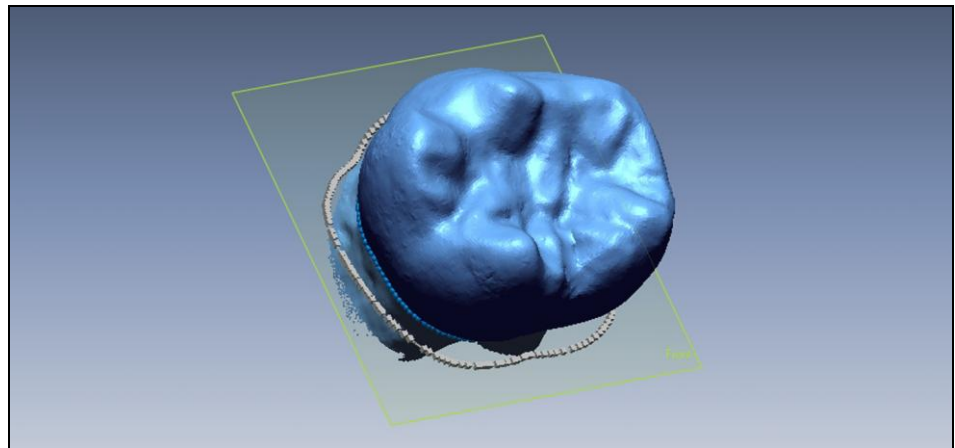


**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE  
ANTROPOLOGICHE  
(XXIV CICLO)**

**Nuove prospettive di indagine tassonomica di  
denti decidui usurati attraverso analisi di  
immagine e tecnologie tridimensionali**

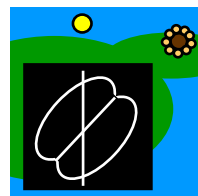
Tesi di

**Laura Buti**



**Coordinatore Prof. Alberto Ugolini  
Tutor Prof. Jacopo Moggi Cecchi  
Co Tutor Dott. Stefano Benazzi**

**(2012)**





**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA “L. Pardi”**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE  
ANTROPOLOGICHE  
(XXIV CICLO, BIO 08)**

**Nuove prospettive di indagine tassonomica di  
denti decidui usurati attraverso analisi di  
immagini e tecnologie tridimensionali**

**Tesi di**

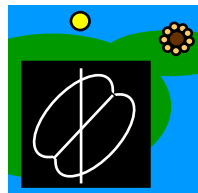
**Laura Buti**

**Coordinatore Prof. Alberto Ugolini**

**Tutor Prof. Jacopo Moggi Cecchi**

**Co Tutor Dott. Stefano Benazzi**

**(2012)**



## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE ALL'ANALISI DENTALE</b>	<b>pag 05</b>
<b>1.1. Morfologia dentale</b>	<b>pag 06</b>
<b>1.1.2 Descrizione morfologica</b>	<b>pag 09</b>
<b>1.1.3 Analisi morfometrica tradizionale</b>	<b>pag 11</b>
<b>1.2 Metodi digitali per lo studio dei denti</b>	<b>pag 16</b>
<b>1.2.1 2D- immagini fotografiche</b>	<b>pag 16</b>
<b>1.2.2 Limiti</b>	<b>pag 20</b>
<b>1.2.3 2D - immagini Raggi X e TC</b>	<b>pag 23</b>
<b>1.2.4 3D – introduzione</b>	<b>pag 25</b>
<b>1.2.5 3D – superficie esterna</b>	<b>pag 26</b>
<b>1.2.6 3D- superficie interna</b>	<b>pag 30</b>
<b>1.3 La problematica</b>	<b>pag 40</b>
<b>1.4 Scopo del lavoro e organizzazione</b>	<b>pag 41</b>
<b>2. ANALISI DEL PROFILO CORONALE E CERVICALE DI MOLARI DECIDUI</b>	<b>pag 43</b>
<b>2.1. Materiali</b>	<b>pag 43</b>
<b>2.2. Metodi</b>	<b>pag 47</b>
<b>2.2.1 Analisi Morfometriche</b>	<b>pag 50</b>
<b>2.2.2 Errore intra- e inter- osservatore</b>	<b>pag 55</b>
<b>2.3. Risultati</b>	<b>pag 57</b>
<b>2.4. Discussione</b>	<b>pag 63</b>
<b>3. CONFRONTO 3D/2D</b>	<b>pag 66</b>
<b>3.1 Materiali</b>	<b>pag 66</b>
<b>3.2 Metodi</b>	<b>pag 67</b>
<b>3.2.1 Modelli 3D</b>	<b>pag 67</b>
<b>3.2.2 Immagini fotografiche</b>	<b>pag 67</b>
<b>3.2.3 Analisi Morfometriche</b>	<b>pag 70</b>
<b>3.2.4 Errore intra- e inter- osservatore</b>	<b>pag 72</b>
<b>3.3 Risultati</b>	<b>pag 73</b>
<b>3.4 Discussione</b>	<b>pag 77</b>
<b>4. CONCLUSIONI</b>	<b>pag 79</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag 81</b>



## ABSTRACT

Nel campo della paleoantropologia è ormai consolidato il ruolo dei denti quali elementi fondamentali per la discriminazione tassonomica.

Nel tempo la morfometria dentale si è sviluppata nell'ottica di un incremento dei fattori di potenzialità informativa e ripetibilità delle misurazioni eseguite, così da creare occasioni di confronto sempre più frequenti fra i risultati raggiunti dai diversi gruppi di ricerca.

Dalle metodologie tradizionali affette dai limiti maggiori, passando attraverso l'analisi di immagini bidimensionali, in tempi recenti si è consolidato l'utilizzo di tecnologie 3D che permettono di oltrepassare alcuni limiti intrinseci del dente e garantiscono maggiore ripetibilità dei protocolli applicati.

Nonostante l'incremento di risultati positivi ottenuti grazie alle tecnologie digitali, poche metodologie sono state sviluppate per il confronto con denti interessati da usura importante della corona, condizione molto diffusa soprattutto nel record fossile; si riscontra inoltre un'ulteriore lacuna, poiché nella maggior parte dei casi le indagini si sono concentrate sulla dentatura permanente, mentre numericamente minori risultano gli studi mirati alla dentatura decidua.

Per questi motivi nella prima parte del presente studio si intende verificare il potenziale discriminante di due regioni della corona difficilmente interessate dall'usura quali l'outline coronale e l'outline cervicale, indagate in un campione di 54 secondi molari decidui mandibolari.

Dai modelli tridimensionali dei denti, uniformemente orientati in ambiente virtuale, sono stati ottenuti due profili (outline). Entrambe le outline sono state caratterizzate da 16 pseudolandmark, opportunamente scalate (dimensione del centroide=1), ed analizzate al fine di valutare le differenze della forma.

I risultati dimostrano che entrambe le outline separano con successo Neanderthal e *Homo sapiens*, con il 96% delle specie correttamente classificate. Si può quindi considerare l'outline cervicale come strumento valido per l'attribuzione tassonomica, specialmente in presenza di denti affetti da usura.

Nella seconda parte del progetto si intende verificare l'attendibilità tassonomica dell'outline coronale estratta da foto oclusali, realizzate seguendo un preciso protocollo di orientamento del dente, testandone allo stesso tempo la ripetibilità. È stato selezionato un nuovo campione di 20 secondi molari decidui moderni, e per ogni individuo è stata

realizzata un'immagine oclusale (M-ph) della corona e un modello tridimensionale (M-3d). Da entrambi M-ph e M-3D è stata estratta l'outline coronale; le due tipologie di outline sono state analizzate seguendo il protocollo illustrato nella prima sezione metodologica. I risultati dimostrano la riproducibilità del protocollo fotografico e l'attendibilità tassonomica del profilo coronale estratto dalle immagini fotografiche. Si può quindi concludere che l'outline coronale, estratta da immagini fotografiche di secondi molari decidui mandibolari opportunamente orientati, si conferma come valido strumento per la discriminazione tassonomica fra Neanderthals e uomo moderno, anche in presenza di denti affetti da usura lieve o moderata.

## 1. INTRODUZIONE

Sin dal XVIII-XIX secolo anatomisti e zoologi hanno sottolineato quale fosse il ruolo di primo piano attribuito ai denti nel tentativo di ricostruire i profili di antichi mammiferi estinti e ripercorrere correttamente il dedalo intricato delle vie seguite dall'evoluzione dei mammiferi, primati e infine dell'uomo

*“And to a paleontologist, nothing about a mammal matters more than its teeth. To paleontologists, teeth are the population markers that micro satellite sequences are to population biologist. Even when represented by only single tooth, a fossil mammal can often be identify by cusp number, relative cusp positions, and cusp hights..” (Polly P.D., 2000 p.14019).*

*“Were it not for teeth, anthropology would be a different subject. Teeth living and dead, have much to contribute in the study of ecology, paleontology, functional morphology, and systematics.”(Jernvall e Jung, 2000 p.172).* Ancora oggi la biologia, l'arqueoantropologia, l'antropologia forense devono molto ai reperti dentali, poiché notevoli sono le informazioni deducibili sul sesso, età di morte, stile di vita, abitudini alimentari, ed altri elementi utili all'identificazione del singolo individuo e al suo inserimento in un contesto popolazionistico più ampio. I denti, grazie alle loro caratteristiche chimico fisiche e alla collocazione nell'arcata alveolare, risultano difficilmente aggredibili dagli agenti chimici presenti nel terreno, rispetto ad altri distretti scheletrici la cui integrità invece è spesso compromessa. Maggiore è il tempo che ci separa dal reperto, maggiori sono le probabilità che più fattori interferiscano nella sua corretta conservazione.

In virtù della loro cospicua presenza all'interno del record fossile, nel tempo si sono moltiplicati e intensificati gli sforzi dedicati alla ricerca di nuove metodologie che permettessero di registrare e interpretare correttamente le informazioni deducibili dagli elementi dentali.

Fino a tempi recenti, l'approccio allo studio dei reperti dentali si è sostanzialmente svolto con le stesse metodologie utilizzate fin dagli inizi della ricerca antropologica. L'approccio primario è stato quello più immediato, cioè un'analisi di tipo macroscopico che comprendesse una descrizione dell'aspetto del dente dal punto di vista morfologico e una descrizione delle effettive dimensioni del reperto, quindi gli aspetti morfometrici.

Nei prossimi paragrafi verranno ripercorse le tappe metodologiche principali che hanno segnato l'evolversi dell'analisi dentale, sia dal



punto di vista morfologico sia morfometrico, illustrando le variabili di interesse, i vantaggi e i limiti applicativi.

## 1.1 MORFOLOGIA DENTALE

Una trattazione dettagliata dell'anatomia dentale risulterebbe superflua in questa sede, esistendo manuali (*Brothwell, 1981; Hillson, 1996;*) in cui l'argomento è trattato diffusamente.

Si rende tuttavia necessario un breve inquadramento delle diverse componenti alle quali si farà riferimento nel corso della dissertazione, per comprendere le problematiche metodologiche e le soluzioni adottate nel tempo dai ricercatori.

I denti si distinguono dall'apparato scheletrico perchè costituiti da due parti chiaramente distinte: la radice, accolta in apposite fossette nei processi alveolari dell'osso mandibolare e mascellare, e la corona che fuoriesce da queste fossette per rivestire un ruolo attivo nelle dinamiche masticatorie.

La corona a sua volta è composta da due tessuti: la dentina coronale, che racchiude internamente la camera pulpare", composta da una parte inorganica simile a quella dell'osso ed una parte organica in cui predomina il collagene e, in percentuale minore, elementi proteici; lo smalto, un rivestimento mineralizzato che ricopre la dentina, è costituito da una parte inorganica (apatite) ed organica (lipidi e residui proteici). La radice è costituita sempre da due tessuti, internamente la dentina che delimita la porzione radicolare della camera pulpare, mentre esternamente il cemento, un tessuto meno compatto non solo dello smalto ma anche della dentina, composto in percentuale maggiore da minerali (calcio, fosfati, ecc.) ma in quantità discreta anche da collagene ed acqua. L'area di contatto tra la corona e la radice è denominata **linea cervicale** (giunzione cemento-smalto). Infine la polpa, un tessuto molle in cui sono presenti vasi e nervi, è contenuta all'interno della camera pulpare (Fig. 1a). I denti presentano quattro pareti o facce: **la faccia vestibolare o buccale** (o labiale); **la faccia linguale**; **la faccia mesiale** e **distale**. Queste ultime costituiscono le cosiddette "facce prossimali", ulteriormente suddivise appunto in "mesiale" e "distale" in relazione alla linea mediana della faccia. Tranne M3 e m2, che presentano una faccia

libera da contatto, in tutti gli altri casi entrambe le facce prossimali dei denti si trovano in situazione di contatto reciproco ( o interprossimale)

Infine **la superficie della corona**: viene chiamata superficie oclusale nei molari e premolari, perché si occlude con i denti antagonisti. Sulla corona del dente si possono riconoscere volumetrie complesse distinguibili in “manifestazioni positive”, e all’opposto “manifestazioni negative”. Entrambe assumono un’importanza fondamentale per la descrizione morfologica e la caratterizzazione del dente, e conseguentemente anche per l’analisi morfometrica. Con “manifestazioni positive” si intendono i rilievi che ricoprono la superficie o le pareti della corona, che in relazione alla collocazione o alla dimensione assumono termini differenti (cuspidi, tubercoli, cingoli, creste)

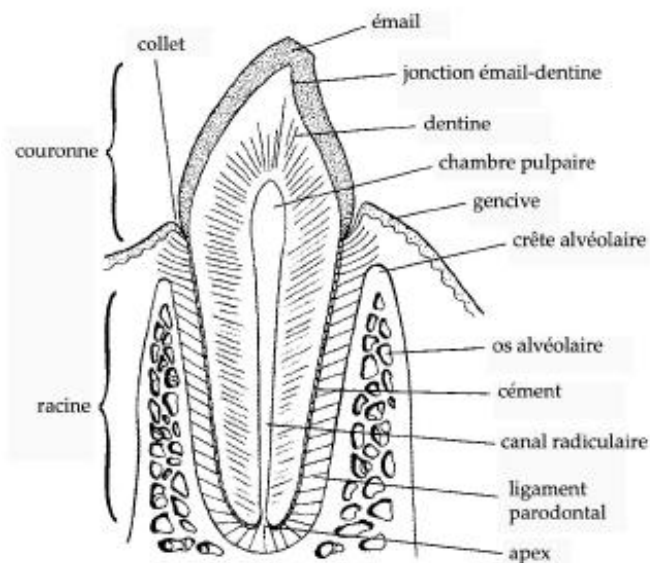


Fig.1a Sezione sagittale di un dente mandibolare con esemplificazione dei diversi tessuti dentali (Scheuer e Black, 2000)

Nello specifico della tipologia del dente molare, le quattro cuspidi principali dei molari superiori e le cinque cuspidi dei molari inferiori, costituiscono elementi fondamentali nello studio morfologico e morfometrico.

All’opposto, con “manifestazioni negative” s’intendono le depressioni, quali solchi, fosse e fossette, diversamente nominate a seconda della loro collocazione e degli elementi coinvolti.

Come già accennato, il passaggio tra la corona e la radice del dente viene sottolineato da una linea fittizia definita dalla discontinuità fra smalto e cemento della radice. Sebbene una delle caratteristiche dei denti sia quella di presentare una indiscutibile variabilità inter e intrapopolazionistica, è evidente che alcune caratteristiche morfologiche si riscontrano più o meno regolarmente nella stessa tipologia dentale, come ad esempio l'andamento della *linea cervicale*. La metodologia illustrata nel presente lavoro di ricerca ricorre alla linea cervicale essendo questa una parte difficilmente interessata da fenomeni di usura, motivo per cui vengono di seguito approfondite alcune considerazioni sulle principali caratteristiche di questa regione dentale, facendo riferimento alla specifica tipologia del dente molare.

Nei molari le convessità della linea cervicale non sono estremamente evidenti, tuttavia l'andamento è tutt'altro che rettilineo. I molari inferiori sono caratterizzati nella faccia vestibolare da una flessione di tale linea in direzione della biforcazione radicolare, così come avviene nell'aspetto linguale. È necessario differenziare l'aspetto mesiale del primo molare inferiore rispetto agli altri molari dell'emi-mandibola, poichè mentre in questi ultimi la linea cervicale tende ad essere rettilinea, il primo molare si presenta più irregolare, registrando casi che non si discostano significativamente dagli ultimi due molari, ma come più spesso accade, riscontrando irregolarità con convessità occlusale. Distalmente invece in tutti i molari si riscontra una linea regolare, rettilinea. In maniera analoga nei molari superiori si registra una certa irregolarità della faccia vestibolare, generalmente con una inflessione in corrispondenza della biforcazione delle radici buccali. Più regolare invece si presenta l'andamento della linea cervicale nell'aspetto linguale. In questo caso è possibile rilevare una depressione che a partire dal solco divisorio tra le due cuspidi linguali (protocono-ipocono) e passando per la linea cervicale, termina verso la metà della radice linguale. In corrispondenza di questa depressione a volte si scorge una lieve inflessione coronale della linea. L'aspetto mesiale, spesso irregolare nel primo molare, è generalmente rettilineo nei restanti molari superiori. Regolare invece la linea cervicale nel lato distale.

### 1.1.2 LA DESCRIZIONE MORFOLOGICA

La morfologia trova naturale applicazione nella componente descrittiva dell'osservazione. Il confronto visivo del ricercatore con il reperto, pone subito in evidenza l'aspetto critico della soggettività che si associa a tale azione. La ricerca antropologica presuppone la possibilità di usufruire di dati condivisibili, ed anche nell'eseguire una descrizione del dente si rende necessario registrarne le caratteristiche in modo tale da poter essere correttamente utilizzate per confronti successivi. Aleš Hrdlička nel 1920 per la prima volta annotò le caratteristiche dentali considerandole nell'ordine di una loro presenza/assenza, e criticò le modalità descrittive dei suoi contemporanei, tendenti a considerare il dente nella sua globalità, invece di focalizzarsi sui singoli caratteri. E' proprio nella pubblicazione del 1920 che venne messo in luce come le diverse variabili anatomiche, quando presenti, si potessero rilevare in un *range* di variazione da un minimo a un massimo di espressione. Il passo successivo fu quello di creare delle placche di riferimento (Fig. 1b) con i diversi gradi di espressione. Sicuramente i contributi dati fino ad oggi alla ricerca antropologica hanno prodotto descrizioni sempre più accurate delle caratteristiche morfologiche dentali, tuttavia mai completamente immuni dal pericolo della soggettività che l'interpretazione delle caratteristiche del singolo dente può intrinsecamente comportare.

La valutazione morfologica basata su una descrizione dettagliata del dente non richiede il sostegno di particolari elementi strumentali, e nel tempo sono stati aggiunti sempre maggiori criteri per diminuire l'errore dovuto all'osservatore nella valutazione dei tratti non metrici. Il fondamento della standardizzazione di questo aspetto metodologico trova la sua massima espressione nell'**ASUDAS** (*Arizona State University Dental Anthropology System*), un sistema di standardizzazione per lo studio della morfologia dentale ampiamente accreditato nel campo della ricerca antropologica. Dalle prime dissertazioni di Aleš Hrdlička nel 1920, attraverso i contributi di A.A. Dahlberg negli anni '40 e '50, senza dimenticare l'apporto di Hanihara (1961) per le caratteristiche della dentizione decidua, attualmente lo "standard" considera più di 28 tratti morfologici per i quali è stata constatata un'effettiva utilità per finalità comparative fra diverse popolazioni. Gli strumenti forniti sono piuttosto

semplici, costituiti da placche combinate con rappresentati i vari gradi di manifestazione dei caratteri e relative descrizioni scritte (Turner *et al.*, 1991). I tratti considerati non esauriscono l'intera casistica, bensì solo quelli relativamente semplici da valutare, che restino visibili anche in caso di usura moderata dello smalto, che non risultino soggetti a dimorfismo sessuale, ma soprattutto che abbiano una comprovata attendibilità nella caratterizzazione della variabilità e delle relazioni intra e interpopolazionistiche. Le applicazioni allo studio dell'umanità fossile sono molteplici, per citarne alcuni tra gli altri (Turner, 1985, 1990a,b,1992; Haeussler, 1995; Vargiu *et al.*, 1997; Bailey, 2000; Guatelli-Steinberg *et al.*, 2001; Irish e Guatelli-Steinberg, 2003).



Fig 1b. Esempio di placca *Asudas*, con indicazione del carattere osservabile e la visualizzazione dei gradi di espressione

La descrizione morfologica più accurata non può considerarsi totalmente esaustiva nella rappresentazione di un oggetto fisico, per il quale anche le dimensioni diventano variabili discriminanti. Nelle prossime sezioni verranno esplorati i principali approcci alla morfometria dentale analizzandone le criticità in relazione alle diverse variabili indagate.

### 1.1.3 ANALISI MORFOMETRICA TRADIZIONALE

La morfometria in campo biologico tratta dello studio quantitativo e comparativo dei caratteri morfologici o delle loro strutture. Ne consegue piuttosto naturalmente che il limite intrinseco della morfometria *in primis* sia connesso ai limiti degli strumenti utilizzati, e diversamente dalle descrizioni morfologiche è stato necessario attendere ulteriori sviluppi nel settore tecnologico per potere affrontare con nuove prospettive le problematiche connesse alle misurazioni.

Le principali dimensioni utilizzate nell'analisi dentale sono quelle che trovano i propri riferimenti nella parte bucco-linguale del dente e in quella mesio-distale, e vengono registrate manualmente con un calibro a branche scorrevoli.

Le dimensioni bucco-linguali sono considerati come diametro, ampiezza, o addirittura spessore; le dimensioni mesio-distali vengono invece in letteratura ricondotte sia all'ampiezza/larghezza ma anche lunghezza del dente (Fig.2).

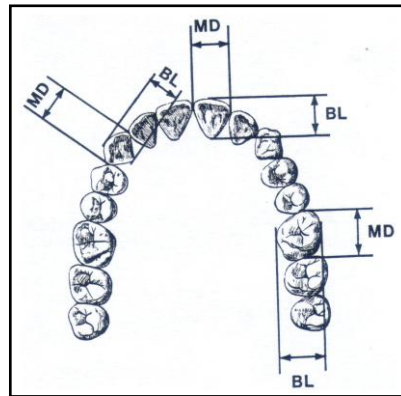


Fig.2. Rappresentazione schematica della rilevazione dei diametri mesiodistale (MD) e buccolinguale (BL). (Brace 1979)

Scorrendo la letteratura antropologica, nello specifico dell'odontometria, si rileva l'esistenza di diversi metodi per la registrazione delle principali dimensioni dentali; sono numerosi i detrattori dell'impossibilità di effettuare studi comparativi fra popolazioni umane sulla base di dati odontometrici (Kieser, 1990), poiché nella comparazione dente-dente non si può trascendere dalla variabilità intrapopolazione; tuttavia l'utilizzo di

strumenti statistici ha permesso di correlare i dati già ottenuti per indagare in maniera più sistematica alcune questioni di grande interesse quali la discriminazione fra popolazioni o individui basate su ampi corredi di misurazioni, attribuzione di un individuo ad uno specifico gruppo/popolazione, relazioni fra le diverse dimensioni dentali, verificare ruolo ed esistenza del dimorfismo sessuale in alcune tipologie dentali.

Ulteriore problematica evidenziata è la mancanza di omogeneità specifica nella nomenclatura attribuita alle misurazioni dentali. Questa lacuna in parte è stata colmata dal contributo di Goose (1963) che si limita ad attribuire la qualifica di diametri a entrambe le misure, evitando il fraintendimento che gli altri termini comporterebbero, essendo associabili anche alle valutazioni di altri distretti scheletrici.

Nonostante diversi tentativi, ancora oggi persiste una gestione della nomenclatura non perfettamente definita (*Hillson, 2005*).

Data la complessità delle forme dentali, in letteratura sono presenti diverse modalità di registrazione di queste misure, che Goose stesso indica, e che verranno poi riprese da Hillson.

- **DIAMETRO MESIODISTALE (MD):** le prime definizioni di questa misura non sono concordi sull'utilizzo della lunghezza media o quella maggiore, quella più esterna o la lunghezza della superficie occlusale del dente, in ogni caso sempre facendo riferimento a un piano con direzione mesio distale. Una definizione più precisa è di Moorrees e Reed (1954) in cui il diametro è dato come la dimensione maggiore della corona in senso mesio distale, parallela alla superficie occlusale. Questa seconda definizione è quella maggiormente seguita soprattutto da Hillson e altri colleghi (*Lukacs, 1985; Kieser, 1985*), e che trova largo impiego nell'approccio al materiale fossile. In altri studi (*Brace et al. 1979*) viene definito come la distanza fra i punti di contatto con i denti vicini, misurato parallelamente al piano occlusale, o come specificato in altri (*Nelson, 1938*), per molari e premolari viene misurato parallelamente all'asse mediano mesio distale della corona in corrispondenza delle faccette interprossimali.
- **DIAMETRO BUCCOLINGUALE (BL):** si intende solitamente il diametro massimo della corona rilevato successivamente e perpendicolarmente al diametro mesio-distale. La particolarità di questa misura si riscontra nella necessità per i denti molari di essere rilevata in due differenti modalità (*Mayhall, 1992*), poiché

la morfologia dei molari mascellari e mandibolari non permette una rilevazione univoca, ma soprattutto non permette il rispetto del parametro dell'ortogonalità con l'altro diametro principale; per questo motivo si tende a privilegiare la dimensione massima (*Tobias, 1967*) per aumentare la ripetibilità della corretta rilevazione.

- **ALTEZZA DELLA CORONA:** questo dato è tra i più difficili da rilevare perché maggiormente soggetto a invalidazione causa la presenza dell'usura dello smalto della corona dentale. Per questo motivo si tende a rilevare questa misura fra la linea cervicale del dente e il punto più profondo del solco fra le cuspidi dei denti. Ne consegue naturalmente che essendo la misura maggiormente soggetta ad alterazione, l'altezza della corona non venga quasi mai utilizzata nello studio dei reperti fossili, per i quali nella stragrande maggioranza dei casi si è costretti a confrontarsi con denti fortemente usurati dall'attività masticatoria e paramasticatoria.

Si preferisce quindi adottare le misure dei diametri per ottenere i principali indici antropometrici utilizzati per la descrizione degli elementi dentali (robustezza e indice della corona).

Appare piuttosto evidente che l'approccio metodologico fin' ora utilizzato per le rilevazioni morfometriche manifesta diversi limiti, evidenziati da quasi tutti gli autori fin'ora citati (*Kieser, 1990*). I denti infatti, ancor più che altri distretti scheletrici, presentano una forma complessa e irregolare, sulla quale è difficile standardizzare punti di riferimento per procedere alle misurazioni, così come sostenuto da Hillson (1986), e per i quali appare ancor più evidente che le limitate misurazioni eseguibili non possono rendere conto della complessità totale del dente in se'. Inoltre, come già riportato precedentemente, nemmeno nelle misurazioni codificate esistono punti anatomici di reperi per eseguire le rilevazioni, e le diverse interpretazioni date non fanno che aumentare la possibilità dell'errore fra i diversi operatori.

In aggiunta, i riferimenti utilizzati per il corretto rilievo delle misurazioni sono spesso soggetti all'influenza dell'orientamento del dente nello spazio, e allo stesso tempo all'impossibilità di verificare l'ortogonalità relativa fra diametri. La conseguenza di queste osservazioni è espressa da Tobias (1967), quando propone di riconsiderare le misure dentali solo in funzione delle dimensioni massime del dente, tralasciando l'aspetto



dell'ortogonalità impossibile da monitorare in una misurazione con strumenti manuali.

In ultimo, ma di fondamentale importanza metodologica, è la presenza dell'usura. L'usura dentale può manifestarsi, in base alla tipologia di dente in oggetto, in diverse aree e con diverse intensità, andando quindi ad inficiare una corretta misurazione del dente: la regione dentale maggiormente compromessa dall'usura è solitamente la superficie oclusale, rendendo impraticabile il rilievo dell'altezza della corona. L'usura della superficie oclusale inoltre, anche se più raramente, può arrivare anche a compromettere le effettive dimensioni del diametro bucco-linguale. Per quanto riguarda il diametro mesio-distale, esso è nella maggior parte dei casi alterato dalla presenza di faccette interprossimali di usura. Si può quindi concludere che i fattori che portano all'errore sono molteplici e di diversa natura:

- La complessità della forma dentale in sé che non offre punti anatomici precisi di riferimento, rendendo ulteriormente difficoltoso il rilievo manuale.
- Errore dovuto all'osservatore, causa di disomogeneità operativa
- Errore tecnologico sistematico dovuto allo strumento utilizzato per le rilevazioni
- Errore dovuto all'alterazione della corona dentale a causa dell'usura dello smalto, manifestazioni patologiche quali carie e concrezioni tartariche.

Se per i primi punti riferiti al rilievo manuale non è possibile trovare correttivi assolutamente efficaci, in tempi recenti si è cercato di agire sulla possibilità di individuare misurazioni di facile esecuzione e che potessero risultare attendibili pur in presenza di usura della corona. I risultati raggiunti da Hillson (*et al.*, 2005) hanno aperto nuove possibilità in questo senso, grazie all'osservazione della relazione fra le misure tradizionali e le nuove proposte, utilizzando un campione di denti non affetti da usura. Il fulcro dello studio riguarda le misurazioni in corrispondenza della linea cervicale del dente (fig XX), che molto raramente risulta interessata dall'usura. E' stato dimostrato che queste misurazioni non portano particolari vantaggi in relazione ai diametri bucco-linguali, mentre diventano cruciali per i diametri mesio-distali, specialmente per i denti anteriori. La possibilità di trovare una relazione che dia attendibilità anche a misurazioni ottenute nonostante la presenza

dell'usura dentale permette di ottenere maggiori informazioni nel confronto con il materiale fossile

Infine, una proposta alternativa, nello specifico dei molari, riguarda la rilevazione dei diametri diagonali della corona (dal punto mesio-buccale a disto-linguale e da mesio-linguale a disto-buccale). In questo modo è sufficiente ruotare il dente fino ad ottenere la misura massima senza necessitare di particolare esperienza da parte dell'operatore (Fig.3).

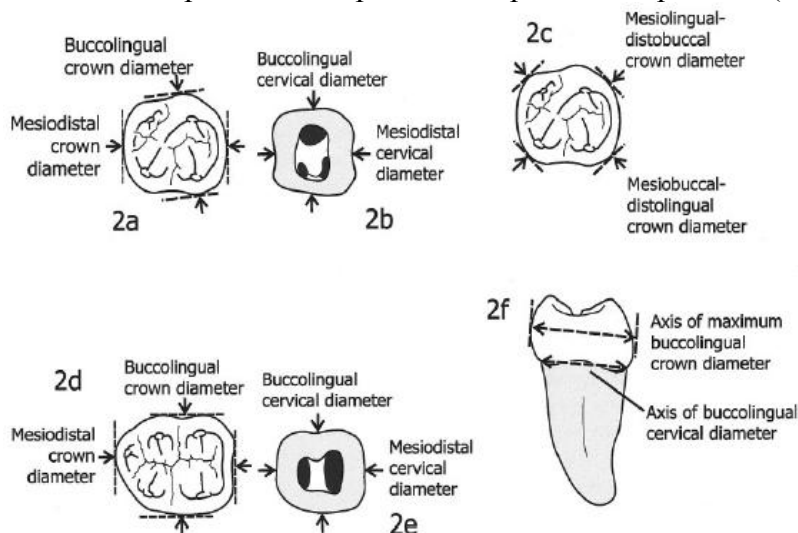


Fig.3. Diametro coronale e cervicale misurati nei molari. **2a,c** Molare superiore in vista occlusale; **2b** Molare superiore, sezione trasversale a livello cervicale; **2d** Molare inferiore, vista occlusale; **2e** Molare inferiore, sezione trasversale a livello cervicale; **2f** Molare inferiore, vista mesiale

Le misure fin'ora illustrate costituiscono le basi per la rilevazione delle principali dimensioni dei resti dentali; tuttavia si è ben consapevoli del fatto che non siano sufficienti a rappresentare volumetrie complesse come ad esempio quelle delle cuspidi coronali, e di altri caratteri dentali il cui grado di manifestazione riveste notevole importanza tassonomica. La valutazione morfometrica infatti non può prescindere dall'esame degli altri tessuti che compongono il dente, e che insieme contribuiscono alla sua variabilità complessiva. Pur riconoscendo la pari importanza attribuita sia alla superficie esterna, sia alle proporzioni dei tessuti, le indagini hanno seguito percorsi diversificati, subordinati alle tecnologie disponibili. Si vedrà di seguito come fin dai primi anni '70 l'introduzione dell'analisi di immagine fotografica abbia dato nuovi riferimenti agli antropologi nell'approccio con la superficie coronale del dente, mentre

per l'accesso ai tessuti interni si dovrà attendere la validazione di sistemi di acquisizione più complessi.

## 1.2 METODI DIGITALI PER LO STUDIO DEI DENTI

Un significativo cambiamento nell'approccio alla morfometria dentale si attesta a partire dalla diffusione dell'utilizzo di immagini bidimensionali (*Biggerstaff, 1970*). Le immagini a disposizione dei ricercatori provengono da due diverse modalità di acquisizione: immagini fotografiche, che restituiscono informazioni sulla superficie esterna, e immagini ricavate da raggi X o Tomografie Computerizzate per avere accesso alla struttura interna del dente.

### 1.2.1 2D – IMMAGINI FOTOGRAFICHE

Le immagini fotografiche sono adoperate per acquisire la superficie oclusale. Pur con alcune modifiche nel corso del tempo, i passaggi metodologici possono essere esemplificati come segue.

Per le riprese si utilizza una macchina fotografica, a pellicola o digitale, munita di sistemi di livellamento, alla quale nel tempo sono stati integrati computer, schermi per ottimizzare la visione dell'inquadratura, e software dedicati all'analisi d'immagine.

L'orientamento preventivo del dente costituisce una fase delicata per ottenere un dato comparabile. I supporti scelti non sono sempre indicati, ma tra quelli utilizzati troviamo un piano in legno (*Peretz et al., 1997*), o un letto di graniglia metallica (*Harris e Dinh, 2006*). Le soluzioni adottate per il corretto posizionamento in favore di camera della superficie oclusale del dente differiscono fra i gruppi di ricerca, ma tutti perseguono la perpendicolarità del piano d'orientamento rispetto all'asse della fotocamera, così da garantire una ripresa zenitale. *Peretz et al. (1997)* utilizza l'altezza delle cuspidi assicurandosi che gli apici risultino alla stessa altezza e paralleli al piano; *Harris e Dinh (2006)* standardizzano la vista oclusale minimizzando le viste laterali e portando la superficie perpendicolare all'asse della fotocamera; *Kondo e Townsend (2006)* posizionano gli apici delle tre cuspidi principali sullo stesso piano; *Bailey (2004)* verifica che il lato buccale, e dove possibile anche quello distale della linea cervicale, risultino perpendicolari al

punto di fuoco della fotocamera, così da approssimare la posizione anatomica del dente; similmente anche Martín-Torres e colleghi (2006) utilizzano la linea cervicale come riferimento. Quando è possibile, gli apici delle cuspidi vengono marcati a grafite per risultare più leggibili. In ultimo, per completare l'allestimento si rende necessaria l'introduzione di una scala metrica di riferimento, posta parallelamente e allo stesso livello della superficie occlusale, rendendo così possibile la calibrazione di ogni immagine.

Il tipo di variabile scelta e la consistenza numerica del campione determinano la potenza dello studio, come sottolineato da Wood e Abbott, che nel 1983 analizzarono 196 molari di ominidi del Plio- e del Pleistocene con il supporto di immagini bidimensionali per creare un cospicuo *dataset* di riferimento per studi successivi.

Ad essere maggiormente indagate con i nuovi supporti sono le variabili morfometriche e le loro relazioni, ad esempio in molari permanenti (perimetri e aree della vista occlusale, diametri dentali e distanze fra le cuspidi).

**L'area della superficie occlusale** viene rilevata per mezzo di un planimetro (*Le Blanc et al., 1974*). **La distanza fra le cuspidi** del primo molare permanente inferiore viene misurata da Sekikawa (*et al., 1988*) per effettuare confronti fra popolazioni moderne, mentre Peretz (*et al., 1998 a*) la utilizza associata agli angoli fra le cuspidi per identificare i parametri distintivi di un gruppo affetto da sindrome di Down rispetto a un gruppo di controllo.

**Le distanze fra le cuspidi e gli angoli** formati da queste ultime sono indagati da Harris e Dinh (2006) in un campione di 160 denti molari mascellari permanenti, appartenenti alla popolazione bianca contemporanea del Nord America, comprendendo nella misurazione sia il primo che il secondo molare, per valutare il gradiente di variabilità fra i due elementi dentali all'interno della popolazione.

Bailey (2004), utilizza le stesse variabili integrandole con la misurazione delle **aree delle cuspidi** (ottenute tracciando la parte di perimetro occlusale e le depressioni che dividono fra loro le cuspidi), focalizzando l'analisi sul primo molare permanente mascellare per confrontare l'uomo moderno con un campione neandertaliano (Fig.4).

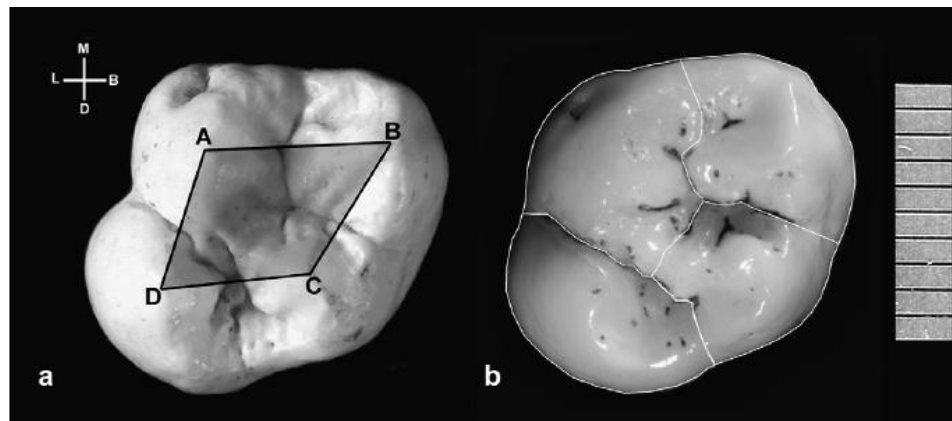


Fig.4 Primo molare superiore con evidenziati **a)** poligono oclusale e angoli delle cuspidi **b)** area delle cuspidi (Bailey *et al.* 2008)

Le aree delle cuspidi dei primi molari permanenti mascellari, associate alle **dimensioni generali della corona**, sono oggetto di studio anche per Kondo e Townsend (2006), per valutare le diverse espressioni della cuspidi di Carabelli in associazione allo sviluppo della corona. A tale scopo sono state calcolate le aree delle 4 cuspidi principali del molare, l'area della cuspidi di Carabelli, ed è stata confrontata la variabilità delle aree delle cuspidi in relazione al tempo di sviluppo /accrescimento; infine sono stati effettuati confronti fra maschi e femmine descrivendo come la cuspidi di Carabelli interagisce con le altre.

Altre caratteristiche della corona nei primi molari permanenti moderni non ancora trattate, sono quelle utilizzate da Ferrario (*et al.* 1999): **outline** del profilo **occlusale** identificato dalle creste marginali e delle cuspidi, e la **circonferenza massima** (equatore). Il campione di 259 denti viene analizzato per valutare quali siano le caratteristiche di un dente normale e sano, per poi approfondire il dimorfismo sessuale.

Il profilo oclusale viene utilizzato da Bailey e Linch (2005), per evidenziare eventuali differenze tassonomiche nella forma delle corone di secondi premolari di Neanderthal e Uomo Anatomicamente Moderno così da poter classificare correttamente denti isolati in contesti archeologici di dubbia attribuzione.

Un nuovo impulso metodologico viene dato da Martín-Torres e colleghi (2006), con uno studio su premolari mandibolari e le variazioni morfologiche fra varie specie di ominidi fossili, con particolare attenzione al genere Homo (Fig.5). In questo caso il contributo innovativo deriva dall'applicazione di metodi di geometria morfometrica basati sull'utilizzo di landmarks e semilandmarks digitalizzati nelle

immagini 2D (Rohlf e Slice, 1990; Bookstein, 1991; Robinson et al., 2002; Adams et al., 2004).

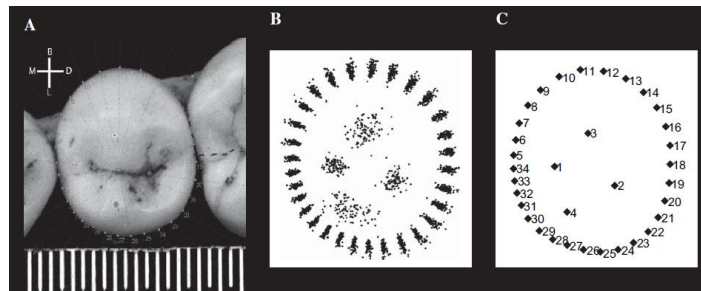


Fig.5. A TPS immagine oclusale digitalizzata di un secondo premolare mandibolare destro con evidenziati 4 landmarks e 30 semilandmarks; B Superimposizione di tutto il campione tramite Generalized Procrustes Analysis (GPA); C Configurazione dei landmarks e semilandmarks della Mean Shape del gruppo. (Martín-Torres et al., 2006)

La morfometria geometrica si dimostra uno strumento estremamente efficace, offrendo la possibilità di scindere forma (shape) e dimensioni (size).

La forma (shape) può essere definita come “*The geometric properties of a configuration of points that are invariant to changes in translation, rotation, and scale*”(Slice,2005,p.4). I landmarks consistono in punti omologhi che catturano la geometria delle strutture a confronto: più consistente risulta l’omologia dei punti individuati, maggiore è la probabilità di ottenere interpretazioni biologiche complete. Per questo motivo i landmarks vengono classificati in base alle proprietà geometriche dei punti che descrivono (Bookstein, 1991). Per ottenere una configurazione geometrica accurata di alcuni profili caratteristici possono essere utilizzati dei semilandmarks, ovvero punti che non comportano significato biologico ma che, attraverso opportuni algoritmi che li rendono geometricamente omologhi, sono posti a descrivere strutture delimitate da Landmarks. Le configurazioni di coordinate “xy” (in 2D) o “xyz” (in 3D) degli individui vengono poi analizzate tramite metodi di geometria morfometrica, che generalmente prevedono 1) la trasformazione delle coordinate dallo spazio euclideo a quello definito “shape-space” e 2) l’analisi delle “Procrustes coordinates” con statistica multivariata. Queste analisi permettono di valutare la variabilità all’interno del gruppo e tra gruppi (within group and inter groups), ma ovviamente (come tutte le analisi statistiche) non forniscono alcuna interpretazione biologica, che rimane a carico del ricercatore.

Peretz (*et al.*, 2006) utilizza la geometria morfometrica per l'analisi di crani e primi molari mascellari; l'approccio basato sull'utilizzo di serie di landmarks biologici con coordinate a due o tre dimensioni, viene in parte ridiscusso, poiché emerge che l'utilizzo dei landmarks potrebbe non essere sufficiente per descrivere alcune peculiari forme biologiche o conformazioni; per questa ragione propone un'alternativa di *sliding semilandmarks*, per catturare la complessità di alcuni profili come ad esempio le outline (Bookstein, 1997). Per attuare lo scorrimento dei punti lungo un outline, la scelta può avvenire fra l'applicazione della *minimum Bending Energy* (Bookstein 1997) e la proiezione perpendicolare della *minimum Procrustes Distance* (Sheets et al 2004). Gomez-Robles (*et al.*, 2007) applica la geometria morfometrica all'assegnazione tassonomica di primi molari superiori di uomo moderno e neandertaliano, per valutare le variabilità morfologiche attraverso il record fossile umano e le relazioni fenetiche tra i diversi taxa. Lo studio si focalizza sulle relazioni fra le popolazioni europee del Pleistocene Medio europeo (*H. heidelbergensis*) con *H. neanderthalensis* e *H. sapiens*; per esemplificare la polarità dei tratti osservati sono stati inclusi nel campione anche *Australopithecus* e altri uomini arcaici.

### 1.2.2 I LIMITI

Come da considerazioni espresse da Arnqvist e Martensson (1998) le diverse fonti di criticità del protocollo di analisi di immagine possono essere definite come errori "metodologici", errori "strumentali", errori "dell'operatore"

Bayle (*et al.*, 2004) propone una partizione ancora più specifica della trattazione:

- **Cause tecniche:** viene fatta distinzione sul *tipo di fotografia*, se digitale o pellicola fotografica tradizionale: in realtà con il miglioramento progressivo delle prestazioni, ad oggi si può accedere facilmente a strumenti molto efficaci e prestanti, ad ogni modo anche con mezzi più "tradizionali" l'errore relativo a questo fattore può considerarsi marginale. Rilevante risulta anche *l'errore di parallasse* della macchina fotografica: l'asse ottico della fotocamera deve essere perpendicolare al piano di riferimento, diversamente l'immagine ottenuta presenterà una

calibrazione falsata e una distorsione che ne invaliderà l'attendibilità per le rilevazioni; infine il software utilizzato per l'analisi: ci sono molti software dedicati all'analisi morfometrica e che includono la funzione di calibrazione dell'immagine, l'identificazione di landmarks con la possibilità di tracciare curve, calcolare aree, perimetri e distanze. Maggiore è la possibilità di interazione col software e la precisione nell'identificazione dei punti, maggiore sarà l'attendibilità del risultato .

- **Errori di tipo metodologico:** il gruppo comprende in primo luogo i limiti delle misurazioni, poichè i metodi bidimensionali permettono di ottenere informazioni morfometriche più consistenti rispetto ai metodi tradizionali, tuttavia le informazioni ottenute sono solo di tipo lineare (ampiezza , lunghezza perimetro) o quadratiche (area), tutte riferite alla proiezione su un piano di riferimento della superficie del dente; direttamente conseguente risulta la perdita di informazioni, dal momento che per la corretta interpretazione morfologica di determinati tratti (es. il cingolo, le cuspidi), l'immagine bidimensionale non rende conto della complessità spaziale, così che pur considerando l'ipotesi di rilevare immagini di tutte le viste del dente, esse non sono sufficienti. L'orientamento del dente può influire sulla geometria finale su cui verrà eseguita l'analisi; mancando una standardizzazione delle procedure, il problema caratterizza anche l'elaborazione di modelli tridimensionali , come si vedrà in seguito; la messa a punto della scala metrica di riferimento: la scelta del posizionamento della scala è soggettivo, inoltre si assume il fatto che sia possibile orientare manualmente la superficie oclusale del dente fino a portarla parallela al piano visivo della fotocamera e che quindi sia poi possibile porre la scala perpendicolarmente all'asse della fotocamera stessa. Tuttavia gli esempi citati nei lavori precedenti (*Bailey 2004; Kondo e Townsend, 2006*) mettono in luce la difficoltà oggettiva nel posizionare correttamente la scala metrica, poiché i riferimenti sono dati da un ipotetico piano oclusale identificati sul dente a sua volta posizionato manualmente, risulta obiettivamente inattendibile. In parte il problema è stato risolto con l'introduzione di macchine fotografiche con incluso un software di auto calibrazione (*Ferrario et al., 1999*). In ultimo la calibrazione delle scala e l'individuazione di punti utili sull'immagine digitale: trattandosi di un processo gestito



dall'operatore è facile intuire la possibilità di errore, tuttavia l'accuratezza possibile grazie ai supporti tecnici consente una certa ripetibilità delle misure da parte dello stesso operatore o da un partner di studio, con errore di tipo marginale (Bailey 2004).

- Errori dovuti alla **forma dell'oggetto analizzato**: lo stato di conservazione del dente influisce notevolmente sull'acquisizione, poiché la presenza di usura rende la superficie estremamente riflettente e altera i riferimenti biologici sulla corona: le cuspidi sono tra i primi elementi ad essere intaccati, motivo per cui quando l'usura ne compromette sensibilmente l'altezza, i punti da identificare vengono per assenso posti al centro dell'area di base, ma senza alcun tipo di riferimento se non l'esperienza dell'osservatore (Bailey et al., 2004); infine la difficoltà nel reperimento di materiale d'interesse, in caso di reperti di grande valore o fragilità.
- **Errore inter e intra osservatore**: Robinson e colleghi (Robinson et al., 2002) valutano l'errore inter-osservatore durante la rilevazione di una serie di punti su immagini bidimensionali di superfici occlusali e buccali di diverse tipologie dentali. La conclusione tratta alla fine delle osservazioni è che l'errore maggiore deriva dalle immagini occlusali, e che ciò dipende in larga misura dall'orientamento adottato prima della fotografia. Le criticità del protocollo d'analisi d'immagine evidenziate precedentemente sono state puntualmente verificate nello studio di Bailey e colleghi (2004), al fine di ponderare e quantificare ogni fattore nella valutazione generale dell'errore inter e intra osservatore. La rilevazione dell'area di base delle cuspidi è stata condotta da due ricercatori su un campione di primi molari mascellari di *Pan Paniscus* e *Pan Troglodytes*. Cuspidi, creste e fosse sono state analizzate per capire i fattori che rendevano alcune rilevazioni più difficili di altre e in che modo l'usura influisse, ad esempio, verificando il grado di usura dei denti che contribuivano alla generazione dell'errore nei test di verifica finale. Dal momento che i risultati ottenuti dai diversi operatori differivano in maniera poco significativa, gli autori hanno concluso che nonostante le leggere differenze nella procedura di orientamento, i risultati non ne fossero inficiati, ferma restando l'accuratezza necessaria per l'orientamento e il posizionamento della scala. Nonostante gli ottimi risultati raggiunti, Robinson puntualizza che l'orientamento, soprattutto per quanto riguarda

l'analisi delle superfici occlusali non va sottovalutata, poiché anche una leggera inclinazione può modificare la geometria dei profili e la reale posizione delle serie di punti utilizzati nelle analisi.

### 1.2.3. 2D – IMMAGINI RAGGI X E TC

Lo spessore dello smalto e le diverse proporzioni fra tessuti dentali costituiscono un altro strumento importante nello studio dei primati, per la tassonomia e adattamento umani (*Molnar et al., 1993*).

Lo studio di Grine (2005) si inserisce all'interno di un dibattito iniziato negli anni '90 sulle proporzioni dello smalto in molari decidui e permanenti correlate a modelli funzionali di biomeccanica masticatoria (*Macho e Berner, 1993*). Lo studio di Grine si pone quindi nell'ottica di verificare la variazione dello spessore dello smalto in un campione geograficamente eterogeneo di uomo moderno da integrare ai dati già noti in letteratura. I risultati ottenuti da Grine, ricondurrebbero la riduzione dei molari nell'uomo moderno a un processo odontogenetico, solo in parte ascrivibile a necessità biomeccaniche di adattamento funzionale. Per questo motivo lo spessore dello smalto viene indagato come variabile nella discriminazione fra taxa e all'interno del genere Homo, (ma non solo; infatti, dato che sussiste una certa correlazione tra lo spessore dello smalto ed il tipo di dieta [ad una dieta folivora è generalmente associato smalto sottile, mentre ad una dieta frugivora è associato uno smalto più spesso], la proporzione dei tessuti dentali – smalto e dentina – varia nei primati e può quindi essere utilizzato per finalità tassonomiche), e come si vedrà in seguito nella trattazione specifica dell'argomento, l'utilizzo di strumentazioni che permettono una lettura accurata dello spessore dello smalto in modo non invasivo, renderanno possibili analisi più approfondite.

Infatti a causa della discussione in atto sulla scarsa affidabilità dei dati ottenuti tramite radiografia e l'inaccuratezza dei dati grezzi ottenuti tramite semplice TC, di cui si discuterà in seguito, nel suo studio Grine decide di procedere con sezioni fisiche; pur non trattandosi di un vero e proprio metodo di analisi di "immagine" (poiché le immagini vengono realizzate compromettendo l'integrità del dente, a differenza di quelle realizzate nei lavori fin'ora descritti), si riporta ugualmente (Fig. 6) la

schematizzazione delle misurazioni proposte, poichè in seguito saranno attuate con metodiche meno invasive.

Le misurazioni eseguite comprendono 3 aree e 10 misure lineari in accordo alle notazioni di Martin (1983) , per evitare fraintendimenti con l'introduzione di annotazioni alternative.

Olejniczack (2006) utilizza radiografie laterali per effettuare le misurazioni lineari dello smalto in ominidi fossili e recenti. I raggi X permettono sicuramente di distinguere lo smalto sottile dei denti decidui e quello più spesso dei denti permanenti, tuttavia per quanto riguarda la misurazione accurata dello spessore dello smalto, le immagini radiografiche non sono sufficienti. Anche le prime immagini ottenute da Tc non sono sufficientemente accurate, e a causa della bassa risoluzione risulta difficoltoso distinguere la discontinuità fra i diversi tessuti. Per questi motivi si dovrà attendere lo sviluppo e la diffusione della microtomografia computerizzata per poter analizzare con maggior precisione le proporzioni dei tessuti dentali.

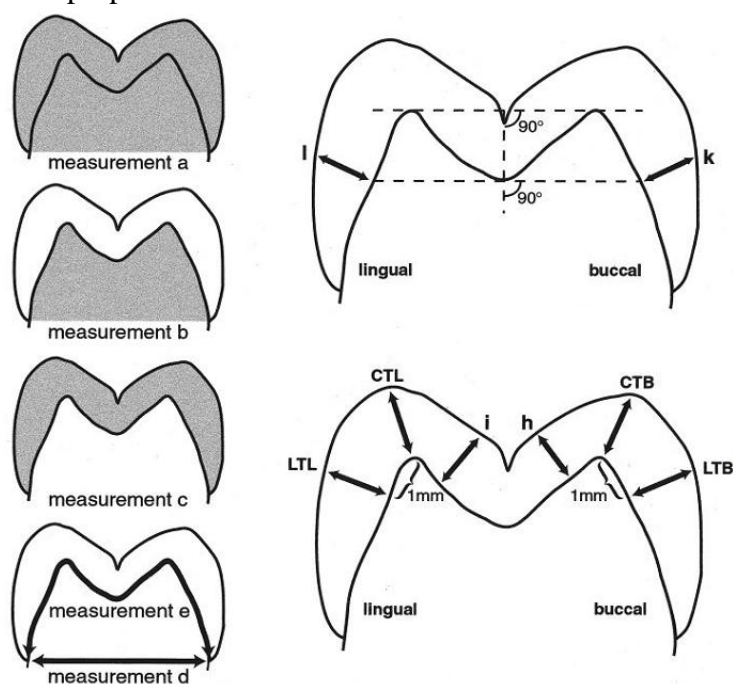


Fig 6. . Cross-Section della corona dentale e misurazioni effettuate. a)Area totale della sezione della corona del dente; b)Area della dentina; c)Area della sezione della cappa di smalto; d) Distanza lineare fra i margini cervicali buccale e linguale; e) Lunghezza del perimetro della giunzione smalto dentina fra i margini cervicali buccale e linguale; h)

Spessore lineare massimo dello smalto oclusale sulla cuspidale buccale; j) Spessore lineare massimo dello smalto oclusale sulla cuspidale linguale; k) Spessore lineare sul lato buccale della cuspidale buccale; l) Spessore lineare sul lato linguale della cuspidale linguale. CTB. Spessore lineare dello smalto sull'apice della cuspidale buccale; CTL. Spessore lineare dello smalto sull'apice della cuspidale linguale; LTB. Spessore lineare massimo dello smalto sul lato buccale della cuspidale buccale; LTL. Spessore lineare massimo dello smalto sul lato linguale della cuspidale linguale (Grine, 2005)

#### 1.2.4 3D- INTRODUZIONE

Solo di recente la ricerca paleo-antropologica ha iniziato a servirsi sistematicamente di tecnologie originariamente dedicate a finalità biomedicali e ingegneristiche per analizzare reperti fossili di grande interesse.

E' necessario valutare attentamente quali informazioni possano essere ricavate in funzione degli interrogativi espressi, e quale approccio possa risultare maggiormente fruttuoso in relazione alle caratteristiche del reperto.

Per questo motivo inizialmente è stato dato ampio spazio alla ricostruzione virtuale del distretto cranio facciale con il supporto della microtomografia: il modello tridimensionale del cranio permette di analizzare le strutture dell'endocranio ampliando le possibilità di verifica delle ipotesi riguardanti la socializzazione, il linguaggio, e altri aspetti legati allo sviluppo cognitivo dell'essere umano (Gunz et al., 2011; Gunz et al., 2012). In seguito l'approccio tridimensionale è stato esteso anche allo scheletro postcraniale (De Groot et al. 2010; Frelat et al. 2012). Inoltre proprio grazie alla micro CT di ultima generazione è ora possibile analizzare con precisione anche reperti di piccole dimensioni, come i denti (Kono 2004; Kono et al., 2005; Kono et., al 2008; Avishai et al., 2004; Rossi et al., 2004; Macchiarelli et al., 2006).

I sistemi di acquisizione tridimensionale attualmente diffusi possono essere raggruppati in due macro categorie:

- strumenti che permettono di acquisire solo la superficie esterna dell'oggetto andando a ricreare un modello virtuale di identica complessità e volumetria, ma al contempo "vuoto" all'interno; in questa categoria ricadono gran parte degli strumenti attualmente in commercio per scopi prettamente industriali, e fra i quali sono disponibili diverse sistematiche di acquisizione: laser scanner, touch scanner e luce strutturata.

- strumenti che permettono un'analisi completa dell'oggetto, estesa anche alle sue sezioni più interne, evitando così metodiche decisamente invasive; in questa seconda categoria ricadono tutte le strumentazioni quali tomografie e micro tomografie computerizzate, risonanza magnetica, radiazione sincrotrone.

La sempre maggiore consapevolezza delle nuove possibilità aperte in questo campo di ricognizione ha motivato diversi studiosi alla creazione di vere e proprie banche dati contenenti, ove possibile, acquisizioni tridimensionali dei fossili di maggiore interesse; anche nel presente studio parte del campione utilizzato è costituito da modelli tridimensionali di elementi dentali fossili resi disponibili sul server NESPOS (<https://www.nespos.org/display/openspace/Home>).

Le scansioni tridimensionali permettono di oltrepassare alcuni limiti delle immagini bidimensionali, rendendo possibile ad esempio la valutazione delle reciproche posizioni nello spazio dei diversi elementi dentali e altre correlazioni non verificabili con metodi più tradizionali, oltre a un'esplorazione accurata delle proporzioni interne dei tessuti.

Si tratta di tecnologie che apportano notevoli vantaggi ma è innegabile che richiedano specifiche competenze per il loro utilizzo: la gestione dei software e dei modelli tridimensionali richiedono lunga pratica, motivo per cui i primi lavori svolti sono stati realizzati in collaborazione fra ingegneri e antropologi (Zuccotti *et al.*, 1998; Jernvall e Selanne, 1999).

#### 1.2.5 3D - SUPERFICIE ESTERNA

Uno degli aspetti più significativi del disporre di modelli tridimensionali in ambiente virtuale è rappresentato dalla possibilità di esplorare volumetrie inaccessibili ai semplici sistemi bidimensionali.

L'innovatività della ricerca di Zuccotti (*et al.*, 1998), in seguito sperimentata anche da altri (Jernvall e Selanne 1999; Ungar e Williamson, 2000; Reed, 1997) risiede principalmente nell'adozione di modelli tridimensionali che permettono un'analisi "topografica" delle superfici interessate, per dedurre/predire aspetti della dieta e delle abitudini di alimentazioni nei primati viventi. Allo scopo sono stati realizzati dei calchi ad alta risoluzione in resina epossidica dei denti di ominoidi esistenti (*Gorilla gorilla*, *Pan troglodytes*, e *Pongo pygmaeus*)

e alcuni fossili di catarrine del Miocene (*Afropithecus turkanesis* e *Dryopithecus laietanus*). (Fig.7)

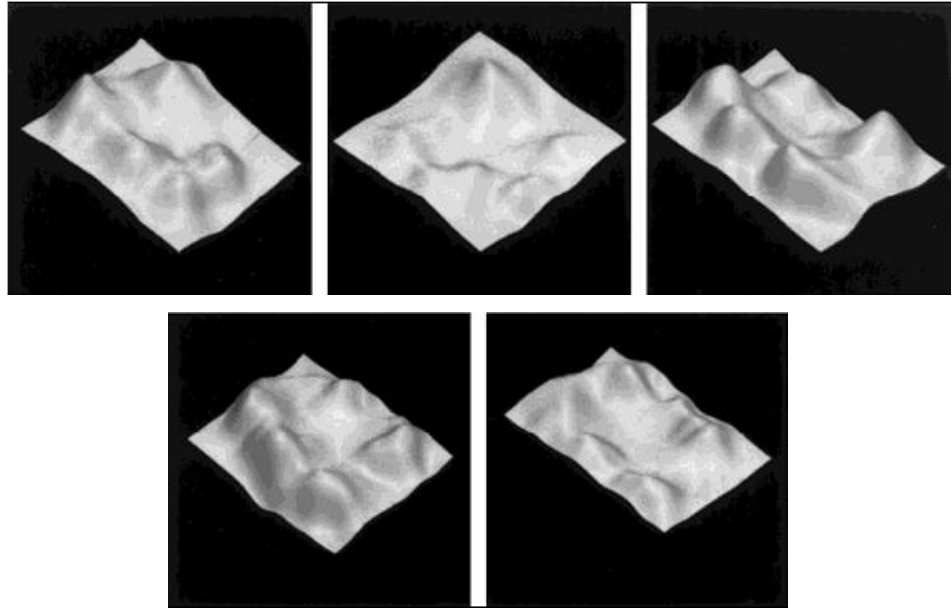


Fig.7. Modelli tridimensionali delle superfici dentali degli ominoidei esaminati: da sinistra verso destra, *Afropithecus*, *Dryopithecus*, *Gorilla*, *Pan*, *Pongo*. (Zuccotti et al., 1998)

I modelli ottenuti sono stati trattati con il Software Grass 4.1, all'interno del quale è possibile calcolare profilo e pendenza della superficie, isolare le singole cuspidi e calcolarne volume e pendenza media. Tra le applicazioni del software è compreso anche uno strumento specifico per misurare il volume del liquido contenuto in un ipotetico bacino: trattando la superficie oclusale del dente come un 'entità topografica, le cuspidi vengono interpretate come rilievi e il programma ne quantifica il volume d'acqua delimitato dalla superficie interna delle cuspidi. Seppure estremamente avanzato per i tempi, lo studio di Zuccotti non è esente da critiche metodologiche: lo strumento utilizzato e le modalità di acquisizione non sono le migliori auspicabili, così da richiedere un intervento sostanziale dell'operatore nella gestione dei dati.

Trattandosi di tecnologie nuove al settore antropologico, i primi lavori svolti mirano principalmente a individuare quali siano le tecnologie e le modalità di acquisizione ottimali.

Una diversa applicazione tecnologica, per registrare e analizzare la morfologia della corona dentale di mammiferi con minima perdita di informazioni sulla forma originale, segnando quindi un discreto progresso rispetto al precedente studio, viene applicata da Jernvall e Selanne (1999): grazie alla microscopia confocale laser si possono generare modelli digitali delle corone dentali, poi esportabili per le analisi nel Sistema di Informazione Geografica (GIS). Il principio di azione del microscopio confocale ben si adatta a questo tipo di indagine, non potendo fare a meno di notare che l'acquisizione per piani focali della sola luce riflessa, viene a ricreare un procedimento per sezioni multiple molto simile al principio della micro CT ( Fig.8).

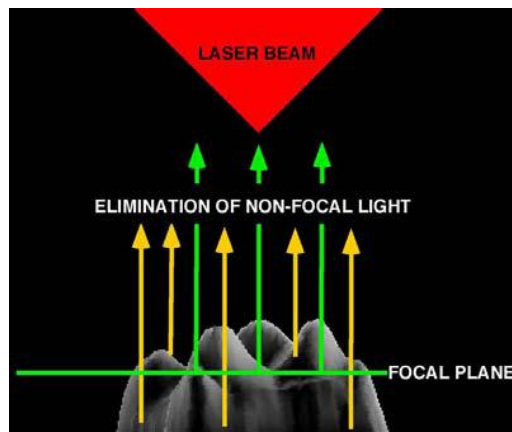


Fig.8. Dente sezionato otticamente con microscopio laser confocale. Il dente è illuminato con un fascio laser, e solo la luce riflessa dal piano focale (verde) viene catturata. La sezione ottica è realizzata muovendo verticalmente il piano focale (Jernvall e Selänne, 1999)

La registrazione delle superfici è stata effettuata in più riprese, a diverso grado di risoluzione per testarne la diversa affidabilità ( con una risoluzione a 50  $\mu\text{m}$  si ottengono i risultati più attendibili).

Con l'intensificarsi delle collaborazioni si assiste a una sperimentazione costante di nuovi protocolli pensati per diversi macchinari, nel tentativo di identificare la procedura ottimale.

Percorrendo le tappe principali nell'evoluzione metodologica, Ungar e Williamson (2000) utilizzano uno scanner laser (Surveyor 500 con un laser RPS 450, Laser Design, Inc.), per creare modelli 3D della superficie occlusale di cinque secondi molari mandibolari di *Gorilla gorilla*, caratterizzati da un diverso grado di usura. La ricerca propone un nuovo

metodo per meglio definire e comparare l'anatomia dentale di denti soggetti a condizioni variabili di usura, considerando infatti che nei lavori precedenti, così come in molti lavori datati recentemente su analisi d'immagine bidimensionale, una delle premesse principali consiste proprio nell'esclusione dal campione dei denti compromessi dall'usura. Anche Ungar e Williamson, come Jernvall e Selanne riconoscono l'utilità dei programmi GIS per esaminare la superficie occlusale del dente come se fosse una superficie topografica terrestre, operando in maniera più definita rispetto a quanto riportato da Reed (1997). Egli infatti tramite microscopio reflex analizza piccoli denti di primati, calcolando l'area delle cuspidi, delle creste e dei bacini, e tuttavia conclude che il microscopio reflex non sia lo strumento adatto sia in termini di risultati che di tempo, così come ribadito da Ungar e Williamson, (2000).

Le ricerche sviluppate in seguito sono caratterizzate da un approccio metodologico sostanzialmente invariato, mentre è interessante valutare le peculiarità caso per caso del campione oggetto di studio. Ungar et Kirera (2003) scansionano la superficie occlusale di un campione di M2 inferiore di *Gorilla gorilla gorilla* (n=48) e *Pan troglodytes troglodytes* (n=56) tramite laser scanner. Assodata la componente tecnico-metodologica, il lavoro si caratterizza per la consistenza numerica del campione di denti analizzato nel caso specifico tramite un altro programma GIS, ARCVIEW 3.1 (ESRI, Redlands, CA). È stato così possibile rilevare la differenza che intercorre tra la pendenza e quella che viene definita "l'angolarità" delle cuspidi di queste due specie di primati, in un campione di denti soggetti a differenti gradi di usura, effettuando quindi uno studio sull'anatomia funzionale dei denti in relazione all'adattamento della specie stessa ad una determinata dieta: gli autori ribadiscono alcune considerazioni che nel tempo diventeranno fondamentali per ulteriori questioni aperte sulla corretta interpretazione dei reperti dentali: l'usura dentale costituisce una fonte preziosa di informazioni, non certo un limite, se si raggiunge la consapevolezza del fatto che la complessità della relazione tra forma-funzione richiede una lettura paziente per decifrare il tipo di dieta di molte specie fossili.

Per finire, gli autori sottolineano che la condizione di usura caratterizza la maggior parte dei denti recuperati nei contesti paleoantropologici, e che il modo migliore per analizzarla è attraverso un approccio tridimensionale, che consente di implementare il campione disponibile per le analisi morfologiche-morfometriche e rende conseguentemente più obiettive le ricostruzioni sulla paleodieta in specie estinte.



Si conferma così con più enfasi la validità di un approccio basato sull'utilizzo di strumentazioni per l'acquisizione delle coordinate x,y,z dei punti utili alla ricostruzione del modello virtuale della superficie occlusale del dente e della successiva analisi dello stesso tramite programmi GIS, non solo per comprendere l'adattamento ecologico e comportamentale, in relazione alle abitudini alimentari, delle scimmie (*Dennis et al., 2004*), ma estendendo anche l'ambito della ricerca alle ominine fossili (*Ungar, 2004*). L'approccio con i mammiferi in generale rimane piuttosto problematico, data la grande variabilità dimensionale dei reperti dentali, così strumenti diversi sono stati sperimentati per cercare di interpretare correttamente gli aspetti peculiari di interesse, ma con notevoli difficoltà.

### 1.2.6 3D SUPERFICIE INTERNA

Uno strumento che sicuramente in parte risolve le difficoltà evidenziate dai ricercatori è la tomografia computerizzata. Oltre ad ampliare il range dimensionale dei reperti osservabili, un nodo importante è costituito dal livello di precisione auspicabile, unitamente alla possibilità di indagare approfonditamente le diverse proporzioni fra i tessuti dentali con metodi non invasivi. Nel 2005 non sono ancora ampi i consensi, né gli autori si trovano concordi sulla reale affidabilità delle TC, per cui non stupisce in letteratura la presenza di lavori svolti ancora con metodologie invasive (*Grine 2005; Smith et al. 2007*), o con l'ausilio di raggi X, che riducendo l'oggetto a sole due dimensioni incorrono nel limite già esposto sulla varietà di informazioni perdute.

Diventa presto sintomatica la necessità di verificare l'effettivo valore tecnologico della CT prima, e della micro CT in seguito, oltre alla loro attendibilità relativa nel fornire dati realmente confrontabili;

In tal senso Macchiarelli (*et al., 2006*) utilizza la scansione tramite microtomografia per indagare la superficie interna dei molari neandertaliani mostrando come i tempi di completamento della corona dentale e delle radici corrispondano a quelli dell'uomo moderno, ma una morfologia più complessa della giunzione smalto-dentina e un picco ritardato nell'estensione delle radici li distinguono. Lo smalto e la dentina infatti conservano tracce delle fasi di sviluppo e delle tempistiche di formazione delle radici e della corona. Allo scopo sono stati selezionati due molari con usura minima dello smalto dal sito di La

Chaise-de Vouthon, Charente in Francia, un secondo molare deciduo inferiore da Abri Suard e un primo molare permanente inferiore da Abri-Bourgeois Delaunay.

Per la prima volta grazie alla micro CT viene messa in evidenza la giunzione smalto dentina permettendo un'analisi differenziata delle diverse componenti del dente. Lo studio ha permesso di verificare le strutture che caratterizzano la morfologia dentale neandertaliana rispetto all'uomo moderno, contestualizzando la formazione rispetto alla proporzione generale di smalto e dentina, le diverse tempistiche, e la differenziazione delle diverse regioni dentali. Nonostante i risultati positivi, al termine dello studio gli autori stessi puntualizzano la necessità di ulteriore validazione tecnica sull'affidabilità della strumentazione utilizzata.

Per questo motivo Olejniczak (*et al.*, 2006) pone a confronto la sezione fisica con quella ottenuta da microtomografia su un campione di denti appartenenti a diversi taxa di primati e non primati, sia recenti che fossili, per verificare se lo spessore dello smalto, le dimensioni del dente e i processi diagenetici di rimineralizzazione potessero in qualche modo interferire con l'affidabilità della microtomografia (Fig.9).

I risultati ottenuti sono differenti se si considerano denti recenti o fossili: nel caso di denti recenti, seppur di diverse dimensioni, la discrepanza fra la sezione fisica e la sezione computerizzata si attesta su valori molto bassi, (circa il 3-5%). L'accuratezza rimane anche nel confronto con denti fossilizzati, tuttavia nel caso di smalto molto sottile e particolarmente rimineralizzato, risulta piuttosto difficoltoso distinguere lo smalto dalla dentina. Inoltre uno smalto di spessore inferiore a 0.10 mm non viene adeguatamente descritto dalle sole immagini grezze della micro CT basate sui soli valori dei pixels, motivo per cui si rendono necessarie procedure adeguate per la corretta lettura dei dati.

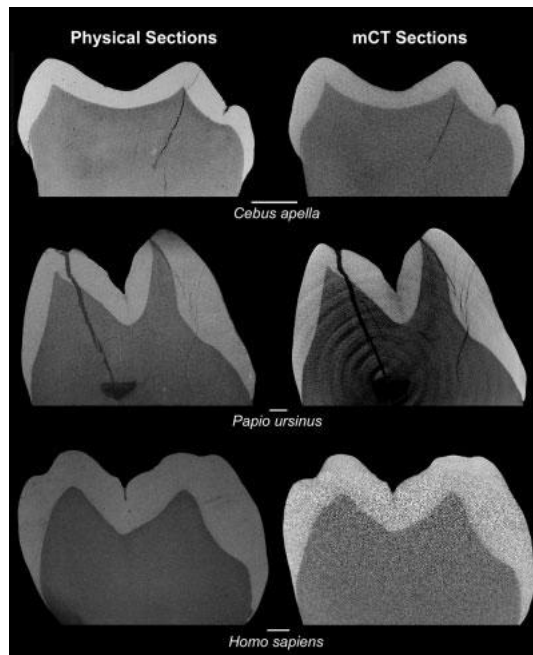


Fig. 9. Sezione fisica (sinistra) e immagine  $\mu$ CT (destra) della medesima sezione del molare di tre diversi primati esaminati (Olejniczak *et al.*, 2006)

In virtù dell'alto grado di accuratezza garantito, si sono di conseguenza moltiplicate le tecniche e le applicazioni possibili, e l'utilizzo della micro CT fra gli antropologi ha raccolto consensi in breve tempo (Olejniczak *et al.*, 2007). La vasta gamma di offerta tecnologica motivata dalla sperimentazione concomitante in ambito medico e dentistico, ha spinto Olejniczak (*et al.*, 2008) a porre a confronto diversi sistemi di acquisizione, così da poter verificare che i risultati prodotti fossero tra loro comparabili e non macchina-dipendenti. Per questo motivo è stato selezionato un campione di denti sia fossili che recenti, e sono state effettuate alcune rilevazioni quali l'area della superficie, volume e misurazioni lineari. Dallo studio emerge un buon range di comparabilità dei risultati ottenuti dai diversi strumenti (all'interno del 3%), e fra tutti il sistema migliore per l'acquisizione si conferma la radiazione sincrotrone. Una volta consolidata l'attendibilità della microtomografia applicata in ambito paleontologico per la discriminazione tassonomica di taxa diversi, Olejniczak (*et al.*, 2008) utilizza la stessa tecnologia per approfondire la variazione dello spessore dello smalto all'interno del genere Homo. Il risultato dell'analisi conferma che lo smalto neandertaliano è sia in valore assoluto che relativo più sottile di quello

dell' uomo moderno nella maggior parte delle posizioni indagate per i denti molari.

I rapporti tassonomici fra i taxa neandertaliano e moderno non sono gli unici nodi evolutivi ancora da sciogliere, infatti l'utilità dei dati tridimensionali trova consenso anche per analisi condotte su altre tipologie di fossili più antichi, per i quali spesso non è possibile ovviare alla presenza di elementi fortemente usurati.

L'usura infatti spesso cancella la maggior parte delle caratteristiche distintive dei diversi taxa di ominidi, riducendo così drasticamente le dimensioni dei campioni disponibili. Skinner (*et al.*, 2008) analizza la morfologia della giunzione smalto dentina per verificarne il potere discriminante fra due diversi taxa di ominidi fossili, *Australopithecus africanus* e *Paranthropus robustus*(Fig.10). In seguito alla scansione microtomo grafica emerge che fra tutti i molari solo in 3 casi si presentano alterazioni della linea di giunzione smalto dentina, e pochi altri casi in cui la diagenesi non permette di distinguere i diversi tessuti rimineralizzati.

I modelli sono poi importati nel software Amira (v4.1, [www.amiravis.com](http://www.amiravis.com)) per l'apposizione dei landmarks stabiliti per l'analisi:

- prima serie di landmarks anatomici specifici, identificati con gli apici delle creste di dentina, uno al punto medio della cresta marginale che congiunge protoconide e metaconide, e un landmark nel punto più basso delle creste marginali che collegano rispettivamente protoconide e ipoconide e ipoconide con ipoconulide;
- seconda serie di landmarks che ripercorre l'intero margine che collega le cuspidi;
- terza serie di landmarks ricavata in corrispondenza della giunzione cervicale cemento-smalto.

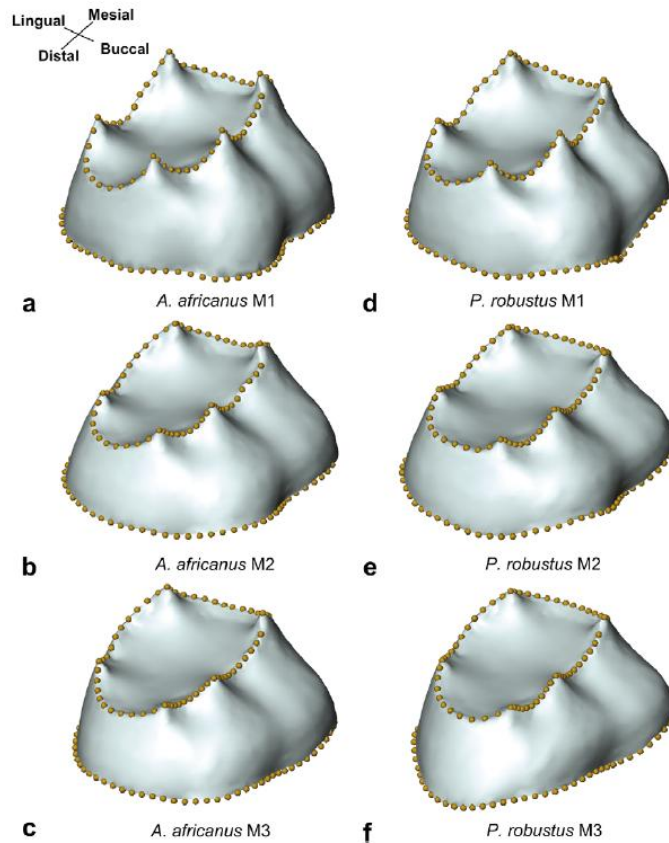


Fig. 10. Illustrazione della mean shape delle curve rappresentanti creste e regione cervicale per ogni tipologia di molare appartenente a *A. africanus* (a,b,c) e *P. robustus* (d,e,f). Da notare la diversa altezza relativa degli apici delle creste della dentina e il diverso andamento della curva cervicale (Skinner *et al.*, 2008)

Con l'applicazione della procedura prevista per la geometria morfometrica Skinner confronta la morfologia della giunzione smalto dentina (EDJ) fra le specie e la variazione della stessa all'interno di entrambe, così da verificare la variazione metamERICA all'interno della successione dei molari. I risultati ottenuti si sono dimostrati interessanti, poiché hanno confermato la funzione discriminante della EDJ in presenza di denti usurati, in particolare fra le specie di ominoidi sudafricani analizzati; nello specifico, primo, secondo e terzo molare possono essere

discriminati all'interno del taxon di appartenenza. Infine le differenze medie di forma dell' EDJ (l'altezza delle creste di dentina, altezza della corona, aspetto dell' area cervicale) sono più marcate fra molari adiacenti all'interno del medesimo taxon, che non fra molari omologhi appartenenti a taxa diversi.

Oltre alla corona, ampiamente indagata, anche le radici possiedono un aspetto peculiare già osservato a livello macroscopico in numerosi studi condotti sin dai tempi dalle prime scoperte archeologiche, e con il supporto di modelli tridimensionali anche questo tipo di studio ha visto aprirsi nuove possibilità analitiche.

Kupczick e Hublin (*Kupczick et al., 2010*) applicano per la prima volta un'analisi metrica globale della morfologia dei molari permanenti mandibolari su un campione di *H. Nenderthalensis* del Pleistocene Medio-Inferiore, *H. Sapiens (Aterian)* del Tardo Pleistocene e *H. Sapiens* Recente, allo scopo di verificare il valore discriminante della morfologia delle radici fra i due gruppi e i casi in cui particolari variazioni fossero invece da attribuire a differenze nella funzionalità del dente nello specifico.

Allo scopo sono stati acquisiti 127 molari, sia isolati che in sede alveolare, utilizzando due diversi sistemi; alcuni dati tridimensionali sono ottenuti dal database di Nespos (per le specifiche di acquisizione si può verificare direttamente sul sito all'indirizzo <https://nespos-live01.pxpgroup.com>). Una volta realizzati i modelli sono state eseguite le seguenti misurazioni: volume dello smalto, dentina primaria e cavità pulpare, volume totale della corona, area della superficie, volume del tronco radicale e dei rami radicali, area della superficie della giunzione smalto dentina, l'area del piano cervicale e la lunghezza delle radici. Le misure rilevate sono poi state correlate in un indice di biforcazione per valutare i diversi gradi di apertura delle radici.

Fra i lavori più recenti Emonet (*et al., 2012*) analizza le radici nel confronto fra scimmie viventi, e fra due tipologie di ominidi fossili, *Khoratpithecus piriya* e *Ouranopithecus macedoniensis*, creando il piano cervicale di riferimento per orientare il dente (*Benazzi et al., 2009*), e un asse perpendicolare su cui proiettare le misurazioni (Fig.11).

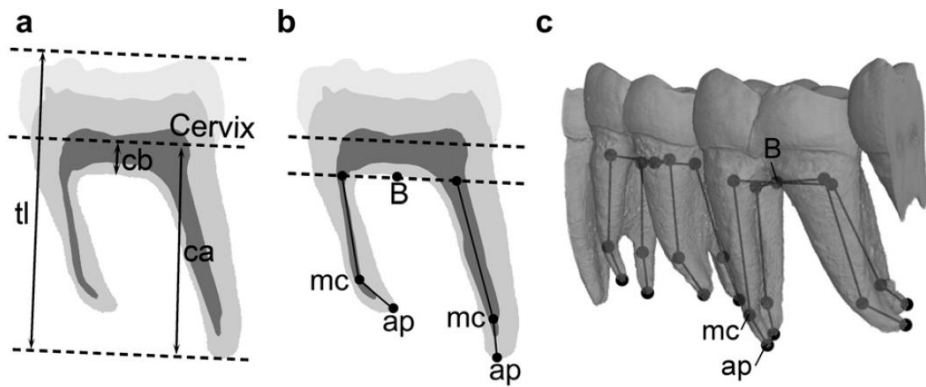


Fig.11. Misurazione delle radici dentali. **a)** Misurazione dell'altezza dell'indice di biforcazione: **tl**, lunghezza totale del dente- **cb**, distanza fra area cervicale e biforcazione- **ca**, distanza fra area cervicale e apice della radice; **b,c)** Landmarks usati nella Procrustes Analysis: **mc**, curvatura massima- **ap**, apice.(Emonet et al., 2012)

L'utilizzo dei modelli tridimensionali ha permesso di oltrepassare molti dei limiti intrinseci del reperto fisico in quanto a maneggevolezza, praticità e accesso a maggiori informazioni sulle proporzioni dei diversi tessuti, tuttavia restano insolute alcune problematiche metodologiche connesse ad esempio all'orientamento preventivo dei denti in funzione di analisi morfometriche attendibili e comparabili.

A questo proposito Benazzi (*et al.*, 2009) presenta un nuovo metodo specificatamente studiato per il corretto orientamento del primo molare permanente, sia mascellare che mandibolare, utilizzando i modelli tridimensionali di un campione di denti moderni e verificando in ambiente virtuale i protocolli più diffusi per l'analisi di immagine (Robinson et al., 2002; Bailey, 2004; Bailey e Linch, 2005; Martinon – Torres et al., 2006; Kondo e Townsend, 2006, riadattando il metodo proposto da Jernavall e Selanne, 1999) e tre sistemi utilizzati nell'analisi dei modelli tridimensionali (Zuccotti et al., 1999; Jernavall e Selanne 1999; Ungar e Williamson 2000; Ungar 2004).

Ogni sistema di orientamento richiede l'identificazione di 3 punti per la creazione di un piano che viene posizionato parallelamente al piano xy del sistema cartesiano di riferimento.

Lo studio ha prodotto risultati diversificati per i molari mandibolari e mascellari: per i molari mandibolari la minore deviazione dall'asse ideale è risultata essere quella prodotta dall'orientamento del piano passante per gli apici delle cuspidi ipoconide-metaconide-entoconide, tuttavia in caso di usura è preferibile utilizzare i punti linguale-mesiale–distale

identificati sulla linea cervicale. Anche per i molari mascellari i risultati migliori sono dati dagli apici delle cuspidi paracono- metacono- protocono, ma come per i rispettivi mandibolari, anche in questo caso il metodo che meglio soddisfa i requisiti richiesti in caso di usura è quello che utilizza i punti mesiale-distale-buccale sulla linea cervicale.

Una volta identificato il sistema per un corretto orientamento del dente in ambiente virtuale, così da limitare la soggettività dell'operatore e garantire una buona riproducibilità del protocollo, sono stati messi a confronto diversi metodi di misurazione per valutarne il potenziale di discriminazione tassonomica.

La valutazione morfometrica dentale, messa in atto sin dai primi studi utilizzando i diametri coronali, recentemente ha visto aumentare la propensione all'utilizzo delle outline (profili) della corona (outline coronale e outline cervicale). Entrambi i sistemi ampiamente sperimentati su immagini bidimensionali sono stati trasferiti in ambiente virtuale e messi a confronto per verificarne l'utilità nella discriminazione fra umanità moderna e neandertaliani, applicandoli a un campione di modelli tridimensionali di primi molari permanenti, superiori e inferiori, analizzati in ambiente Rhino 4.0 beta Cad (Benazzi *et al.*, 2010).

La *principal component analysis* mostra una buona discriminazione dei due taxa per entrambe le outline per quanto attiene ai molari superiori, così come le misurazioni a livello cervicale. Diversi invece i risultati per i molari inferiori, per i quali le misurazioni a livello cervicale e della corona mostrano una generale sovrapposizione dei due gruppi, mentre risultano chiaramente distinti utilizzando l'outline coronale una volta rimosse le informazioni dimensionali. Quindi i diametri e l'outline coronali possono essere considerati utili per la discriminazione di molari superiori non usurati o al limite leggermente usurati, mentre l'outline coronale può essere utilizzata per la discriminazione dei molari inferiori una volta rimossa l'informazione dimensionale.

Ad eccezione di Macchiarelli che nel 2006 ha proposto le prime analisi sulla dentizione decidua con l'ausilio di tecnologie tridimensionali, la quasi totalità delle ricerche svolte fino a tempi recenti si è focalizzata sui denti permanenti.

Come indicato da Bayle (*et al.*, 2008) un elemento chiave per la differenziazione fra Neanderthals e Uomo Moderno concerne la valutazione dei rispettivi pattern di sviluppo dentario.

Nelle diverse collaborazioni messe in atto Bayle (Bayle, 2009 a,b, Bayle *et al.*, 2010), esplora la relazione fra le sequenze dentali e la variazione nelle proporzioni dei tessuti in ogni tipologia di dente deciduo



mandibolare comparando neandertaliani e uomini del Paleolitico Superiore. Le variabili considerate sono il volume totale, volume della cappa di smalto, volume totale della dentina, volume totale della camera pulpale. Nello specifico dell'analisi svolta nel 2009 sul bambino di Roc de Marsal, per mezzo dell'approccio Bayesiano è stata calcolata la probabilità che le dentizioni decidua e permanente mandibolare dell'individuo analizzato ricadessero all'interno del pattern di variazione di un campione di uomo attuale. L'analisi volumetrica dei denti decidui è stata poi utilizzata per sottolineare le differenze nelle dimensioni assolute dei denti e proporzioni relative fra i denti laterali e anteriori, così come nelle proporzioni dei tessuti

Toussaint (*et al.*, 2010) utilizza lo spessore laterale dello smalto per verificare l'appartenenza al taxon Neandertaliano del secondo molare deciduo mandibolare rinvenuto presso la Cava di Trou de L'Abime-Couvin (Belgio). I dati microtomografici sono utilizzati per la misurazione delle proporzioni fra tessuti dentali per ricavare informazioni tassonomiche; a causa della notevole usura della superficie non è stato possibile valutare il volume totale dello smalto e della dentina, tuttavia lo spessore laterale si è dimostrato estremamente attendibile per l'assegnazione al taxon moderno o neandertaliano, seguendo le indicazioni fornite da Kono (2004), Tafforeau (2004) e Olejniczak (2006). Le misurazioni eseguite riguardano la superficie dell'area di giunzione smalto dentina contenuta all'interno dello smalto laterale, il volume laterale dello smalto, il volume della dentina contenuta all'interno dello smalto laterale, lo spessore medio dello smalto laterale, l'indice di spessore relativo dello smalto laterale.

L'indice proposto da Toussaint, per ovviare alla presenza dell'usura è stato in seguito comparato da Benazzi (*et al.*, 2011c) ad altre dimensioni tradizionali misurate sulla corona. In questo modo è stato possibile verificare anche quali misurazioni tradizionali risultassero effettivamente affette dall'usura e quindi scarsamente attendibili per la discriminazione tassonomica (Fig.12).

Allo scopo è stato considerato un campione di secondi molari decidui non compromessi da usura, a cui applicare il protocollo di Toussaint; per valutare il solo aspetto laterale dello spessore dello smalto, viene disegnato un altro piano (piano 2) parallelo al piano cervicale, passante attraverso il punto più basso della giunzione smalto dentina del bacino medio occlusale; solamente la porzione di corona compresa fra i due piani viene presa in considerazione per l'analisi dello spessore laterale dello smalto (Macchiarelli *et al.*, 2006; Olejniczak *et al.*, 2008).

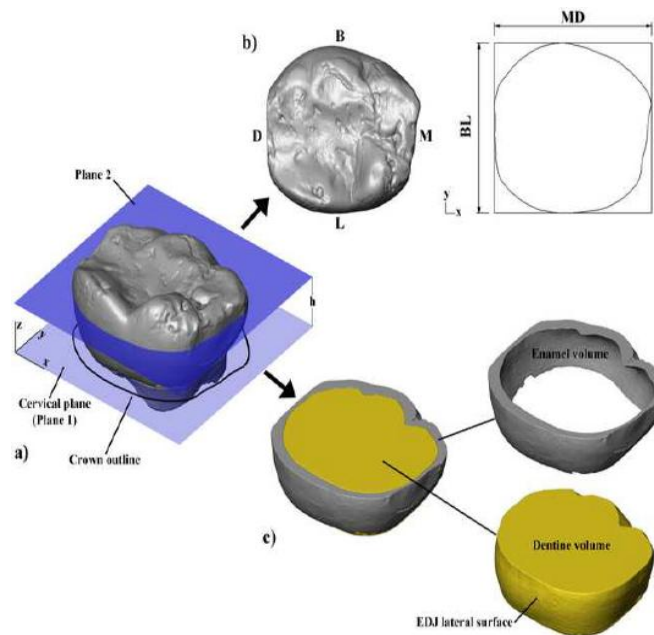


Fig.12. **a)** Dente molare Cavallo A (Grotta Cavallo, Puglia, Italia ) allineato con il piano cervicale (plane1) parallelo al piano cartesiano di riferimento. Per identificare l'area della corona sulla quale effettuare l'analisi dello spessore dello smalto, è stato creato un secondo piano (plane 2) parallelo al piano 1, seguendo le indicazioni di Toussaint (*et al.*, 2010). **b)** L'outline coronale, proiettata sul piano cervicale, viene iscritta in un bounding box i cui lati forniscono i diametri Buccolinguale e Mesiodistale. **c)** Volume dello smalto, volume della dentina e superficie laterale della giunzione smalto dentina (EDJ) utilizzate per le misurazioni dello spessore laterale dello smalto. (Benazzi *et al.* 2011c)

Le misure registrate su questa porzione di corona sono: il volume dello smalto, il volume laterale della dentina e della polpa dentale (LDPV) e la giunzione smalto dentina (EDJ) della superficie laterale. Gli indici ottenuti dall'elaborazione delle misure sono l'indice dello spessore medio laterale dello smalto (AET) , e l'indice dello spessore relativo dello smalto laterale (RET).

A riprova delle potenzialità discriminanti derivanti dall'integrazione reciproca di metodi morfometrici indipendenti, Benazzi ha analizzato i denti decidui provenienti da Grotta del Cavallo nell'Italia meridionale, e confrontandoli con un campione di neandertaliani, uomo moderno del Paleolitico e uomo recente, ne ha correttamente riclassificato l'appartenza al taxon moderno. Utilizzando il valore discriminante delle

outlines cervicale e delle corona, i risultati collocano Cavallo B all'interno del range dell'umanità moderna, e anche Cavallo C risulta assolutamente moderno.

Il secondo metodo morfometrico utilizzato riguarda la struttura interna del dente, ovvero l'analisi dello spessore dello smalto e delle proporzioni dei tessuti dentali. Lo spessore medio e relativo dello smalto sono accreditati come fattore discriminante fra i taxa moderno e neandertaliano, poiché i neandertaliani sono tipizzati da uno smalto generalmente più sottile rispetto al volume totale della dentina. Anche in questo caso Cavallo C ricade perfettamente nell'umanità moderna (*Benazzi et al., 2011d*).

Infine, recentissimo esempio di studio condotto su molari decidui, ma con diversa finalità tassonomica, è stato affrontato da Zanolli (*et al., 2012*). Allo scopo è stata utilizzata l'analisi delle proporzioni del tessuto dentale a supporto di una classificazione preliminare a Homo Erectus di due molari decidui.

### 1.3 LA PROBLEMATICA

La maggioranza degli studi illustrati si rivolge alla dentizione permanente a scapito di quella decidua, e le ricerche svolte di recente sono incentrate per la maggior parte sull'analisi comparativa del pattern di sviluppo dentale (*Bayle et al., 2009, a,b 2010*), le proporzioni fra i tessuti e il potere discriminante dello spessore laterale dello smalto (*Toussaint et al., 2010*).

Tale evidenza è sicuramente imputabile in prima battuta a una scarsità di rinvenimenti nel record fossile, ma soprattutto al fatto che nel confronto con la dentizione permanente è assai più probabile costituire dei campioni numericamente consistenti.

Fattore ancora più importante per le analisi morfometriche, basate sulla quantificazione dello spessore dello smalto e sull'individuazione di landmarks sulla superficie, è la possibilità di rapportarsi con elementi dentali in buone condizioni di conservazione, non usurati o al limite affetti da usura leggera.

La necessità che emerge chiaramente è quindi quella di oltrepassare i limiti imposti dalla presenza dell'usura, sia in termini di consistenza numerica dei campioni analizzati, sia come identificazione di elementi discriminanti anche in presenza di usura moderata della corona.

## 1.4 SCOPO DEL LAVORO E ORGANIZZAZIONE

L'obiettivo posto al presente lavoro di ricerca è dunque oltrepassare la problematica delle dimensioni del campione ed essere in grado di estrarre informazioni utili anche da esemplari estremamente intaccati dall'usura o seriamente danneggiati per ragioni tafonomiche, per i quali non è più possibile riconoscere punti anatomici sulla corona. L'unica soluzione (Benazzi *et al.*, 2011 a) possibile è quindi concentrare l'attenzione sugli aspetti ancora osservabili e che dovrebbero possedere valore tassonomico.

Fortunatamente l'outline coronale e quella cervicale solitamente sono conservate anche nei denti usurati, ed è stato dimostrato che questi due profili del dente supportano informazioni morfologiche utili per distinguere i primi molari permanenti neandertaliani da quelli dell'uomo moderno (Benazzi *et al* 2011b), e i molari decidui mascellari (). Si intende quindi verificare se gli stessi parametri possano essere utili anche per discriminare secondi molari decidui inferiori, quando sono perduti altri aspetti caratteristici della corona.

Per perseguire le finalità esposte, il presente lavoro di ricerca si articola in due sezioni metodologiche.

- Nella prima sezione vengono utilizzati metodi di morfometria geometrica per analizzare la corona e la linea cervicale di un campione di molari decidui mandibolari con l'intento di verificarne l'attendibilità per la discriminazione tassonomica fra Neanderthals e Uomo Moderno. Per verificare la validità del metodo proposto, sono stati inclusi nell'analisi due elementi dall'attribuzione incerta: il molare deciduo rinvenuto nella Cava di Bondi, vicino a Chiatura, in Georgia, e pubblicato su una rivista da Tushabramishvili e colleghi (2012) e il secondo molare deciduo inferiore rinvenuto a Lagar Velho. Va specificato che mentre per il molare di Lagar Velho è disponibile il modello tridimensionale, per il dente proveniente dalla cava di Bondi è attualmente disponibile solo un'immagine fotografica della vista oclusale.
- La seconda sezione metodologica è dedicata all'approfondimento di quest'ultimo aspetto. I risultati ottenuti dall'analisi dell'outline

coronale di Bondi concordano con le ipotesi fatte in fase di rinvenimento del reperto, tuttavia i risultati vanno considerati con cautela poiché il dente nell'immagine non è stato orientato secondo il protocollo utilizzato per i modelli tridimensionali. Lo scopo di questa ulteriore sezione metodologica è quello di verificare se l'applicazione di un protocollo di orientamento standard del dente prima della realizzazione dell'immagine possa restituire un profilo coronale spendibile in rigorose analisi tassonomiche. Allo scopo è stato analizzato un ulteriore campione di secondi molari decidui non usurati, per i quali sono stati creati sia modelli tridimensionali, sia immagini fotografiche della vista oclusale, utilizzando il protocollo standard illustrato nella prima sezione metodologica. I profili estratti sono stati analizzati per verificare l'attendibilità del profilo fotografico rispetto all'omologo tridimensionale.

## 2. ANALISI DEL PROFILO CORONALE E CERVICALE DI MOLARI DECIDUI

### 2.1 MATERIALI

Il campione selezionato si compone di 54 secondi molari decidui mandibolari, di cui 14 esemplari di Neanderthal (N), 7 esemplari di Uomini Moderni del Paleolitico Superiore (UPMH), e 31 esemplari di Uomo Moderno Recente (RMH). Provenienza, attribuzione tassonomica, lateralizzazione, e stadio di usura (Smith 1984), sono riportati in *tabella 1*.

Taxon	Specimen	Country	Side	Source	Wear stage <sup>a</sup>	
N <sup>c</sup>	Abri Suard S14-5	France	R	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	2	
	Abri Suard S37	France	R	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	1	
	Abri Suard S42	France	R	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	1	
	Cavallo A	Italy	L	Benazzi et al. (2011c) ( $\mu$ CT)	5	
	Couvin	Belgium	R	Toussaint et al. (2010) ( $\mu$ CT)	3	
	Engis 2	Belgium	R	Toussaint et al. (2010) ( $\mu$ CT)	3	
	Krapina d62	Croatia	L	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	2	
	Krapina d63	Croatia	L	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	3	
	Krapina d64	Croatia	L	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	3	
	Krapina d65	Croatia	L	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	1	
	Krapina d66	Croatia	L	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	4	
	Krapina d68	Croatia	R	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	1	
	Roc de Marsal 1	France	L	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	1	
	Scladina 4A-13	Belgium	L	Toussaint et al. (2010) ( $\mu$ CT)	6	
	UPMH <sup>d</sup>	Dolní Věstonice 36-6	Czech Republic	L	Original data ( $\mu$ CT)	1
		La Madeleine 4	France	L	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	1
		Paglicci 38	Italy	R	Original data (surface scan of the cast)	1
Paglicci 39		Italy	L	Original data (surface scan of the cast)	3	
Paglicci 40		Italy	R	Original data (surface scan of the cast)	1	
Paglicci 41		Italy	L	Original data (surface scan of the cast)	3	
Paglicci 42		Italy	L	Original data (surface scan of the cast)	6	
Unclassified	Bondi 1	Georgia	R	Tushabramishvili et al. (2012) (2D image)	7	
	Lagar Velho 1	Portugal	R	NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	2	
RMH <sup>e</sup>	From Medieval and contemporary samples <sup>f</sup>	Austria = 14	L = 9; R = 5	Original data ( $\mu$ CT)	Wear stage 1 = 21	
		France = 7	L	Bayle et al. (2010), NESPOS ( $\mu$ CT) <sup>b</sup>	Wear stage 2 = 6	
		Italy = 10	L	Original data ( $\mu$ CT)	Wear stage 3 = 4	

Tab.1. Note: a) grado di usura Smith (*et al.*,1984); b) Nespos Database/www.nespos.org.c) Neanderthals d)Upper Paleolithic Modern Humans e) Recent Modern Humans f) Materiale conservato presso il Dipartimento di Antropologia (Università di Vienna, Austria), Università di Bodeaux, Istituto di Anatomia di Strasburgo (Francia), Dipartimento di Storie e Metodi per la Conservazione dei Beni Culturali (Università di Bologna, Ravenna –Italia)

All'interno del campione sono inclusi due elementi dall'attribuzione incerta. Il primo è il bambino di Lagar Velho (*Lagar Velho1*), ad oggi considerato come appartenete all'umanità moderna del Paleolitico Superiore, il quale presenta tuttavia alcuni aspetti morfologici misti in

parte classificabili come neandertaliani. Si tratta di uno scheletro pressoché completo di un individuo di età stimata fra i 3.5. e i 5.2 anni, datato circa 24.500 anni fa'. Il cranio e la mandibola, la dentizione in buono stato di conservazione (Fig.1e2), le ossa postcraniali, mostrano un mosaico di caratteri attribuibili sia ai primi uomini moderni europei, sia ai neandertaliani; fra le caratteristiche a sostegno dell'appartenenza al ramo moderno si riscontrano la conformazione del mento, le dimensioni dentali e le proporzioni, supportate dall'aspetto dei rami mandibolari. Altri aspetti postcraniali che propendono per la classificazione neandertaliana sono la conformazione e robustezza di femore e tibia.



Fig.1. Abrigo do Lagar Velho 1: Vista linguale della mandibola e della dentizione, con in parte esposto lo stadio di sviluppo della dentizione (*Duarte et al., 1999*).

La presenza di individui caratterizzati da aspetto a mosaico contraddistingue tutti i momenti salienti nelle discriminazioni tassonomiche in fasi cruciali della storia evolutiva umana, alimentando le controverse interpretazioni di un'emergenza complessa dell'umanità moderna, rifiutando il modello della semplice sostituzione. Diventa quindi di grande importanza poter individuare elementi discriminanti di buona attendibilità per interpretare al meglio le dinamiche popolazionistiche che hanno interessato la zona (*Duarte et al., 1999*).

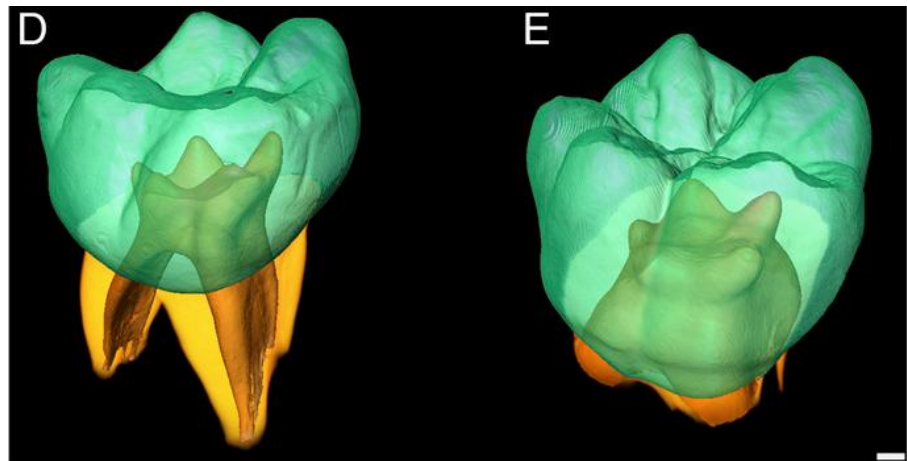


Fig.2. Lagar Velho 1: Ricostruzione 3D, valutata per le misurazioni lineari, superfici, volumi e proporzioni dei tessuti dentali. D) secondo molare deciduo mandibolare destro, vista obliqua mesio buccale; E) primo molare permanente mandibolare destro, vista obliqua mesio buccale. I volumi dei denti virtualmente ricostruiti sono resi in trasparenza e ogni componente dentale (cappa dello smalto, dentina, camera pulpare) sono mostrati in colori differenti. (Barra -Scala 1mm). (Bayle *et al.*, 2010)

Il secondo caso problematico inserito nella trattazione è il dente umano proveniente dalla Cava Bondi (Bondi 1) (Tushabramishvili *et al.*, 2012). Il dente è piuttosto ben conservato nonostante alcune brecce nello smalto all'angolo mesio buccale e lungo il margine cervicale del lato buccale, a cui si aggiunge una piccola porzione mancante all'angolo disto-buccale poco sopra la linea cervicale (Fig.3). A rendere ancora più difficoltosa l'identificazione è l'aspetto della corona, che secondo Tushabramishvili si presenta con un grado di usura 5, stimato secondo la classificazione di Molnar (1971). In base alle osservazioni morfologiche, presumibilmente si tratta di un secondo molare deciduo inferiore destro. Il dente infatti presenta forma rettangolare e aspetto bulboso della corona; l'aspetto della camera pulpare, le parti di radice conservata e il contorno ovoidale lasciano presumere la presenza di 5 cuspidi.

Bondi 1 rappresenta il più antico reperto umano in un contesto del Paleolitico Superiore fin ora rinvenuto in Georgia, essendo datato tra 25.700 e i 29.500 anni fa' e per il quale Tushabramishvili e colleghi ipotizzano l'attribuzione a *H. Sapiens*.



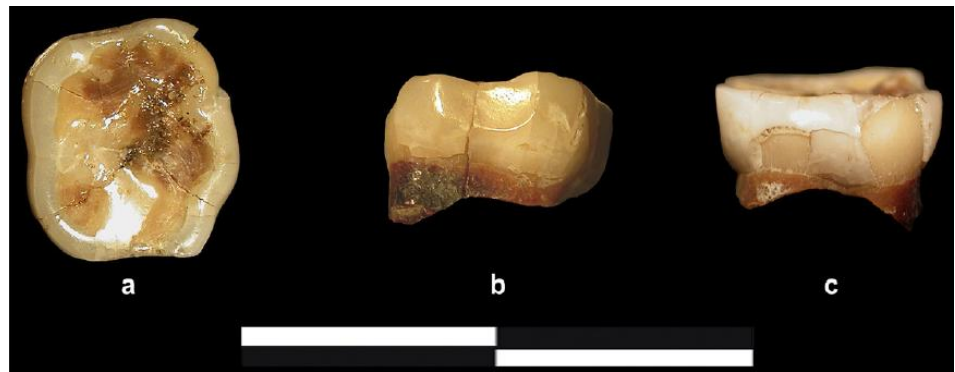


Fig.3. Dente umano Bondi 1 (layer V): a) vista occlusale con bordo mesiale in alto; b) vista mesiale, con bordo buccale a sinistra ; c) vista buccale, con bordo mesiale a destra. (*Tushabramishvili et al. 2012 p.183*)

Nelle conclusioni gli autori hanno tuttavia sottolineato la necessità di attendere nuove metodologie di indagine per poter stabilire con certezza se si tratti di un neandertaliano o di un uomo moderno, dal momento che l'usura del dente non permette di utilizzare criteri morfologici tradizionali e analisi morfometriche della corona e della giunzione smalto-dentina per una corretta discriminazione tassonomica.

Per quanto riguarda il campione UPMH, si ritiene doverosa un'annotazione sul campione specifico di Grotta Paglicci (Puglia, Italia). Si tratta di materiale inedito, per il quale si forniscono di seguito alcuni riferimenti per circoscriverne il contesto archeologico. Paglicci 38 è stato rinvenuto da Palma di Cesnola nel livello 21d, una fase evoluta del Gravettiano, datato cronologicamente circa  $24.-720 \pm 420$  anni fa. Paglicci 39-42 sono stati trovati in un deposito, purtroppo gravemente disturbato in seguito ad un'intrusione all'inizio del secolo scorso. I visitatori hanno effettuato l'accesso attraverso una piccola apertura nell'ambiente di ingresso principale, poiché prima di questa violazione la grotta era rimasta sigillata da un crollo risalente alla fine del Paleolitico Superiore. Probabilmente lo scopo era penetrare fino al secondo ambiente più interno, la cosiddetta "seconda camera". La setacciatura del deposito ha restituito alcuni resti umani e faunistici, associati ad artefatti e strumenti litici che coprono tutta l'intera sequenza epigravettiana della grotta (tuttavia nel deposito non sono state rinvenute evidenze attribuibili né al Gravettiano né all' Aurignaziano). Una nuova datazione C14 ha ricollocato i reperti faunistici al periodo Tardo Glaciale

(LABEL Università di Firenze, dati non pubblicati) confermando l'attribuzione di Paglicci 39-42 a una fase tarda del Paleolitico Superiore.

Tutti i molari considerati nell'analisi sono stati trattati come molari sinistri, e nel caso di molari destri, si è proceduto a crearne copia speculare (*mirroring*) prima di procedere ad ulteriori analisi. Dal campione di 54 denti sono state realizzate 54 outline coronali e 51 cervicali.

## 2.2 METODI

Ad eccezione degli elementi dentali provenienti da Grotta Paglicci, il campione è stato acquisito per mezzo di microtomografia computerizzata ( $\mu$ CT) con un micro CT scan industriale a sincrotroni, alla lunghezza isotropica dei voxel fra i 15 e 55  $\mu$ m; parte delle microscansioni (“dati originali” in Tabella 1) sono state prodotte con un Viscom X8060  $\mu$ CT scanner, utilizzando i seguenti parametri: 130 kV, 100mA, voxel size =25  $\mu$ m cubici. Per le specifiche tecniche di acquisizione dei reperti per i quali il modello tridimensionale già esistente è stato mutuato da precedenti studi, si vedano nell'ordine: Bayle (*et al.*, 2009 a, b; 2010), Toussaint (*et al.*, 2010), Benazzi (*et al.* 2011 c;) e il Database Nespos 2011 (Neanderthal Studies Professional On Line Service)

Le immagini microtomografiche sono state segmentate in ambiente virtuale seguendo il protocollo di Spoor e colleghi (1993) definito *Half Maximum High* (HMH): questo protocollo è stato creato in risposta all'esigenza di identificare i punti precisi per le misurazioni su immagini ottenute dalla CT, nelle quali i confini tra un tessuto e l'altro spesso appaiono dai contorni sfocati. Il problema è risolvibile utilizzando i valori numerici attribuiti ai singoli pixel che compongono l'immagine: infatti i numeri della CT nel passaggio di interfaccia da un tessuto all'altro cambiano; questo cambiamento non è improvviso, ma graduale, risultando in un'immagine dai contorni non sempre definiti. È stato dimostrato che l'interfaccia si trova a metà fra i due livelli della CT. Il livello dell'interfaccia, identificata con il termine di *Half Maximum High* (HMH), “*can be calculated as the mean of the two CT number levels on either side of the interface.*” (Spoor *et al.*, 1993).

I modelli digitali sono stati creati con il software Amira 5.4. (Mercury Computer Systems , Chelmsford, MA).

Per quanto riguarda il campione rappresentativo di Grotta Paglicci, si è reso necessario creare delle repliche degli originali per procedere alle analisi; in questo caso il protocollo seguito per la realizzazione dei calchi ad alta risoluzione è compatibile con le indicazioni di Fiorenza (et al. 2009). I denti sono stati replicati creando uno stampo in silicone Provil® Novo Light C.D.2 (Heraeus Kulzer GmbH), e replicati in positivo in resina metil-metacrilato Technovit 3040 (Heraeus Kulzer GmbH).

I modelli digitali delle superfici esterne dei calchi di Grotta Paglicci sono stati generati con uno scanner a luce strutturata con una risoluzione di 50µm, Scanprobe ST.

(Scansystems s.r.l. - le specifiche tecniche dello strumento sono reperibili all'indirizzo:[http://www.scansystems.it/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9&Itemid=4&lang=it](http://www.scansystems.it/index.php?option=com_content&view=article&id=9&Itemid=4&lang=it)).

Considerati i numerosi riferimenti a lavori svolti con l'ausilio della µCT nella letteratura riportata in precedenza, si approfondisce di seguito la creazione dei modelli tridimensionali tramite scanner a luce strutturata.

In breve, il sistema prevede un proiettore digitale a luce bianca per l'emissione di frange di luce, e un dispositivo di visione stereo composto da due telecamere *Firewire* per l'acquisizione delle immagini (Fig.4). Questa soluzione permette di mantenere costantemente valida la calibrazione dello strumento e accresce l'affidabilità del sistema grazie all'assenza di organi in movimento.



Fig.4 . Scanprobe St (Scansystem s.r.l.) in dotazione presso il Dipartimento di Storie e Metodi per la Conservazione dei Beni Culturali (Università di Bologna, Polo Scientifico di Ravenna)

Le frange di luce proiettate sull'oggetto si deformano in base alla forma di quest'ultimo, e il pattern viene letto dalle telecamere precedentemente

calibrate con il sistema. Il software dedicato restituisce le singole scansioni sotto forma di una nuvole di punti, ognuno dei quali con coordinate xyz collocabili con precisione nello spazio.

Il modello tridimensionale si ottiene dall' allineamento, e successiva unione, delle nuvole di punti originate dalle diverse riprese dell'oggetto. Per potere essere correttamente integrate evitando deformazioni e incongruenze, le riprese devono essere effettuate soddisfacendo alcuni requisiti fondamentali: le scansioni devono garantire l'intera copertura del dente, ed essere tra loro parzialmente sovrapponibili per favorire il corretto allineamento. Il numero e la modalità delle viste incluse nelle scansioni deve essere ponderato, poiché una quantità eccessiva di dati ridondanti può inficiare la bontà del risultato finale allo stesso modo di una scansione parziale. Nel caso dei denti molari, solitamente si utilizza come riferimento la superficie occlusale, alla quale poi ancorare le viste laterali del dente (Fig.5).

Utilizzando il software integrato allo Scanprobe St , viene creato un primo modello “grezzo” del dente, per verificare che i dati siano stati correttamente acquisiti. Le singole nuvole di punti vengono depurate dalle parti non propriamente pertinenti al dente ( es. *clusters* di punti irregolari o sparsi in sospensione sulla superficie), oppure dalle parti eccedenti le zone di sovrapposizione, così da evitare irregolarità nel modello finale.

Le viste vengono allineate in due passaggi successivi:

- **Manual registration/registrazione manuale:** sulle nuvole contigue, vengono identificati 3 punti omologhi, in modo da ancorarle reciprocamente in posizione corretta e creando una costrizione che impedisca l'eccessiva dislocazione delle nuvole di punti durante la fase successiva. In questa fase è possibile inoltre creare un *blocco* costituito dall' insieme di tutte le nuvole allineate manualmente , ma non ancora unite in un'unica superficie.
- **Fine registration /registrazione fine :** viene individuata una nuvola di riferimento che il programma mantiene fissa, mentre le altre scorrono in diverse iterazioni automatiche, secondo un grado di libertà individuato dall'operatore. Se in fase di registrazione manuale i punti di costrizione fra le nuvole sono stati identificati correttamente, al termine delle iterazioni le nuvole che compongono il modello risultano correttamente allineate ( in genere con margine medio di errore compreso fra 0.01 mm 0 0.018mm) (Fig.5).

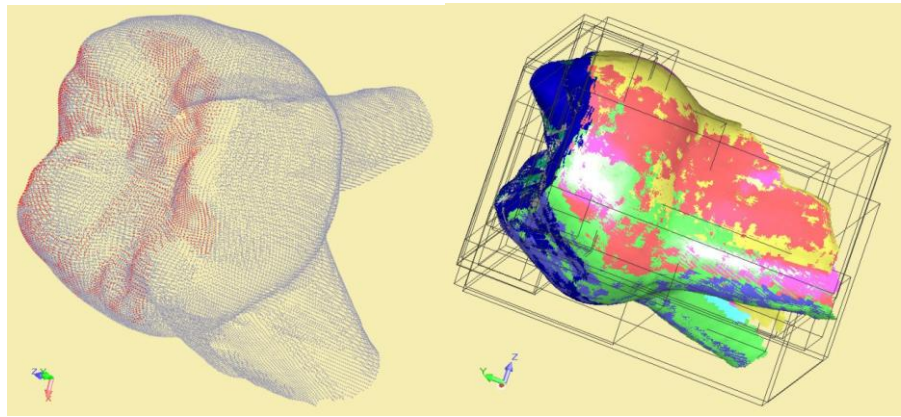


Fig.5. A sinistra, nuvole di punti allineate manualmente; a destra processo iterativo automatico di *fine registration* delle nuvole di punti.

Il modello provvisorio, formato ancora da nuvole di punti, viene importato nel programma di post-processamento Rapidform Xor 2 (INUS Technology, Inc.). Qui viene globalmente riesaminato per correggere eventuali difetti accidentali non individuati dal software precedente, e si realizza il passaggio finale di *merging* (fusione) delle nuvole in un'unica superficie (*mesh*).

### 2.2.1 ANALISI MORFOMETRICHE

La preparazione del campione alle successive analisi morfometriche sulla corona prevede una preliminare procedura di orientamento a garanzia di una corretta rilevazione dei profili di interesse.

La prima fase consiste nella digitalizzazione della linea cervicale: la linea cervicale di ogni singolo dente è stata digitalizzata nel programma Rapidform Xor2 utilizzando il tool > "spline curve".

Una volta creata la curva, viene generato un piano di taglio ottimale (*best fit plane*) in corrispondenza della linea cervicale, definendo così il piano cervicale (Fig.6)

Il piano cervicale viene utilizzato per la successiva fase di allineamento del dente all'interno del sistema cartesiano.

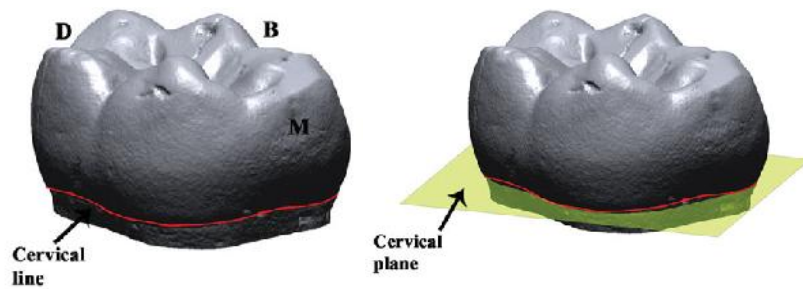


Fig.6. Modello tridimensionale del campione di uomo moderno con visualizzata la digitalizzazione della spline cervicale. D, distale; B, buccale; M, mesiale; Modello tridimensionale del campione di uomo moderno con visualizzazione del *best fit plane* cervicale

Tramite la procedura di *datum match* il piano cervicale viene fatto coincidere con la vista frontale dell'ambiente Rapidform Xor: in questo modo il dente si trova in vista oclusale con il piano cervicale vincolato parallelamente al piano xy di riferimento. Una volta ancorato al piano, il dente può essere ruotato solo attorno al proprio asse z.

La rotazione attorno all'asse viene eseguita soddisfacendo i seguenti criteri:

1. il solco mesio-distale deve trovarsi parallelo all'asse delle x
2. il solco linguale deve trovarsi parallelo all'asse delle y
3. l'asse delle x deve risultare parallelo alla tangente il minimo geometrico dei due lobi del lato linguale (Fig.7).

In presenza di casi particolarmente problematici, come ad esempio denti con usura estremamente evidente, tale da obliterare i solchi, oppure la presenza di un' unica concavità nel lato linguale, vengono utilizzati solo i parametri ben distinguibili fra quelli sopra elencati.

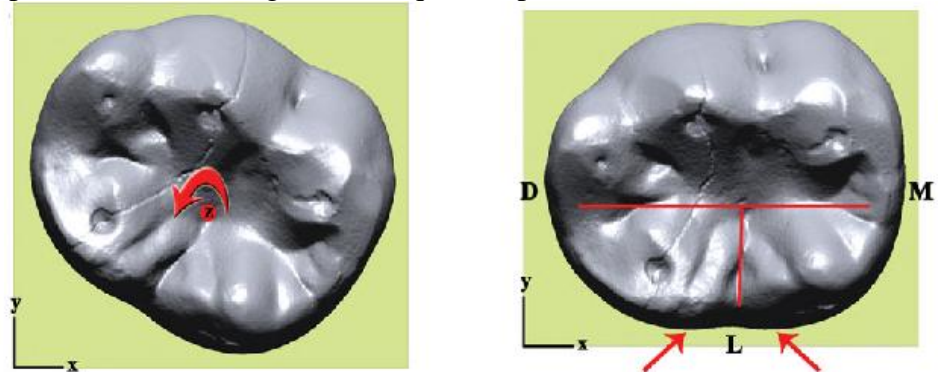


Fig.7: Modello tridimensionale del campione di uomo moderno allineato con il piano cervicale parallelo al piano xy del sistema Cartesiano di riferimento, e successivamente ruotato attorno al proprio asse z secondo i seguenti criteri:

solco mesiodistale parallelo all'asse x, solco linguale parallelo all'asse y, l'asse x parallelo alla tangente al minimo geometrico dei due lobi del lato linguale. D, distale; B, buccale; L, linguale.

Il contorno della sezione identificata dal piano cervicale rappresenta l'outline cervicale (*Benazzi et al., 2011 a,b*). L'outline della corona corrisponde alla silhouette della corona del dente correttamente orientato, in vista oclusale, e proiettata sul piano cervicale. Nei casi in cui i denti mostrano usura interprossimale, i profili originali della porzione mesiale e distale dell'outline coronale sono stati corretti facendo riferimento all'estensione delle faccette di usura presenti sui lati buccale e linguale, facendo seguire all'outline la curvatura del margine della corona in vista oclusale, così come da indicazioni di Wood e Engleman (1988) e ampiamente condiviso (*Bailey 2004; Benazzi et al., 2011 b*). Differente l'approccio necessario per l'analisi del molare Bond1, per il quale è disponibile solo l'immagine in vista oclusale pubblicata da Tushabramishvili.

L'immagine è stata importata in ambiente Rhino 4.0 beta Cad (Robert Mc Neel & Associates Seattle, WA). L'immagine è stata allineata al piano xy del sistema di coordinate cartesiane e ruotato attorno al proprio asse z facendo riferimento al lato linguale (ovvero posizionando la tangente al minimo geometrico dei due lobi del lato linguale parallela all'asse x del sistema di riferimento). Trattandosi di un molare destro, dopo aver digitalizzato manualmente l'outline, la curva è stata replicata specularmente (*mirroring*) per ottenere il profilo di un molare sinistro. La regione mancante di smalto dell'outline sul lato mesio-buccale è stato restaurato attraverso un off-set della corrispondente outline della dentina, di una lunghezza uguale allo spessore dello smalto misurato nella frattura (Fig.8). L'usura interprossimale è stata virtualmente compensata come menzionato già sopra. Deve comunque essere tenuto presente il fatto che l'outline coronale estratta dall'immagine di Bondi 1 non è stata orientata seguendo il protocollo appena descritto, per cui il risultato finale dell'analisi va considerato con precauzione.

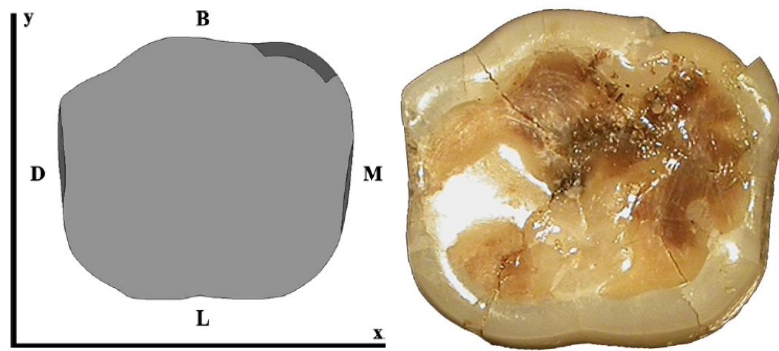


Fig 8. A sinistra: Ricostruzione dell'outline coronale del molare Bondi 1, a partire dall'immagine occlusale pubblicata. L'outline originale è visualizzata in grigio, le porzioni ricostruite in grigio scuro. Il profilo è orientato con il lato linguale parallelo all'asse x (utilizzando il criterio della tangente al minimo geometrico dei due lobi). D, distale, B, buccale; M, mesiale; L, linguale. ; a destra: immagine occlusale sottoposta a *mirroring* del molare Bondi 1.

Entrambe le outline cervicale e coronale di ogni dente sono state importate in Rhino 4.0 per le fasi di preparazione all'analisi statistica. Entrambe sono state centrate *super imponendo* i centroidi delle loro aree. Tutte le outline sono state rappresentate da 16 pseudolandmark ottenuti da 16 vettori radiali equiangolari originati dal centroide dell'area. Il primo raggio è diretto buccalmente e parallelo all'asse y del sistema cartesiano di riferimento (Fig.9).

Infine, sono state rimosse le informazioni sulle dimensioni dalle outline orientate e centrate per mezzo di una scalatura uniforme della configurazione degli pseudolandmark allo Unit Centroid Size.(CS=1)

E' importante dare rilievo al fatto che la procedura seguita differisce dalla propriamente definita Generalize Procrustes Anaysis (GPA) , nella quale rotazione, traslazione e scalatura sono guidati dalle configurazioni dei landmark. Nel presente approccio di geometria morfometrica, che fornisce ancora le coordinate della forma, è stato affrontato il problema relativo alla rotazione e traslazione vincolando l'orientamento del dente e basandolo su considerazioni anatomiche.

Per la stessa ragione, non sono stati fatti scorrere gli pseudolandmark , sia perché in letteratura si trovano molte segnalazioni di estrema precauzione nell'applicare lo slittamento dei semilandmark ( es. minimizzazione della *Procrustes Distance* e minimizzazione della *Bending Energy*) per analizzare curve individuali (*De Groot et al., 2010*), sia perché l'interpretazione della natura biologica della variazione



anatomica potrebbe essere influenzata, in modo diverso, da entrambe queste tecniche (Bruner e Bastir, 2009).

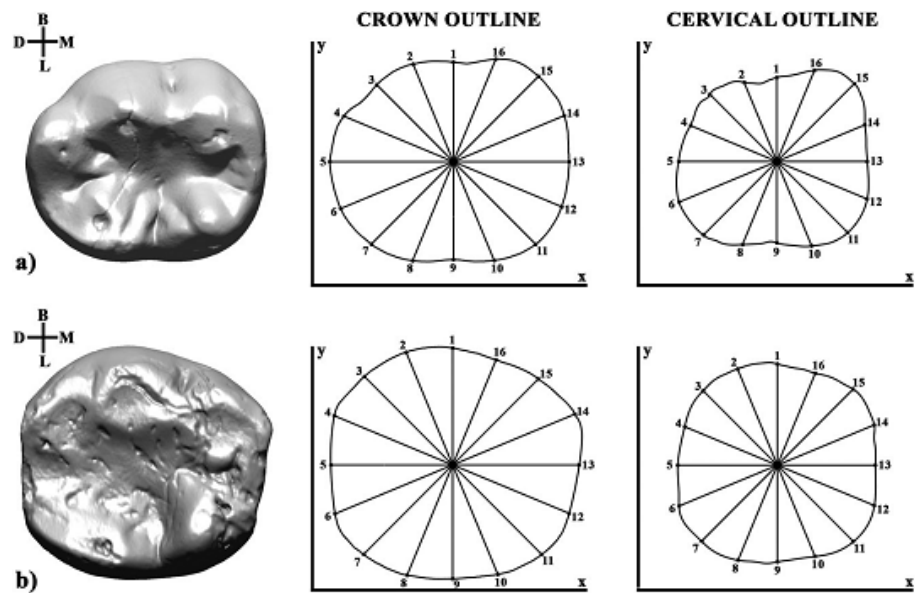


Fig.9 a) nell' ordine: modello tridimensionale del campione moderno, aree dell' outline coronale e outline cervicale suddivise dai 16 vettori equiangolari. b) nell' ordine: modello tridimensionale del campione neandertaliano Cavallo A, aree dell' outline coronale e outline cervicale suddivise dai 16 vettori equiangolari. Per entrambi i profili il primo vettore è diretto buccalmente e parallelo all'asse delle y del sistema Cartesiano. B,buccale; M, mesiale; L, linguale; D, distale.

Tenendo separate le outline cervicali da quelle coronali, è stata effettuata la *Principal Component Analysis* (PCA) del matrix delle coordinate delle forma. Il campione neandertaliano (N) è stato confrontato sia con il campione moderno completo (MH), comprendente umanità recente (RMH) e del Paleolitico Superiore (UPMH), sia separatamente con il solo campione del Paleolitico Superiore. Dal momento che i campioni di Lagar Vehlo 1 e Bondi 1 sono considerati tassonomicamente indeterminati, le variabili di forma delle loro outline coronali, e quelli dell'outline cervicale di Lagar Vehlo 1 sono stati proiettati nello spazio costituito dal campione di confronto solo per verificare il posizionamento delle forme delle loro outlines rispetto alla variazione di forma delle outline dei due gruppi, moderno e neandertaliano.

E' stata eseguita una *leave –one –out cross validation quadratic discriminant analysis* (QDA) di un sottoinsieme di componenti principali per classificare il campione.

Il numero di componenti principali necessarie per la QDA è stato valutato applicando la formula di Anderson (*Anderson 1963*).

I modelli QDA sono stati costruiti escludendo i dati di Lagar Vehlo 1 e Bondi 1. La computazione delle probabilità a posteriori (Ppost) è stata fatta con un' identica probabilità a priori (Pprior) di 0.5 per i gruppi di Neanderthal e i gruppi di Uomo Moderno. E' stato usato un metodo di *cross validation (leave one out method)* per assegnare ogni individuo del campione al gruppo con la più alta probabilità a posteriori.

I campioni di Lagar Vehlo e Bondi 1 sono stati testati in questa fase attraverso tutte le iterazioni della *leave one out cross validation* delle QDA. I dati sono stati processati e analizzati nel software R (R Development Core Team, 2010).

## 2.2.2 ERRORE INTRA E INTER OSSERVATORE

E' già stato verificato che la  $\mu$ CT e i sistemi scanner a luce strutturata restituiscono modelli digitali molto affidabili (*Olejniczak et al., 2007; Fiorenza et al., 2009*) e che i molari possono essere orientati sistematicamente utilizzando la linea cervicale (*Benazzi et al. 2009, 2011 a,b,c*). Allo stesso modo l'identificazione del piano cervicale, la proiezione dell'outline della corona su questo piano e tutte le procedure per ottenere i 16 pseudolandmark sulle outline centrate, sono tutti processi semiautomatici che richiedono un intervento minimo o per lo meno non soggettivo. Al contrario, la rotazione del dente attorno all'asse z richiede un intervento manuale, quindi soggettivo. Si rende quindi necessario valutare l'errore inter e intra osservatore, per verificarne l'incidenza durante la fase di rotazione. Allo scopo è stato selezionato in maniera casuale utilizzando il software R un campione di 10 elementi : il campione è composto da 4 neandertaliani e 6 uomini moderni.

I dieci elementi selezionati sono stati orientati per due volte, ognuna a distanza di dieci mesi da due diversi operatori (Fig.10).

Per ogni elemento è stata misurata la distanza euclidea dalla media della stessa forma, e l'analisi della varianza (ANOVA) è stata utilizzata per esaminare le medie dei gruppi.

Non sono state osservate differenze statisticamente rilevanti per entrambe le tipologie di valutazione, errore intra osservatore (SB: F value =0.253; p value= 0.778; CF: F value= 0.234 p value= 0.634) e inter osservatore ( F value=0.758;p value =0.388) (Fig 10a).

Come ulteriore verifica per testare l'affidabilità dell'orientamento, il sistema è stato perturbato includendo un gruppo nel quale un campione di 10 elementi sono stati intenzionalmente orientati in maniera errata, con un range di rotazione fra i 7 e i 16 gradi. (Fig 10b).

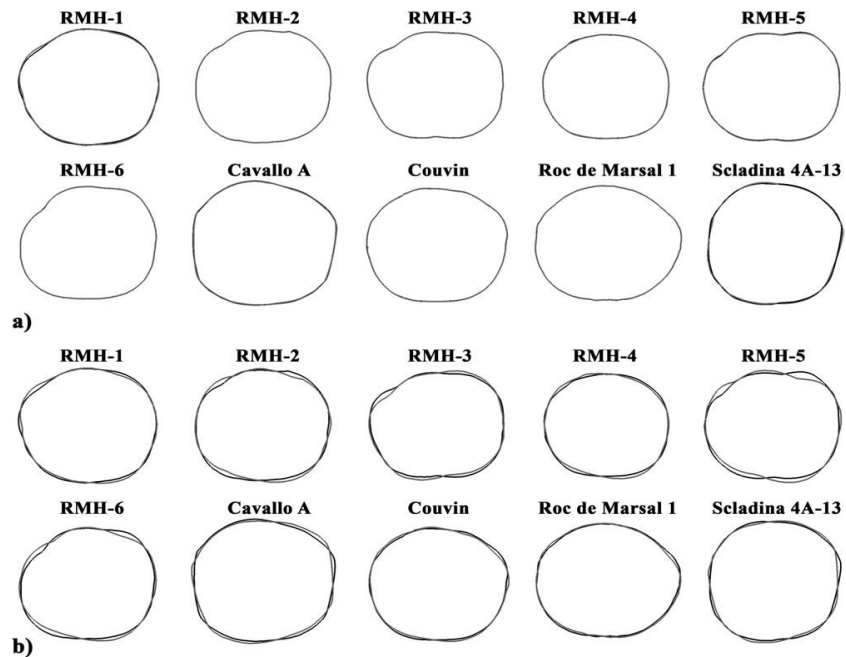


Fig.10. **a)** 10 outline riorientate dai due operatori e superimposte con il centroide della loro area; **b)** 10 campioni orientati consapevolmente in maniera errata superimposte agli omologhi correttamente orientati secondo il protocollo.

In seguito sono stati effettuati con ANOVA i test post-hoc di Tukey per determinare le differenze fra i gruppi. Mentre i confronti a coppie fra le medie dei primi quattro gruppi non sono risultati significativi (p value >0.752), il nuovo gruppo mostra significative differenze rispetto a tutti gli altri (p value <0.001). Questo risultato ribadisce ulteriormente la precisione dell'approccio proposto per l'orientamento dei secondi molari decidui.

### 2.3. RISULTATI

I risultati raggiunti sono mostrati in fig.11 nella PCA costruita per il confronto Neanderthals e Uomo Moderno (cioè comprendendo uomo del Paleolitico Superiore e umanità recente) per quanto attiene le outline coronali (Fig.11a) e le outline cervicali (Fig.11b), e per il medesimo confronto ristretto a Neanderthals e uomo del Paleolitico Superiore (Fig. 11c,d).

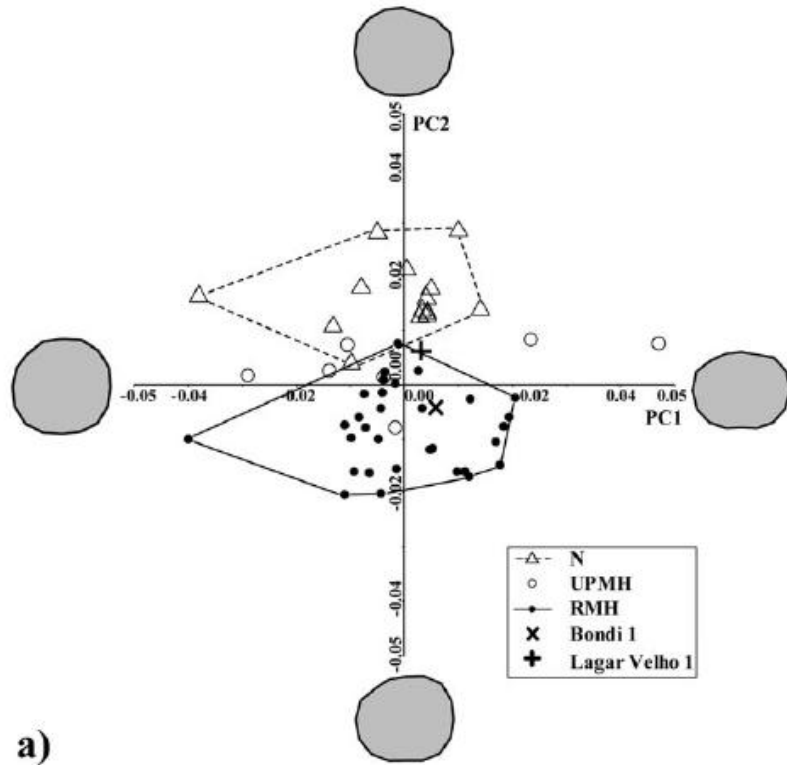


FIG 11a Shape-Space Pca Plot dell'outline coronale dei secondi molari decidui mandibolari - Neanderthal (N) e Modern Humans (MH comprendendo sia RMH sia UPMH).

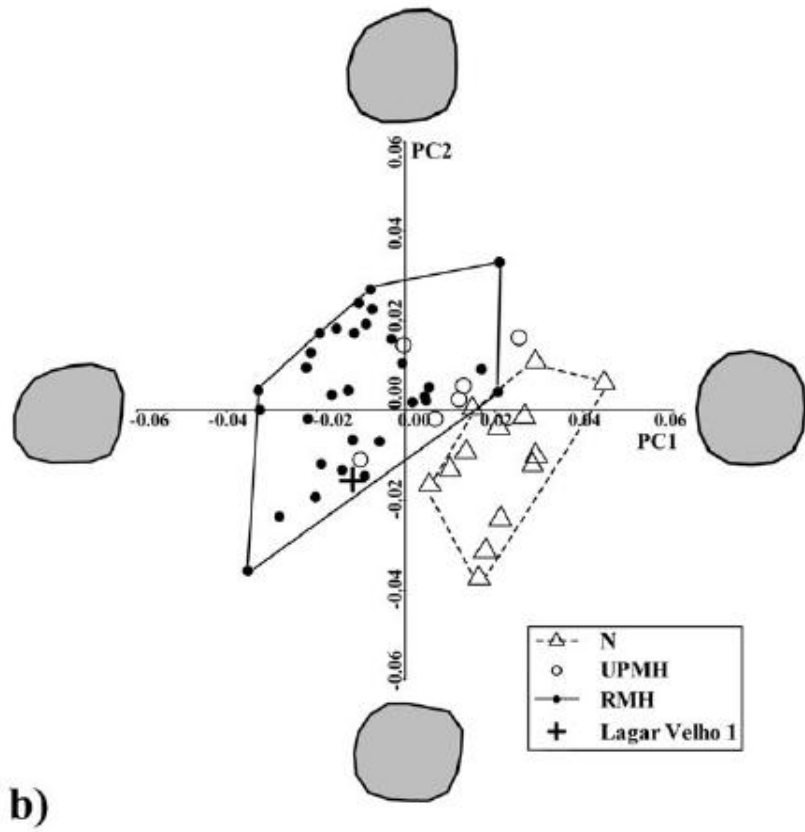


Fig.11b. Shape-Space Pca Plot dell'outline cervicale dei secondi molari decidui mandibolari - Neanderthal (N) e Modern Humans (MH comprendendo sia RMH sia UPMH).

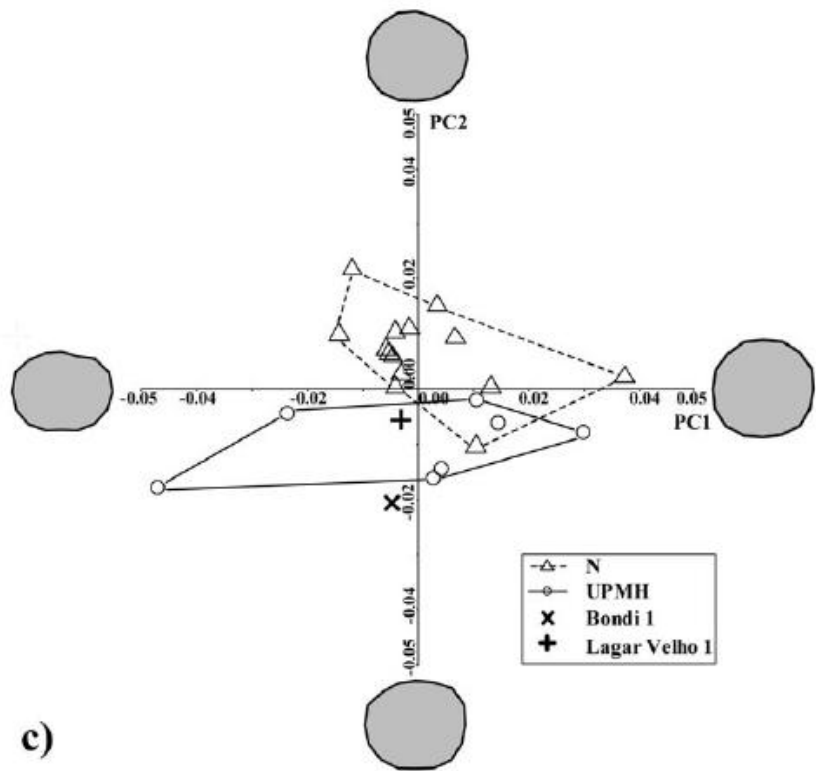


Fig 11c. Shape-Space Pca Plot dell'outline coronale dei secondi molari decidui mandibolari - Neanderthal (N) e Upper Paleolithic Modern Humans (UPMH)

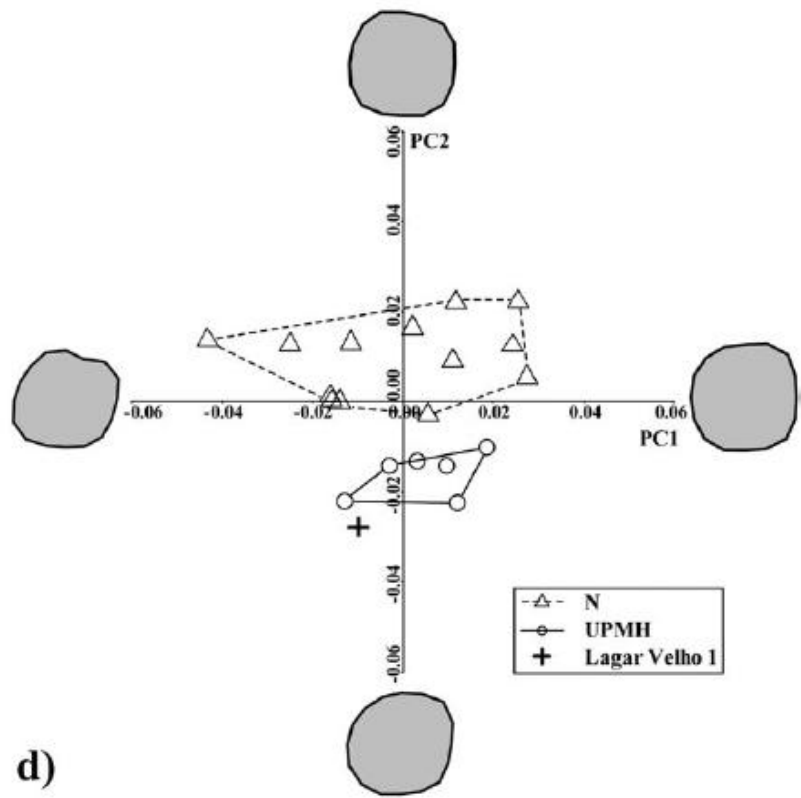


FIG.11d. Shape-Space Pca Plots dell'outline cervicale dei secondi molari decidui mandibolari - Neanderthal (N) e Upper Paleolithic Modern Humans (UPMH).

## OUTLINE CORONALE

Per quanto riguarda le outline coronali (Fig.11a) le prime tre componenti principali (PCs) rendono conto di circa l' 80% della varianza totale. Neandertaliani e moderni si separano lungo la PC2 (31.3% ), che esprime la variazione della forma in funzione delle dimensioni ( allometria statica,  $r = -0.588$ ;  $p < 0.001$ ), mentre non si riconosce alcun trend di differenziazione lungo la PC1 e PC3 (quest'ultima non mostrata.). I Neanderthals mostrano un' espansione dell'outline in senso buccodistale , e un aspetto convesso nel profilo linguale (valori alti delle PC2).

Al contrario, il campione di umanità recente e del Paleolitico Superiore denota una riduzione dell'outline in senso buccodistale , mentre il lato linguale si differenzia per un andamento pressoché rettilineo (valori bassi di PC2).

Lungo la PC1 (41.5%), che registra la variazione della forma indipendentemente dalle dimensioni ( $r = 0.025$ ;  $p = 0.859$ ), i valori più elevati sono associati a un'outline che tende ad allargarsi in senso medio distale, conformandosi in una forma sub rettangolare. Diversamente, i valori più bassi indicano una forma sub circolare. Lungo la PC1, il campione del Paleolitico Superiore mostra una maggiore variabilità rispetto all'umanità recente. I due casi discutibili di Bondi1 e Lagar Vehlo si posizionano diversamente all'interno dell'analisi: Bondi 1 si posiziona con sicurezza all'interno del range di variazione dell'umanità moderna, mentre Lagar Vehlo1 ricade fra i due gruppi.

I risultati della *cross validation* (QDA) delle prime tre PCs, applicata alle 52 outline coronali del campione , escludendo Bondi 1 e Lagar Vehlo, mostrano che circa il 92% dei Neandertaliani e degli uomini moderni sono correttamente discriminati (Tab.2). Fra gli elementi di dubbia attribuzione del campione di uomo moderno , uno appartiene al gruppo selezionato del Paleolitico Superiore (Paglicci 39); basandosi sul modello predittivo, entrambi Lagar Vehlo e Bondi 1 sono classificati come uomo moderno con una probabilità a posteriori (Ppost) rispettivamente di 0.58 e 0.99 .



Parameter	n	Misclassified		Total misclassified	Correctly classified (%)	n	Misclassified		Total misclassified	Correctly classified (%)
		MH <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>				UPMH	N		
Crown outline	52 <sup>c</sup>	2	2	4	92.3	21 <sup>e</sup>	1	2	3	85.7
Cervical outline	50 <sup>d</sup>	1	1	2	96.0	19 <sup>f</sup>	0	0	0	100

Tab.2. Risultati del Cross Validation (QDA) test per entrambe le outline coronale e cervicale dei secondi molari decidui mandibolari. **a** MH, comprendente sia RMH sia UPMH; **b** Neanderthals ; **c** esclusi Lagar Velho1 e Bondi 1; **d** escluso Lagar Velho 1; **e** UPMH e N, esclusi Lagar Valho 1 e Bondi 1; **f** UPMH e N escluso Bondi 1.

## OUTLINE CERVICALE

Nell'analisi dell'outline cervicale dei secondi molari decidui (Fig.11b), le prime tre PCs descrivono circa il 74.7% della variazione totale. I neandertaliani e gli uomini moderni si distinguono lungo la PC1 (35.5%), la quale esprime la variazione della forma in funzione delle dimensioni (allometria statica,  $r = 0.59$ ;  $p < 0.001$ ), ma si presentano sovrapposti lungo PC2 e PC3 (quest'ultima non mostrata). L'outline cervicale del gruppo neandertaliano denota una tendenza all'espansione della forma in direzione buccodistale e un aspetto convesso sul lato linguale (alti valori sulla PC1), originando una caratteristico aspetto generale di tipo sub circolare.

Al contrario il campione moderno, comprensivo di entrambi i gruppi del Paleolitico Superiore e umanità recente, si distinguono per un outline dalla forma sub-quadrate, caratterizzata da una notevole riduzione in senso bucco distale e da un andamento rettilineo sul lato linguale (bassi valori della PC1). I cambiamenti di forma non collegati alle dimensioni ( $r = -0.22$ ;  $p = 0.116$ ) sono ancora una volta evidenziati lungo la PC2 (24.7%). I valori bassi caratterizzano outline di forma sub quadrata e con una leggera espansione buccodistale, mentre i valori più alti identificano sempre outlines di forma sub quadrata, ma contraddistinte da riduzione in senso buccodistale. Il campione di Lagar Velho 1 ricade all'interno del range dell'umanità moderna.

La *cross-validation* QDA delle prime tre PCs, applicata all'intero campione di 50 outlines cervicali, escludendo Lagar Velho, porta a una corretta classificazione del 96% del campione, e attribuisce Lagar Velho 1 all'umanità moderna con una probabilità a posteriori  $P_{post} > 0.98$ .

I risultati non cambiano anche quando sono messi a confronto i Neandertaliani con il solo gruppo del Paleolitico Superiore (Fig.11d, Tab.2). Anche se consapevoli della ridotta consistenza numerica del

campione rappresentativo, sia per le outline coronale (PC1 = 55.5%; PC2 = 19.9 %; Fig.11c), sia con maggiore estensione per l'outline cervicale (PC 1= 41.7% ; PC2 = 23.9% ; Fig 11d), il campione del Paleolitico Superiore e i neandertaliani si separano lungo la PC2, basate sugli aspetti morfologici menzionati precedentemente. E' importante notare, comunque, che in entrambi i casi la PC2 non è correlata alle dimensioni (per l' outline coronale  $r = 0.313$ ;  $p = 0.167$ ; per l'outline cervicale  $r = 0.396$ ;  $p = 0.08$ ), così che le differenze morfologiche osservate fra i due gruppi non dovrebbero essere interpretate in termini di allometria. Come osservato precedentemente due Neandertaliani e Paglicci 39 non sono risultati classificati correttamente utilizzando l'outline della corona, mentre tutti i campioni sono stati assegnati correttamente grazie all'outline cervicale (Tab.2). Ancora una volta, in entrambi i casi Bondi 1 e Lagar Velho 1 sono attribuiti al Paleolitico Superiore, l'ultimo con  $P_{post} = 0.78$  e  $P_{post} > 0.99$  per l'outline coronale e cervicale rispettivamente .

## 2.4 DISCUSSIONE

I risultati delle analisi indicano che entrambe le outlines differenziano con successo neandertaliani (N) e uomini moderni (MH), con oltre il 96% del campione correttamente classificato; lo stesso risultato positivo si ottiene anche quando il paragone è ristretto ai neandertaliani con i soli uomini del Paleolitico Superiore (UPMH). In entrambe le analisi, comprendendo umanità recente (RMH) e non, le differenze morfologiche delle outlines coronali osservate fra neandertaliani (espansione buccodistale e caratteristica convessità dell'andamento dell'outline sulla vista linguale) e uomini moderni (riduzione buccodistale e andamento rettilineo dell'outline sulla vista linguale) si riflettono anche nella regione cervicale.

Ciò non di meno, nel primo caso, cioè con incluso il campione di umanità recente, la separazione fra i due gruppi è data dalle componenti allometriche di variazione (variazione della forma dipendente dalle dimensioni); nel secondo caso, con l' esclusione dal confronto dell' umanità recente, le stesse caratteristiche morfologiche, che distinguono i neandertaliani anche dagli uomini del Paleolitico Superiore, non sono correlate alle dimensioni. In qualche misura, questo risultato suggerisce che i secondi molari decidui appartenenti al campione di umanità recente

hanno mantenuto la morfologia caratteristica del Paleolitico Superiore, ma a differenza di questi ultimi sono caratterizzati da una riduzione dimensionale.

Sono tuttavia necessarie alcune considerazioni più specifiche riguardo al campione del Paleolitico Superiore, in particolare per Lagar Vehlo 1 e Bondi 1. A dispetto del fatto che l'umanità del Paleolitico Superiore tende a separarsi dai neandertaliani, le outlines coronali del Paleolitico Superiore non solo sono più variabili delle outlines dell'umanità recente ( con alcuni esemplari vicini al range di variazione dei neandertaliani), ma sono anche più variabili delle outline cervicali dello stesso gruppo. Questo dovrebbe spiegare l'attribuzione di Lagar Velho 1 al Paleolitico Superiore con un basso valore di Ppost basata sull'outline coronale.

Il risultato ambiguo è da imputare molto probabilmente alla caratterizzazione mista di questo dente come una morfologia mista fra Neanderthals e umanità moderna (*Duarte et al., 1999; Bayle et al., 2010*). Questo campione è stato utilizzato per avvalorare l'ipotesi di una commistione Neanderthals e moderni nella penisola Iberica (*Zilhão et al., 2010*). Ciò non di meno bisogna ricordare che anche un altro campione del Paleolitico Superiore, Paglicci 39, è stato erroneamente classificato come Neanderthal basandosi sull'outline coronale, ma correttamente attribuita all'umanità moderna sulla base dell'outline cervicale. Basandosi sul nostro campione, questi risultati suggeriscono che i decidui del Paleolitico Superiore (UPMH) mostrano una variabilità morfologica più alta rispetto a quelli dell'umanità recente e dei neandertaliani. Sicuramente sarebbe auspicabile ampliare il campione del Paleolitico Superiore (UPMH) e di Umanità Recente includendo popolazioni geograficamente distinte, per una panoramica di maggior completezza sulle differenze morfologiche sia fra Umanità Recente (RMH) e Paleolitico Superiore e fra Neandertaliani e Paleolitico Superiore. Se ricerche future confermeranno ulteriormente le nostre assunzioni sull'ampia variabilità della dentizione del Paleolitico Superiore rispetto a quella dell'umanità recente (RMH), allora si rende necessario ribadire una grande attenzione quando i neandertaliani sono confrontati con campioni di umanità moderna in larga parte rappresentati campioni di umanità recente (RMH), poiché è ragionevole pensare che questi ultimi potrebbero non rappresentare la variabilità della prima umanità moderna. L'outline cervicale rappresenta un parametro affidabile per distinguere fra neandertaliani e umanità moderna, indispensabile nel confronto con reperti fortemente danneggiati o usurati nei quali la maggior parte delle caratteristiche morfologiche della corona non siano più visibili. E'

interessante notare che risultati simili, anche se meno chiari sono stati ottenuti per i primi molari mandibolari permanenti (*Benazzi et al., 2011 b*). L'outline coronale del primo molare mandibolare permanente è stata riconosciuta come indicatore tassonomico più efficace rispetto all'outline cervicale. Risulta oltremodo interessante che sia la morfologia dell'outline coronale (per la maggior parte) sia la morfologia dell'outline cervicale del primo molare permanente mandibolare, rispecchino quella dei secondi molari decidui mandibolari (espansione/riduzione buccodistale e convessità/linearità dell'andamento dell'outline in vista linguale). Questi risultati dimostrano la generale annotazione per cui la morfologia del secondo molare deciduo mandibolare abbia una marcata somiglianza con quella del primo molare permanente mandibolare (*Hillson, 1996*). Infine le differenze di forma nell'aspetto disto buccale fra uomini moderni e neandertaliani a livello del secondo molare deciduo, sono state osservate anche nella regione disto linguale del corrispettivo mascellare (*Benazzi et al., 2011 a*), ma il grado di correlazione fra la morfologia dei molari decidui superiori e inferiori è ancora da accertare.

Una notazione particolare è richiesta per il campione di Bondi 1 : Tushabramishvili e colleghi hanno ipotizzato che appartenesse all'umanità moderna, ma non sono stati in grado di affermare un'attribuzione tassonomica certa sulla base degli aspetti morfologici della corona a causa della pesante usura che interessa il dente. Anche i risultati del presente studio attribuiscono Bondi 1 all'umanità moderna, e nonostante il dente non sia stato orientato con criteri omogenei rispetto al resto del campione, l'attribuzione che ne consegue dovrebbe essere tenuta in considerazione (*Benazzi et al., 2012*). L'adozione di un sistema di orientamento comune e codificato per la realizzazione delle foto occlusali dei reperti dentali costituirebbe un'importante progresso nella possibilità di utilizzare i dati derivanti direttamente dalle immagini pubblicate in analisi rigorose. Da questo impulso scaturisce la motivazione alla realizzazione dell'ultima parte del presente lavoro, nella quale ci si propone di testare ulteriormente il protocollo proposto da Benazzi 2009 per l'orientamento dei primi molari permanenti (sia mascellari che mandibolari), utilizzando l'allineamento di tre punti lungo la linea cervicale.

### 3. CONFRONTO 2D e 3D

#### 3.1.MATERIALI

Il campione utilizzato in questa seconda sezione è costituito da 20 secondi molari decidui inferiori provenienti da diverse necropoli italiane. Numero, provenienza, lateralizzazione e stadio di usura (*Smith, 1984*) sono indicati in tabella 1. Come già indicato nel capitolo precedente, tutti i molari sono stati trattati come molari sinistri, e in presenza di campioni di lateralità opposta sono state create immagini speculari prima di procedere alle analisi.

Taxon Number	Specimen	Country	Side	Source	Wear Stage
RMH C1	SMBT TB 5	Italy	R	Original Data (Surface Scan)	1
C2	SM BT TB 6 IND 2	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1
C3	VALD TB 35 INF MIN	Italy	R	Original Data (Surface Scan)	1
C4	ROCCAP S. 107	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1
C5	VALD TB 70 IND 2	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1
C6	SM BT TB 92	Italy	R	Original Data (Surface Scan)	2
C7	RN XX SETT TB 65	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1
C8	RN XX SETT TB 66	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	2
C9	VALD TB 35 INF M1	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1
C10	VALD TB 35 INF M2	Italy	R	Original Data (Surface Scan)	1
C11	SM BT US 15	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	2
C12	RN XX SETT TB 70	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1
C14	SM BT US 15_2	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	2
C15	RN XX SETT TB 40	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1
C16	SM BT US 15B	Italy	R	Original Data (Surface Scan)	2
C18	RN XX SETT TB 35	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1
C19	RN XX SETT TB 10 IND 2	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1
C20	SM BT TB 84	Italy	R	Original Data (Surface Scan)	2
C21	SM BT TB 6 IND 1	Italy	R	Original Data (Surface Scan)	1
C22	SM BT TB 4	Italy	L	Original Data (Surface Scan)	1

Tab.1 Legenda siglatura del campione: SMBT- San Martino in Rivosecco, Borgotaro Parma (*Buti, 2006*); RN XX SETT- Via XX Settembre (Rimini)( *Miulli, 2011*); VALD- Valdaro (Mantova), non pubblicato; ROCCAP- Roccapelago (Modena) non pubblicato.

## 3.2 METODI

### 3.2.1 MODELLI 3D

Ogni elemento del campione è stato acquisito utilizzando uno scanner a luce strutturata ScanProbe St (Scansystem srl), già menzionato con relative specifiche tecniche nella prima parte della dissertazione. La procedura seguita per la creazione dei modelli tridimensionali è la stessa adottata per il campione del Paleolitico Superiore di Grotta Paglicci. Le nuvole di punti sono state processate inizialmente con il software integrato allo scanner, per poi essere esportate in Rapidform Xor (Inus Technology) per la creazione del modello tridimensionale definitivo.

### 3.2.2 IMMAGINI FOTOGRAFICHE

Per ogni elemento del campione è stata realizzata un'immagine fotografica della vista occlusale da utilizzare per le successive analisi.

L'allestimento del set fotografico è stato affrontato sulla base delle diverse esperienze riportate in letteratura. Le indicazioni disponibili per la scelta del mezzo fotografico indicano come parametri basilari una buona risoluzione delle immagini e ove possibile l'utilizzo di un macro setting per riprese ravvicinate.

Lo strumento utilizzato per le riprese è una NIKON D7000 integrata con un obiettivo macro Sigma 70mm F2.8 EX DG Macro

La macchina fotografica è stata assicurata a un tripode munito di sistema di livellazione, e tramite strumentazione apposita è stata verificata l'effettiva orizzontalità del piano di lavoro e l'ortogonalità del fuoco della macchina con il punto di posizionamento del campione. Come ultima verifica dell'assenza di distorsione è stata realizzata un'immagine di un foglio millimetrato.

La luminosità dell'ambiente è stata regolata per evitare l'utilizzo del dispositivo flash.

Come ribadito più volte nel corso della dissertazione, apprestandosi ad acquisire delle immagini occlusali per finalità morfometriche, l'orientamento del dente è di fondamentale importanza poiché esso

influisce sulla geometria del profilo che si intende estrarre. (Robinson *et al.*, 2002).

A questo proposito, l'ultimo elemento da considerare per completare l'allestimento è il supporto per il dente al momento dell'acquisizione.

In letteratura sono presenti diverse alternative ed emerge chiaramente che la scelta sia in gran parte influenzata dal tipo di orientamento che si persegue

Il protocollo di orientamento che si intende applicare in questa sede è quello proposto da Benazzi (*et al.*, 2009).

Il metodo ottimale per orientare un primo molare permanente mandibolare, anche in presenza di usura moderata della superficie occlusale, consiste nel portare sullo stesso piano i tre punti linguale-mesiale-distale identificati sulla linea cervicale. (Fig.1)

Nella pratica questo approccio risulta essere un'approssimazione del metodo basato sul best-fit plane della linea cervicale utilizzato per i modelli 3D.

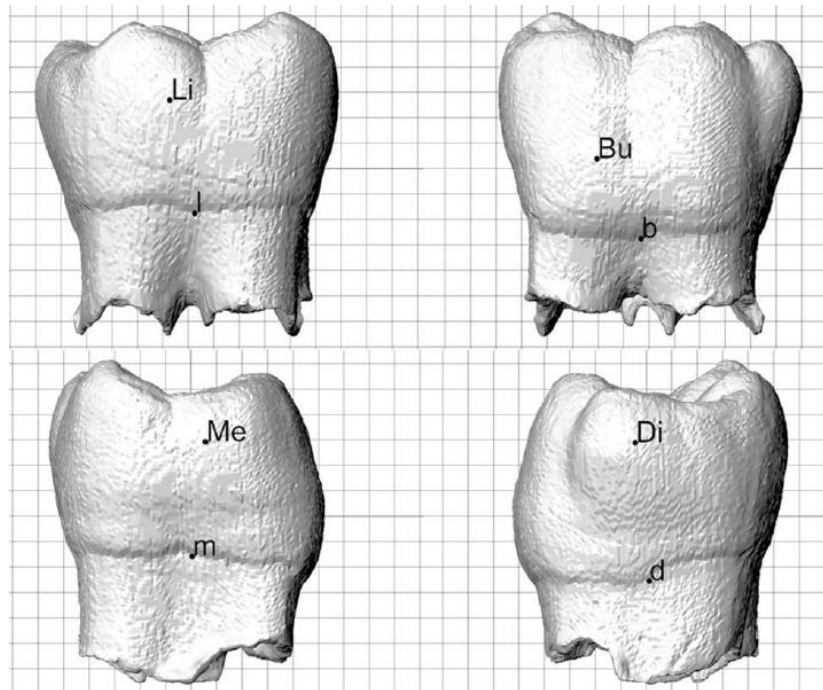


Fig.1 Landmarks identificati sui modelli tridimensionali del primo molare inferiore permanente. Sulla corona: Li-linguale, Bu- buccale, Me-mesiale, Di-distale. Sulla linea cervicale b-buccale, l-linguale,m-mesiale, d-distale.(Benazzi *et al.*, 2009)

L'attuazione di questo sistema di orientamento al di fuori dell'ambiente virtuale implica la scelta di un supporto adeguato che permetta di monitorare l'allineamento dei punti di interesse.

Il materiale selezionato allo scopo è un derivato della schiuma fenolica, materiale versatile e utilizzato anche nel settore ortopedico.

La peculiare composizione di questo materiale, poco elastico e caratterizzato da un'elevata microporosità, gli conferisce un aspetto rarefatto che ben si adatta al nostro scopo. È possibile infatti inserire gli oggetti esercitando una pressione minima, garantendone allo stesso tempo la stabilità. Il confronto con i denti decidui spesso implica la presenza di radici frammentate e fragili, soprattutto in caso di gemme dentali con radici appena accennate, per le quali l'utilizzo di plastiline o altri materiali simili rimane problematico.

Graniglie metalliche o sabbia, alternative valide se si considera la fragilità del reperto, non sono tuttavia utili allo scopo, poiché il livello della superficie limitrofa all'inserimento del dente si altera, precludendo il monitoraggio dell'allineamento dei tre punti sulla linea cervicale.

Diversamente, le radici del dente si inseriscono nettamente nella schiuma lasciando inalterato il livello del piano, creando un utile riferimento per controllare l'allineamento dei punti di interesse.

Fra i formati in commercio, la schiuma fenolica è disponibile anche in sezioni a parallelepipedo. Anche il tono verde scuro della colorazione si è rivelato utile nel contrastare efficacemente con la colorazione del dente.

Tutte queste caratteristiche oltre a una facile reperibilità ne fanno quindi la scelta ottimale.

Per terminare la preparazione dell'area di acquisizione è stata verificata la perfetta orizzontalità della superficie di inserimento del dente con appositi strumenti di livellazione. Per facilitare il monitoraggio i punti sulla linea cervicale sono stati leggermente evidenziati a grafite, facilmente rimovibile.



### 3.2.3 ANALISI MORFOMETRICHE

L'estrazione delle outline della corona dai modelli tridimensionali è avvenuta secondo le modalità già illustrate nella prima sezione metodologica, e terminando con l'importazione dei profili all'interno dell'ambiente Rhinoceros 4.0 Beta Cad Enviroment (Robert McNeel & Associates, Seattle, WA).

L'estrazione del profilo della corona dalle immagini fotografiche è stata effettuata come nel caso dell'immagine del molare di Bondi 1.

L'immagine oclusale di ogni dente è stata importata in Rhinoceros Beta Cad, allineata al piano xy del sistema di coordinate cartesiane e ruotata attorno al proprio asse z facendo riferimento al lato linguale (ovvero posizionando la tangente al minimo geometrico dei due lobi del lato linguale parallela all'asse x del sistema di riferimento).

L'outline della corona di ogni dente è stata digitalizzata utilizzando una polilinea per punti di controllo (Fig.2).

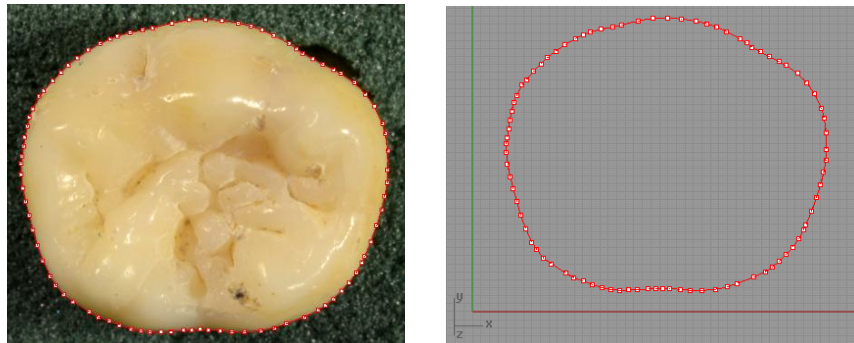


Fig.2. Campione 10, secondo molare deciduo mandibolare destro. A sinistra immagine oclusale con evidenziata la digitalizzazione dell'outline coronale. A destra l'outline con evidenziati i punti di controllo.

Sia le outline estratte dai modelli tridimensionali (M-3D), sia quelle estratte dalle immagini fotografiche (M-ph) sono state centrate super imponendo il centroide delle rispettive aree. Tutte le outline sono state rappresentate da 16 pseudo landmark individuati sul profilo da 16 vettori equiangolari originati dal centroide dell'area. Infine sono state rimosse le informazioni dimensionali applicando una scalatura uniforme.(Fig.3)

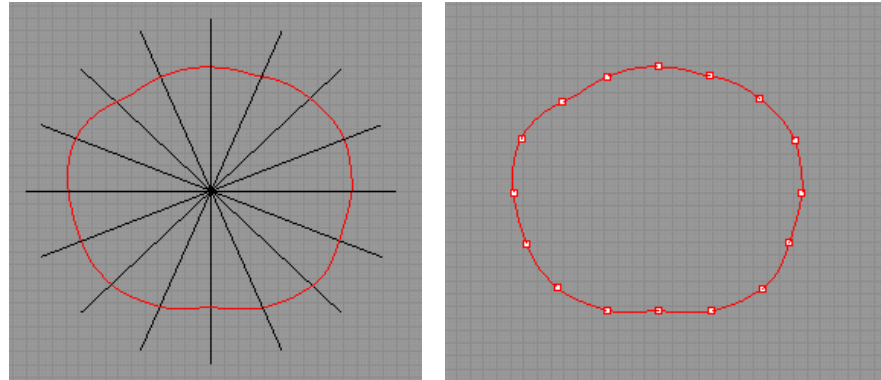


Fig. 3. A sinistra, outline coronale con schematizzazione dei 16 vettori radiali equiangolari originati dal centroide dell'area. A destra, identificazione dei 16 pseudolandmarks sull'outline.

Come descritto precedentemente, anche in questo caso non è stata utilizzata una Generalized Procrustes Analysis dato che traslazione e rotazione sono state effettuate in fase di orientamento delle outlines. Allo stesso modo si è evitato lo slittamento degli pseudo-landmarks lungo l'outline. La Principal Component Analysis del matrix delle coordinate di forma è stata effettuata in diverse modalità, sia separatamente per le outline coronali estratte dai modelli tridimensionali e dalle immagini bidimensionali, sia inserendole simultaneamente. In tutte e tre le analisi gli elementi del campione attuale sono stati integrati al gruppo iniziale di Neanderthals, Uomo Moderno e del Paleolitico Superiore.

Il significato della distribuzione ottenuta e le implicazioni metodologiche sono state analizzate attraverso diversi test di permutazione in successione, variando di volta in volta il popolamento del campione in risposta agli interrogativi espressi.

Si riportano le seguenti analisi:

### Analisi 1

I due gruppi di outline (M-3D e M-ph) sono stati unificati ed è stata calcolata l'outline media. Successivamente per ogni individuo è stata calcolata la *Procrustes Distance* dall'outline media per verificare, attraverso un test di permutazione, se i valori medi dei due gruppi sono significativamente differenti (“*inter group variation*”).

### Analisi 2

È stata calcolata la *Procrustes Distance* tra un individuo M-ph e l'omologo M-3D (matrix-1 costituita da 20 valori). Inoltre, è stata calcolata la matrice di *Procrustes Distance* tra ogni individuo M-ph e tutti gli individui M-3D (matrix-2, costituita da 20x20 valori). Attraverso un test di permutazione si valuta se la media ottenuta per matrix-1 è significativamente minore della media ottenuta da 1000 combinazioni di 20 valori selezionati a “random” da matrix-2.

### Analisi 3

Viene effettuato un test di permutazione dei primi due “*PC scores*” (PCs) della PCA. I PCs rappresentano le nuove coordinate di ciascun individuo all'interno del PCA plot. L'analisi è volta a valutare se la variabilità osservabile nel PCA plot è statisticamente significativa.

I dati sono stati processati e analizzati nel software R (R Development Core Team 2010).

## 3.2.4 ERRORE INTER E INTRA OSSERVATORE

Se nella prima sezione metodologica è stata verificata l'attendibilità del protocollo applicato in ambiente virtuale, in questa seconda sezione è stato parimenti valutato l'errore intra e inter osservatore nell'attuazione dell'orientamento, della realizzazione delle immagini fotografiche e della preparazione alle analisi morfometriche. Un sub campione di 5 individui è stato selezionato casualmente utilizzando il software R, e gli elementi sono stati orientati due volte a distanza di due mesi. Per ogni elemento è stata calcolata la distanza dalla media del proprio gruppo di appartenenza. Trattandosi di campioni composti da 5 elementi è stata verificata la normalità della distribuzione tramite il test di Anderson

Darling; verificati positivamente gli assunti necessari (Test intra1= 0,364 p=0,273; Test intra2= 0,345 p= 0,311; Test inter= 0,333 p=0,337) i gruppi sono stati confrontati con ANOVA. Non sono state osservate differenze statisticamente significative per entrambi gli errori inter- (F value=0,0029 pvalue=0,99 ) e intra- (F value= 0,0045 p value=0,947 ) osservatore.

### 3.3 RISULTATI

I risultati della PCA mostrano la distribuzione delle outline coronali dei 20 individui M-3D (Fig 4a), delle outline M-ph (Fig.4b), ed infine dei modelli tridimensionali e fotografici inseriti contemporaneamente (Fig.4c).

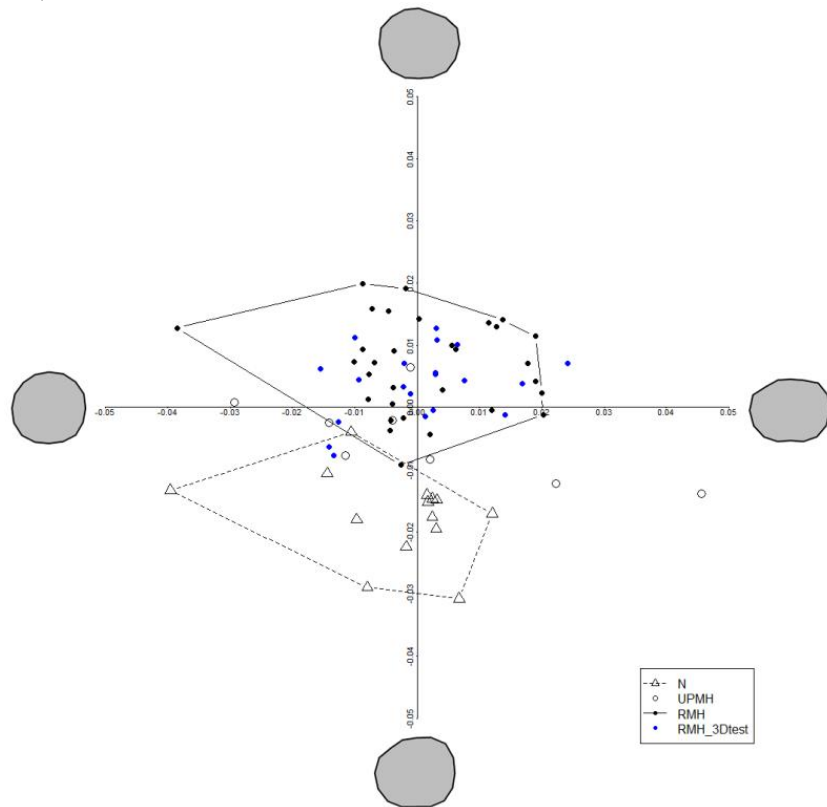


Fig.4a. Shape space PCA(PC1\_PC2) Plots delle outline coronali dei modelli tridimensionali del nuovo campione moderno (RMH\_3d test) a confronto con le outline coronali del campione di Neanderthals (N), Paleolitico Superiore (UPMH) e uomo moderno recente (RMH).

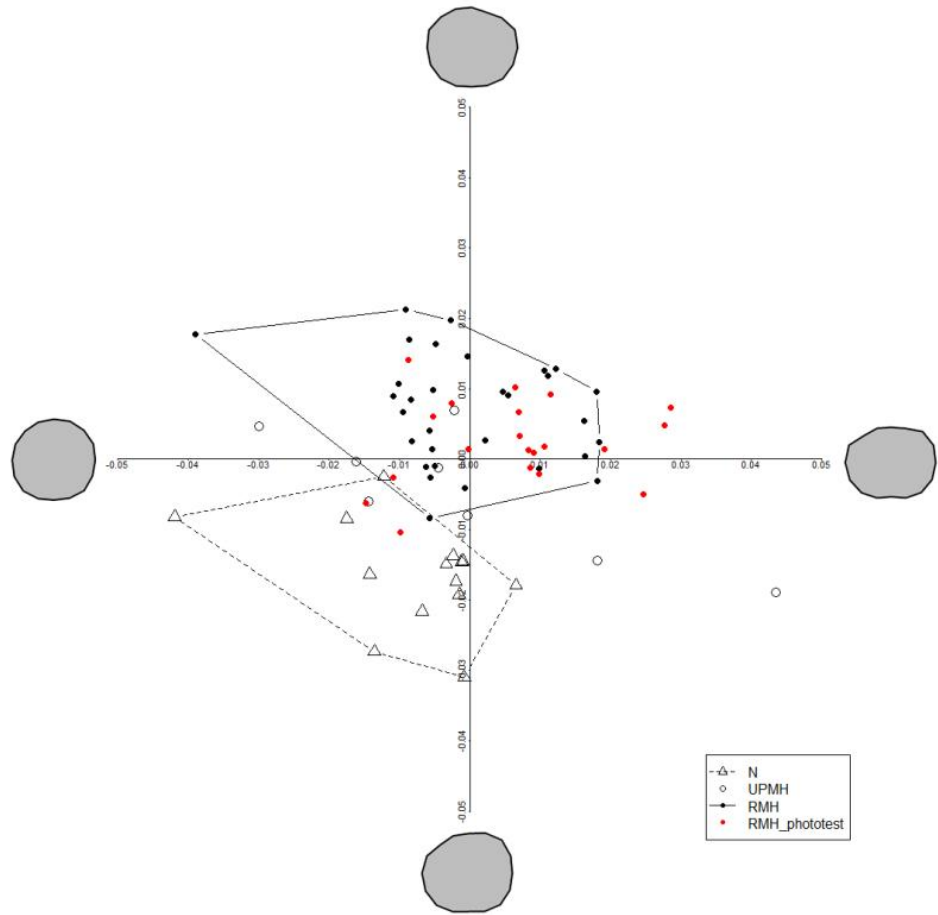


Fig 4b. Shape space (PC1\_PC2) Plots delle outline coronali dei modelli fotografici del nuovo campione moderno (RMH\_phototest) a confronto con le outline coronali del campione di Neanderthals (N), Paleolitico Superiore (UPMH) e uomo moderno recente (RMH).

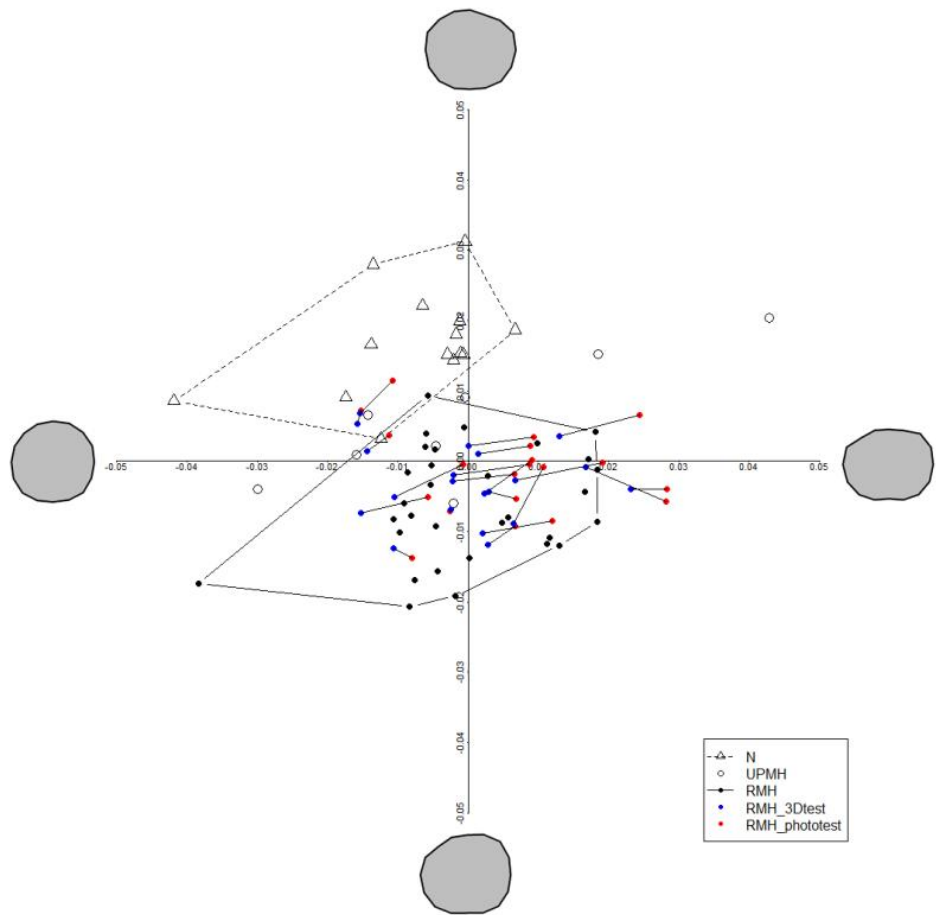


Fig 4c. Shape space PCA(PC1\_PC2) Plots delle outline coronali dei modelli fotografici (RMH\_phototest) degli omologi tridimensionali(RMH\_3d test), a confronto con le outline coronali del campione di Neanderthals (N), Paleolitico Superiore (UPMH) e uomo moderno recente (RMH). I segmenti utilizzati collegano ogni outline del photo test con la rispettiva outline tridimensionale.

Dal grafico in figura (4a) le outline coronali M-3D risultano distribuite compatibilmente al campione moderno, classificando quindi correttamente i nuovi 20 individui come moderni; le outline ottenute dalle immagini fotografiche (Fig.4b) permettono di classificare correttamente 19 individui dei 20 inseriti.

La differente distribuzione del campione fotografico rispetto all'omologo tridimensionale, già intuibile dalle immagini separate, emerge ancor più chiaramente nel grafico in cui entrambi sono inseriti contemporaneamente. Per rendere leggibile la relazione fra le immagini

fotografiche e i corrispettivi tridimensionali, ogni coppia di dati è stata unita per mezzo di un segmento (Fig. 4c).

Ciò nonostante l'Analisi 1 ("intergroup analysis") non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i due gruppi (pvalue = 0.469), risultato supportato anche dall'Analisi 3 in cui vengono utilizzati i PCs (p=0.213). Inoltre, l'Analisi 2 indica che la *Procrustes Distance* tra un individuo M-ph e l'omologo M-3D è significativamente minore rispetto alla distanza tra un, i.e., M-ph e tutti gli altri individui M-3D (p<0.001). Questi risultati sottolineano che, sebbene le differenze osservabili nel PCA plot, non sussistono differenze significative tra M-3D e M-ph.(Fig.4d)

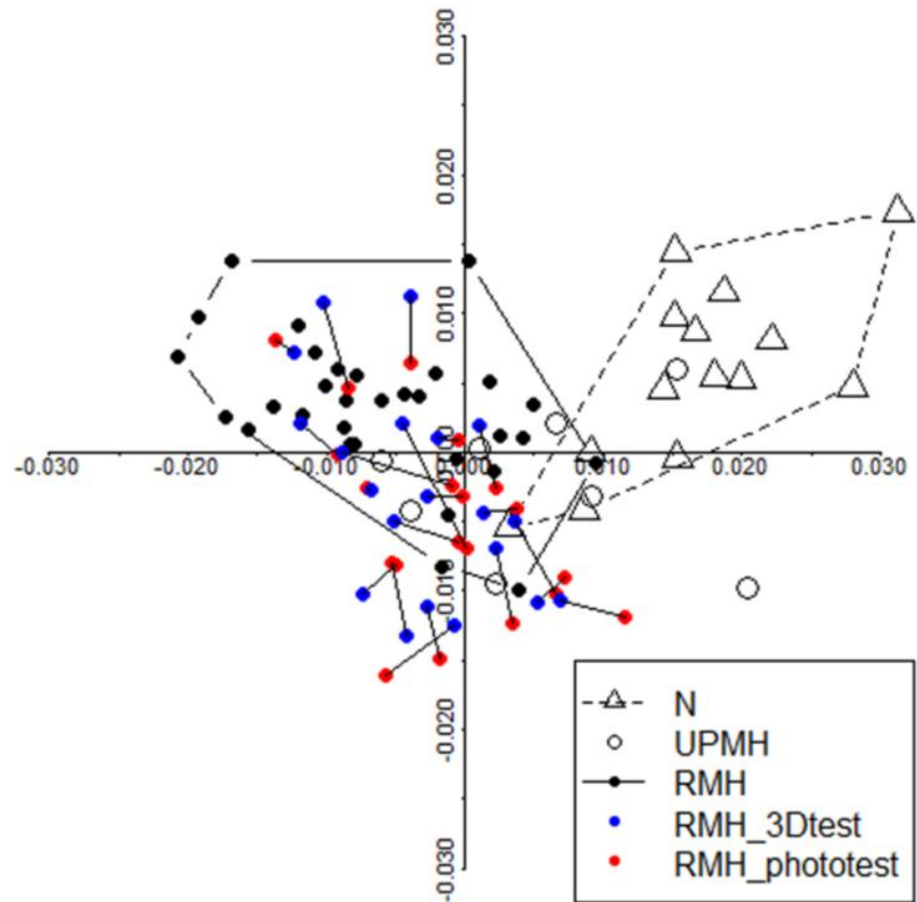


Fig. 4d. Shape Space Plot (PC2\_PC3) delle outline tridimensionali (RMH\_3Dtest) e fotografiche (RMH\_phototest).

### 3.4 DISCUSSIONE

I risultati della *Principal Component Analysis*, visualizzati graficamente, mostrano una corretta classificazione tassonomica del 95.7%.

Dalla rappresentazione grafica emergono chiaramente due aspetti: la scarsa variabilità morfologica all'interno del nuovo campione di 20 individui moderni, e la differente distribuzione degli M-ph rispetto a M-3D.

Per questi motivi è stata approfondita la relazione fra le immagini fotografiche e il campione tridimensionale. Le analisi indicano che la *Procrustes Distance* tra un individuo M-ph e l'omologo M-3D è significativamente minore rispetto alla distanza tra un M-ph e tutti gli altri individui M-3D ( $p < 0.001$ ). Inoltre, nonostante le differenze visivamente osservabili nel PCA plot, non sussistono differenze statisticamente significative tra M-3D e M-ph, risultato supportato anche dall'analisi dei PCs ( $p = 0.213$ ). L'assenza di valori statisticamente significativi nella valutazione dell'errore inter e intra osservatore conclude la serie di requisiti necessari alla valutazione positiva complessiva del protocollo e della sua riproducibilità.

E' interessante notare che le immagini fotografiche svolgono un ruolo attivo nella discriminazione tassonomica da oltre 40 anni, tuttavia senza poter travalicare alcuni limiti tecnico-metodologici sollevati anche recentemente da diversi autori (tra gli altri *Bailey et al. 2004; Robinson et al., 2002*), primo fra tutti la mancanza di un orientamento standard ottimale per l'acquisizione delle immagini oclusali, e secondariamente la necessità di confrontarsi solo con reperti poco o per nulla usurati. In tal senso le tecnologie tridimensionali sono state utilizzate da Benazzi (*et al., 2009*) per confrontare le metodologie più diffuse per l'orientamento dei primi molari permanenti, arrivando a definire uno standard ottimale applicabile anche in presenza di denti usurati. Nonostante la bontà teorica del metodo, questo non è mai stato attuato nella realizzazione di immagini oclusali, pur essendo stato individuato principalmente per supportare tale modalità di acquisizione. Per questo motivo si è deciso di testare l'effettiva praticabilità del protocollo di acquisizione di immagine, arrivando a poterne confermare la riproducibilità, ma soprattutto grazie a un confronto diretto dell'immagine fotografica con un omologo tridimensionale, viene confermata la possibilità di ricavare un profilo tassonomicamente discriminante da immagini di denti oclusali affetti da modesta usura della corona.



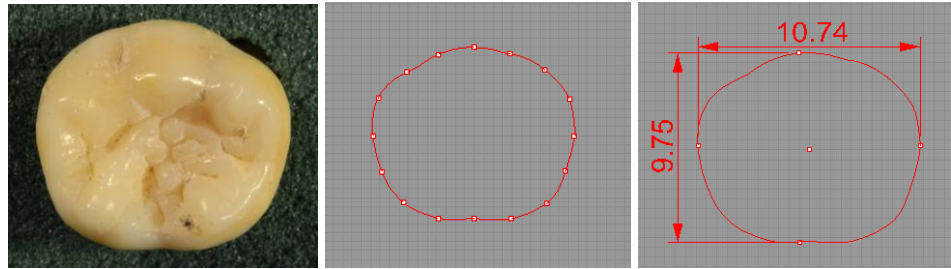


Fig.5 Da sinistra: immagine oclusale, outline della corona con evidenziati gli pseudolandmarks, misurazione dei diametri Mesiodistale e Buccolinguale del dente.

L'immagine in figura (Fig.5), corredata del valore del centroide (Centroide dell'area in figura 10,10,0 +/- 2e-008,1.6 e -008,0) e del Centroid Size (CS=1) esemplifica quello che potrebbe essere considerato un corredo informativo condivisibile già al momento della pubblicazione del materiale, così da agevolare la divulgazione di dati spendibili in analisi rigorose anche nel caso dell'impossibilità immediata di disporre di modelli tridimensionali del reperto in questione.

#### 4. CONCLUSIONI

I denti sono fra i reperti più abbondanti nel record fossile, motivo per cui sono stati sviluppati numerosi metodi morfologici e morfometrici per ricavarne descrizioni e analisi sempre più dettagliate. Gli studi concernenti la dentizione permanente sovrastano numericamente quelli eseguiti sui denti decidui ( *Bayle et al., 2009 a,b; 2010; Toussaint et al., 2010; Benazzi et al., 2011 a,c; Zanolli et al., 2012*); inoltre la maggioranza dei metodi analitici correntemente in uso nella biologia dentale sono concepiti per il confronto con materiale non usurato o poco usurato, e pochi invece affrontano decisamente il problema dell'usura ( *Hillson et al., 2005; Benazzi et al., 2011, a b, c*). I metodi morfometrici incentrati sulla morfologia delle cuspidi non possono essere applicati a denti usurati ( *Martinòn-Torres et al., 2006; Gómez-Robles et al., 2007*). In alcuni protocolli in cui l'individuazione dei landmarks sulle cuspidi dentali è subordinata alla morfologia alterata dall'usura, la posizione originale dell'apice della cuspidi è approssimata al centro della dentina esposta ( *Bailey, 2004*), o al centro della faccetta di usura ( *Martinòn-Torres et al., 2006*). L'accuratezza di questa approssimazione non è mai stata testata, tanto più che la posizione, la forma e le dimensioni delle faccette di usura e dei bacini della dentina sono estremamente variabili, in quanto dipendenti dalla morfologia della corona, dalle relazioni fra antagonisti, dai movimenti occlusali, dalla consistenza del cibo, da fattori ambientali e comportamentali ( *Lussi, 2006; Fiorenza et al., 2011 b; Kullmer et al., 2012*).

Un problema simile si riscontra anche nell'indagine della giunzione smalto dentina (EDJ) ( *Skinner et al., 2008*), nei casi in cui l'usura abbia già intaccato la dentina; anche l'analisi dello spessore dello smalto e delle proporzioni fra i tessuti ( *Olejniczak et al., 2008*) richiede denti non usurati, o al limite affetti da un grado di usura uniforme all'interno del campione ( *Benazzi et al., 2011 a*).

Senza dubbio denti fortemente usurati, nei quali nessun riferimento anatomico è preservato, rappresentano una grande sfida per le analisi morfometriche, tuttavia non possiamo sviluppare metodi che compensino interamente la perdita di dati.

Nel presente studio si utilizzano l'outline coronale e cervicale per la discriminazione di secondi molari decidui mandibolari usurati di neandertaliani e uomini moderni, dal momento che è comprovato che questi aspetti sono ancora presenti nei denti usurati, e allo stesso tempo è

stata dimostrata la loro utilità nella discriminazione fra neandertaliani e uomini moderni per altre tipologie dentali, come ad esempio per i primi molari permanenti (*Benazzi et al., 2011 a, b*). Il protocollo ivi proposto per l'orientamento dei modelli dentali è altamente riproducibile, e anche la fase più soggettiva della rotazione del dente attorno all'asse Z, svolta manualmente dall'operatore, non comporta errore intra o inter osservatore di tipo significativo.

Tra i vantaggi più evidenti di questo nuovo metodo risalta sicuramente la possibilità di includere nei campioni anche denti affetti da evidente grado di usura della superficie occlusale, e soprattutto trattare campioni dentali decisamente più eterogenei, dal momento che questo approccio può essere utilizzato anche nello studio di denti poco o per nulla usurati, così da ridurre la criticità per antropologi e paleontologi del doversi confrontare con campioni di esigua consistenza numerica.

L'incremento costante di studi effettuati con l'ausilio di dati tridimensionali, unito alla consapevolezza di poter preservare materiali di grande valore da indagini invasive, ha motivato i ricercatori alla creazione di banche dati (ad esempio Nespos Database 2011) e spazi di condivisione facilmente accessibili. Con il medesimo intento in questa sede si vorrebbe incentivare gli autori di ricerche sviluppate in ambito virtuale a fornire entrambi i profili dentali di interesse all'atto di pubblicazione degli studi, così da promuovere la diffusione di informazioni complete sui reperti analizzati, agevolando i confronti fra i dati ottenuti, aspetti entrambi vitali per l'attività di ricerca.

Considerando l'inclusione delle outline all'atto della pubblicazione un innegabile vantaggio, non può ignorarsi la realtà del fatto che le tecnologie tridimensionali, anche se estremamente diffuse, non costituiscono ancora la regola nella rilevazione dei dati, e spesso in fase di rinvenimento, prima di procedere ad analisi più approfondite, i nuovi reperti vengono documentati con il mezzo più immediato, ovvero quello fotografico. Tutti gli articoli in cui vengono presentati nuovi rinvenimenti sono corredati da immagini degli elementi dentali ripresi in diverse viste, compresa quella occlusale. Dove possibile, si potrebbe quindi estrarre l'outline coronale, nel caso di primi molari permanenti o di secondi molari decidui inferiori correttamente orientati secondo il protocollo proposto, per disporre immediatamente di un profilo tassonomicamente discriminante. Oppure, come proposto per i profili ottenuti dai modelli tridimensionali, gli autori potrebbero inserire direttamente il profilo estratto come ulteriore descrizione del dente illustrato.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMS D.C., Rohlf F.J., Slice D.E., 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. Zool.* 71: 5–16.
- ANDERSON T.W., 1963. Asymptotic Theory for Principal Component Analysis. *Ann. Math. Statist.*, 34, pp. 122-148.
- ARNQVIST G., Martensson T., 1998. Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. In: Kingenburt C.P., Bookstein F.L. (Eds.), *Acta Zoologica*, Vol. 44 (1/2). *Academiae Scientiarum Hungaricae*: 73–96. *Verificare*
- AVISHAI G., Müller R., Gabet Y., Bab I., Zilberman U., Smith P., 2004. New approach to quantifying developmental variation in the dentition using serial micro-tomographic imaging. *Micr. Res. Technol.* 65, pp. 263-269.
- BAILEY S.E., 2000. Dental morphological affinities among late Pleistocene and recent humans. *Dent. Anthropol.* 14: 1–8.
- BAILEY S.E. 2004, A morphometric analysis of maxillary molar crowns of Middle\_Late Pleistocene hominins. *J. Hum Evol* 47, pp. 183-198.
- BAILEY S.E., Pilbrow V.C., Wood B.A., 2004. Interobserver error involved in independent attempts to measure cusp base areas of Pan M1s. *J. Anat.* 205, pp.323-331.
- BAYLE P., Braga J., Mazurier A., Macchiarelli R., 2009 a. Dental development pattern of the Neanderthal child from Roc De Marsal: a high resolution 3D analysis. *J. of Human Evol.*
- BAYLE P. 2008, Analyses quantitatives par imagerie à haute résolution des séquences de maturation dentaire et des proportions des tissus des dents déciduales chez les Néanderthaliens et les Hommes modernes. *PHd Dissertation.*
- BAYLE P., Braga J., Mazurier A., Macchiarelli R., 2009b. Brief communication :high resolution assesment of dental developmental pattern and characterization of tooth tissue proportions in the late Upper Paleolithic child from La Madeleine, France. *Am.J. Phys Anthropol.*, 138, pp. 493-498
- BAYLE P., Macchiarelli R., Trinkaus E., Duarte C., Mazurier A., Zilhão J., 2010. Dental maturational sequence and dental tissue proportions in the early Upper Paleolithic Child from Abrigo

- do Lagar Vehlo , Portugal, Proc. Natl. Acad. Sci., 107, pp. 1338-1342.
- BENAZZI S., Fantini M., De Crescenzo F., Persiani F., Gruppioni G., 2009. Improving the spatial orientation of human teeth using a virtual 3D approach. J.of Hum. Ev. 56 , pp. 286-293.**
- BENAZZI S., Douka K., Fornai C., Bauer C.C., Kullmer O., Svoboda J., Pap I., Mallegni F., Bayle P., Coquerelle M., Condemi S., Ronchitelli A., Harvati K., Weber G.W., 2011 a. Early dispersal of modern humans in Europe and implications for Neanderthal behaviour. Nature, 479, pp.525-528.**
- BENAZZI S., Coquerelle M., Fiorenza L., Bookstein F., Katina S., Kullmer O., 2011b. Comparison of Dental measurement systems for taxonomic Assignment of first molars, Am. J. of Phys. Anthropol. 144, pp.342-354**
- BENAZZI S., Fornai C., Bayle P., Coquerelle M., Kullmer O., Mallegni F., Weber G.W., 2011c. Comparison of dental measurement systems for taxonomic assignment of Neanderthals and modern human lower second deciduous molar. J.of Hum.Ev. 61, pp. 320-326.**
- BENAZZI S., Viola B., Kullmer O., Fiorenza L., Harvati K., Paul T., Gruppioni G., Weber G.W., Mallegni F., 2011 d. A reassessment of the Neanderthal teeth from Taddeo Cave ( southern Italy), J. Hum. Evol., 61, pp. 377- 387.**
- BENAZZI S., Fornai C., Buti L., Toussaint M., Mallegni F., Ricci S., Gruppioni G., Weber G.W., Condemi S., Ronchitelli A. 2012. Cervical and crown outline analysis of worn Neanderthal and Modern Human lower second deciduous Molars. Am. J. of Phys. Anthropol. 149, pp. 537-546.**
- BIGGERSTAFF R.H., 1970. A Quantitative and Qualitative Study of the Post-Canine Dentition of Twins. Ann Arbor, MI: University Microfilms.**
- BOOKSTEIN F.L., 1991. Morphometric Tools for Landmark Data. Cambridge University Press, Cambridge.**
- BOOKSTEIN F.L., 1997. Landmark methods for forms without landmarks: localizing group differences in outline shape. Med Image Anal 1: 225–243.**
- BRACE C.L. 1979. Krapina, “Classic “ Neanderthals , and the evolution of the European Face. J.of Hum. Evol. 8, pp.527-550.**
- BROTHWELL D.R., 1981. Digging up bones. Cornell University Press .**

- BRUNER E., Bastir M., 2009. Landmarks could slide brains can not: Interpreting models of shape variation. Paleontologia I, Evolució, memòria especial, pp. 3-33.**
- BUTI L., 2006. Analisi dei reperti scheletrici della necropoli tardo medievale di San Martino in Rivosecco, Borgotaro (PR), Tesi di Laurea, Università di Bologna.**
- DE GROOTE I., Lockwood C.A., Aiello L.C., 2010. Technical Note: A new method for measuring long bone curvature using 3D landmarks and semi-landmarks. Am. J. Phys. Anthropol. , 141, pp. 658-64.**
- DUARTE C., Maurício J., Pettitt B.P., Souto P., Trinkaus E., van der Plicht H., Zilhão J., 1999. The early Upper Paleolithic human skeleton from the Abrigo do Lagar Velho (Portugal)and modern human emergence in Iberia. Proc. Natl. Acad. Sci, 96. Pp. 7604-7609.**
- EMONET E.G., Tafforeau P., Chaimanee Y., Guy F., de Bonis L., Koufos G., Jaeger J.J. 2012. Three dimensional analysis of Mandibular dental root morphology in hominoids. J. of Hum. Evol., pp.164-154.**
- FIORENZA L., Benazzi S., Kullmer O., 2009. Morphology, Wear and 3D digital surface models: materials and techniques to create high resolution replicas of teeth. J. Anthropol. Sci., 87, pp. 211-218.**
- FIORENZA L., Benazzi S., Viola B., Kullmer O., Schrenk F., 2011 a., Relationship between cusp size and occlusal wear pattern in Neanderthal and *Homo Sapiens* First Maxillary Molars. Anat. Rec., 294, pp. 453 – 461.**
- FIORENZA L., Benazzi S., Tausch J., Kullmer O., Bormage T.G., Schrenk F., 2011b. Molar Macrowear Reveals Neanderthal Eco – Geographic Dietary Variation . PLoSONE, 6: e 14769.**
- FRELAT M.A, Katina S., Weber G.W., Bookstein F.L., 2012. Technical Note: A Novel Geometric Morphometric Approach to the Study of Long Bone Shape Variation. Am J. of Phys. Anthrop., 149-4, pp. 628.638.**
- GOMEZ ROBLES A., Martinón –Torres M., Bermúdez de Castro J.M. 2007. A geometric morphometric analysis of hominin upper first molar shape. J. of Hum. Evol. 53, pp. 272 -285.**
- GOOSE D. H., 1963. Dental Measurement: an assessment of its value in anthropological studies. In: Brothwell D.R., editor. Dental anthropology. London: Pergamon Press: 125-148.**

- GRINE F.E. 2005. Enamel Thickness of Deciduous and Permanent Molars in Modern Homo Sapiens. Am J. of Phys. Anthrop. 126, pp. 14-31.**
- GUATELLI -STEINBERG D., Irish J.D., Lukacs J.R., 2001. Canary islands–north African population affinities: measures of divergence based on dental morphology. Homo 52: 173–188.**
- GUNZ P., Neubauer S., Maureille B., Hublin J.J., 2011. Virtual reconstruction of the Le Moustier 2 Newborn skull. Implication for Neanderthal Ontogeny. Paleo, 22 pp.155-172.**
- GUNZ P., Neubauer S., Golovanova L., Doronichev V., Maureille B., Hublin J.J., 2012. A uniquely modern human pattern of endocranial development. Insights from a new cranial reconstruction of the Neandertal newborn from Mezmaiskaya. J. of Hum. Evol. 62, pp.300-313**
- HRDLIČKA A., 1920. Shovel-shaped teeth. Am. J. Phys. Anthropol. 3: 429–465.**
- HAEUSSLER A., 1995. Upper Paleolithic teeth from the Kostenki sites on the Don river, Russia. In Aspects of Dental Biology: Palaeontology, Anthropology and Evolution (ed. Moggi-Cecchi J), pp. 315–332. Florence: International Institute for the Study of Man.**
- HILLSON S. 1996, Dental Anthropology, Cambridge, Cambridge University Press.**
- HILLSON S., Fitzgerald C., Flinn H., 2005. Alternative dental measurements: proposals and relationships with other measurements. Am J. Phys. Anthropol., 126, pp. 413-426.**
- HANIHARA K., 1961. Criteria for classification of crown characters of the human deciduous dentition. J. Anthropol. Soc. Nippon 69: 27–45.**
- IRISH J.D., Guatelli-Steinberg D., 2003. Ancient teeth and modern human origins: an expanded comparison of African Plio-Pleistocene and recent world dental samples. J. Hum. Evol. 45: 113–144.**
- JERNVALL & JUNG 2000, Jernvall J. & Jung H.S., Genotype, Phenotype, and Developmental Biology of Molar Tooth Characters, Yearbook of Physical Anthropology, 43, 2000, pp. 171-190**
- KIESER J.A., 1990. Human Adult Odontometrics. The Study of Variation in Adult Tooth Size. Cambridge Studies in Biological Anthropology 4, Cambridge University Press.**

- KONO R.T., 2004 Molar enamel thickness and distribution patterns in extant great apes and humans : new insights based on a 3dimensional whole crown perspective. *Anthropol. Sc.* 112, pp.121-146.**
- KONDO S., Townsend G.C., 2006. Associations between Carabelli Trait and Cusp areas in human permanent maxillary first molars. *Am. J. Phys. Anthropol.* 129, pp. 196-203.**
- KULLMER O., Schultz D., Benazzi S., 2012. An experimental approach to evaluate the correspondence between wear facet position and occlusla movements. *Anat. Rec.* 295, 846- 852.**
- KUPCZICK K., Hublin J.J., 2010. Mandibular molar root morphology in Neanderthals and Late Pleistocene and recent Homo Sapiens., *J. Hum. Evol.*, 59, pp. 525-541.**
- LE BLANC S.A., Black B., 1974. A long term trend in tooth size in the eastern Mediterranean. *Am. J. Phys. Anthropol.* 41: 417-422.**
- LUSSI A., 2006. Dental Erosion\_ From Diagnosis to therapy. In: Withford GM. Editors, *Monographs in Oral Science*, vol. 20, Basel : Karger.**
- MACCHIARELLI R., Bondioli L., Debénath A., Mazurier A., Tournpiche J.F., Birch W., Dean C. 2006 *Nature* vol. 444 pp. 748-751**
- MACHO G.A, Berner M.EW., 1993. Enamel thickness of human maxillary molars reconsidered. *AmJ. Phys.Anthropol.* 92, pp.189-200.**
- MARTIN LB., 1983. The relationship of the later Miocene Hominoidea. Ph.D. thesis, University College, London.**
- MARTINON-TORRES M., Bastir M., Bermúde de Castro J.M., Gómez-Robles A., Sarmiento S., Muela A., Arsuaga J.L., 2006. Hominin lower second premolar morphology: evolutionary inferences through geometric morphometric analysis. *J. of Hum. Evol.*, 50, pp.523-533.**
- MIULLI A. 2011. Studio paleopatologico degli inumati della necropolis tardo antica di V. Arnaldo da Brescia (Rimini), Tesi di laurea Università di Bologna.**
- MOLNAR S., Hildebolt C, Molnar IM, Radovcic J, Gravier M. 1993. Hominid enamel thickness: I, the Krapina Neandertals. *Am J Phys Anthropol.* 92:131–138.**
- OLEJNICZACK A.J, Grine F.E. 2006, Assessment of the Accuracy of Dental Enamel Thickness Measurements Using Microfocal**



- X-Ray Computed Tomography, The anatomical record part A 288A, pp.263–275.
- OLEJNICZACK A.J., Tafforeau P., Smith T.M., Temming H., Hublin J.J., 2007. Technical Note: Compatibility of Microtomographic Imaging Systems for Dental Measurements, Am. J. of Phys. Anthropol. 133, pp.2-5.**
- OLEJNICZACK A.J., Smith T.M., Feeney R.N.M., Macchiarelli R., Mazurier A., Bondioli L., Rosas A., Fortea J., De Rasilla M., Tabernero A.G., Radovic J., Skinner M.M., Toussaint M., Hublin J.J. 2008. Dental tissue proportions and enamel thickness in Neandertal and Modern human molars, J.Hum. Evol. 55, pp12-23.**
- PALMA DE CESNOLA A., Messeri M.P., Quatre dents humaines paléolithiques trouvées dans des caverns de l'Italie Méridionale., 1967. L'anthropologie 71, pp.249-262**
- PERETZ B., Nevis N., Smith P., 1997. Morphometric variables of developing primary maxillary first molar crowns in humans. Archs oral Biol. Vol. 42, No. 6: 423-427.**
- PERETZ B., Nevis N., Smith P. 1998. Morphometric analysis of developing crowns of maxillary primary second molars and permanent first molars in humans. Arch. Oral. Biol. 43, pp. 525-533.**
- PERETZ B., Shapira J., Farbstein H., Arieli E. AND Smith P., 1998a. Modified cuspal relationships of mandibular molar teeth in children with Down's syndrome. J. Anat. 193: 529-533.**
- PERETZ S.I., Bernal V., Gonzalez P.N., 2006. Differences between sliding semi-landmark methods in geometric morphometrics, with an application to human craniofacial and dental variation. J. Anat. 208: 769–784.**
- PINHASI R., 1998. An Odontometric Investigation of the affinities of the Nazlet Khater specimen to Prehistoric, Protohistoric and Modern African Population. Dental Anthropology vol.12, n. 2-3, pp. 2-10.**
- POLLY P.D. 2000, Development and Evolution Occlude: Evolution of development in mammalian teeth, Pnas December 19 - 2000, vol.97, n.26 pp.14019 -14021.**
- R DEVELOPMENTCORE TEAM .R., A language and environment for statistical computing. Vienna , Austria: R Foundation for statistical Computing <http://www.r-project.org>. (2010).**

- ROBINSON D.L., Blackwell P.G., Stillman E.C., Brook A.H., 2002. Impact of landmark reliability on the planar Procrustes analysis of tooth shape. *Archives of Oral Biology* 47: 545–554.
- ROSSI M., Casali F., Romanini D., Bondioli L., Macchiarelli R., Rook L., 2004. Micro Ct scan in paleobiology : application to the study of dental tissue. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B* 213, pp. 747-750.
- SHEETS D.H., Kim K., Mitchel C.E., 2004. A combined landmark and outlinebased approach to ontogenetic shape change in the Ordovician Trilobite *Triarthrus Becki*. In: Elewa A. (Ed.), *Morphometrics in Paleontology*. Springer, Berlin, Wien.
- SCHAEFER M., Black S., Scheuer L. 2009. *Juvenile Osteology – A laboratory and Field Manual*, Elsevier Academic Press pp. 75-95.
- SCHEUER L., BLACK S.M., 2000. *Developmental Juvenile Osteology*, Academic Press.
- SCHWARTZ G.P., 2000. Taxonomic and functional aspects of the patterning of enamel thickness distribution in extant large bodied hominoids. *Am J. Phys. Anthrp.* 111: pp.221-224.
- SKINNER M.M., Gunz P., Wood B.A., Hublin J.J. 2008. Enamel-Dentine Junction (EDJ) Morphology distinguishes the lower molars of *Australopithecus africanus* and *Paranthropus robustus*. *J. of H. Evolution*, 55, pp 979-988.
- SLICE D.E., 2005. *Modern Morphometrics in Physical Anthropology*. Russle H., Tuttle Editor, University of Chicago Chicago IL.
- SMITH B.H., 1984. Patterns of molar wear in hunter gatherers and ariculturists. *Am J. Phys. Anthropol.* , 63, pp. 39-56.
- SMITH T.M., Toussaint M., Reid D.J., Olejniczak A.J., Hublin J.J., 2007. Rapid dental development in a middle Paleolithic Belgian Neanderthal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 20220-20225.
- SMITH T.M., Tafforeau P., Reid D.J., Pouech J., Lazzari V., Zermeno J.P., Guatelli-Steinberg D., Olejniczak A.J., Hoffman A., Radovic J., Makaremi M., Toussaint M., Stringer C., Hublin J.J., 2010. Dental evidence for ontogenic differences between modern humans and Neanderthals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107: 20923-20928.
- SPOOR C.F., Zonneveld F.W., Macho G.A., 1993. *Linear*

- Measurements of cortical bone and dental enamel by microcomputed tomography: Applications and problems . *Am J. Phys. Anthropol.*, 91, pp. 469-484.
- TOUSSAINT M., Olejczak A.J., El Zaatari S., Cattelain P., Flas D., Letourneux C., Pirson S., 2010. The Neanderthal lower right deciduous second molar Trou de l'Abime at Couvin, Belgium. *J. of Hum. Evol.* 58, pp. 56-67.
- TURNER C.G., II 1985. The dental search for Native American origins. In *Out of Asia: Peopling of the Americas and Pacific* (eds Kirk R, Szathmary E), pp. 31–78. Canberra: *Journal of Pacific History*.
- TURNER C.G., II, 1990a. Major features of Sundadonty and Sinodonty, including suggestions about East Asian microevolution, population history, and late Pleistocene relationships with Australian Aborigines. *Am. J. Phys. Anthropol.* 82: 295–317.
- TURNER C.G., II, 1990b. Origin and affinity of the prehistoric people of Guam: a dental anthropological assessment. In *Recent Advances in Micronesian Archaeology, Micronesia (Suppl.) 2* (ed. Hunter-Anderson R): 403–416.
- TURNER C.G., II, 1992. Microevolution of East Asian and European populations: a dental perspective. In *The Evolution and Dispersal of Modern Humans in Asia* (eds Akazawa T, Aoki K, Kimura T), pp. 415–438. Tokyo: Hokusen-Sha Publications. Co.
- TURNER ET AL 1991, Turner CG II, Nichol CR, Scott GR., Scoring procedures for key morphological traits of the permanent dentition: The Arizona State University Dental Anthropology System. In: Kelley MA, Larsen CS, editors. *Advances in Dental Anthropology*. New York: Wiley-Liss. p 13–31.
- TUSHABRAMISHVILI N., Pleurdeau D., Moncel M.H., Agapishvili T., Vekua A., Bukhsianidze M., Maureille B., Muskhelishvili A., Mshvildadze M., Kapanadze N., Lordkipanidze D., 2012. Human remains from a new Upper Pleistocene, sequence in Bondi Cave (Western Georgia). *J. of Hum. Evol.* 62, pp. 179-185.
- UNGAR P.S. and Williamson M., 2000. Exploring the effects of tooth wear on functional morphology: a preliminary study using dental topographic analysis. *Palaeontologia Electronica*. <http://www-odp.tamu.edu/paleo>.

- VARGIU R., Coppa A., Lucci M., Mancinelli D., Rubini M., Calcagno J., 1997. Population relationships and non-metric dental traits in Copper and Bronze Age Italy. *Am. J. Phys. Anthropol.* 24, 232.**
- WOOD B.A., Abbot S.A., Graham S.H., 1983. Analysis of the dental morphology of Plio-Pleistocene hominids. II Mandibular molars study of cusp areas, fissure pattern and cross sectional shape of the crown. *J.Anat.* 137, pp. 287-314.**
- ZANOLLI C., Bondioli L., Mancini L., Mazurier A., Widiyanto H., Macchiarelli R., 2012. Brief communication: two human fossil deciduous molars from the sangiran dome (Java, Indonesia): outer and inner morphology. *Am J. of Phys. Anthropol.* 147, pp. 472- 481**
- ZILHÃO J., Davis S.J., Duarte C., Soares A.M., Steier P., Wild E., 2010. Pego do Diabo (Loures, Portugal): dating the emergence of anatomical modernity in westernmost Eurasia. *PLoSOne*, 5:e8880.**
- ZUCCOTTI L.F., Williamson M.D., Limp W. F. and Ungar P.S., 1998. Technical Note: Modeling Primate Occlusal Topography Using Geographic Information Systems Technology. *Am. J. Phys. Anthropol.* 107: 137–14.**

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio tutte le persone che negli anni hanno reso possibile la realizzazione di questo progetto di ricerca.

Ringrazio il Prof. Jacopo Moggi Cecchi per la fiducia e la grande disponibilità dimostrate lungo tutto il percorso, specialmente nei momenti più problematici.

Ringrazio il Dott. Stefano Benazzi guida insostituibile, costante e paziente.

Ringrazio il Prof. Giorgio Gruppioni, per avere reso disponibile il laboratorio di antropologia e le attrezzature per la buona riuscita del lavoro.

Ringrazio Priscilla Bayle e Jiří Svoboda per il campione fossile e moderno messo a disposizione.

Ringrazio il Musée National de Préhistoire (France), L'Università di Bordeaux 1, UMR 5199 e il Portuguese Ministério da Cultura; La Soprintendenza per i Beni Archeologici della Puglia e l'Università di Siena.

Ringrazio Caterina Minghetti e tutto il gruppo di lavoro del Laboratorio di Antropologia del Dipartimento di Storie e Metodi per la Conservazione dei Beni Culturali dell'Università di Bologna, sede di Ravenna

Infine ringrazio la mia famiglia e Marco, che mi è sempre stato accanto con amore e pazienza infiniti.