

ALESSIA NAVA<sup>1,2</sup>, ALFREDO COPPA<sup>1</sup>, DONATO COPPOLA<sup>3</sup>, LUCIA MANCINI<sup>4</sup>, DIEGO DREOSSI<sup>4</sup>, FRANCO ZANINI<sup>4</sup>, FEDERICO BERNARDINI<sup>5,6</sup>, CLAUDIO TUNIZ<sup>6</sup>, LUCA BONDIOLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia Ambientale, Università di Roma "La Sapienza"

<sup>2</sup>Servizio di Bioarcheologia, Museo delle Civiltà, Roma

<sup>3</sup>Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

<sup>4</sup>Elettra - Sincrotrone Trieste S.C.p.A., Basovizza, Trieste, Italy

<sup>5</sup>Centro Fermi, Museo Storico della Fisica e Centro di Studi e Ricerche "Enrico Fermi", Roma

<sup>6</sup>Multidisciplinary Laboratory, The "Abdus Salam" International Centre for Theoretical Physics, Trieste, Italy

## **Lo studio dello smalto prenatale delle gemme dentali dell'individuo fetale del Paleolitico superiore Ostuni 1b (Puglia, ca 28 ka BP) per mezzo di analisi istologica virtuale**

### *Deciduous dental prenatal enamel investigation of the Upper Paleolithic fetal individual Ostuni 1b (Apulia, Italy, ca 28 ka BP) through virtual histological analysis*

Lo smalto dei denti che si forma durante la vita prenatale offre la possibilità di aprire una finestra unica sugli stadi precoci dello sviluppo umano nelle serie scheletriche da contesti archeologici e paleoantropologici. Infatti, i tessuti mineralizzati del dente si accrescono in maniera appositiva secondo un ritmo circadiano e registrano i tassi di crescita individuali, che possono essere direttamente misurati (Hillson 2014). Le traiettorie di crescita dei denti rispecchiano, in una certa misura, quelle dello scheletro e le informazioni derivanti dalla loro analisi possono essere estese allo studio delle traiettorie di sviluppo, anche in una prospettiva evolutiva. Inoltre, la porzione prenatale dello smalto racchiude non solo informazioni sul feto, ma anche sulla dieta e sulla salute materna nel periodo della gravidanza.

L'approccio convenzionale allo studio della microstruttura dello smalto dentale è quello dell'istologia classica, un'analisi per definizione distruttiva. Il recente sviluppo di tecniche non distruttive ad alta risoluzione (Nava *et al.* 2017a, Tafforeau e Smith 2008), come la microtomografia a raggi X in contrasto di fase per mezzo della luce di sincrotrone (SR- $\mu$ CT), consente di estendere l'analisi delle microstrutture della crescita dentaria a reperti unici non sacrificabili, come i resti dentali del feto del Paleolitico superiore Ostuni 1b (Os1b). Il presente contributo intende riportare l'analisi dei resti dentali decidui del feto Os1b, scoperti nel 1991 nella grotta di Santa Maria di Agnano (Puglia, Italia) (Vacca *et al.* 2012). La tomba Ostuni 1 ha restituito lo scheletro di una giovane donna (Os1) in avanzato stato di gravidanza. I resti fetali di Os1b sono stati recuperati, in eccellente stato di conservazione, all'interno della regione pelvica della madre.

A unique window on the human early developmental stages in skeletal series is offered by the prenatal enamel, which is the portion of this mineralized tissue that forms during the intra-uterine life. Tooth's mineralized tissues are deposited incrementally on a circadian rhythm, recording the individual growth rates that can be directly measured thanks to their layered structure (Hillson 2014). The teeth's growth trajectories can be correlated to that of the whole body, and hence the information that can be drawn from their study can be extended, to a certain extent, to the study of the ontogenetic trajectories, also in an evolutionary perspective. Particularly, the prenatal portion of the dental enamel encompasses not only information on the fetus, but also about the mother's diet and health during pregnancy. A better understanding of life *in utero* in past populations is, therefore, crucial in the reconstruction of lifestyle and health in antiquity.

The conventional approach to the study of the dental enamel microstructure is characterized by classic histology of the crown, which is by essence a destructive analysis. The recent development of high resolution non-destructive microtomographic techniques (Nava *et al.* 2017a; Tafforeau and Smith 2008) such as the phase contrast X-ray microtomography with synchrotron light (SR- $\mu$ CT), permits to extend the analysis of the dental growth microstructures to precious ancient specimens, like the dental remains of the Upper Paleolithic Ostuni 1b fetus (Os1b), discovered in 1991 in the Santa Maria di Agnano cave (Apulia, Italy) (Vacca *et al.* 2012). Ostuni 1 grave contained the skeleton of a young woman (Os1) in the advanced stages of pregnancy at time of death and the fetal remains of Os1b were found in excellent preservation inside

Due incisivi centrali decidui (superiore e inferiore) di Os1b sono stati misurati con SR- $\mu$ CT alla linea di luce SYRMEP del laboratorio Elettra - Sincrotrone Trieste (Italia) (Nava *et al.* 2017a), al fine di rivalutare l'età gestazionale alla morte del feto e di condurre inferenze sullo stato di salute di entrambi gli individui attraverso un approccio non distruttivo. I volumi microtomografici sono stati sezionanti virtualmente in modo da ottenere sezioni istologiche digitali dei due incisivi centrali fetali. I volumi sono caratterizzati da un voxel isometrico pari a 7,7 micrometri e lo spessore virtuale delle sezioni è stato impostato a 38,5 micrometri.

Entrambe le corone sono caratterizzate dalla presenza di tre marcatori di stress prenatale, visibili nello smalto come linee di accrescimento accentuate (*Accentuated Lines*, AL), che rappresentano gravi episodi di stress fisiologico e che corrispondono a un'interruzione della secrezione della matrice dello smalto (vedi figura 1 per l'incisivo deciduo superiore centrale sinistro). La cronologia delle tre AL è stata stimata dalla formula di regressione derivata dal campione pre-industriale romano di Velia (Nava *et al.* 2017b) e mostra una periodicità quasi identica. L'allineamento delle due corone per mezzo delle AL ha permesso di calcolarne il tempo di formazione (incisivo centrale superiore = 108 giorni, incisivo centrale inferiore = 98 giorni), e conseguentemente, la cronologia degli stress in giorni prima della morte (74, 45-46, 28 giorni).

Infine, l'età gestazionale alla morte di Os1b è stata stimata sommando il tempo di formazione della corona con l'intervallo conosciuto dei tempi di inizio della corona per l'incisivo mandibolare. L'età alla morte è stata stimata in 31-33 settimane gestazionali e diverge da quella scheletrica, basata su standard di riferimento moderni, stimata in 34-36 settimane (Vacca *et al.*, 2012). Questa differenza suggerisce, almeno per questo individuo del Paleolitico superiore, uno sviluppo fetale leggermente più veloce rispetto a quello medio odierno.

I risultati del presente studio suggeriscono che l'uso di standard di riferimento moderni nell'analisi osteologica di resti fetali umani preindustriali è potenzialmente fuorviante e sottolineano la necessità di creare nuovi riferimenti scheletrici e dentali destinati a campioni archeologici e paleoantropologici.

**Parole chiave:** Smalto dentale prenatale, istologia virtuale, feto del Paleolitico superiore OS1b.

the pelvic region of the mother.

Two deciduous central incisors (upper and lower) of Os1b has been measured by SR- $\mu$ CT at the SYRMEP beamline of the Elettra - Sincrotrone Trieste laboratory (Italy) (Nava *et al.* 2017a), in order to re-assess its gestational age-at-death and to evaluate the maternal-fetal health history through a non destructive approach. The microtomographic volumes were sliced in order to obtain the virtual histological sections of the two fetal central deciduous incisors. The volumes have an isometric voxel size of 7.7 micrometers and the virtual thickness of the slices has been set to 38.5 micrometers.

Both crowns are characterized by the presence of three prenatal stress markers, visible in the enamel as accentuated growth lines, the *Accentuated Lines* (AL), that represent severe physiological stress episodes and that correspond to a disruption of the enamel matrix secretion (see figure 1 for the left central upper deciduous incisor). The chronology of the three ALs has been calculated using the regression formula (Nava *et al.* 2017b) obtained from the pre-industrial roman sample of Velia and showed an almost identical periodicity. The alignment of the two crowns by means of the ALs allowed for the calculation of the Crown Formation Times (upper central incisor = 108 days, lower central incisor = 98 days), and consequently to derive the stresses' chronology in days before death (74, 45-46, 28 days).

Finally, the gestational age-at-death of Os1b has been estimated by summing the Crown Formation Time to the known Crown Initiation Time range for the mandibular incisor. The dental histological age has been estimated at 31-33 gestational weeks and diverge from the skeletal one, based on modern reference standards, estimated at 34-36 gestational weeks (Vacca *et al.* 2012). This discrepancy suggests for this Paleolithic individual a slightly faster fetal development when compared with the modern growth standards.

Results of this study strongly suggest that the use of modern reference standards in the osteological analysis of human pre-industrial fetal remains is potentially misleading and highlights the need to find new skeletal and dental standard references targeted for archaeological and paleoanthropological specimens.

**Key-words:** prenatal dental enamel, virtual histology, Upper Palaeolithic fetus OS1b.

## Riferimenti bibliografici / References

- HILLSON S. (2014). *Tooth development in human evolution and bioarchaeology*, Cambridge University Press.
- NAVA A., BONDIOLI L., COPPA A., DEAN C., ROSSI P.F., ZANOLLI C. (2017b). *New Regression Formula to Estimate the Prenatal Crown Formation Time of Human Deciduous Central Incisors Derived from a Roman Imperial Sample (Velia, Salerno, I-II cent. CE)*, PLoS ONE, 12(7):e0180104.
- NAVA A., COPPA A., COPPOLA D., MANCINI L., DRESSI D., ZANINI F., BERNARDINI F., TUNIZ C., BONDIOLI L. (2017a). *Virtual histological assessment of the prenatal life history and age at death of the Upper Paleolithic fetus from Ostuni (Italy)*, Scientific Reports, 7(1):9427.
- TAFFOREAU P., SMITH T.M. (2008). *Nondestructive imaging of hominoid dental microstructure using phase contrast X-ray synchrotron microtomography*, Journal of Human Evolution, 54(2):272-278.
- VACCA E., FORMICOLA V., PESCE DELFINO V., COPPOLA D. (2012). *I resti scheletrici umani delle sepolture paleolitiche di Grotta Santa Maria d'Agnano - Ostuni (BR)*. In: COPPOLA D., ed. *Il Riparo di Agnano nel Paleolitico superiore*. Università di Roma Tor Vergata, 201–364.



**Figura 1.** Sezione istologica virtuale dell'incisivo centrale superiore deciduo di sinistra del reperto fetale Os1b (si veda il testo per dettagli).

**Figure 1.** Virtual histology of Os1b's left upper deciduous central incisor (see text for details).