseas, permitindo assim a sua identificação. Cho (2012) acrescenta ainda que, é das poucas análises que permite distinguir com certeza a diferença entre, por exemplo, osteónios completos e fragmentados. Para além desta minúcia, o recurso à luz polarizada potencia toda a investigação, uma vez que é a indicada em situações onde a espessura da amostra não pode ser controlada, como é o caso do presente estudo. A grande maioria das estruturas pode ser delimitada com um certo grau de fiabilidade.

Dito isto, a falta de uma análise com luz polarizada fez com que muita informação necessária à determinação da percentagem de osso não remodelado não pudesse ser recolhida. As figuras 4.1 a 4.13 são um exemplo vivo disso, tendo como termo de comparação as figuras (3.6 e 3.7), fotografadas com o filtro de polarização. Na análise efectuada por Ingraham (2004), de imediato se percebe a quantidade de informação estrutural e identificativa que foi perdida, impedindo uma análise exaustiva.

Outra problemática ainda associada ao instrumento de microscopia, relaciona-se com a ampliação disponível para a análise. O estudo realizado por Ingraham (2004), que por ser, o estudo que mais se assemelha com a presente investigação, fornece uma boa base de comparação. Assim, o autor à semelhança de outros (Thompson, 1980; Han *et al.*; 2009; Stewart *et al.*, 2012) utiliza uma ampliação de 100x, que parece ser a ampliação ideal para a identificação das estruturas necessárias ao cálculo de osso não remodelado.

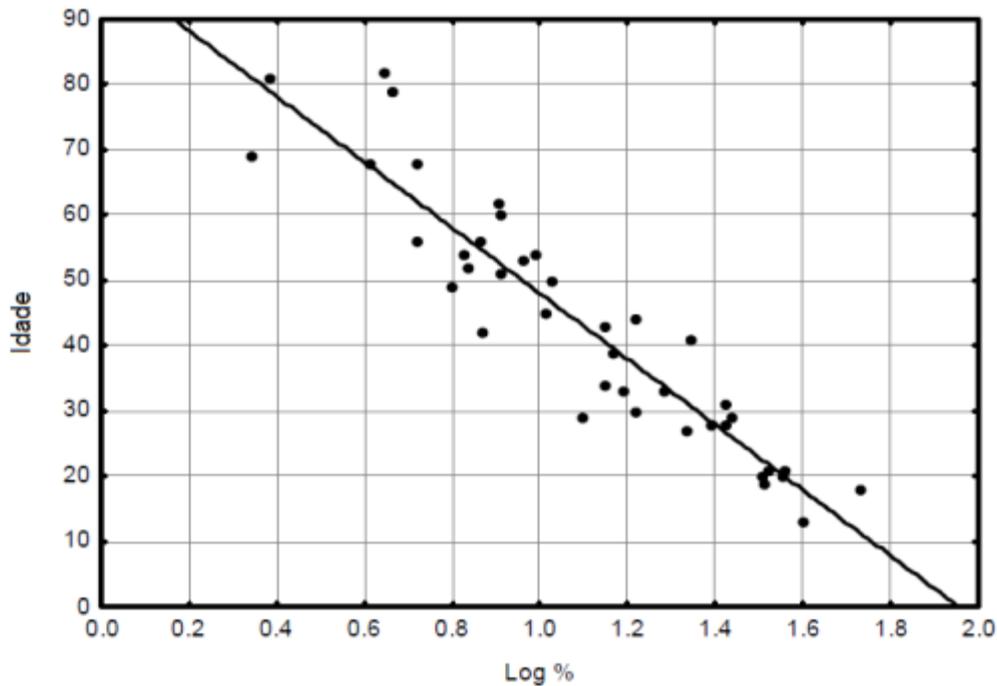
O microscópio utilizado para a análise das amostras deste estudo não disponibilizava tal ampliação. Em alternativa, as imagens foram observadas, na sua maioria, com uma ampliação de 50x, porque a ampliação superior disponível era de 200x e tornava impossível definir qualquer tipo de estrutura. Esta questão constituiu mais uma limitação à análise microscópica, que associada à anterior, tornou a identificação dos osteónios primários, do tecido lamelar e dos canais não Haversianos, uma tarefa árdua e morosa.

Por fim, refere-se uma questão mais logística mas que vale a pena pautar. A utilização do microscópio estava condicionada, ou seja, para se aceder a este era necessário realizar uma marcação prévia, condição que em certa medida poderia retardar o processo, que tinha já condicionantes temporais.

Deste modo, e após a explanação de um conjunto de questões que puseram em causa toda a análise microscópica, no entanto, optou-se por examinar os resultados obtidos das componentes que foram sendo recolhidas das amostras. Estes são, na realidade, uma das respostas fulcrais para o tão reduzido número de espécimes.

A primeira característica a ser avaliada foi a distribuição da percentagem de osso não remodelado pelas diferentes faixas etárias (figura 4.14). Em primeiro lugar, importa referir o motivo que levou à escolha deste parâmetro em detrimento de outros, como por exemplo, a densidade populacional de osteónios (OPD) utilizada por Stout e Paine (1992) e Stout e colaboradores na clavícula.

Numa primeira análise, e mais uma vez com base no trabalho de Ingraham (2004), verificou-se que a percentagem de osso não remodelado apresentava uma forte correlação com a idade. Quando o autor aplicou às variáveis uma transformação logarítmica de base 10, verificou um  $r = -0,93$ , o que demonstra a existência de uma forte correlação negativa entre a idade e a percentagem de osso não remodelado. Ou seja, à medida que a idade avança, a percentagem de osso não remodelado tem tendência a diminuir. Com base nesta informação, o autor utilizou uma regressão linear para confrontar a variável idade com o logaritmo da percentagem de osso não remodelado, da qual resultou um  $r^2$  de 0,871 com um SEE (standard error of the estimate) de 6,7985 (figura 5.1).



**Figura 5.1.** Linha de regressão linear que cruza a variável idade (eixo yy) com o logaritmo da percentagem de osso não remodelado (eixo xx). Adaptado de Ingraham (2004: 19).

Para além do mencionado, outra das razões para a escolha deste parâmetro reside no facto de que as características que o compõe, como os canais não Haversianos, o osso lamelar e os osteónios primários, quando observados com os recursos adequados, não são de difícil identificação. Ao contrário de, por exemplo, a OPD que implica a identificação de estruturas como os osteónios completos e fragmentados, que não é por vezes, tão intuitiva. Como um dos principais objectivos deste projecto é demonstrar que a histologia pode ser uma ferramenta de fácil e prática aplicação, a análise da percentagem de osso não remodelado surge como resposta a estes requisitos.

Porém, pelos motivos já referidos, a análise não se processou da forma esperada e isso reflecte-se em larga escala, nos resultados obtidos. Quando se tentou cruzar a percentagem de osso não remodelado, com a idade à morte dos indivíduos (figura 4.14), os resultados apresentaram-se contraditórios ao esperado.

Além da faixa etária dos  $\geq 60$  anos não alocar nenhum indivíduo, a percentagem de osso não remodelado é máxima no intervalo etário dos 50 aos 59 anos (15,43%), contra os 12,39% da faixa etária mais jovem. O esperado seria que, esta variável diminuísse à medida que a idade aumentasse, porém tal não se verifica. Por um lado, este facto acaba

por não ser tão inesperado, especialmente devido a dois grandes factores, um deles prende-se com tudo o que foi dito até aqui. As dificuldades analíticas da microscopia podem ter feito com que as estruturas fossem mal identificadas, inserindo um erro considerável em toda a amostra. A outra questão prende-se com o reduzido número amostral, que por sua vez está relacionado precisamente com todas as condicionantes analíticas já mencionadas.

Na verdade, os resultados apresentados face à análise microscópica são de certa forma mais informativos do que taxativos e interpretativos, porque em bom rigor este método foi abandonado. Quando se começaram a perceber todas as condicionantes impeditivas de uma análise rigorosa da microanatomia óssea, com base na percentagem de osso não remodelado, resolveu-se antes de abandonar por completo o método, perceber se este teria, mesmo contra as adversidades, algum potencial de estudo. Para responder a este quesito, era necessário saber em que grau os problemas associados ao microscópio, iriam afectar a identificação das estruturas necessárias ao cálculo da variável pretendida. Logo, antes de continuar a análise, resolveu-se avaliar ainda que precariamente, ou seja, sem ferramentas estatísticas significativas, o erro inter e intra observador.

É sabido que o erro na análise de uma dada variável, quer seja entre o mesmo observador, quer seja entre dois observadores diferentes, é de extrema importância para perceber se o método/exame aplicado é o mais correcto (Lucy, 2005). Desta feita, procedeu-se à análise do mesmo como se pode observar na figura 4.15.

É possível atestar que existe realmente uma desigualdade nos exames elaborados pelos diferentes observadores, sendo esta, máxima, entre o primeiro e o segundo observador ( $\approx 7\%$ ). É de destacar o facto de que o segundo observador tende a verificar, para todas as faixas etárias, uma percentagem de osso não remodelado superior às duas análises do observador número 1. As divergências entre o primeiro e o segundo exame do observador número 1 não são de maior, de resto, na faixa etária dos 40 aos 49 anos registam-se valores que diferem apenas em centésimas. Embora segundo os resultados, as diferenças não sejam tão notórias quanto esperado, importa visualizar as imagens correspondentes às áreas seleccionadas pelos observadores, como pertencentes a estruturas que simbolizam osso não remodelado.

As imagens 4.1 a 4.13 ilustram precisamente estas diferenças. Tome-se por exemplo o primeiro caso, e deste pode extrapolar-se para todos os outros. As figuras 4.1 a 4.3 expõem, respectivamente, a análise do primeiro campo microscópico, pelos diferentes observadores (número 1, número 1 num segundo momento e número 2). Como se pode observar, as estruturas seleccionadas são substancialmente diferentes, e se por vezes coincidem, aproximadamente na mesma zona, alterando apenas a área seleccionada, como é o caso da zona central destas figuras em concreto, existem situações em que nem a zona se aproxima.

As figuras 4.10 a 4.13 são uma excepção ao referido, pois a sua análise foi inviabilizada, por motivos que serão avançados posteriormente na discussão do método utilizado para produzir as amostras para a microscopia.

Seguindo esta linha de pensamento, e para reforçar a ideia, quando se inquiriu o segundo observador sobre as dificuldades sentidas, este expressou-as de forma muito peremptória, enfatizando a grande dificuldade em definir as diferentes estruturas. Deve no entanto, salvaguardar-se o facto de que o observador número 2 não tinha qualquer experiência na área da histologia óssea, tinha apenas conhecimentos de Antropologia Forense e foi seleccionado por esse mesmo motivo. Se este conseguisse identificar as estruturas sem problemas, significaria que o método cumpria o principal objectivo, rápido e de fácil aplicação, contudo tal não se verificou.

Por uma questão de curiosidade científica, apesar de todas as restrições metodológicas, resolveu-se experimentar e tentar perceber se mesmo assim faria algum sentido aplicar a fórmula desenvolvida por Ingraham (2004) neste contexto (tabela 4.1). Deve-se ter em mente que, o contexto populacional em que o estudo de Ingraham (2004) foi desenvolvido não se assemelha com o contexto português, já para não referir todo o erro analítico que está associado à análise microscópica. Curiosamente, a aplicação da fórmula estima dentro do intervalo, duas das três idades analisadas. Estima uma idade de  $33,06 \pm 6,8$ , para o indivíduo CVL 4 com 35 anos, e  $38,08 \pm 6,8$  para o CVL 2 com 42 anos. Apenas no indivíduo CVL 7, com 50 anos, a estimativa falha, subestimando a idade deste ( $30,80 \pm 6,8$ ). É difícil avançar com uma explicação categórica para este facto, até porque não se pode descartar a aleatoriedade do mesmo, uma vez que tal é possível, já que se fala da análise de um único indivíduo por grupo etário.

Após elencar tudo isto, optou-se por deixar de realizar a análise com recurso ao microscópio. Denotaram-se demasiadas limitações e barreiras que iriam impreterivelmente influenciar o rigor científico do presente trabalho. A variabilidade do erro introduzido estava a ser grande e existia um afastamento claro dos objectivos propostos. O processo estava a ser moroso, de difícil aplicação, e com erros na selecção das estruturas. Por este mesmo motivo, optou-se por não se aplicar a análise à amostra total, uma vez que a única possibilidade de o fazer seria encontrar outro microscópio, o que não constituiria tarefa fácil, dada a circunscrição temporal para a realização deste trabalho.

Independentemente desta questão, achou-se por bem não eliminar deste projecto o conjunto de análises, que apesar de numericamente pouco significativas, fizeram parte de um processo de descoberta e adaptação, já que a sua falha foi, em última instância, a responsável pela aplicação do método com recurso ao scâner.

### ***5.3. Análise com recurso ao scâner***

Importa justificar, previamente à discussão dos resultados obtidos, o motivo que levou à escolha deste método, e da variável que ele analisa, em detrimento de outras metodologias igualmente importantes.

A análise com recurso ao scâner surge de toda a problemática associada à análise microscópica. Como já foi aludido, a análise microscópica teve de ser abandonada porque, em bom rigor, se sabia que os resultados, dela provenientes, não seriam completamente fidedignos, devido a todas as limitações. Desta feita, era necessário encontrar uma abordagem que permitisse continuar a utilizar componentes histológicas do osso, mas que não envolvesse a utilização do microscópio. Em última análise, esta informação acaba por ser contraditória, porque, à partida, para se conseguir aceder à microestrutura óssea é necessário recorrer à microscopia.

Por coincidência, na altura em que se procurava um método que conseguisse preencher os requisitos citados, surge uma publicação que parece vir responder às necessidades nutridas. Assim, o estudo realizado por Stewart e colaboradores (2012)

deu o impulso necessário para se conseguir aplicar um novo método sem recurso ao microscópio.

A pesquisa efectuada por Stewart e colegas (2012), consiste na “*comparação de diferentes métodos para a obtenção de dados (valores da área cortical relativa) necessários à investigação histomorfométrica*” (Stewart *et al.*, 2012: 1). Muito sucintamente, refere-se que os autores compararam quatro métodos distintos que permitissem recolher dados sobre a área cortical relativa. Dois dos métodos apresentados recorriam à microscopia para calcular a área cortical, e por esse motivo foram imediatamente descartados. As outras duas metodologias, envolviam a utilização de ferramentas que permitissem de forma simples transformar em imagem digital um espécime histológico em análise.

Entre estes, destacou-se o método com recurso a um digitalizador, devido a duas razões principais que serão explicadas de seguida. Ao contrário de todas as outras metodologias apresentadas, que recorriam a microscópios, ou câmaras fotográficas (com um manancial de dispositivos associados), o digitalizador é um recurso fácil de adquirir, e que de resto, já muitos investigadores possuem, não sendo necessário dispendir recursos na aquisição de um material novo. O outro motivo subjacente à escolha deste método, remete para os resultados obtidos por Stewart e colaboradores (2012) no seu estudo. O método com recurso ao digitalizador é aquele que apresenta um menor desvio padrão para as médias de área cortical relativa, sendo apontado pelos autores, como o método mais preciso para este tipo de recolha de dados.

Com base nesta informação, a metodologia apresentada parecia enquadrar-se perfeitamente nos padrões de estudo. Mas faltava responder a uma última questão, era ainda necessário apurar se a área cortical relativa seria um bom indicador para estimar a idade à morte dos indivíduos. Apesar de Stewart e colaboradores (2012) discorrerem brevemente sobre o possível uso desta para tal fim, não apresentam nenhum resultado em concreto.

Na verdade, existem alguns estudos que mencionam a área cortical relativa ou componentes associados (área cortical e área medular), como um constituinte histológico a avaliar, quando se pretende estimar a idade à morte, mas acabam por não apresentar uma relação directa desta variável com a idade cronológica do indivíduo. Autores como Stout e Paine (1992), dos poucos que desenvolveram análises

histológicas na clavícula, avançam, na sua publicação, com a definição de área cortical como um dos elementos a examinar. Porém, ao nível dos resultados focam-se exclusivamente na densidade de osteónios, não fazendo qualquer menção à área cortical.

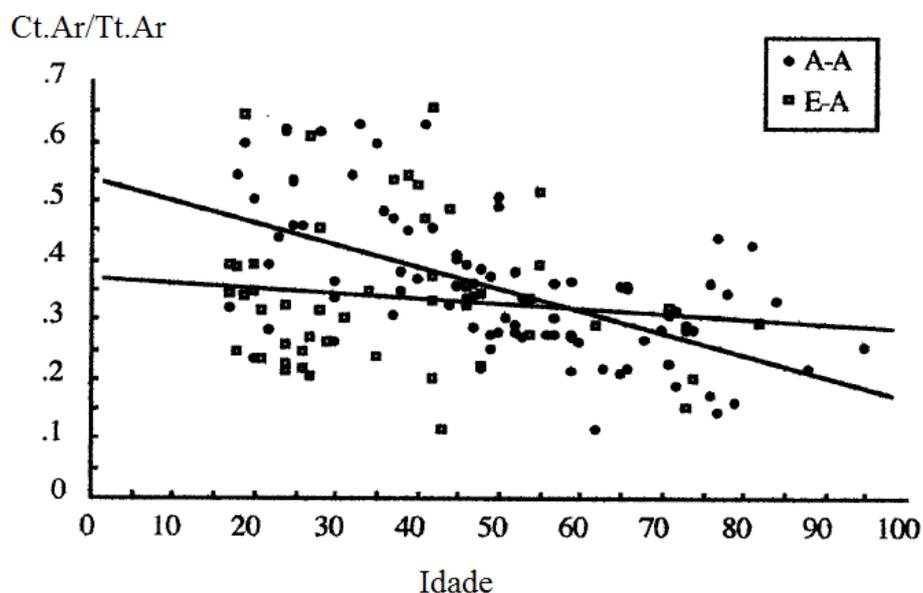
Análises como as de Thompson (1980) e Chan e colaboradores (2007), utilizam entre outras características histológicas, a espessura cortical em fémures. Esta variável não traduz o mesmo que a área cortical, logo não se pode aplicar uma comparação directa com o presente estudo, já para não falar da diferença no tipo de osso. Todavia, julga-se que estas duas variáveis estão intimamente ligadas, e mais tarde ao nível da discussão dos resultados obtidos, pode ser útil aplicar uma analogia entre estes dois parâmetros.

Neste momento importa, no entanto, explicar o porquê da escolha da área cortical relativa. Das poucas investigações que, de facto, entram em linha de conta com esta variável, destacam-se os estudos de Takahashi e Frost (1966), Cho e colegas (2002), Cho e colaboradores (2006) e Cannet e colaboradores (2011). De ressaltar o facto que todos eles foram efectuados em costelas sendo necessário por isso uma certa dose de cautela.

Os estudos de Takahashi e Frost (1966) e Cho e colegas (2002) cruzam em teoria as variáveis idade e área cortical, mas fazem-no com um intuito diferente daquele utilizado para estimar a idade à morte. O primeiro estudo faz uma descrição das alterações das áreas corticais e medulares à medida que a idade avança. Este preconiza que a área medular tem tendência a aumentar, mas estranhamente a área cortical não tem tendência a diminuir, já que parece existir um aumento da área total. O segundo estudo utiliza a área cortical relativa, a área cortical e a área medular, a par com outras características, mas aplica-as para perceber as diferenças sexuais e etárias com base na afinidade populacional, distribuindo as variáveis não pelas faixas etárias, mas entre *African-American* e *European-American*.

À semelhança de Stout e Paine (1992), Cannet e colaboradores (2011) referem a área cortical relativa como um parâmetro passível de relacionar com a idade dos indivíduos, mas não aplica esta variável à sua análise. Os autores utilizam apenas a densidade populacional de osteónios afirmando que, entre as medições histológicas recolhidas, este é o critério mais fiável para estimar a idade.

O único estudo que relaciona concretamente a área cortical relativa com a idade cronológica dos indivíduos, é a análise efectuada por Cho e colaboradores (2006). Embora o objectivo dos autores passe por uma análise multivariada, com a criação de modelos estatísticos específicos, para estimar a idade em tipos populacionais *African-American* e *European-American*, acabam por apresentar a correlação separada de cada um dos elementos que analisam, estando entre eles a área cortical relativa (figura 5.2). Segundo os autores a área cortical relativa, quando cruzada com a idade, dentro do mesmo grupo populacional, exhibe um  $r^2 = 0,589$ .



**Figura 5.2.** Associação entre a área cortical relativa (Ct.Ar/Tt.Ar) e a idade à morte em African-American (A-A) e European-American (E-A). Não importa tanto constatar as interações entre os grupos, mas sim a relação da área cortical com a idade. Adaptado de Cho e colaboradores (2006: 15)

Como se pode perceber pela figura 5.2, a relação entre as duas variáveis não é a melhor, como já indicava o próprio valor de  $r^2$ . Contudo, há uma ressalva que dever ser feita, este teste foi aplicado em costelas, logo ao se mudar o tipo de osso os resultados podem divergir.

Após esta explicação pensa-se que ficou clara a falta de métodos desenvolvidos com base na área cortical relativa, de resto, em toda a pesquisa bibliográfica, não existe nenhum estudo que relacione esta variável com a idade em clavículas. Esta é então, umas das razões porque se escolheu este parâmetro para tentar estimar a idade de

indivíduos já padecidos. Aliado a este facto, a medição das estruturas necessárias ao cálculo da área cortical é muito intuitiva, e o método de recolha da imagem que lhe está subjacente também, como de resto o comprovam os resultados obtidos. Encontrar uma forma prática e de fácil aplicação da histomorfometria para a estimativa da idade de indivíduos adultos, é a questão chave para o cumprimento dos objectivos deste projecto.

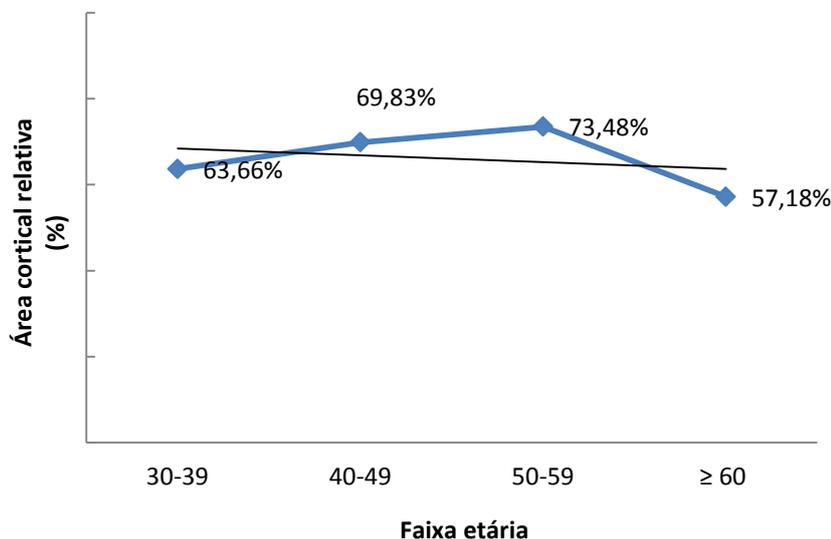
Independentemente do referido anteriormente, consegue-se perceber que à medida que a idade aumenta, a área cortical relativa tem tendência a diminuir (figura 5.2). De certo modo parece que o normal processo de envelhecimento acarreta uma perda de material ósseo.

Os resultados obtidos (figura 4.16) estão em certa medida de acordo com o esperado, já que as principais diferenças se verificam nos dois extremos etários, sendo que os indivíduos mais jovens apresentam uma diferença positiva de aproximadamente 6%, quando comparados com indivíduos mais velhos. Importa então avançar com uma possível explicação para este facto. Segundo Cho e colaboradores (2002), a diminuição da área cortical, que de certa forma expressa um decréscimo da densidade óssea com o avançar da idade, pode estar relacionada com uma alteração da taxa de remodelação. Seguindo esta linha de pensamento, preconiza-se que a taxa de remodelação óssea seja menor em indivíduos mais velhos, acarretando uma vantagem para estes, uma vez que a massa óssea é mantida. A actividade de remodelação introduz porosidade no osso, com a criação de novos osteónios, existindo uma formação contínua de osso nestas unidades. Porém, associado a esta diminuição está uma rápida acumulação de microfracturas que tornam o osso mais frágil.

Apesar da amostra coincidir em parte com o esperado, verifica-se um aumento da área cortical relativa, dos 30 aos 50 anos, o que não seria de esperar. É sabido que a diminuição da taxa de remodelação se faz sentir sobretudo a partir dos 50 anos (Cho *et al.*, 2002; Takashi e Frost, 1966), como tal não seria de prever este acréscimo. Uma das únicas explicações para este facto prende-se com as condicionantes da amostra, já que o seu reduzido tamanho pode ter mimetizado um perfil que não é representativo da população geral. Por uma questão elucidativa, decidiu-se aplicar aos dados uma ferramenta disponível no Microsoft Excel 2010, designada de *linha de tendência linear* (figura 5.3). Estas linhas de tendência são utilizadas para representar graficamente tendências em dados e para ajudar a analisar problemas relacionados com predições.

Com base nos dados recolhidos, o programa projecta uma linha no gráfico para além dos dados reais, prevendo uma possibilidade de apresentação dos dados futuros (<http://office.microsoft.com/pt-pt/>).

Como se pode distinguir na figura 7.3, a propensão dos dados, consoante a linha apresentada, remete para uma diminuição da área cortical relativa, face ao aumento da idade. O motivo pelo qual tal abordagem não foi apresentada nos resultados, está ligada com o facto de que se estão a prever dados futuros, não sendo concretamente aquilo que se obteve. Assim, decidiu-se apenas tentar perceber o que aconteceria se, por exemplo, a amostra fosse maior, realçando o conteúdo informativo e não vinculativo desta análise.



**Figura 5.3.** Distribuição da área cortical relativa, em percentagem, pelas diferentes faixas etárias, com a linha de tendência linear, meramente informativa e não vinculativa, que mostra graficamente a tendência dos dados. N=18

Embora na opinião de Cho e colaboradores (2002), a área cortical relativa seja uma variável mais relevante para estimar a idade dos indivíduos, vale a pena referir os dados obtidos para as áreas absolutas, representadas na tabela 4.2.

Deste modo, segundo Takashi e Frost (1966) a área cortical atinge a sua área máxima entre os 25-30 anos, depois estabiliza e começa a decrescer por volta dos 55-60. Os resultados obtidos estão, de certa forma, de acordo com esta afirmação. Embora se verifique um aumento desta variável dos 30 para os 40 anos, ela decresce

essencialmente a partir dos 60 anos. A constatação deste facto vai de encontro ao já afirmado, face à perda de densidade óssea em indivíduos mais velhos.

Em relação à área total, esta tem segundo os autores, uma tendência crescente que parece servir como meio de compensação para a perda da porção cortical do osso. Aliado a este facto, sabe-se que a área medular nunca diminui ao longo da vida de um indivíduo, continua sempre no sentido crescente. Deste feito, em teoria o aumento da área medular é o grande responsável pela perda de tecido cortical, uma vez que, tanto a área total como a medular, aumentam com a idade. Preconiza-se que a taxa de crescimento da área medular se dê a um ritmo mais acelerado que a área total, fazendo com que a área cortical diminua.

A este nível os resultados obtidos apontam numa direcção diferente, uma vez que, ao contrário do esperado, a área total sofre uma redução com a idade. O mesmo se verifica com a área medular, já que o seu aumento apenas se constata nos indivíduos com idades superiores a 60 anos. Não é fácil avançar com uma teoria explicativa para este facto. Pode-se mais uma vez, estar perante um condicionamento da amostra, introduzindo assim um viés nos resultados obtidos, ou então, a tendência verificada por Takashi e Frost (1966) deixou de se aplicar. É de referir que esta publicação data de há aproximadamente 50 anos atrás. É possível portanto que a tendência verificada na altura, não seja a mesma daquela observada na actualidade.

Com base na análise elaborada, achou-se pertinente expor uma possível relação entre a área cortical relativa e o sexo do indivíduo (figura 4.25). A grande maioria dos estudos (Takashi e Frost, 1966; Cho *et al*, 2002; Cho *et al*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Cannet *et al*, 2011) chama a atenção para este mesmo facto. O sexo é um factor importante que afecta a remodelação do osso, sendo que a perda de material esquelético é exacerbada pelo aumento da taxa da actividade dos BMUs (Kim, *et al.*, 2007). A menopausa pode na realidade ser o grande factor por detrás das diferenças sexuais encontradas, uma vez que os autores indicam que as divergências encontradas são maiores nos intervalos etários correspondentes à idade média de encerramento do ciclo ovárico da mulher. A nível fisiológico pensa-se que a diminuição do estrogénio associada à não ovulação suprime a reabsorção e a formação de osso, fazendo com que a área cortical decresça. Esta diferença pode também estar associada à localização da amostra de osso, já que dentro do mesmo osso se podem observar diferenças devido às

constricções biomecânicas que se fazem sentir particularmente nas zonas de inserção muscular (Cannet, 2011). No caso concreto deste projecto, pensa-se que esta questão pode ser descartada, uma vez que as zonas de maior inserção na clavícula foram evitadas aquando do corte.

Os resultados obtidos estão de acordo com a teoria avançada, até porque antes da idade média da menopausa, os indivíduos do sexo feminino exibem uma percentagem de área cortical ligeiramente superior à dos indivíduos masculinos. Tal faz todo o sentido já que, a taxa de estrogénio presente nas mulheres ainda não iniciou o seu declínio. Já a subida verificada nos indivíduos pertencentes à faixa etária dos 50 aos 59 anos, não se enquadra no padrão esperado, o que de certa forma não é estranho uma vez que, nesta faixa existe apenas um indivíduo de cada sexo, o que não representa de todo a população geral.

A área total mostra também uma variância conforme o sexo do indivíduo, sendo que os indivíduos do sexo masculino exibem em média uma área total maior ( $\bar{x}_{\text{♂}} = 119,07 \text{ mm}^2$  e  $\bar{x}_{\text{♀}} = 107,43 \text{ mm}^2$ ). A explicação mais plausível para este facto está relacionada com a existência de um dimorfismo sexual na espécie humana, que se em muitas situações não é extremamente evidente, aqui parece constituir uma explicação viável (Wasterlain, 2000).

Para finalizar, cabe agora discutir a distribuição da área cortical relativa tendo em consideração a análise do observador número 1 em dois momentos diferentes e a análise do observador número 2 (figura 4.28). Como já foi referido, as destrinças entre as análises de dois investigadores pode legitimar ou invalidar um determinado método (Lynnerup *et al.*, 1998; Cannet *et al.*, 2011). Pensa-se que os resultados obtidos fornecem um bom ponto de partida para uma expansão do uso do scâner, como auxiliar do processo de transformação da amostra para o mundo digital. Como se pode observar na figura 4.28, as diferenças entre os observadores são mínimas. Embora não se saiba se existe de facto a ausência de uma desigualdade significativa a nível estatístico, pode afirmar-se que a maior disparidade entre as diferentes observações é de 2,14%, verificadas entre a primeira e a segunda análise do mesmo observador.

Em suma, apesar da área cortical relativa, segundo dados recolhidos na literatura (Cho *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007), não ser das variáveis mais fidedignas para estimar a idade à morte, pensa-se que para além de não existir nenhum método desenvolvido para

a clavícula, a metodologia carece de uma verificação minuciosa, onde a área cortical relativa seja a única em análise. Além deste facto resalta-se a fácil aplicação deste método. Quando se inquiriu o segundo observador sobre qual dos dois métodos, microscópico ou com recurso ao scâner, era de mais fácil aplicação, a resposta foi clara e concisa. O método com recurso ao digitalizador foi eleito como definitivamente mais fácil e prático de aplicar.

#### ***5.4. Apreciação Global***

Após o escrutínio dos resultados obtidos, em virtude da bibliografia utilizada, passa-se agora a dar uma visão geral de todo o processo, e discutir em que medida os objectivos inicialmente propostos foram de facto alcançados.

Assim, importa primeiramente referenciar um ponto, que apesar de não constituir um resultado no sentido restrito da palavra está-lhe altamente associado. O método utilizado na preparação da amostra para análise constitui um dos elementos chave deste trabalho.

A metodologia utilizada para desgastar a amostra, até uma espessura passível de análise, foi escolhida principalmente em virtude dos recursos utilizados. Em abono da verdade, a metodologia adaptada de Frost por Maat (2001; 2006b) tem como principais premissas, a baixa necessidade de adquirir material sofisticado para elaborar a análise, a rapidez no processamento da amostra, ao mesmo tempo que exhibe uma preocupação em garantir uma eficácia mínima que não invalide uma boa análise dos espécimes.

Só depois de aplicar a metodologia se percebeu que ela é realmente rápida e de fácil aplicação. Sem nunca se ter realizado tal tarefa, é com facilidade que se põe em prática as recomendações do autor. No entanto, existe um conjunto de situações que a podem tornar menos viável para determinados tipos de estudo. Um dos principais problemas que se encontrou foi a constante incerteza da espessura final da amostra. Os autores acabam por dar uma definição muito vaga, fazendo com que todas as amostras fiquem com espessuras diferentes. Neste caso em particular, este factor não pesava muito para o

tipo de análise efectuado, todavia em outro tipo de estudos, esta pode ser uma variável de peso na exclusão desta metodologia.

O facto de esta abordagem não exigir a descalcificação do osso é sem dúvida uma mais-valia importante, uma vez que este processo pode demorar vários dias. Contudo, segundo Cannet e colaboradores (2011), conseguem-se imagens microscópicas de maior qualidade se forem utilizadas amostras descalcificadas, sendo que esta afirmação é discutível, como já referido no capítulo da metodologia. Consequentemente, e comparativamente a outras metodologias, a desenvolvida por Maat (2001; 2006b), não é relativamente demorada, porém é um pouco mais morosa do que os autores referem. Em quase nenhuma das circunstâncias se demorou 20 minutos a realizar toda a análise, desde o corte com a serra até ao desgaste final. A verdade é que o tempo de desgaste do osso está amplamente relacionado com a espessura do corte que se efectuou com a serra, e nem sempre é possível realizar cortes com menos de 2-3 cm de espessura.

Em suma, pode-se afirmar que apesar de uma ou outra *nuance*, a metodologia aplicada ao nível da preparação da amostra, cumpriu o propósito deste projecto, e não foi impeditiva de boa análise microscópica.

Um dos objectivos principais deste trabalho, é fazer uma ponderação do potencial da histologia para estimar a idade à morte, sobretudo a um nível mais empírico do que teórico. Ou seja, saber se o antropólogo forense pode recorrer à análise histológica de um modo ao mesmo tempo que eficiente, prático. Depois de se trabalhar de perto com esta realidade, pensa-se que se ganhou experiência suficiente para responder a tal objectivo, até porque não há uma resposta peremptória.

A rapidez, fiabilidade, complexidade e mesmo a aplicabilidade dos métodos histológicos está amplamente ligada com as estruturas que se pretendem analisar e com o método histológico que se utiliza. Neste caso concreto, os métodos histológicos usados para estimar a idade à morte não foram dos mais complexos.

Em certa medida, pode-se afirmar que os resultados obtidos com recurso a métodos histológicos são mais precisos comparativamente aos métodos macroscópicos, dado que a maioria dos processos fisiológicos tem uma base ao nível celular, não sendo a senescência óssea uma excepção. O grande problema é encontrar as ferramentas certas para descodificar esta informação. O que leva a uma outra questão levantada no início

deste estudo, a necessidade *a priori* de conhecimentos e experiência na área da microanatomia óssea.

Para quem segue o percurso académico com uma formação base em ciências, o conhecimento citológico é inerente, logo pode-se afirmar que, com uma dose de boa vontade, os conhecimentos histológicos não são de difícil apreensão, chegando mesmo a ser bastante intuitivos. A experiência, essa sim faz sentir o seu peso. Sem qualquer dúvida que, um investigador com experiência consegue fazer a análise histomorfométrica, ao nível da identificação das estruturas, de uma forma muito mais rápida e provavelmente com menos erro. Todavia, a única forma possível de ganhar experiência é através da prática, e se a histologia continuar, de certa forma, a ser negligenciada pelos antropólogos forenses, nunca se revelará como uma ferramenta útil ao seu dispor.

Por fim, resta responder às questões que visam averiguar se a eleição da clavícula como material ósseo foi, de facto, uma opção viável, sendo necessário perceber se a percentagem de osso não remodelado e a área cortical relativa fornecem bons indicadores para estimar a idade à altura da morte. Qualquer uma destas questões vai permanecer em aberto. Opta-se por, com base nos resultados obtidos, não avançar com nenhuma opinião sobre este item. Não é possível avaliar de forma assertiva, se as características histomorfológicas avaliadas são as mais indicadas para estimar a idade à morte, não havendo dados suficientes que permitam afirmar ou sequer excluir estas componentes como passíveis de análise para o fim pretendido.



**6**

**Considerações Finais**



A estimativa da idade à morte é, provavelmente, um dos maiores desafios a que o antropólogo forense se propõe. Se, por exemplo, a diagnose sexual varia apenas entre três respostas possíveis (masculino, feminino e indeterminado), a idade não pode ser categorizada de tal forma. Quando muito, avança-se com um intervalo etário, que possa fornecer às entidades competentes elementos suficientes para estas actuarem, sendo que, em algumas circunstâncias, é preferível não manifestar qualquer tipo de opinião, ao invés de cair no equívoco de induzir em erro a linha de investigação.

Como já mencionado, são vários os métodos que podem ser utilizados para tentar encontrar uma relação entre a idade biológica e a idade cronológica, mas importa esclarecer que esta relação nunca será perfeita, por mais estudos e pesquisas que se façam.

A histologia surge como uma ferramenta para auxiliar os antropólogos forenses. Pensa-se que cada vez mais, os profissionais desta área apostam em metodologias que saiam um pouco da sua área de conforto, com o intuito de granjear os melhores resultados possíveis. Desde 1965 que, pela primeira vez, um investigador percebe a potencialidade da histologia, para o contexto específico da estimativa da idade à morte. E se por um lado os investigadores continuam a preferir métodos morfológicos para estimar este parâmetro, a histologia pode revelar-se em algumas situações como o único meio de tentar avançar com um diagnóstico. Ressaltam-se possíveis casos de ossos queimados, ou largamente afectados pela tafonomia, onde esta metodologia pode funcionar não só para estimar a idade, mas também para, por exemplo, fazer uma distinção entre osso humano e osso não-humano.

Este projecto tem então como objectivo, desmistificar qualquer ideia pré-concebida que possa existir em relação à utilização da histologia. Não é, na realidade, uma prática tão demorada assim, e apresenta bons resultados dependendo do tipo de estruturas analisadas.

Por motivos já explicados anteriormente, não foi possível perceber se a percentagem de osso não remodelado e a área cortical relativa são bons indicadores para estimar a idade, nem afirmar que a clavícula é um osso importante para este fim. Existem empiricamente pouco estudos em histologia com aplicação em Antropologia Forense, e de uma certa perspectiva, apesar de a presente tentativa não ter apresentado os resultados desejados, abriu-se um precedente para a realização de novos estudos nesta área.

Assim, pode afirmar-se que existe um manancial de estudos que podem ser feitos com base na histologia, como ferramenta para estimar a idade, nomeadamente porque ainda nenhum método foi desenvolvido para uma população portuguesa. Seria interessante estudar as variáveis mais comuns, desde o diâmetro médio dos canais de Havers até à densidade populacional de osteónios. É importante fazê-lo ainda, com recurso a diferentes tipos de ossos, testando os métodos já desenvolvidos, e projectando outros, bem como apostar em análises multivariadas e perceber se existem vantagens em utilizar a medição de várias características, ou não. Importa salientar para interessados em futuros estudos, que um dos parâmetros mais importantes a definir quando se realiza uma análise destas, é a dimensão da amostra. É necessário elaborar estudos representativos da população, passíveis de uma análise estatística robusta.

Cada vez mais, a necessidade de aplicar os conhecimentos estatísticos na Antropologia Forense, e nas ciências forenses em geral, se torna peremptória. Esta ferramenta quantifica o trabalho do antropólogo e permite legitimar as metodologias por ele usadas. O precedente aberto pelo caso *Daubert vs. Merrell Dow Pharmaceuticals*, mostra que os investigadores têm de estar muito seguros dos seus conhecimentos, porém isso não chega, é necessário legitimar empiricamente que esses mesmos conhecimentos podem ser aplicados sem nenhum tipo de contestação.

Em suma, acaba-se dizendo que é necessário que estes estudos nunca deixem de ser realizados sem receio de conseguir resultados menos bons. Tal facto não é sinónimo de uma má investigação, já que a única forma de seguir a busca do conhecimento é através do erro, da percepção deste, da sua aceitação e por fim da sua ultrapassagem. Este é o derradeiro caminho de todos aqueles que tentam assim fazer ciência.

“If we’re are not prepared to be wrong, we’ll never come up with anything original”

7

**Bibliografia**



- Aaron, J.; Carter, H. 1987. Rapid preparation of fresh-frozen undecalcified bone for histological and histochemical. *The Journal of Histochemical Society*, 35(3): 361-369
- Abou-Arab, M.; Thomsen, J.; Frohlich, B.; Lynnerup, N. 1995. Technical note: Histological staining of secondary osteons. *American Journal of Physical Anthropology*, 98(3): 391-394.
- Adam, C. 2010. *Essential mathematics and statistics for forensic science*. West Sussex, John Wiley & Sons.
- Adams, B. J. 2007. *Forensic Anthropology*. New York, Chelsea House Publishers.
- Alciati, G.; Drusini, A. G.; Bacco, M.; Pezzulli, S. 1994. Age at death determination by means of femoral frequency of secondary osteons. *International Journal of Anthropology*, 9(4): 329-337.
- An, Y.; Guber, H. 2003. Introduction to experimental bone and cartilage histology. In: An, Y.; Martin, K. (eds.). *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. Totowa, Humana Press Inc.:3-58.
- Anderson, M.; Anderson, D.; Wescott, D. 2009. Estimation of adult skeletal age-at death using the Sugeno Fuzzy Integral. *American Journal of Physical Anthropology*, 142(1): 30-41.
- Areia, M.; Rocha, M. 1985. O ensino da Antropologia. In: *Cem anos de Antropologia em Coimbra, 1895-1995*. Coimbra, Museu e Laboratório Antropológico: 13-60.
- Areia, M.; Rocha, M.; Miranda, M. 1991. O Museu e Laboratório Antropológico da Universidade de Coimbra. In: *Universidade(s). História. Memória. Perspectivas. Actas Congresso "História da Universidade" (No 7º Centenário da sua Fundação)*. Coimbra, Comissão Organizadora do Congresso "História da Universidade", 1991(2): 87-106.
- Aubin, J.; Turksen, K. 1996. Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. *Microscopy Research and Technique*, 33(2): 128-140.
- Aykroyd, R.; Lucy, D.; Polliard, A.; Solheim. 1997. Technical note: regression analysis in adult age estimation. *American Journal of Physical Anthropology*, 104(2): 259-265.
- Baccino, E. 2005. Forensic Anthropology Society of Europe (FASE), a subsection of the IALM, is 1 year old. *International Journal of Legal Medicine*, 119(6): N1.
- Baccino, E.; Schmitt, A. 2006. Determination of adult age at death in the forensic context. In: Schmitt, A.; Cunha, E.; Pinheiro, J. (eds.). *Forensic Anthropology and Medicine*. Totowa, Humana Press Inc.: 259-280-
- Baccino, E.; Tavernier, J.; Lamendin, H.; Frammery, D.; Nossintchouk, R.; Humbert, J. 1991. Recherche d'une méthode multifactorielle simple pour la détermination de l'âge des cadavres adultes. *Journal de Médecine Légale Droit Médical*, 34(1): 27-33.
- Baccino, E.; Ubelaker, D.; Hayek, L.; Zerilli, A. 1999. Evaluation of seven methods of estimation age at death from mature human skeletal remains. *Journal of Forensic Sciences*, 44(5): 931-936.
- Baccino, E.; Zerilli, A. 1997. The two-step strategy or the right way to combine a dental (Lamendin) and an anthropological (Suchey-Brooks System) method for age determination. *Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences*, 3: 150.
- Beach, J.; Schmidt, C.; Sharkey, R. 2010. Dental aging techniques: a review. In: Latham, K.; Finnegan, M. (eds.). *Age estimation of the human skeleton*. Springfield, Charles C Thomas Publisher, Ltd.: 5-18.

- Beauthier, J.; Lefèvre, P.; Orban, R.; Polet, C.; Grévin, G.; Quatrehomme, G. 2008. L'anthropologie et la personne décédée. In: Beauthier, J. (ed.). *Traité de médecine légale*. Bruxelles, De Boeck & Larcier: 423-482.
- Berg, G. 2008. Pubic bone age estimation in adult women. *Journal of Forensic Sciences* 53(3):569-577.
- Bethard, J. 2005. *A test of the transition analysis method for estimation of age-at-death in adult human skeletal remains*. Master Dissertation, University of Tennessee.
- Black, S. 2008. Forensic Anthropology serving justice. In: Schutkowski, H. (ed.). *Between biology and culture*. Cambridge, Cambridge University Press: 39-66.
- Boel, L.; Boldsen, J.; Melsen, F. 2007. Double lamellae in trabecular osteons: towards a new method for age estimation by bone microscopy. *HOMO – Journal of Comparative Human Biology*, 58(4): 269-277.
- Bellamy, D. 1995. *Aging: a biomedical perspective*. New York, Wiley & Sons.
- Schmitt, A.; Murail, P.; Cunha, E.; Rougé, D. 2002. Variability of the pattern of aging on the human skeleton: evidence from bone indicators and implications on age at death estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 47(6): 1203-1209.
- Tood, T.; Lyon, D. 1924. Ectocranial suture closure. Parte I. Adult males of white stock. *American Journal of Physical Anthropology*, 7(3): 325-384.
- Tood, T.; Lyon, D. 1925. Cranial suture closure. Its progress and age relationship. Part II. Ectocranial closure in adult males of white stock. *American Journal of Physical Anthropology*, 8(1): 23-45.
- Masset, C. 1989. Age estimation on the basis of cranial sutures. In: Iscan, M. (ed.). *Age markers in the human skeleton*. Springfield, Charles C. Thomas: 71-103.
- Lamendin, H.; Baccino, E.; Humbert, J.; Tavernier, J.; Nossintchouk, R.; Zerilli, A. 1992. A simple technique for age estimation corpses: the two criteria dental method. *Journal of Forensic Sciences*, 37(5): 1373-1379
- Cameriere, R.; Ferrante, L.; Math, D.; Cingolani, M. 2004. Variations in pulp/tooth area ratio as an indicator of age: a preliminary study. *Journal of Forensic Sciences*, 49(2): 317-319.
- Iscan, M.; Loth, S.; Wright, R. 1984. Metamorphosis at the sternal rib end: a new method to estimate age at death in white males. *American Journal of Physical Anthropology*, 65(2): 147-156.
- Tood, T. 1920. Age changes in the pubic bone. *American Journal of Physical Anthropology*, 3(3): 285-334.
- Brooks, S. 1955. Skeletal age at death: the reliability of cranial and pubic age indicators. *American Journal of Physical Anthropology*. 13(4): 567-597.
- Brooks, S.; Suchey, S. 1990. Skeletal age determination based on the Os Pubis. A comparison of the Ascádi-Nemeskéri and Suchey-Brooks methods. *Journal of Human Evolution*.5: 227-238.
- Martrille, L.; Irinopoulou, T.; Bruneval, P.; Baccino, E.; Fornes, P. 2009. Age at death estimation in adults by computer-assisted histomorphometry of decalcified femur cortex. *Journal of Forensic Sciences*, 54(6): 1231-1237.
- Streeter, M. 2010. A four-stage method of age at death estimation for use in the subadult rib cortex. *Journal of Forensic Sciences*, 55(4): 1019-1024.

- Thompson, D. 1980. Age changes in bone mineralization, cortical thickness, and haversian canal area. *Calcified Tissue International*, 31(1): 5-11.
- Stout, S. 1986. The use of bone histomorphology to estimate age. *Journal of Forensic Sciences*, 33(1): 121-125.
- Stewart, M.; McCormick, L.; Goliath, J.; Sciulli, P.; Stout, S. 2012. A comparison of histomorphometric data collection methods. *Journal of Forensic Sciences*, doi: 10.1111/j.1556-4029.2012.02195.x.
- Ahqvist, J.; Damsten, O. 1969. A modification of Kerley's method for the microscopic determination of age in human bone. *Journal of Forensic Sciences*, 14(2): 205-212.
- Keplinger, L. 2001. Stature, maturation and secular trends in Forensic Anthropology. *Journal of Forensic Sciences*, 46(4): 788-790.
- <http://www.medicalmuseum.mil> [Acedido em 01-06-2012].
- MacLaughlin, S. 1990. Epiphyseal fusion at the sternal end of the clavicle in a modern Portuguese skeletal sample. *Antropologia Portuguesa*, 8: 59-68.
- Henriques, F.; Rodrigues, T. 2008. O século XX: a transição. In: Rodrigues, T. (ed.). *História da população portuguesa: das longas permanências à conquista da modernidade*. Porto, CEPESE & Edições Afrontamento: 417-513.
- Stein, M.; Thomas, C.; Feik, S.; Wark, J.; Clement, J. 1998. Bone size and mechanics at the femoral diaphysis across age and sex. *Journal of Biomechanics*, 31(12): 1101-1110.
- Peck, J.; Stout, S. 2007. Intrasketal variability in bone mass. *American Journal of Physical Anthropology*, 132(1): 89-97.
- Bartlett, J.; Kotrlik, J.; Higgins, C. 2001. Organizational research: determining appropriate sample size in survey research. *Information Technology, Learning and Performance Journal*, 19(1): 43-50.
- Lucy, D. 2005. *Introduction to statistics for forensic scientists*. West Sussex, John Wiley & Sons Ltd.
- Motulsky, H. 1995. *Intuitive biostatistics*. New York, Oxford University Press.
- Takahashi, H.; Frost, H. 1966. Age and sex related changes in the amount of cortex of normal human ribs. *Acta Orthopaedica Scandinavia*, 37(2): 122-130.
- <http://office.microsoft.com/pt-pt/> [Acedido em 26-07-2012].
- Bonewald, L.; Johnson, M. 2008. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, 42(4): 606-615.
- Bouvier, M.; Ubelaker, D. 1977. A comparison of two methods for the microscopic determination of age at death. *American Journal of Physical Anthropology*, 46(3): 391-394.
- Boyle, W.; Simonet, W.; Lacey, D. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937): 337-342.
- Brickley, M.; Ferlini, R. 2007. Forensic Anthropology: developments in two continents. In: Brickley, M. B.; Ferlini, R., (eds.). *Forensic Anthropology Case studies from Europe*. Springfield, Charles C. Thomas Pub: 3-19.
- Britz, H.; Thomas, C.; Clement, J.; Cooper, D. 2009. The relation of femoral osteon geometry to age, sex, height and weight. *Bone*, 45(1): 77-83.

- Saunders, S.; Fitzgerald, C.; Rogers, T.; Dudar, C.; McKillop, H. 1992. A test of several methods of skeletal age estimation using a documented archaeological sample. *Canadian Society of Forensic Science*, 25: 97-118
- Brown, C. 2009. *Uncertainty in skeletal aging: a retrospective study and test of skeletal aging methods at the joint POW/MIA Accounting Command Central Identification Laboratory*. Master Dissertation in Anthropology, California State University.
- Buckberry, J.; Chamberlain, A. 2002. Age estimation from the auricular surface of the ilium: a revised method. *American Journal of Physical Anthropology*, 119(3): 231-239.
- Buikstra, J.; Ubelaker D. 1994. *Standards for data collection from human skeletal remains*. Fayetteville, Arkansas Archeological Survey.
- Byers, S. 2010. *Introduction to Forensic Anthropology*. Upper Saddle River, Pearson Education.
- Camariere, R.; Cunha, E.; Sassaroli, E.; Nuzzolese, E.; Ferrante, L. 2009. Age estimation by pulp/tooth area ratio in canines: study of a Portuguese sample to test Cameriere's method. *Forensic Science International*, 193(1-3): 128.e1 – 128.e6.
- Cannet, C.; Baraybar, J.; Kolopp, M.; Meyer, P.; Ludes, B. 2011. Histomorphometric estimation of age in paraffin-embedded ribs: a feasibility study. *International Journal of Legal Medicine*, 125(4): 493-502.
- Cardoso, H. 2006a. Brief Communication: The collection of identified human skeletons housed at the Bocage museum (national museum of natural history), Lisbon, Portugal. *American Journal of Physical Anthropology*, 129(2): 173-176.
- Cardoso, H. 2006b. Elementos para a história da Antropologia Biológica em Portugal: o contributo do Museu Bocage (Museu Nacional de História Natural, Lisboa). *Trabalhos de Antropologia e Etnologia*, 46: 47-66.
- Castillo, R.; Ubelaker, D.; Djorojevic, M. 2011. Age estimation through histological study of trabecular volume and cortical bone width of the iliac crest. *Science and Justice*, 52(3): 177-180.
- Cattaneo, C. 2007. Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. *Forensic Science International*, 165(2-3):185-193.
- Cattaneo, C. 2009. Anthropology: Age determination of remains. In: Jamieson, A.; Moenssens, A. (eds.). *Wiley Encyclopedia of Forensic Science*. West Sussex, John Wiley & Sons Ltd: 179-187.
- 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 Science International*, 102(2-3): 181-191.
- Cattaneo, C.; Porta, D.; Gibelli, D.; Gamba, C. 2009. Histological determination of the human origin of bone fragments. *Journal of Forensic Sciences*, 54(3): 531-533.
- Chan, A.; Crowder, C.; Rogers, T. 2007. Variation in cortical bone histology within the human femur and its impact on estimating age at death. *American Journal of Physical Anthropology*, 132(1): 80-88.
- Cho, H. 2012. The histology laboratory and principles of microscope instrumentation. In: Crowder, C.; Stout, S. (eds.). *Bone Histology. An anthropological perspective*. Boca Raton, CRC Press: 341-360.
- Cho, H.; Stout, S.; Bishop, T. 2006. Cortical bone remodeling rates in a sample of African American and European American descent groups from the American midwest: comparisons of age and sex in ribs. *American Journal of Physical Anthropology*, 130(2): 214-226.

- Cho, H.; Stout, S.; Madsen, R.; Streeter, M. 2002. Population-specific histological age-estimating method: a model for known African-American and European-American skeletal remains. *Journal of Forensic Sciences*, 47(1): 12-18.
- Colleyn, J. 2008. *Elementos de Antropologia Social e Cultural*. Lisboa, Edições 70.
- Cox, M.; Mays, S. 2000. *Human osteology in archaeology and forensic science*. London, Greenwich Medical Media.
- Crews, D. 2007. Senescence, aging, and disease. *Journal of Physiological Anthropology*, 26(3): 365–372.
- Crews, D.; Bogin, B. 2010. Growth, development, senescence, and aging: A life history perspective. In: Larsen, C. S. (ed.). *A Companion to Biological Anthropology*. West Sussex, John Wiley & Sons Ltd: 124-152.
- Crowder, C. 2011. Histological age estimation. In: Blau, S.; Ubelaker, D. (eds.). *Handbook of forensic anthropology and archaeology*. Walnut Creek, Left Coast Press: 222-235.
- Crowder, C.; Pfeiffer, S. 2010. The application of cortical bone histomorphometry to estimate age at death. In: Latham, K.; Finnegan, M. (eds.). *Age estimation of the human skeleton*. Springfield, Charles C Thomas Publisher, Ltd: 193-217.
- Crowder, C.; Rosella, L. 2007. Assessment of intra- and intercostal variation in rib histomorphometry: its impact on evidentiary examination. *Journal Forensic Sciences*, 52(2): 271-276.
- Culham, E.; Peat, M. 1993. Functional anatomy of the shoulder complex. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 18(1): 342-350.
- Cullinane, D.; Einhorn, T. 2002. Biomechanics of bone. In: Bilezikian, J.; Raisz, L.; Rodan, G. (eds.). *Principles of bone biology*. Amsterdam, Elsevier Inc.: 17-32.
- Cunha, A.; Antunes-Ferreira, N. 2008. *Antropologia Forense*. Lisboa, Quid Juris – Sociedade Editora.
- Cunha, E. 1996. Viajar no tempo através dos ossos. A investigação paleobiológica. *All-madan*, 2(5): 131-135.
- Cunha, E. 2008. Contribución para el conocimiento del desarrollo actual de la Antropología Forense en Portugal. *Cuadernos de Medicina Forense*, 14(53-54): 201-211.
- Cunha, E. 2010. *Como nos tornámos humanos*. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Cunha, E.; Baccino, E.; Martrille, L.; Ramsthaler, F.; Prieto, J.; Schuliar, Y.; Lynnerup, N.; Cattaneo, C. 2009. The problem of aging human remains and living individuals: a review. *Forensic Science International*, 193(1-3): 1-13.
- Cunha, E.; Cattaneo, C. 2006. Forensic Anthropology and Forensic Pathology: the state of the art. In: Schnitt, A; Cunha, E.; Pinheiro, J. (eds.). *Forensic anthropology and medicine*. Totowa, Human Press: 39-55.
- Cunha, E.; Mendonça, M. 2002. Anthropologie médico-légale: contribution de la paléopathologie à un cas des Açores. In: *Temas de Medicina Legal II*. Centro de Estudos de Pós-Graduação em Medicina Legal, Coimbra: 121-126.
- Cunha, E.; Pinheiro J. 2007. Forensic Anthropology in Portugal: from current practice to future challenges In: Brickley, M. B.; Ferllini, R. (eds.). *Forensic Anthropology: case studies from Europe*. Springfield, Charles C. Thomas Pub 38-57.

- Cunha, E.; Wasterlain, S. 2007. The Coimbra identified osteological collections. In: Grupe, G.; Peters, J. (eds.). *Skeletal series and their socio-economic context. Documenta Archaeobiologiae* 5, Verlag Marie Leidorf GmbH: Rahden/Westf.: 23-33.
- Cunha, X. A.; Morais, M. 1961. Estudo antropológico da clavícula dos Portugueses. *Contribuições para o Estudo da Antropologia Portuguesa*, 7(5): 65-120.
- Curate, J. 2010. *O perímetro do declínio. Osteoporose e fracturas de fragilidade em três amostras osteológicas identificadas portuguesas – séculos XIX & XX*. Dissertação de Doutoramento em Antropologia Biológica, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra.
- De Angelis, D.; Poppa, P. 2006. Identification of the living on vídeo surveillance systems: a novel approach. *Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences*, 12: 317.
- Dedouit, F.; Bindel, S.; Gainza, D.; Blanc, A.; Joffre, F.; Rougé, D.; Telmon, N. 2008. Application of the Iscan method to two- and three-dimensional imaging of the sternal end of the right fourth rib. *Journal of Forensic Sciences*, 53(2): 288-295.
- Dirkmaat, D.; Cabo, L.; Ousley, S.; Symes, S. 2008. New perspectives in forensic anthropology. *American Journal of Physical Anthropology*, 137(S47): 33-52.
- Dorandeu, A.; Grandmaison, G.; Coulibaly, B.; Durogon, M.; Piercecchi-Marti, M.; Baccino, E.; Leonetti, G. 2009. Value of histological study in the fronto-sphenoidal suture for age estimation at the time of death. *Forensic Science International*, 191(1-3): 64-69.
- Drake, R.; Vogl, W.; Mitchell, A. 2006. *Gray's – Anatomia para estudantes*. Rio de Janeiro, Elsevier Inc.
- Duday, H. 2006. Archaeoethanatology or the archaeology of death. In: Gowland, R.; Knüssel, C. (eds.). *Social Archaeology of funerary remains*. Oxford, Oxbow Books: 30-56.
- Emerton, K.; Hu, B.; Woo, A.; Sinofsky, A.; Hernandez, C.; Majeska, R.; Jepsen, K.; Schaffler, M. 2010. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone*, 46(3): 577-583.
- Ericksen, M. 1991. Histological estimation of age at death using the anterior cortex of the femur. *American Journal of Physical Anthropology*, 84(2): 171-179.
- Everts, V.; Delaisse, J.; Korper, W.; Jansen, D.; Tigchelaar-Gutter, W.; Saftig, P.; Beertsen, W. 2002. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(1): 77-90.
- Faria, F.; Andrade, M.; Cardoso, H. 2010. Estimating age at death in adults from degenerative changes in the sternal end of the clavicle – Preliminary results using a Bayesian approach. In: Viera, D.; Wsack, A.; Beth, P. (eds.). *Acta Medicinae Legalis et Socialis*. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra/ International Academy of Legal Medicine: 39-43.
- Feik, S.; Thomas, C.; Bruns, R.; Clement, J. 2000. Regional variations in cortical modeling in the femoral mid-shaft: sex and age differences. *American Journal of Physical Anthropology*, 112(2): 191-205.
- Fenton, T.; Birkly, W.; Cornelison, J. 2003. A fast and safe non-bleaching method for forensic skeletal preparation. *Journal of Forensic Sciences*, 48(1): 1-3.
- Fink, S. 1986. A new integrated concept for the improved preparation of sections of fresh or frozen tissue for light microscope histochemistry. *Histochemistry*, 86(1): 43-52.

- Forwood, M.; Turner, C. 1995. Skeletal adaptations to mechanical usage: results from tibial loading studies in rats. *Bone*, 17(Sup 4): 197S-205S.
- Franklin, D. 2010. Forensic age estimation in human skeletal remains: current concepts and future directions. *Legal Medicine*, 12(1): 1-7.
- Frost, H. 1996. Perspectives: a proposed general model of the “mechanostat” (suggestions from a new skeletal-biologic paradigm). *The Anatomical Record*, 244(2): 139-147.
- Frost, H. 1998a. Changing concepts in skeletal physiology: Wolff’s law, the mechanostat, and the “Utah Paradigm”. *American Journal of Human Biology*, 10(5): 599-605.
- Frost, H. 1998b. From Wolff’s law to the mechanostat: a new “face” of physiology. *Journal of Orthopaedic Science*, 3(5): 282-286.
- Frost, H. 2000. The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organ. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 18(6):305-316.
- Frost, H. 2003. Bone’s mechanostat: a 2003 update. *The Anatomical Record*, 275(A): 1081-1101.
- Gan, J. 2005. *Characterisation of bone defect models in immunodeficient animals*. Doctoral dissertation, University of New South Wales.
- Gartner, L.; Hiatt, J. 2007. *Color textbook of histology*. Amsterdam, Elsevier Academic Press.
- Garvin, H.; Passalacqua, N. 2012. Current practices by forensic anthropologists in adult skeletal age estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 57(2): 427-433.
- Garvin, H.; Passalacqua, N.; Uhl, N.; Gipson, D.; Overbury, R.; Cabo, L. 2012. Developments in forensic anthropology: age-at-death estimation. In: Dirkmaat, D. (ed.). *A Companion to Forensic Anthropology*. West Sussex, John Wiley & Sons, Ltd.: 202-223
- Goldstein, S. A. 1987. The mechanical properties of trabecular bone: dependence on anatomic location and function. *Journal of Biomechanics*, 20(11-12): 1055-1061.
- Gonçalves, C.; Bairros, V. 2010. *Histologia, texto e imagens*. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Gosman, J.; Stout, S. 2010. Current concepts in bone biology. In: Larsen, C S. (ed.). *A companion to Biological Anthropology*. West Sussex, Wiley & Sons Ltd, Pub.: 465-484.
- Grynblas, M. 1993. Age and disease-related changes in the mineral of bone. *Calcified Tissue International*, 53 (Suppl 1): S57-S64.
- Hall, B. 2005. *Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology*. Amsterdam, Elsevier Academic Press.
- Han, S.; Kim, S.; Ahn, Y.; Huh, G.; Kwan, D.; Park, D.; Lee, U.; Kim, Y. 2009. Microscopic age estimation from the anterior cortex of the femur in Korean adults. *Journal of Forensic Sciences*, 54(3): 519-522.
- Hartnett, K. 2010. Analysis of age-at-death estimation using data from a new, modern autopsy sample - Part I: pubic bone. *Journal of Forensic Sciences*, 55(5): 1145-1151.
- Henning, C.; Cooper, D. 2011. Brief communication: the relation between standard error of the estimate and sample size of histomorphometric aging methods. *American Journal of Physical Anthropology*, 145(4): 658-664.

- Hens, S.; Belcastro, M. 2012. Auricular surface aging: a blind test of the revised method on historic Italians from Sardinia. *Forensic Science International*, 214(1-3): 209e.1-209.e5.
- Hillson, S. 2000. *Dental anthropology*. Cambridge, Cambridge University Press.
- <http://aafs.org/physical-anthropology> [Acedido em 08-12-2011].
- Ingraham, M. 2004. *Histological age estimation of the midshaft clavicle using a new digital technique*. Thesis prepared for the Degree of Master of Science, University of North Texas.
- Introna, F.; Campobasso, C. 2006. Biological vs legal age of living individuals. In: Schnitt, A; Cunha, E.; Pinheiro, J. (eds.). *Forensic anthropology and medicine*. Totowa, Human Press: 57-80.
- Iscan, M. 1989. *Age markers in the human skeleton*. Springfield, Charles C. Thomas Inc.
- Iscan, M.; Loth, S. 1986. Determination of age from the sternal rib in white females: a test of phase method. *Journal of Forensic Science*, 31(1): 990-999.
- Iwaniec, U.; Crenshaw, T.; Schoeninger, M.; Stout, S.; Ericksen, M. 1998. Methods for improving the efficiency of estimating total osteon density in the human anterior mid-diaphyseal femur. *American Journal of Physical Anthropology*, 107(1): 13-24.
- Jangjetriew, B.; Thamtakerngkit, S.; Wongchanapai, W.; Sangvichien, S. 2007. Cranial suture closure and age determination in the Thai population. *Siriraj Medical Journal*, 56(5): 226-231.
- Jee, W. 2001. Integrated bone tissue physiology: anatomy and physiology. In: Cowin, S. (ed.). *Bone Mechanics Handbook*. Boca Raton, CRC Press LLC: 1-1 – 1-68.
- Jo, S.; Kim Y. 2011. Histomorphometric assessment of bilaterality from the cadaveric femurs: implications for guidance of field practice for anthropological age estimation. *Anthropologist*, 13(1): 21-25.
- Junqueira, L.; Carneiro, J. 2008. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A.
- Kawamoto, T.; Shimizu, M. 2000. A method for preparing 2- to 50-µm-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochemistry and Cell Biology*, 113(5): 331-339.
- Kemkes-Grottenthaler, A. 2001. The reliability of forensic osteology - a case in point. Case study. *Forensic Science International*, 117(1-2): 65-71.
- Keough, N; L'Abbé, E.; Steyn, M. 2009. The evaluation of age-related histomorphometric variables in a cadaver sample of lower socioeconomic status: implications for estimating age at death. *Forensic Science International*, 191(1-3): 114.e1-114.e6.
- Kerley, E. 1965. The microscope determination of age in human bone. *American Journal of Physical Anthropology*, 23(2): 149-164.
- Kerley, E.; Ubelaker, D. 1978. Revisions in the microscopic method of estimating age at death in human cortical bone. *American Journal of Physical Anthropology*, 49(4): 545-546.
- Kim, Y.; Kho, H.; Lee, K. 2000. Age estimation by occlusal tooth wear. *Journal of Forensic Sciences*, 45(2): 303-309.
- Kim, Y.; Kim, D.; Park, D.; Lee, J.; Chung, N.; Lee, W.; Han, S. 2007. Assessment of histomorphological features of the sternal end of the fourth rib for age estimation in Koreans. *Journal of Forensic Sciences*, 52(6): 1237-1242.

- Klepinger, L. 2006. *Fundamentals of forensic anthropology*. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.
- Knudson, K.; Stojanowski, C. 2008. New directions in bioarchaeology: Recent contributions to the study of human social identities. *Journal of Archaeological Research*, 16(4): 397-432.
- Koester, K.; Barth, H.; Ritchie, R. 2011. Effect of aging on the transverse toughness of human cortical bone: evaluation by R-curves. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7): 1504-1513.
- Komar, D.; Buikstra, J. 2008. *Forensic Anthropology. Contemporary theory and practice*. New York, Oxford University Press.
- Konisberg, L.; Hermann, N.; Wescott, D.; Kimmerle, E. 2008. Estimation and evidence in Forensic Anthropology: age-at-death. *Journal of Forensic Sciences*, 53(3): 541-557.
- Kranioti, E.; Paine, R. 2011. Forensic Anthropology in Europe: an assessment of current status and application. *Journal of Anthropological Sciences*, 89:71-92.
- Krogman, W.; Iscan, Y. 1986. *The human skeleton in Forensic Medicine*. Springfield, Charles C. Thomas Publisher.
- Lacey, D.; Timms, E.; Tan, H.; Kelley, M.; Dunstan, C.; Burgess, T.; Elliot, R.; Colombero, A.; Elliot, G.; Scully, S.; Hsu, H.; Sullivan, J.; Hawkins, N.; Davy, E.; Capparelli, C.; Eli, A., Qian, Y.; Kaufman, S.; Sarosi, I.; Shalhoub, V.; Senaldi, G.; Guo, J.; Delaney, J.; Boyle, W. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2): 165-176.
- Langley-Shirley, N.; Jantz, R. 2010. A Bayesian approach to age estimation in modern Americans from the clavicle. *Journal of Forensic Sciences*, 55(3): 571-583.
- Lee, E.; Luedtke, J.; Allison, J.; Arber, C.; Merriwether, D.; Steadman, D. 2010. The effects of different maceration techniques on nuclear DNA amplification using human bone. *Journal of Forensic Sciences*, 55(4): 1032-1038.
- Littleton, J.; Kinaston, R. 2008. Ancestry, age, sex, and stature: identification in a diverse space. In: Oxenham, M. (ed.). *Forensic Approach to death, disaster and abuse*. Bowen Hills, Australian Academic Press: 155-176.
- Lovejoy, C.; Meindl, R.; Pryzbeck, T.; Mensforth, R. 1985. Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium: a new method for determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1): 15-28.
- Lynnerup, N.; Frohlich, B.; Thomsen, J. 2006. Assessment of age at death by microscopy: unbiased quantification of secondary osteons in femoral cross sections. *Forensic Science International*, 159(Suppl 1): S100-S103
- Lynnerup, N.; Jørgen, T.; Frohlich, B. 1998. Intra- and inter-observer variation in histological criteria used in age at death determination based on femoral cortical bone. *Forensic Science International*, 91(3): 210-230.
- Maat, G.; Maes, A.; Aarents, M.; Nagelkerke, N. 2006a. Histological age prediction from the femur in a contemporary Dutch sample. The decrease of nonremodeled bone in the anterior cortex. *Journal of Forensic Sciences*, 51(2): 230-237.
- Maat, G.; Aarents, M.; Nagelkerke, N. 2005. Age prediction from bone replacement: remodeling of circumferential lamellar bone tissue in the anterior cortex of the femoral shaft of the present Dutch population. *Baerge's Anthropologica*, 10: 1-44.

- Maat, G.; Van Den Boss, R.; Aarents, M. 2001. Manual preparation of ground sections for the microscopy of natural bone tissue: update and modification of Frost's "Rapid Manual Method". *International Journal of Osteoarchaeology*, 11(5): 366-374.
- Maat, G.; Van Den Boss, R.; Aarents, M. 2006. Manual of preparation of ground sections for the microscopy of natural bone tissue. *Baeger's Anthropologica*, 7: 1-18.
- Mann, R.; Berryman, H. 2012. A method for defleshing human remains using household bleach. *Journal of Forensic Sciences*, 57(2): 440-442.
- Manolagas, S.; Parfitt, A. 2010. What old means to bone. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(6): 369-374.
- Marks, S.; Odgren, P. 2002. Structure and development of the skeleton. In: Bilezikian, J.; Raisz, L.; Rodan, G. (eds.). *Principles of bone biology*. Amsterdam, Elsevier Inc.: 3-15.
- Marrafa, L. 1992. *Métodos de determinação da idade à morte. Monografia de investigação em Ciências Humanas*, Departamento de Antropologia, Universidade de Coimbra.
- Martin, R. 2000. Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone*, 26(1): 1-6.
- Martins, R.; Oliveira, P.; Schmitt, A. 2012. Estimation of age at death from the pubic symphysis and the auricular surface of the ilium using a smoothing procedure. *Forensic Science International*, 219(1-3): 287.e1-287.e2
- Matos, O. 2007. *Estudo dos efeitos induzidos por um protocolo utilizando exercícios físicos específicos, na densidade mineral óssea, em mulheres portadoras de osteopenia ou osteoporose pós-menopáusia*. Dissertação de Doutoramento em Ciências do Desporto, Faculdade de Desporto, Universidade do Porto.
- Mays, S. 1998. *The archaeology of human bones*. London, Routledge.
- Mazur, E.; Cohen, J. 1989. Basic concepts of hematopoiesis and the hematopoietic growth factors. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 46(3): 250-256.
- Mckern, T.; Stewart, T. 1957. *Skeletal age changes in young American males*. Technical Report, Headquarters Quartermaster Research & Development Command.
- Medina, J. 1996. *The clock of ages: why we age-how we age-winding back the clock*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Meindl, R.; Lovejoy, C. 1985. Ectocranial suture closure: a revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral-anterior sutures. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1): 57-66.
- Meindl, R.; Lovejoy, C.; Mensforth, R.; Walker, R. 1985. A revised method of age determination using the Os Pubis, with a review and tests of accuracy of other current methods of pubic symphyseal aging. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1): 29-45.
- Mescher, A. 2010. *Junqueira's basic histology. Text and atlas*. Columbus, McGraw-Hill Companies, Inc.
- Mulhern, D.; Jones, E. 2004. Test of revised method of age estimation from the auricular surface of the ilium. *American Journal of Physical Anthropology* 126(1):61-65.
- Murray, K.; Murray, T. 1991. A Test of the auricular surface aging technique. *Journal Forensic Sciences*, 36(4): 1162-1169.

- Nawrocki, S. 1998. Regression formulae for estimating age at death from cranial suture closure. In: Reichs K. (eds.). *Forensic Osteology*. Springfield, Charles C Thomas Publisher Ltd.: 276-292.
- Nawrocki, S. 2010. The nature and sources of error in the estimation of age at death from the skeleton. In: Latham, K.; Finnegan, M. (eds.). *Age estimation of the human skeleton*. Springfield, Charles C Thomas Publisher, Ltd.: 79-101.
- Noble, B.; Reeve, J. 2000. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 159(1-2): 7-13.
- Ortner, D. J. 1975. Aging effects on osteon remodeling. *Calcified Tissue International*, 18(1): 27-36.
- Ortner, D.; Turner-Walker, G. 2003. The biology of skeletal tissues. In: Ortner, D. J. (ed.). *Identification of pathological condition in human skeletal remains*. San Diego, Academic Press Inc.: 11-35.
- Paine, R.; Brenton, B. 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.
- Parfitt, A. 2003. New concepts of bone remodeling: a unified spatial and temporal model with physiologic and pathophysiologic implications. In: Agarwal, S.; Stout, S. (eds.). *Bone loss and osteoporosis: an anthropological perspective*. New York, Plenum Publishers: 3-17.
- Parfitt, A.; Drezner, M.; Glorieux, F.; Kanis, J.; Malluchie, H.; Meunier, P.; Ott, S.; Recker, R. 1987. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2(6): 595-610.
- Pasquier, E.; Pernot, L.; Burdin, V.; Mounayer, C.; Le Rest, C.; Colin, D.; Mottier, D.; Roux, C.; Baccino, E. 1999. Determination of age at death: assessment of an algorithm of age prediction using numerical three-dimensional CT data from pubic bones. *American Journal of Physical Anthropology*, 108(3): 261-268.
- Pfeiffer, S.; Pinto, D. 2012. Histological analyses of human bone from archaeological context. In: Crowder, C.; Stout, S. (eds.). *Bone histology. An anthropological perspective*. Boca Raton, CRC Press: 297-312.
- Pickering, R.; Bachman, D. 2009. *The use of Forensic Anthropology*. Boca Raton, CRC Press.
- Pinheiro, J. 2006. Introduction to forensic medicine and pathology. In: Schmitt, A.; Cunha, E.; Pinheiro, J. (eds.). *Forensic Anthropology and Medicine*. Totowa, Humana Press: 13-37.
- Pinheiro, J.; Cunha, E.; Cordeiro, C.; Vieira, D. 2004. Bridging the gap between forensic anthropology and osteoarchaeology: a case of vascular pathology. *International Journal Osteoarchaeology*, 14(2): 137-144.
- Purves, S.; Woodley, L.; Hackman, L. 2011. Age determination in the adult. In: Black, S.; Ferguson, E. (eds.). *Forensic Anthropology. 2000 to 2010*. Boca Raton, CRC Press: 29-60.
- Quintais, L. 2009. *O Essencial sobre Cultura e Cognição*. Coimbra, Angelus Novus.
- Reichs, K. 1998. Forensic Anthropology: a decade of progress. In: Reichs, K. (ed.). *Forensic Osteology*. Springfield, Charles C. Thomas Pub: 13-35.
- Ritz-Timme, S.; Cattaneo, C.; Collins, M.; Waite, E.; Schutz, H.; Kaatsch, H.; Borrman, H. 2000. Age estimation: the state of art in relation to the specific demands of forensic practice. *International Journal of Legal Medicine*, 113(3): 129-136.

- Robling, A.; Stout, S. 2008. Histomorphometry of human cortical bone: applications to age estimation. In: Katzenberg, M.; Saunders, S. (eds.). *Biological Anthropology of the human skeleton*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Rocha, M. 1985. Antropologia Criminal. In: *Cem anos de Antropologia em Coimbra, 1895-1995*. Coimbra, Museu e Laboratório Antropológico: 83-107.
- Rodan, G.; Martin, T. 1981. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - A hypothesis. *Calcified Tissue International*, 33(4): 349-351.
- Rösing, F.; Graw, M.; Marré, B.; Ritz-Timme, S.; Rothschild, M.; Rotzcher, K.; Schemeling, A.; Schroder, I.; Geserick, G. 2007. Recommendations for the forensic diagnosis of sex and age from skeletons. *HOMO – Journal of Comparative Human Biology*, 58(1): 75-89.
- Ross, M. H.; Pawlina, W. 2011. *Histology: A text and atlas*. Riverwoods, Lippincott Williams Wilkins.
- Rougé-Maillart, C.; Vielle, B.; Jousset, N.; Chappard, D.; Telmon, N.; Cunha, E. 2009. Development of a method to estimate skeletal age at death in adults using the acetabulum and the auricular surface on a Portuguese population. *Forensic Science International*, 188(1-3): 91-95.
- Santos, A. 2000. *A skeletal picture of tuberculosis. Macroscopic, radiological, biomolecular, and historical evidence from the Coimbra Identified Skeletal Collection*. Dissertação de Doutoramento em Antropologia, Departamento de Antropologia, Universidade de Coimbra.
- Santos, A. 1995. *Certezas e incertezas sobre a idade à morte*. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Trabalho de Síntese, Departamento de Antropologia, Universidade de Coimbra.
- Santos, G. 2005. *A escola de Antropologia de Coimbra 1885-1950*. Lisboa, Imprensa de Ciências Sociais.
- Scheuer, L. 2002. Application of osteology to Forensic Medicine. *Clinical Anatomy*, 15(4): 297-312.
- Scheuer, L.; Black, S. 2000. *Developmental Juvenile Osteology*. Amsterdam, Elsevier INC.
- Scheuer, L.; Black, S. 2007. Identification from the hard tissues – Osteology. In: Thompson, T.; Black, S. (eds.). *Forensic Human Identification. An introduction*. Boca Raton, CRC Press: 199-220.
- Schmitt, A. 2008. *Variabilite de la senescence du squelette humain reflexions sur les indicateurs de l'age au deces : a la recherche d'un outil performant*. These Doctorale, Universite Bordeaux.
- Schwartz, J. 1993. *What bones tell us*. Tuscon, The University of Arizona Press.
- Seeman, E. 2008. Modeling and remodeling the cellular machinery responsible for the gain and loss of bone's material and structural strength. In: Bilezikian, J.; Raisz, L.; Martin, T. (eds.). *Principles of Bone Biology*. Maryland Heights, Academic Press Inc.: 3-28.
- Skinner, R. 2003. Decalcification of bone tissue. In: An, Y.; Martin, K. (eds.). *Handbokk of histology methods for bone and cartilage*. Totowa, Humana Press Inc.: 167-184.
- Simmons, D. 1985. Options for bone aging with the microscope. *Yearbook of Physical Anthropology*, 28(S6): 249-263.
- Simmons, T.; Haglund, W. 2005. Anthropology in a forensic context. In: Hunter, J.; Cox, M. (eds.). *Forensic Archaeology: advances in theory and practice*. London, Routledge Taylor & Francis Group: 159-176.

- Singh, I.; Gunberg, D. 1970. Estimation of age at death in human males from quantitative histology of bone fragments. *American Journal of Physical Anthropology*, 33(3): 373-382.
- Snow, C. 1982. Forensic Anthropology. *Annual Review of Anthropology*, 11: 97-131.
- Soares, J. 2008. Prefácio. In: Cunha, A.; Antunes-Ferreira, N. (eds.). *Antropologia Forense*. Lisboa, Quid Juris Sociedade Editora: 5-6.
- Sousa, J. 2003. *Medicina Forense em Portugal, contributo para o estudo da criminalidade em Coimbra (1899-1917)*. Coimbra, Mar da Palavra.
- Spatola, B.; Damann, F.; Ragsdale, B. 2012. Bone histology collections of the National Museum of Health and Medicine. In: Crowder, C.; Stout, S. (eds.). *Bone histology. An anthropological perspective*. Boca Raton, CRC Press: 313-326.
- Stanford, C.; Allen, J.; Anton, S. 2006. *Biological anthropology: The natural history of humankind*. New Jersey, Pearson Prentice Hall.
- Stewart, T. D. 1979. *Essentials of Forensic Anthropology: especially as developed in the United States*. Springfield, Charles C. Thomas Pub.
- Stout, S. 1998. The application of histological techniques for age at death determination. In: Reichs, K. (ed.) *Forensic Osteology*. Springfield, Charles C. Thomas Pub.: 237-252.
- Stout, S.; Crowder, C. 2012. Bone remodeling, histomorphology, and histomorphometry. In: Crowder, C.; Stout, S. (eds.). *Bone histology. An anthropological perspective*. Boca Raton, CRC Press: 1-22.
- Stout, S.; Paine, R. 1992. Brief communication: histological age estimation using rib and clavicle. *American Journal of Physical Anthropology*, 87(1): 111-115.
- Stout, S.; Porro, M.; Perotti, B. 1996. Brief communication: a test and correction of the clavicle method of Stout and Paine for histological age estimation of skeletal remains. *American Journal of Physical Anthropology*, 100(1): 139-142.
- Decreto-Lei n.º 274/99. DR 62/99 Série I de 1999-03-15.
- Streeter, M. 2012. Histological age-at-death determination. In: Crowder, C.; Stout, S. (eds.). *Bone histology. An anthropological perspective*. Boca Raton, CRC Press: 135-152.
- Tamagnini, E.; Serra, J. 1942. *Subsídios para a história da Antropologia portuguesa*. Memória apresentada ao Congresso de Actividade Científica Portuguesa (Coimbra 1940). Coimbra.
- Thomas, C.; Clement, J. 2012. The Melbourne Femur Collection: how a forensic and anthropological collection came to have broader applications. In: Crowder, C.; Stout, S. (eds.). *Bone histology. An anthropological perspective*. Boca Raton, CRC Press: 327-340.
- Thomas, C.; Feik, S.; Clement, J. 2005. Regional variation of intracortical porosity in the midshaft of the human femur: age and sex differences. *Journal of Anatomy*, 206(2): 115-125.
- Thomas, C.; Stein, M.; Feik, S.; Wark, J.; Clement, J. 2000. Determination of age at death using combined morphology and histology of the femur, *Journal of Anatomy*, 196(Pt3): 463-471.
- Turner-Walker, G.; Mays, S. 2008. Histological studies on ancient bone. In: Mays, S.; Pinhasi, R. (eds.). *Advances in human Paleopathology*. Hoboken, John Wiley & Sons: 121-146.
- Ubelaker, D. 1996. *Human skeletal remains*. Washington, Taraxacum.

- Ubelaker, D. 1998. The evolving role of the microscope in Forensic Anthropology. *In: Reichs, K. (ed.). Forensic Osteology*. Springfield, Charles C. Thomas Pub: 514-531.
- Ubelaker, D. 2005. Estimating age at death. *In: Rich, J.; Dean, D.; Powers, R. (eds.). Forensic Medicine of the lower extremity: human identification and trauma analysis of the thigh, leg, and foot*. Totowa, The Humana Press Inc.: 99-111.
- Ubelaker, D. 2006. Introduction to Forensic Anthropology. *In: Schmitt, A.; Cunha, E.; Pinheiro, J. (eds.). Forensic Anthropology and Medicine*. Totowa, Humana Press: 3-12.
- Ubelaker, D. 2008. Forensic anthropology: methodology and diversity of application. *In: Katzenberg, M.; Saunders, S. (eds.). Biological Anthropology of the human skeleton*. New York, John Wiley & Sons, Inc: 41-70.
- Ubelaker, D. 2010a. A history of methodology in the estimation of age at death from the skeleton. *In: Latham, K. E.; Finnegan, M. (eds.). Age estimation of the human skeleton*. Springfield, Charles C Thomas Publisher, Ltd: xvii-xxv.
- Ubelaker, D. 2010b. Recent advances in Forensic Anthropology. *In: Vieria, D.; Wsack, A.; Beth, P. (eds.). Acta Medicinae Legalis et Socialis*. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra/ International Academy of Legal Medicine: 29-32.
- Väänänen, H.; Zhao, H.; Mulari, M.; Halleen J. 2000. The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*, 113(3): 377-381.
- Van Wylsberghe, D.; Noback, C.; Carola, R. 1995. *Human anatomy and physiology*. Boston, McGraw-Hill.
- Villa, C.; Lynnerup, N. 2010. Technical note: a stereological analysis of the cross-sectional variability of the femoral osteon population. *American Journal of Physical Anthropology*, 142(3): 491-486.
- Voisin, J. 2006. Clavicle, a neglected bone: morphology and relation to arm movements and shoulder architecture in Primates. *The Anatomical Record Part A*, 288(9): 944-953.
- Waldron, T. 2009. *Paleopathology*. Cambridge, Cambridge University Press
- Wallin, J., Tkocz, I.; Kristensen, G. 1994. Microscopic age determination of human skeletons including an unknown but calculable variable. *International Journal of Osteoarchaeology*, 4(4): 353-362.
- Walsh, W.; Walton, M.; Bruce, W.; Yu, Y.; Gillies, R.; Svehla, M. 2003. Cell structure and biology of bone and cartilage. *In: An, Y.; Martin, K. (eds.). Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Totowa, Humana Press Inc.: 35-58.
- Wasterlain, R. 2000. *Morphé : análise das proporções entre os membros, dimorfismo sexual e estatura de uma amostra da coleção de esqueletos identificados do Museu Antropológico da Universidade de Coimbra*. Dissertação de Mestrado em Evolução Humana, Departamento de Antropologia, Universidade de Coimbra.
- Wasterlain, R. 2006. *Males' da boca : estudo da patologia oral numa amostra das coleções osteológicas identificadas do Museu Antropológico da Universidade de Coimbra : finais do séc. XIX inícios do séc. XX*. Dissertação de Doutoramento em Antropologia, Departamento de Antropologia, Unoversidade de Coimbra.
- White, T.; Black, M.; Folkens, P. 2012. *Human osteology*. Amsterdam, Elsevier INC.
- Wickens, A. 1998. *The causes of aging*. Amsterdam, Harwood Academic Publishers.

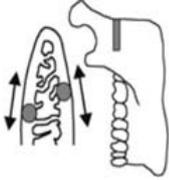
- Xing, L.; Boyce, B. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research and Therapy*, 9(I): SI.
- Yasuda, H.; Shima, N.; Nakagawa, N.; Mochizuki, S.; Yano, K.; Fujise, N.; Sato, Y.; Goto, M.; Yamaguchi, K.; Kuriyama, M.; Kanno, T.; Murakami, A.; Tsuda, E.; Morinaga, T.; Higashio, K. 1998. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology*, 139(3): 1329-1337.
- Young, B.; Lowe, J.; Stevens, A.; Heath, J. 2006. *Weather's functional histology a text colour atlas*. Philadelphia, Elsevier Inc.
- Zambrano, C. 2000. *Evaluation of regression equations used to estimate age at death from cranial suture closure*. Master Dissertation in Human Biology, University of Indianapolis.



## **Apêndice A**

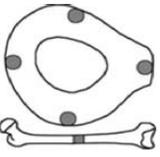
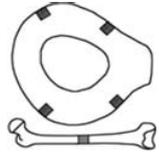


**Tabela A.1** - Síntese dos métodos histológicos para a determinação da idade à morte. Adaptado de Robling e Stout (2008: 175-182).

<b>Ossos</b>	<b>Método</b>	<b>Parâmetros amostrais:</b> Nº de Amostra (N) Intervalo Etário (IE) Sexo (S)	<b>Técnica de recolha da amostra</b>	<b>Variáveis analisadas</b>	<b>Comentários (Robling e Stout, 2008)</b>
Occipital	Cool <i>et al.</i> , 1995	N - 17 IE - 21-70 S - 17♂; 0♀		Volume parcial de: 1. Osteónios primários; 2. Osteónios secundários; 3. Fragmentos de osteónios secundários; 4. Osso lamelar não remodelado.	Os autores (Cool <i>et al.</i> , 1995) não recomendam o método devido à baixa correlação das variáveis com a idade.
2º Metacarpo	Kimura, 1992	N - 227 IE - 30-98 S - 114♂; 113♀		1. Densidade cortical óssea; 2. Espessura cortical; 3. Nº total de osteónios de fragmentos de osteónios; 4. Densidade populacional de osteónios.	Os autores (Kimura, 1992) encontraram melhores resultados com a divisão da amostra em 2 grupos (entre os 30-65 anos e entre os 66-98 anos).
Mandíbula	Singh e Gunberg, 1970	N - 52 IE - 39-87 S - 52♂; 0♀		1. Nº total de osteónios observados em 2 campos microscópicos; 2. Número médio de lamelas por osteónio; 3. Diâmetro médio dos canais de Havers.	Dos 3 ossos analisados, a mandíbula é a que produz melhores resultados. As secções ósseas foram produzidas tanto com base em osso descalcificado (33) e não descalcificado (19).
	Drusini e Businaro, 1990	N - 50 IE - 18-97 S - 32♂; 18♀		1. Número médio de osteónios secundários por mm²; 2. Número médio de fragmentos de osteónios secundários por mm².	O método de extração da amostra é semelhante ao de Singh e Gunberg (1970) mas apenas foram colhidas amostras não descalcificadas.

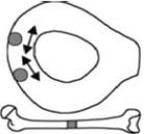
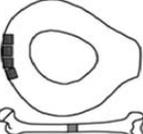
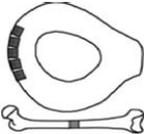
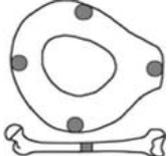
(Continua)



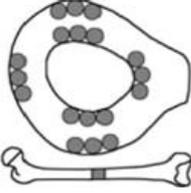
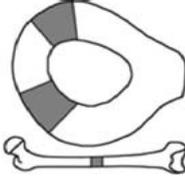
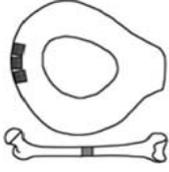
Osso	Método	Parâmetros amostrais:		Técnica de recolha da amostra	Variáveis analisadas	Comentários (Robling e Stout, 2008)
		Nº de Amostra (N)	Intervalo Etário (IE)			
Fíbula	Kerley, 1965 Kerley e Ubelaker, 1978 (revisão)	N - 25 IE - 0-83 S - 19♂; 5♀; 1?			Número de: 1. Osteónios intactos; 2. Fragmentos de osteónios; 3. Canais não Haversianos; 4. % de osso não remodelado num campo de 2,06 mm <sup>2</sup> .	Dos 3 ossos analisados por Kerley a fíbula é a que apresenta um melhor resultado.
Ulna	Thompson, 1979	N - 31 IE - ? * S - 114♂; 113♀	* Não há nenhum registo do intervalo etário apenas da média das idades - $\bar{x}$ = 68,8		19 variáveis analisadas. Consultar publicação original para uma descrição detalhada.	Técnica com destruição mínima do espécimen.
Fémur	Kerley, 1965 Kerley e Ubelaker, 1978 (revisão)	N - 67 IE - 0-95 S - 43♂; 17♀; 7?			Número de: 1. Osteónios intactos; 2. Fragmentos de osteónios; 3. Canais não Haversianos; 4. % de osso não remodelado num campo de 2,06 mm <sup>2</sup> .	É das técnicas mais utilizadas. Na opinião de Robling e Stout (2008) existe uma dificuldade em identificar consistentemente as microestruturas.
	Abqvist e Damisen, 1969	N - 20 IE - ? * S - ??♂; ??♀			% de osso remodelado em 1 mm <sup>2</sup> de um campo quadrado.	Tamanho da amostra necessário não é grande. A variável utilizada parece ser menos subjectiva na identificação das microestruturas (Bouvier e Ubelaker, 1977).

(Continua)



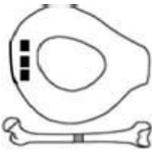
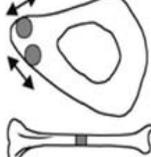
Osso	Método	Parâmetros amostrais: Nº de Amostra (N) Intervalo Etário (IE) Sexo (S)	Técnica de recolha da amostra	Variáveis analisadas	Comentários (Robling e Stout, 2008)
Singh e Gunberg, 1970	N - 33 IE - 39-87 S - 33♂; 0♀		1. Número total de osteónios em dois campos microscópicos; 2. Número médio de lamelas por osteónio 3. Canais não Haversianos; 4. Diâmetro médio dos canais de Havers.	Foram usadas secções descalcificadas. Os autores (Singh e Gunberg, 1970) realçam que os resultados para este osso são preliminares. Devido ao número reduzido da amostra e pelo facto de ter sido desenvolvido só em indivíduos masculinos.	
Thompson, 1979	N - 116 IE - 30-97 S - 64♂; 52♀		19 variáveis analisadas. Consultar publicação original para uma descrição detalhada.	Técnica com destruição mínima do espécimen.	
Ericksen, 1991	N - 328 IE - 14-97 S - 174♂; 154♀		Densidade de: 1. Osteónios; 2. Osteónios do tipo II; 3. Fragmentos; 4. Espaços de reabsorção; 5. Canais não Haversianos. 6. de Osso não remodelado; 7. Osteonal; 8. de Fragmentos.	Amostra bastante completa. A técnica de recolha é um compromisso positivo entre a destruição do original e o tamanho necessário à amostra.	
Fangwu, 1983	N - 35 IE - 5-86 S - 29♂; 6♀		Número de osteónios intactos, fragmentados e de canais não Haversianos e ainda a média da espessura da lamela circunferencial externa, num campo de 100x.	Os autores aplicam a análise de Kerley mas num contexto populacional diferente. As equações resultantes são mais exactas.	



Osso	Método	Parâmetros amostrais: Nº de Amostra (N) Intervalo Etário (IE) Sexo (S)	Técnica de recolha da amostra	Variáveis analisadas	Comentários (Robling e Stout, 2008)
	Hauser <i>et al.</i> , 1980	N - 96 IE - 21-87 S - ??♂; ??♀		1. Densidade populacional de osteónios; 2. Diâmetro mínimo médio dos canais de Havers; 3. % de superfície ocupada pelos canais de Havers.	Existem fórmulas separadas para a região subperiosteal e a região endocortical. As fórmulas endocorticais podem ser úteis sobretudo em contexto arqueológico.
	Cera e Drusini, 1985 Drusini, 1987 (Revisão)	N - 20 IE - 19-50 S - ??♂; ??♀;		Número de osteónios secundários por mm <sup>2</sup>	Amostra de tamanho reduzido. A porção de osso necessária para a realização da amostra é considerável.
Fémur	Samson e Branigan, 1987	N - 58 IE - 16-91 S - 31♂; 27♀		1. Nº de canais de Havers por mm <sup>2</sup> ; 2. Diâmetro médio dos canais de Havers; 3. Espessura cortical média (excluindo a linha áspera).	O método é potencialmente útil em ossos mal preservados. As equações para a estimativa das idades não são fornecidas, bem como o critério de seleção dos canais de Havers
	Narasaki, 1990	N - 52 IE - 43-98 S - 28♂; 24♀		1. Área osteonal intacta; 2. Área e densidade dos osteónios; secundários;	Este estudo aplica 6 das 19 variáveis analisadas por Thompson (1979), mais duas novas medidas.

(Continua)



Osso	Método	Parâmetros amostrais: Nº de Amostra (N) Intervalo Etário (IE) Sexo (S)	Técnica de recolha da amostra	Variáveis analisadas	Comentários (Robling e Stout, 2008)
Fémur	Watanabe, 1998	N - 93 IE - 20-92 S - 72♂; 26♀		1. Perímetro dos osteónios; 2. Largura dos canais de Havers; 3. Nº de fragmentos de osteónios.	Vários autores (Stout e Gehlert, 1980; Cera e Drusini, 1985) expressaram a dificuldade em identificar consistentemente as microestruturas
Tíbia	Singh e Gunberg, 1970	N - 33 IE - 39-87 S - 33♂; 0♀		Número de: 1. Osteónios intactos; 2. Fragmentos de osteónios; 3. Canais não Haversianos; 4. % de osso não remodelado num campo de 2,06 mm <sup>2</sup> .	As amostras foram feitas com base em osso descalcificado. Os autores atentam para o facto de os resultados na tíbia serem preliminares.
Thompson e Gavin, 1983	N - 53 IE - 17-53 S - 48♂; 5♀		1. Densidade e espessura cortical óssea; 2. Nº, área e perímetro dos osteónios secundários; 4. Área e perímetro dos canais De Havers.	O método de Thompson (1979) produzia, para a tíbia, resultados fracos em indivíduos mais novos que 55 anos. Esta metodologia parece apresentar resultados mais precisos.	

(Continua)



Parâmetros amostrais:		Técnica de recolha da amostra	Variáveis analisadas	Comentários (Robling e Stout, 2008)
Osso	Método			
	Hauser <i>et al.</i> , 1980		<p>1. Densidade populacional de osteónios;</p> <p>2. Diâmetro médio dos canais de Havers;</p> <p>3. % de superfície ocupada pelos canais de Havers.</p>	Tamanho da amostra é reduzido, e apresenta um largo erro padrão. As fórmulas endocorticais podem ser especialmente úteis em contexto arqueológico.
Tíbia	Uytterschaut, 1985, 1993		% de osso remodelado num campo microscópico de 1 mm <sup>2</sup> .	Esta técnica aplica, na tíbia, o método de Ahlqvist e Damsten (1969) desenvolvido para o fémur.
	Balthazard e Lebrun, 1911		Diâmetro médio dos canais de Havers no córtex anterior da tíbia	Primeiro método publicado para a estimativa da idade à morte com base na microanatomia óssea.
Úmero	Thompson, 1979		19 variáveis analisadas. Consultar publicação original para uma descrição detalhada.	Técnica com destruição mínima do espécimen. Mais tarde a técnica é desencorajada devido à falta de exactidão.

\* Não há nenhum registo do intervalo etário apenas da média das idades -  $\bar{x}$  = 67,9

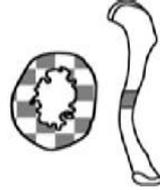
(Continua)



Osso	Método	Parâmetros amostrais: Nº de Amostra (N) Intervalo Etário (IE) Sexo (S)	Técnica de recolha da amostra	Variáveis analisadas	Comentários (Robling e Stout, 2008)
Úmero	Yoshino <i>et al.</i> , 1994	N - 40 IE - 23-80 S - 40♂; 0♀		Densidade de: 1. Osteónios secundários e do tipo II; 2. Fragmentos de osteónios e de espaços de reabsorção; 3. Nº total e média dos canais de Havers e da área osteonal.	São necessárias microfotografias para distinguir os diferentes tipos de osteónios.
Úmero	Iwamoto, 1978	N - 42 IE - 41-102 S - 42♂; ??♀		1. Osteónios/mm <sup>2</sup> ; 2. Tamanho dos osteónios; 3. Diâmetro dos canais Havers; 4. Lamelas intersticiais/mm <sup>2</sup> ;	A amostra contempla apenas indivíduos mais velhos, com idades não inferiores a 40 anos. As variáveis parecem de alguma forma confusas.
Úmero	Rother <i>et al.</i> , 1978	N - 70 IE - 20-81 S - 42♂; 28♀		1. Diâmetro dos canais de Havers, dos osteónios e dos osteócitos; 2. Densidade dos canais de Havers e de Volkman; 3. % de osso osteonal e intersticial.	Os autores (Rother <i>et al.</i> , 1978) verificaram um grau maior de precisão quando as variáveis macroscópicas são introduzidas na regressão.
6ª Costela	Stout e Paine, 1992	N - 40 IE - 13-62 S - 32♂; 7♀; 1?		Soma dos osteónios intactos e fragmentados por mm <sup>2</sup> .	Foram seccionadas duas amostras por osso. Os melhores resultados foram obtidos pela fórmula que combina a clavícula com a costela.
6ª Costela	Cho <i>et al.</i> , 2002	N - 103 IE - 17-82 S - ??♂; ??♀		Ver artigo original para terminologia específica.	É o método que, usando a costela, apresenta uma maior precisão em indivíduos menos experientes (Robling e Stout, 2008).

(Continua)

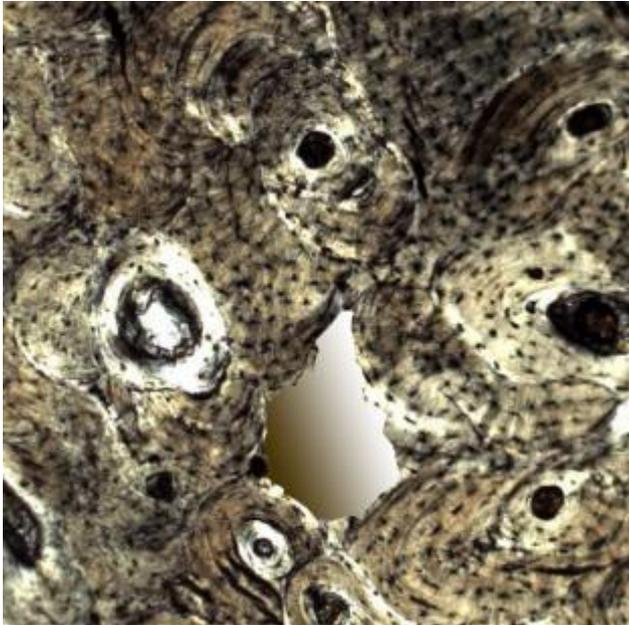


Osso	Método	Parâmetros amostrais: Nº de Amostra (N) Intervalo Etário (IE) Sexo (S)	Técnica de recolha da amostra	Variáveis analisadas	Comentários (Robling e Stout, 2008)
4ª Costela	Stout <i>et al.</i> , 1994	N - 59 IE - 11-88 S - ??♂; ??♀		Soma dos osteónios intactos e fragmentados por mm <sup>2</sup> (o método macroscópico de determinação da idade com base na extremidade esternal é também aplicado).	A proveniência da amostra é tanto moderna como arqueológica. Este método explora a informação disponível para aumentar a precisão da estimativa.
Clavícula	Stout <i>et al.</i> , 1996	N - 123 IE - 13-75 S - 73♂; 49♀; 1?		Soma dos osteónios intactos e fragmentados por mm <sup>2</sup> .	Substitui o método de Stout e Paine (1992). A amostra tem um tamanho considerável. A estimativa da idade, com base neste método é menos afectada pelo desgaste do perióstio.



## **Apêndice B**

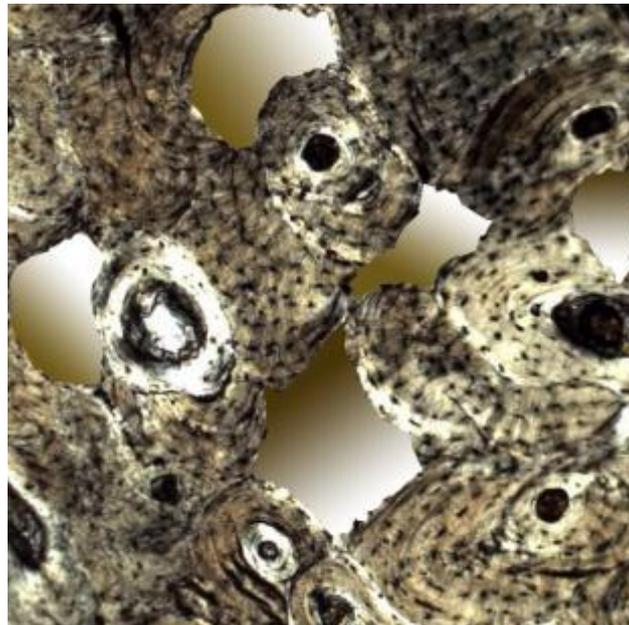




**Figura B.1.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

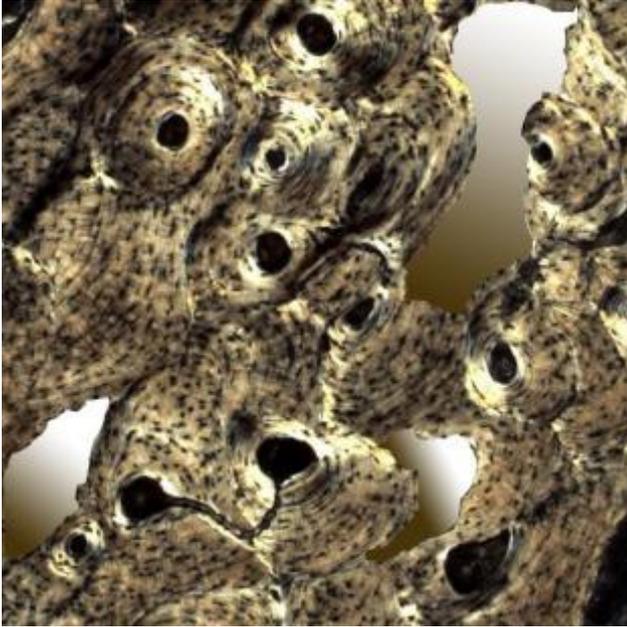


**Figura B.2.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

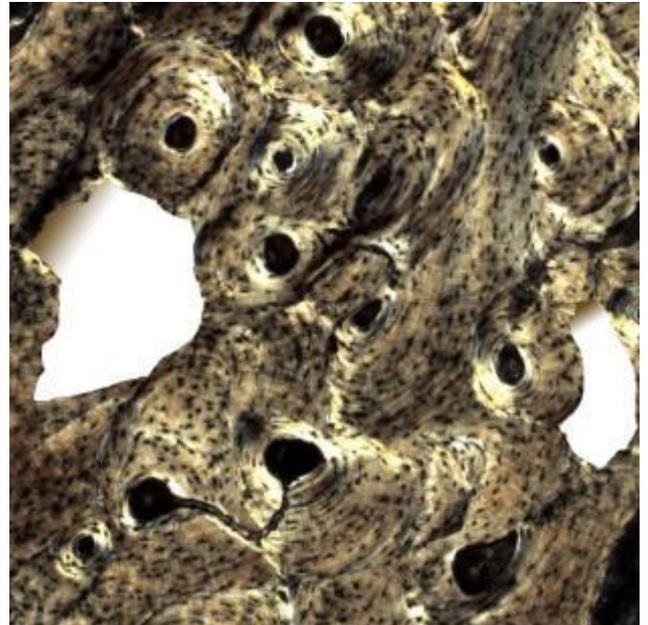


**Figura B.3.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.

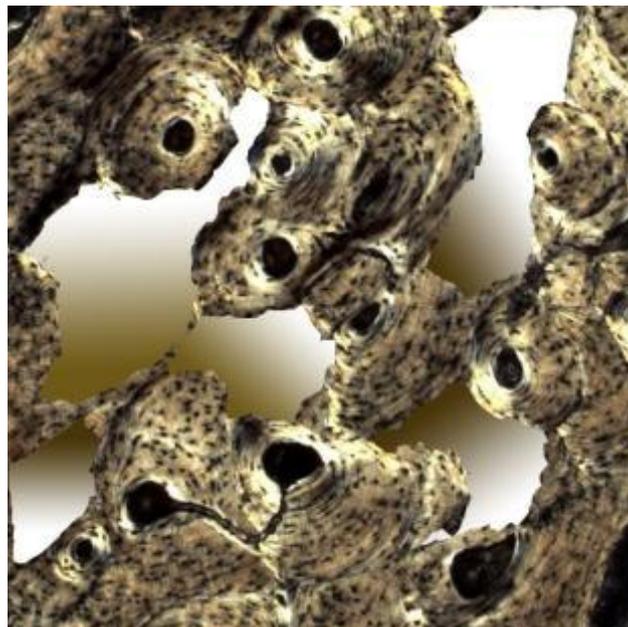




**Figura B.4.** Terceiro campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

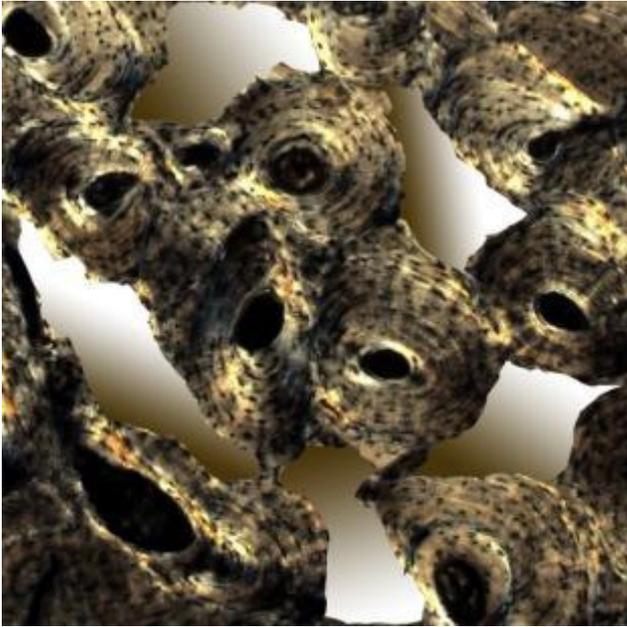


**Figura B.5.** Terceiro campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.



**Figura B.6.** Terceiro campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.

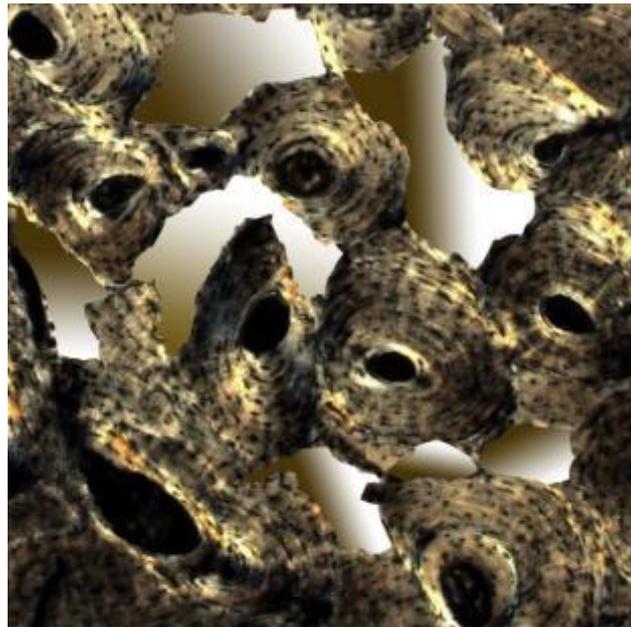




**Figura B.7.** Quarto campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.



**Figura B.8.** Quarto campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.



**Figura B.9.** Quarto campo microscópico do indivíduo CVL 4, pertencente à faixa etária dos 30 aos 39 anos. É possível observar a área assinalada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.





**Figura B.10.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

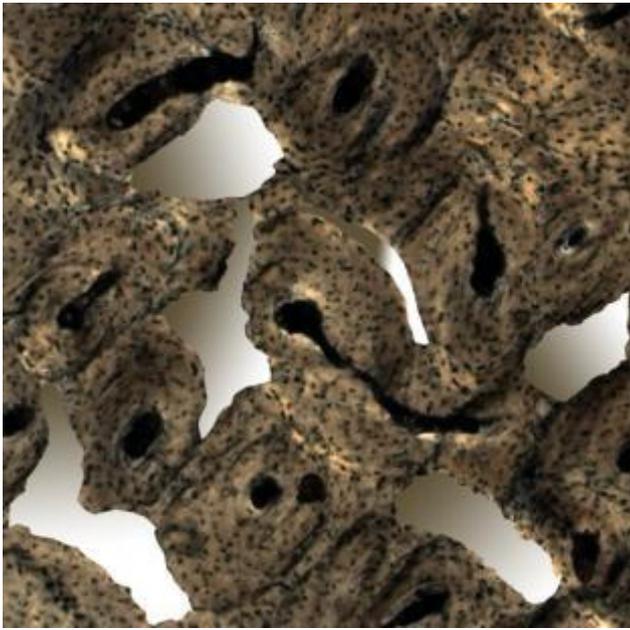


**Figura B.11.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

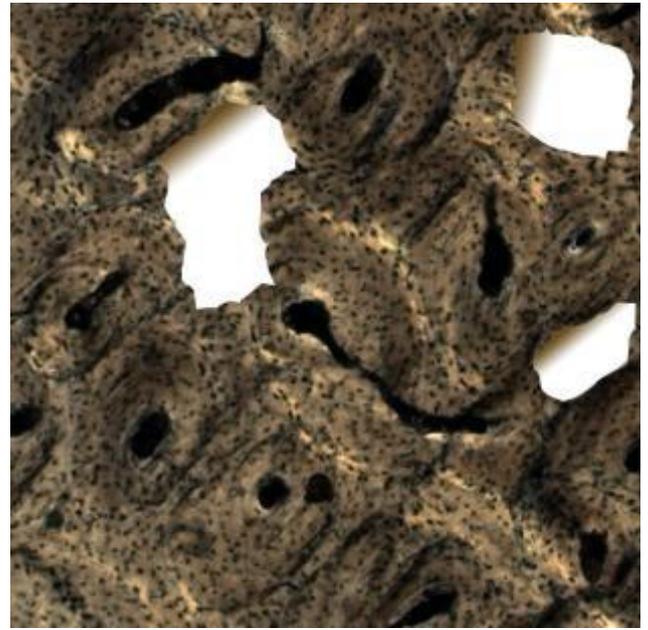


**Figura B.12.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.

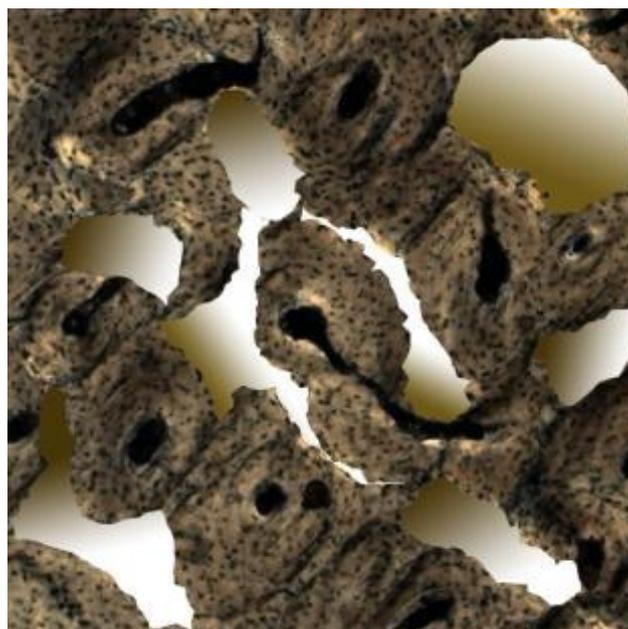




**Figura B.13** Terceiro campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

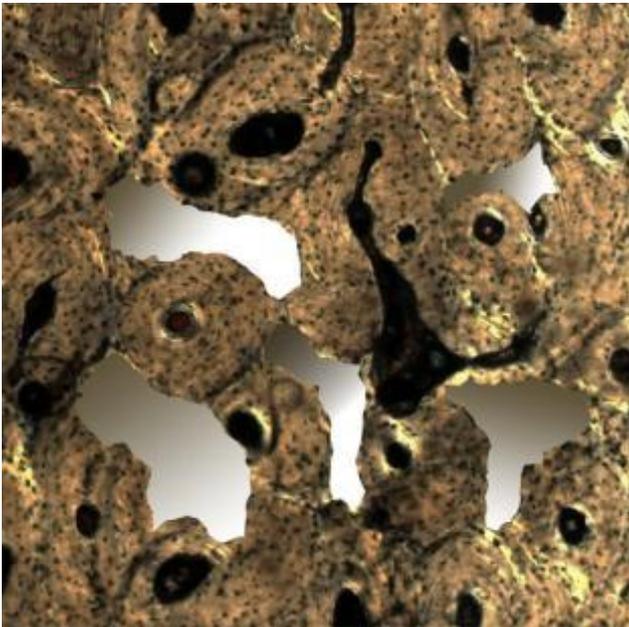


**Figura B.14.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

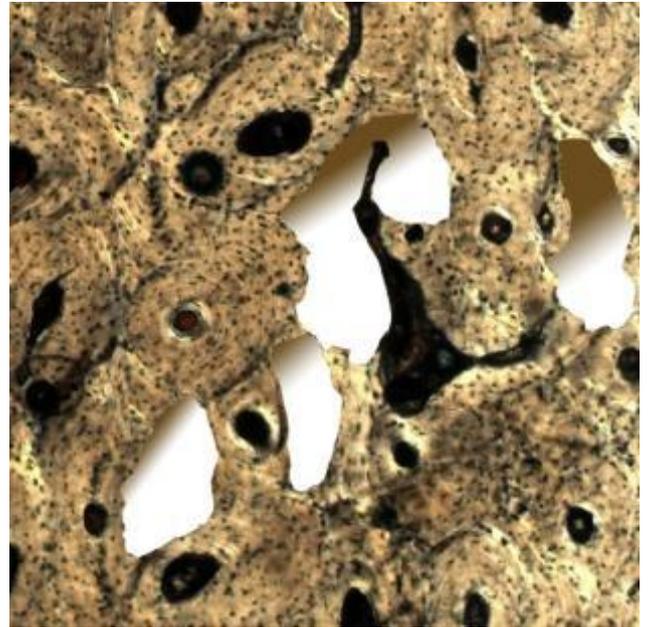


**Figura B.15.** Terceiro campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.

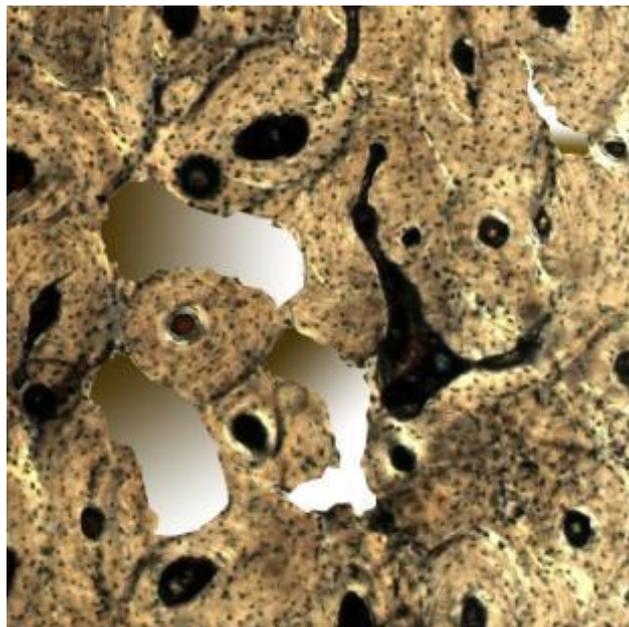




**Figura B.16.** Quarto campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

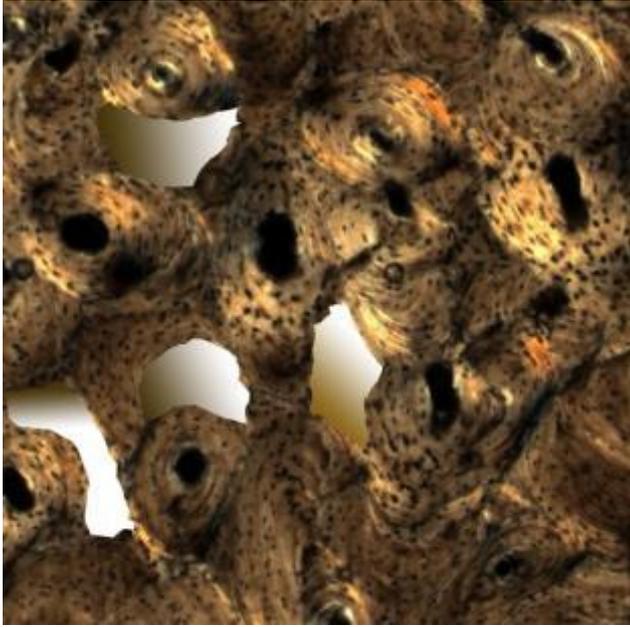


**Figura B.17.** Quarto campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.



**Figura B.18.** Quarto campo microscópico do indivíduo CVL 2, pertencente à faixa etária dos 40 aos 49 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.





**Figura B.19.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.



**Figura B.20.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.



**Figura B.21.** Segundo campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.

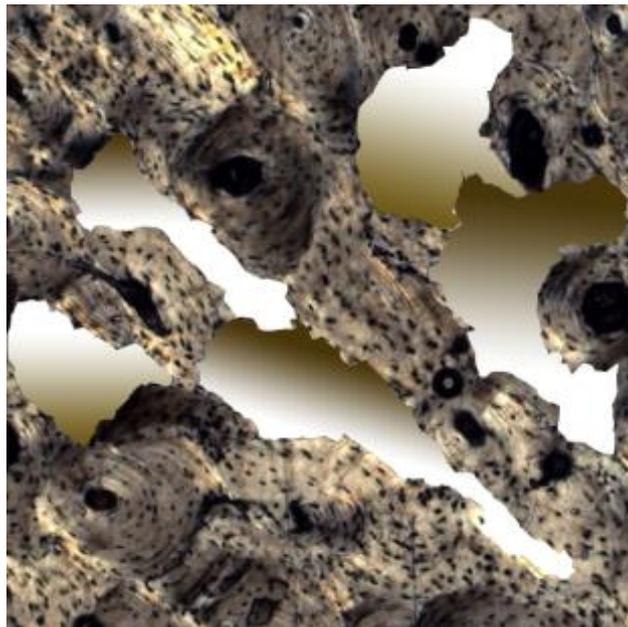




**Figura B.22.** Terceiro campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

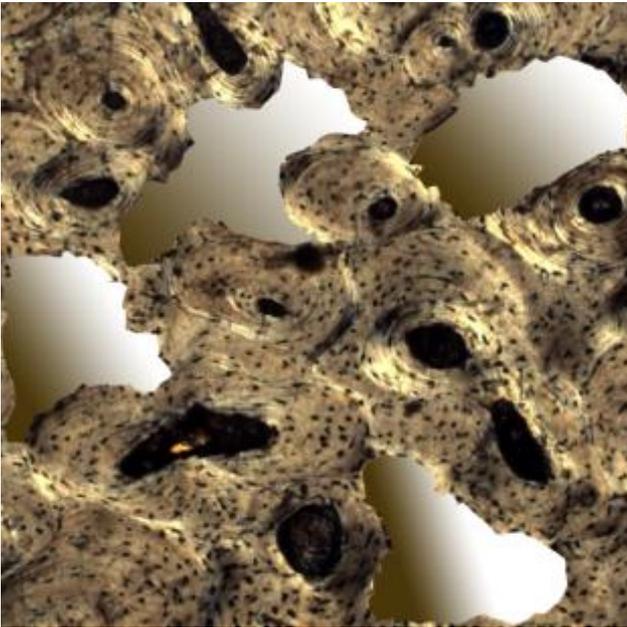


**Figura B.23.** Terceiro campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.

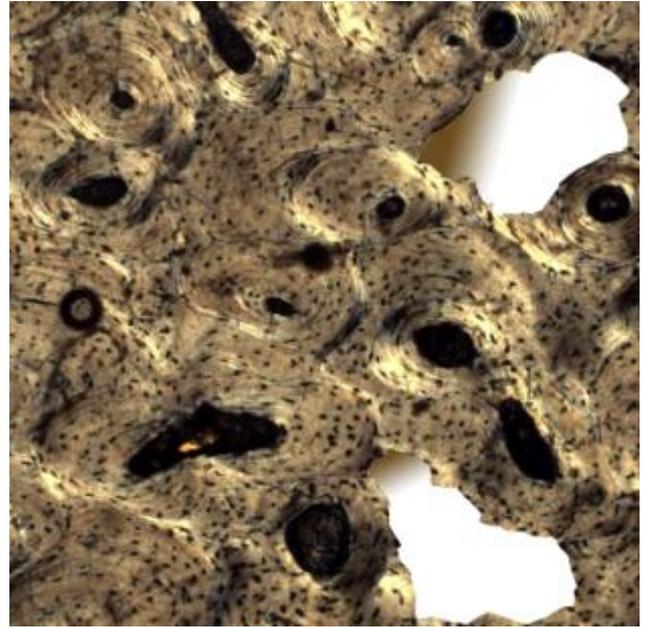


**Figura B.24.** Terceiro campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.

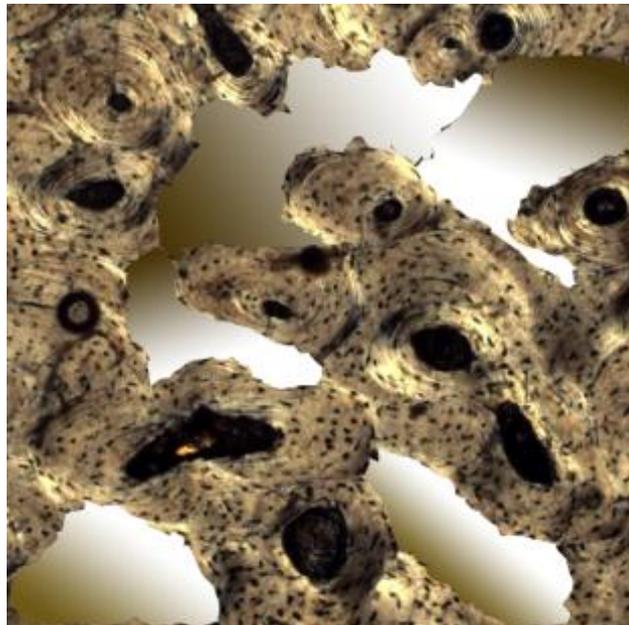




**Figura B.25.** Quarto campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, numa primeira análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.



**Figura B.26.** Quarto campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na segunda análise pelo observador número 1. Ampliação de 50x.



**Figura B.27.** Quarto campo microscópico do indivíduo CVL 7, pertencente à faixa etária dos 50 aos 59 anos. É possível observar a área delineada como osso não remodelado, na análise feita pelo observador número 2. Ampliação de 50x.