

MECANOBIOLOGIA DO OSSO

I. MICROARQUITECTURA DO OSSO TRABECULAR EM ESTUDOS DE PALEODEMOGRAFIA

Fernando Capela e Silva¹, Teresa Fernandes², Lurdes Rebocho³, Joana da Costa Reis⁴, José Caeiro Potes⁵, Alfredo Pereira⁶

¹*Departamento de Biologia, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal; fcs@uevora.pt*

²*Departamento de Biologia, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal; tmf@uevora.pt*

³*Departamento de Biologia, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal; lurdesmoreno@hotmail.com*

⁴*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal; jmfer@uevora.pt*

⁵*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal; jacpotes@uevora.pt*

⁶*Departamento de Zootecnia e Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal; apereira@uevora.pt*

PALAVRAS CHAVE: Mecanobiologia, osso trabecular, paleodemografia.

RESUMO: *Os esqueletos representam a evidência mais directa da biologia das populações antigas e o seu estudo fornece dados acerca da sua demografia (ratios de idade e de sexos), saúde e bem-estar, dieta, violência, parentesco e modo de vida, ou padrões de actividade. A microarquitECTURA do osso trabecular apresenta correlações acentuadas com os padrões funcionais e os estímulos mecânicos externos aplicados ao longo do seu desenvolvimento e remodelação. Pretende-se com o presente trabalho, com base no conhecimento da biologia do tecido ósseo, fornecer informação acerca da avaliação da microarquitECTURA do osso trabecular de populações humanas antigas, e da importância da sua aplicação: em estudos de crescimento, desenvolvimento e remodelação óssea, associados com alterações na massa corporal; e na reconstituição de padrões de actividades físicas normais, e/ou associadas a condições de saúde.*

1 INTRODUÇÃO

Os estímulos mecânicos induzem alterações fisiológicas e/ou patológicas na estrutura, na composição e nas funções dos tecidos [1, 2]. Relativamente ao tecido ósseo, sabe-se que a sua microarquitECTURA é influenciada por forças mecânicas durante o crescimento e o desenvolvimento dos indivíduos, através de adaptações funcionais [3-7]. Estas adaptações variam com o genótipo [8-13], com a idade [7, 11, 13], com o local anatómico [7, 14, 15], com o estado fisiológico [5, 16], com a presença de microdanos no osso [17-19], e com as características das cargas mecânicas [4, 6, 11, 20, 21]. O tecido ósseo adapta-se às condições mecânicas externas [4, 7, 22],

através dum sistema regulador constituído por numerosos mecanorreceptores, que se aceita serem os osteócitos [23-26], e que resulta num equilíbrio dinâmico dos processos de modelação/remodelação [8]. A regulação da construção do esqueleto através dos efeitos de factores mecânicos pode ser analisada nas perspectivas ontogenética e filogenética [13, 27, 28]. Sendo a morfologia e a estrutura dos ossos influenciadas por estímulo mecânicos [29-32], a avaliação de esqueletos de populações antigas, para além de permitir a reconstituição dos seus padrões de actividade (estratégias de subsistência, mobilidade, tipos de actividade, distribuição de tarefas por sexo

e idade, etc.), permite ainda obter informações acerca da evolução e da adaptação dos tecidos esqueléticos das populações modernas [13], e das condições biológicas, ambientais, demográficas e sócio-culturais que produziram determinadas variações morfológicas nos indivíduos dessas populações [29].

Pretende-se com o presente trabalho, com base no conhecimento da biologia do tecido ósseo, fornecer informação acerca da avaliação da microarquitetura do osso trabecular de populações humanas antigas, e da importância da sua aplicação: em estudos de crescimento, desenvolvimento e remodelação óssea, associados com alterações na massa corporal; e na reconstituição de padrões de actividades físicas normais, e/ou associadas a condições de saúde.

2 BIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, cujas células (células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células de revestimento ósseo) e fibras (principalmente colagénicas), se encontram imersas numa matriz extracelular, ou osteóide, mineralizada (principalmente cálcio e fósforo, na forma de cristais de hidroxiapatite, que é o fosfato tricálcico dihidratado, e outros iões, designadamente, Mg, Na, K), o que lhe confere as suas características de dureza e rigidez. A componente orgânica da matriz extracelular é constituída por água, colagénio (fundamentalmente do tipo I), proteínas não colagénicas (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea, osteopogélica e factor estimulante de colónias de macrófagos) e proteoglicanos. O tecido ósseo desempenha uma função fundamental de suporte, estando, no entanto, associado a outras importantes funções, tais como: protecção de órgãos vitais, locomoção, formação de células sanguíneas e reservatório de minerais [33].

Do ponto de vista anatómico o tecido ósseo pode classificar-se em tecido ósseo compacto e

tecido ósseo esponjoso. O osso compacto (ou denso, ou cortical) tem um aspecto sólido, não apresenta cavidades visíveis, constituindo a parte mais externa dos ossos (o córtex), e é encontrado nas diáfises dos ossos longos, na periferia dos ossos curtos e nas tábuas dos ossos chatos [34]. O osso esponjoso (ou poroso, ou trabecular, ou medular) tem um aspecto poroso, estando organizado em trabéculas irregulares de tecido ósseo, as quais formam uma rede tridimensional de espículas ósseas, que delimitam um vasto sistema de espaços, onde se aloja a medula óssea; este tecido é encontrado numa posição mais interna dos ossos, nas diáfises e nas epífises. O número, a espessura e a orientação destas trabéculas dependem das cargas mecânicas a que o osso está exposto, de modo a oferecer a máxima força para uma massa mínima; por exemplo, existem muitas trabéculas interconectadas e espessas nas vértebras, as quais estão constantemente a suportar peso, ao contrário do que acontece no centro das costelas, que não estão sujeitas a cargas constantes [34].

Do ponto de vista histológico o tecido ósseo pode classificar-se em: osso primário (ou imaturo, ou entrelaçado) e osso secundário (ou maduro, ou lamelar; o osso compacto e o osso esponjoso são deste tipo). O osso primário ou imaturo é o primeiro tipo de tecido a formar-se no feto e na reparação óssea. Não apresenta lamelas, e é menos mineralizado que o tecido ósseo secundário. As fibras colagénicas estão dispostas em várias direcções na matriz, sem organização definida. Nos indivíduos adultos é pouco frequente, persistindo nas suturas dos ossos do crânio, alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção dos tendões e em certas situações em que se verifica uma rápida neoformação óssea patológica, designadamente na doença de Paget ou em fracturas em consolidação [34]. Pelo contrário, no osso secundário, ou maduro, as fibras colagénicas apresentam uma disposição altamente ordenada, dispostas paralelamente dentro de cada lamela e

obliquamente entre lamelas [34]. O osso lamelar é fundamentalmente constituído por lamelas ósseas dispostas concentricamente, estando os osteócitos alojados nas lacunas, comunicando entre si através de prolongamentos citoplasmáticos ao longo de canalículos [34]. O osso compacto maduro tem um arranjo lamelar concêntrico característico possuindo 4 sistemas lamelares: (i) sistemas de Havers, ou osteónios, formados por lamelas concêntricas em volta do chamado canal de Havers; (ii) sistema intermediário ou intersticial; (iii) sistema lamelar circunferencial externo; e (iv) sistema lamelar circunferencial interno. Os canais de Havers dispõem-se paralelamente ao eixo dos ossos longos, e contêm vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, interconectando-se uns com os outros, e com o endóstio e o perióstio, através dos canais de Volkmann, dispostos perpendicular, ou obliquamente, em relação aos primeiros [34]. Esta organização do osso compacto traduz o compromisso entre a resistência e rigidez do tecido ósseo e a actividade metabólica das suas células, ainda que incluídas numa matriz mineralizada. Quanto ao osso esponjoso maduro, as lamelas que o constituem apresentam um arranjo paralelo, não formando sistemas de Havers; no entanto, os osteócitos, as lacunas e os canalículos têm um aspecto semelhante aos do osso compacto. As extremidades das trabéculas do osso esponjoso estão ligadas às lamelas circunferenciais internas do osso compacto e a sua elevada actividade metabólica é assegurada pela presença dos sinusóides sanguíneos nos espaços hematopoiéticos da medula óssea [34]. Para compreender completamente a biologia do tecido ósseo, convém referir que o osso compacto é revestido exteriormente por uma camada de tecido conjuntivo denso, o perióstio, e internamente, em contacto com a cavidade medular, as trabéculas do osso esponjoso, e os canais de Havers, por uma fina camada de tecido conjuntivo, o endóstio [34]. Estas estruturas histológicas, apresentam na sua constituição células osteoprogenitoras,

pelo que possuem capacidade osteogénica, e daí serem fundamentais no crescimento, na remodelação e na reparação de fracturas [34, 35].

O tecido ósseo origina-se a partir de tecido conjuntivo pré-existente, podendo ocorrer de duas formas, nas quais o processo de deposição do osteóide é essencialmente o mesmo: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa inicia-se com a diferenciação de células mesenquimais em células osteogénicas, e depois em osteoblastos, sendo estes os responsáveis pela síntese da matriz do osso, nos múltiplos centros de ossificação, e consequente mineralização. O tecido ósseo resultante é formado por uma rede de trabéculas ósseas, designada esponjosa primária, a qual em seguida pode ser transformada em tecido ósseo compacto através do preenchimento dos espaços entre as trabéculas [36]. Este tipo de ossificação ocorre nos ossos chatos da abóbada craneana e em parte do osso da mandíbula. A ossificação endocondral ocorre a partir de moldes de cartilagem hialina pré-existentes, considerados modelos dos futuros ossos, iniciando-se com a hipertrofia dos condrócitos e das respectivas lacunas na zona central do modelo cartilágneo [34, 36]. Este tipo de ossificação ocorre nos ossos longos do esqueleto apendicular, nos ossos da coluna vertebral, da pélvis, da face e da base do crânio. Após uma série de eventos, e de se formarem os centros de ossificação primários e secundários, a maior parte da cartilagem das epífises é substituída por osso esponjoso, excepto ao nível da cartilagem articular e da cartilagem da placa epifisária [36]. Os ossos longos aumentam de tamanho por dois mecanismos distintos: em diâmetro, através de crescimento aposicional, uma forma de ossificação intramembranosa, em que o osteóide é depositado externamente; e em comprimento, através do processo de ossificação endocondral, na placa epifisária [6, 37]. No decurso deste processo de ossificação, os condrócitos da placa epifisária, dispostos

em colunas, proliferam, sintetizam matriz, hipertrofiam e morrem por apoptose, após o que se verifica a invasão vascular e a consequente chegada dos osteoblastos que iniciam a síntese de osteóide nas trabéculas de cartilagem, entretanto calcificada. Esta cartilagem calcificada é assim convertida em osso esponjoso primário, formado por uma rede de trabéculas ósseas, orientadas no sentido das colunas da placa epifisária. Processos de remodelação posteriores, em resposta a estímulos mecânicos externos e outros processos fisiológicos, produzem a estrutura trabecular secundária [6, 34].

O tecido ósseo apresenta uma elevada actividade metabólica, sendo possível distinguir dois tipos de actividade: a remodelação e a modelação óssea [33, 34]. No processo de remodelação, verifica-se a formação de osso pelos osteoblastos, associada à reabsorção parcial de tecido já formado, através da actividade dos osteoclastos. A reabsorção osteoclástica contribui para a remodelação em resposta ao crescimento ou aos estímulos mecânicos dinâmicos no esqueleto, bem como para a manutenção, a longo prazo, da homeostasia do cálcio sanguíneo [34]. O principal objectivo da remodelação é renovar o tecido, enquanto na modelação, a reestruturação da matriz óssea leva a alterações, mais ou menos, rápidas, na forma, no tamanho e na massa dos ossos, através, igualmente, da actividade equilibrada de osteoblastos e osteoclastos [38, 39].

3 AVALIAÇÃO DO OSSO TRABECULAR

O desenvolvimento do osso trabecular é influenciado pela combinação de um conjunto de factores biológicos e biofísicos que resulta num equilíbrio dinâmico dos processos de modelação/remodelação [ver: 40]. No final, o osso trabecular consiste numa rede tridimensional (3D) de trabéculas com uma distribuição altamente anisotrópica, dispostas de modo paralelo relativamente às linhas de stress, e cujas características de robustez

dependem da sua densidade mineral e da sua microarquitECTURA [41, 42]. Existem várias técnicas disponíveis para avaliar a densidade mineral óssea [43-45] e a microarquitECTURA do osso trabecular [39, 41, 42, 46, 47]. Uma vez que estamos a falar da avaliação do osso trabecular de populações antigas, a escolha da(s) técnica(s) a utilizar, deve levar em linha de conta, o custo, a facilidade de execução e análise, o tipo de ossos disponíveis, o seu estado de conservação e, no caso da histomorfometria, que apenas podemos quantificar parâmetros directamente relacionados com a componente mineral. No entanto, é de referir que não se colocam as questões relativas à invasividade da técnica nem aos efeitos das radiações.

Em vários trabalhos foi feita a avaliação dos efeitos da idade, do sexo, das condições de saúde e de actividades funcionais nas características do tecido ósseo trabecular (na tíbia, no fémur, no calcâneo, no rádio, e em vértebras) de populações antigas, utilizando diferentes técnicas, designadamente, radiologia convencional, absorciometria de dupla energia radiológica (DEXA), tomografia tridimensional microcomputadorizada (3D- μ CT) e histomorfometria [11, 40, 48-52; ver revisão em: 53]. Relativamente à microarquitECTURA, os parâmetros avaliados seguiram, de uma maneira geral, a nomenclatura aprovada pela The American Society of Bone and Mineral Research [54], designadamente, espessura das trabéculas, número de trabéculas (ou mais exactamente, a densidade trabecular) e a separação trabecular. Estes parâmetros são derivados duma combinação de medições da superfície e do perímetro das trabéculas, e podem ser obtidas directamente através de microscópio fotónico equipado com retículo adequado, ou através da análise de fotomicrografias com software adequado. Com o desenvolvimento de microcomputadores e o interesse crescente na estereologia, têm sido propostos métodos de estudo da microarquitECTURA do osso trabecular mais robustos, independentes das medições da

superfície e do perímetro das trabéculas em imagens digitalizadas de osso, e que permitem calcular o volume da fracção óssea, o grau de anisotropia, a espessura, o número, a separação e a conectividade das trabéculas [42, 55]. A descrição detalhada dos métodos de análise da microarquitetura do osso trabecular, relativamente à morfologia, à topologia e à textura, pode ser encontrada em Dalle Carbonare *et al.*, 2005 [47], Lespassiles *et al.*, 2006 [41] e Chappard *et al.*, 2008 [42].

4 CONCLUSÕES

O osso trabecular é um material complexo com uma acentuada heterogeneidade, consistindo numa rede 3D de trabéculas com uma distribuição altamente anisotrópica, que lhe confere características mecânicas muito particulares e que dependem do local anatómico, dos padrões funcionais e das cargas externas aplicadas durante a vida do indivíduo [55-57]. A microarquitetura do osso trabecular traduz, assim, os factores mecanobiológicos que influenciaram o desenvolvimento do esqueleto.

Deste modo, a aplicação duma abordagem integrada e multidisciplinar na avaliação do osso trabecular, e das possíveis relações com a adaptação do esqueleto a estímulos físicos, abre perspectivas muito interessantes nos estudos de paleodemografia, contribuindo para um melhor conhecimento do crescimento, desenvolvimento, comportamento, estado de saúde e estilo de vida das populações antigas.

REFERÊNCIAS

- [1] Wang, J.H.-C.; Thampatty, B.P. An introductory review of cell mechanobiology. *Biomechan Model Mechanobiol*, 5, 1-16, 2006.
- [2] Ingber, D.E. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Ann Med*, 35, 564-577, 2003.
- [3] Martin, R.; Burr, D.; Sharkey, N. Skeletal tissue mechanics. Springer, New York. 1998.
- [4] Huiskes, R.; Ruimerman, R.; van Lenthe, G.; Janssen, J. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*, 405, 704-706, 2000.
- [5] van der Meulen, M.C.H.; Prendergast, P.J. Mechanics in skeletal development, adaptation and disease. *Phil Trans R Soc Lond A*, 358, 565-578, 2000.
- [6] Carter, D.R.; Beaupré, G.S. Skeletal function and form: mechanobiology of skeletal development, aging, and regeneration. Cambridge University Press, Cambridge. 2001.
- [7] Ryan, T.M.; Krovitz, G.E. Trabecular bone ontogeny in the human proximal femur. *J Hum Evol*, 51, 591-602, 2006.
- [8] Frost, H.M. Bone "mass" and the "mechanostat:" a proposal. *Anat Rec*, 219, 1-9, 1987.
- [9] Wenzel, T.E.; Schaffler, M.B.; Fyhrie, D.P. In vivo trabecular microcracks in human vertebral bone. *Bone*, 19, 89-95, 1996.
- [10] Aloia, J.F.; Vaswani, A.; Delorme-Pagan, C.; Flaster, E. Discordance between ultrasound of the calcaneus and bone mineral density in black and white women. *Calcif Tissue Int*, 62, 481-485, 1998.
- [11] Agarwal, S.C.; Dumitriu, M.; Tomlinson G.A.; Grynbas, M.D. Medieval trabecular bone architecture: the influence of age, sex, and lifestyle. *Am J Phys Anthropol*, 124, 33-44, 2004.
- [12] Pearson, O.; Lieberman, D. 2004. The aging of Wolff 's "law": ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone. *Yearb Phys Anthropol*, 47, 63-99, 2004.
- [13] Ruff, C.B. Mechanical determinants of bone form: insights from skeletal remains, *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 5, 202-212, 2005.
- [14] Bass, S.; Delmas, P.D.; Pearce, G.; Hendrich, E.; Tabensky, A.; Seeman, E. The differing tempo of growth in bone size, mass, and density in girls is region-specific. *J Clin Invest*, 104, 795-804, 1999.
- [15] Lieberman, D.E.; Devlin, M.J.; Pearson, O.M. Articular area responses to mechanical loading: effects of exercise, age, and skeletal location. *Am J Phys Anthropol*, 116, 266-277, 2001.
- [16] Mosekilde, L.; Ebbesen, E.N.; Tornvig, L.; Thomsen, J.S. Trabecular bone structure and strength-remodelling and repair. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 1, 25-30, 2000.
- [17] Lee, T.C.; Staines, A.; Taylor, D. Bone adaptation to load: microdamage as a stimulus for bone remodelling, *J Anat*, 201, 437-446, 2002.
- [18] Lee, T.C.; O'Brien, F.J.; Gunnlaugsson, T.; Parkesh, R.; Taylor, D. Microdamage and bone mechanobiology. *Technol Health Care*, 14, 359-365, 2006.
- [19] Wang, X.; Niebur, G.L. Microdamage propagation in trabecular bone due to changes in loading mode. *J Biomech*, 39, 781-790, 2006.
- [20] van der Meulen, M.; Beaupré, G.S.; Carter, D. Mechanobiologic influences in long bone cross-sectional growth. *Bone*, 14, 635-642, 1993.
- [21] Burr, D.; Robling, A.; Turner, C. Effects of biomechanical stress on bones in animals. *Bone*, 30, 781-786, 2002.
- [22] Biewener, A.; Fazzalari, N.; Konieczynski, D.; Baudinette, R. Adaptive changes in trabecular architecture in relation to functional strain patterns and disuse. *Bone*, 19, 1-8, 1996.

- [23] Burger, E. H.; Klein-Nulend, J. Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J*, 13, S101-S112, 1999.
- [24] Klein-Nulend, J.; Bacabac, R.G.; Mullender, M.G. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris)*, 53, 576-580, 2005.
- [25] Hazenberg, J.G.; Lee, T.C.; Taylor, D. The role of osteocytes in functional bone adaptation. *Bonekey Osteovision*, 3, 10-16, 2006.
- [26] Bonewald, L.F.; Johnson, M.L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signalling. *Bone*, 42, 606-615, 2008.
- [27] Jantz L.M.; Jantz, R.L. Secular change in long bone length and proportion in the United States, 1800-1970. *Am J Phys Anthropol*, 110, 57-67, 1999.
- [28] Prendergast, P.J. Mechanics applied to skeletal ontogeny and phylogeny. *Meccanica*, 37, 317-334, 2002.
- [29] Larsen, C.S. Bioarchaeology: The lives and lifestyles of past people, *J Archaeol Res*, 10, 119-166, 2002.
- [30] Bridges, P.S.; Blitz, J.H.; Solano, M.C. 2000. Changes in long bone diaphyseal strength with horticultural intensification in West-Central Illinois. *Am J Phys Anthropol*, 112, 217-238, 2000.
- [31] Ruff, C. Body size, body shape, and long bone strength in modern humans. *J Hum Evol*, 38, 269-290, 2000.
- [32] Turner, C.H.; Robling, A.G. Exercise as an anabolic stimulus for bone. *Curr Pharm Des*, 10, 2629-2641, 2004.
- [33] Sommerfeldt, D.W.; Rubin, C.T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, 10, S86-S95, 2001.
- [34] Young, B.; Lowe, J.S.; Stevens, A.; Heath, J.W. *Wheater's Functional Histology*, 5th edition. Elsevier, Amsterdam. 2006.
- [35] Allen, M.R.; Hock, J.M.; Burr, D.B. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*, 35, 1003-1012, 2004.
- [36] Gonçalves, C. Tecido ósseo. In Gonçalves, C.; Bairos, G. (ed.) *Histologia-Texto e Imagens*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, pp. 73-87, 2006.
- [37] Rauch, F. Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 5, 194-201, 2005.
- [38] Canhão, H.; Fonseca, J.E.; Queiroz, M.V. Epidemiologia da osteoporose, mecanismos de remodelação óssea e factores protectores do osso. *Acta Reum Port*, 30, 225-240, 2005.
- [39] Rauch, F. Watching bone cells at work: what we can see from bone biopsies. *Pediatr Nephrol*, 21, 457-462, 2006.
- [40] Gosman, J.H.; Ketcham, R.A. Patterns in ontogeny of human trabecular bone from SunWatch village in the prehistoric Ohio Valley: general features of microarchitectural change. *Am J Phys Anthropol*, 2008 (doi 10.1002/ajpa.20931).
- [41] Lespessailles, E.; Chappard, C.; Bonnet, N.; Benhamou, C.L. Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture. *Joint Bone Spine*, 73, 254-261, 2006.
- [42] Chappard, D.; Baslé, M.-F.; Legrand E.; Audran M. Trabecular bone microarchitecture: a review. *Morphologie*, 92, 162-170, 2008.
- [43] Simões, M.E. Métodos de avaliação da massa óssea. In Queiroz, M.V. (ed.) *Osteoporose*. Lidel, Lisboa, pp.49-62, 1998.
- [44] Langton, C.M.; Njeh, C.F. *The physical measurement of bone*. 1st edition. Taylors & Francis, London. 2006.
- [45] Compston, J. Bone quality: what is it and how is it measured? *Arq Bras Endocrinol Metab*, 50, 579-585, 2006.
- [46] Hernández Díaz, E. Biopsia ósea e histomorfometria. In Queiroz, M.V. (ed.) *Osteoporose*. Lidel, Lisboa, pp.63-76, 1998.
- [47] Dalle Carbonare, L.; Valenti, M.T.; Bertoldo, F.; Zanatta, M.; Zenari, S.; Realdi, G.; Lo Cascio, V.; Giannini, S. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron*, 36, 609-616, 2005.
- [48] Aaron, J.E.; Rogers, J.; Kanis, J.A. Paleohistology of Paget's disease in two medieval skeletons. *Am J Phys Anthropol*, 89, 325-331, 1992.
- [49] Kneissel, M.; Boyde, A.; Hahn, M.; Teschler-Nicola, M.; Kalchhauser, G.; Plenk, H. Jr. Age and sex-dependent cancellous bone changes in a 4000y BP population. *Bone*, 15, 539-545, 1994.
- [50] Kneissel, M.; Roschger, P.; Steiner, W.; Schamall, D.; Kalchhauser, G.; Boyde, A.; Teschler-Nicola, M. Cancellous bone structure in the growing and aging lumbar spine in a historic Nubian population. *Calcif Tissue Int*, 61, 95-100, 1997.
- [51] Mays, S.; Lees, B.; Stevenson, J.C. Age-dependent bone loss in the femur in a medieval population. *Int J Osteoarch*, 8, 97-106, 1998.
- [52] McEwan, J.M.; Mays, S.; Blake, G.M. Measurements of bone mineral density of the radius in a medieval population. *Calcif Tissue Int*, 74, 157-161, 2004.
- [53] Agarwal, S.C.; Grynblas, M.D. Bone quantity and quality in past populations. *Anat Rec*, 246, 423-432, 1996.
- [54] Parfitt, A.M.; Drezner, M.K.; Glorieux, F.H.; Kanis, J.A.; Malluche, H.; Meunier, P.J.; Ott, S.M.; Recker, R.R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 2, 595-610, 1987.
- [55] Yeni, Y.N.; Kim, D.-G.; Divine, G.W.; Johnson, E.M.; Cody, D.D. Human cancellous bone from T12-L1 vertebrae has unique microstructural and trabecular shear stress properties. *Bone*, 2008 (doi:10.1016/j.bone.2008.09.002)
- [56] Goldstein, S.A. The mechanical properties of trabecular bone: dependence on anatomic location and function. *J Biomech*, 20, 1055-1061, 1987.
- [57] Keaveny, T.M.; Morgan, E.F.; Niebur, G.L.; Yeh O.C. Biomechanics of trabecular bone. *Ann Rev Biomed Eng*, 3, 307-333, 2001.
- [58] Swartz, S.; Parker, A.; Huo, C. Theoretical and empirical scaling patterns and topological homology in bone trabeculae. *J Exp Biol*, 209, 573-590, 1998.