



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Valutazione dell'età nei Cervidi tramite esame della dentatura

Come realizzare una guida per l'identificazione
delle classi di età



MANUALI E LINEE GUIDA



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Valutazione dell'età nei Cervidi tramite esame della dentatura

**Come realizzare una guida per l'identificazione
delle classi di età**

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida 90.1/2013
ISBN 978-88-448-0616-3

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

Grafica di copertina: Franco Iozzoli
Foto di copertina: Anna Maria De Marinis
Impaginazione: Anna Maria De Marinis

Coordinamento editoriale:

Daria Mazzella
ISPRA – Settore Editoria

La pubblicazione del presente volume è stata finanziata da ATC 16 Pistoia, D.R.E.Am. Italia Soc. Coop. Agr. For. di Pistoia e Federazione Italia della Caccia, Sezione G. Puccini, Pescia.



Stampato nel mese di aprile 2015
dalla tipografia TMB Stampa s.r.l. - Via Portuense, 155 - 00148 Roma

Autrice

Anna Maria De Marinis (ISPRA)

Si prega di citare il documento con la seguente dicitura:

De Marinis A.M., 2015. Valutazione dell'età nei Cervidi tramite esame della dentatura - Come realizzare una guida per l'identificazione delle classi di età. Manuali e Linee guida n. 90.1/2013, ISPRA.

Autori delle fotografie

Anna Maria De Marinis, Andrea Dal Pian (Fig. 2.5 Cervo), Sandro Nicoloso (Figg. 3.1, 4.5B).

Ringraziamenti

Si ringraziano:

- Agenti del Corpo Forestale della Provincia Autonoma di Trento; Associazione Cacciatori Trentini; ATC AR 1 Casentino e ATC AR 2 Val Tiberina; ATC SV 1 e ATC SV 3; Sandro Barabino; Luca Mattioli; Gabriele Meacci; Parco Nazionale dello Stelvio; Elisabetta Raganella Pelliccioni; Luca Pedrotti; Francesca Ronchi; Servizio Foreste e Fauna della Provincia di Trento; Servizio Tutela della Fauna, Caccia e Pesca della Provincia di Arezzo; Tenuta Presidenziale di Castelporziano (Segretariato Generale della Presidenza della Repubblica, Settore Tutela e Gestione Fauna e Nucleo operativo del Corpo forestale dello Stato) e URCA Provinciale di Arezzo per aver reso disponibili i campioni che hanno consentito la realizzazione di questo volume.
 - D.R.E.Am. Italia e l'ATC PT 16 per aver reso disponibili i campioni che hanno consentito la realizzazione di questa guida, ed in particolare Sandro Nicoloso per aver fornito pratiche indicazioni nel corso di numerosi incontri di analisi critica del testo affinché il manuale sia di chiara ed immediata lettura per qualsiasi operatore.
 - gli studenti Angela Aiolo, Cristina Gozzi, Valeria Marasco, Carmine Montedoro, Loredana Ricchiuti e Matias Villamil che hanno collaborato con entusiasmo e passione alla raccolta dati e in particolare Cristina e Matias che hanno anche attivamente partecipato alla preparazione di parte del materiale iconografico.
 - Mauro Delogu, Stefano Mattioli, Chiara Mercuriali e Paolo Montanaro per aver revisionato il testo.
 - Barbara Franzetti e Vittorio Guberti per aver fornito nel corso di numerosi incontri preziosi suggerimenti e per aver contribuito a rendere il materiale iconografico ricco di dettagli informativi e nel contempo di facile e immediata lettura.
 - Lorenza Sorbini per aver collaborato all'elaborazione grafica della copertina.
-

INDICE

1. PERCHÉ UNA GUIDA PRATICA PER LA VALUTAZIONE DELL'ETÀ	1
2. ESAME MICROSCOPICO DI SEZIONI DELLA RADICE DI DENTI DECALCIFICATI: STATO DELL'ARTE E CRITICITÀ	2
2.1. Decalcificazione del dente o della radice	2
2.1.1 <i>Dimensioni di I₁</i>	2
2.1.2. <i>Protocolli di laboratorio per la decalcificazione di I₁</i>	6
2.1.2.1 <i>Tipo di soluzione decalcificante</i>	6
2.1.2.2 <i>Volume della soluzione decalcificante</i>	6
2.2 Taglio della radice in sezioni	7
2.3 Allestimento di preparati istologici	8
2.4 Valutazione della leggibilità del preparato istologico	9
3. PROTOCOLLO DI LABORATORIO	10
4. COME REALIZZARE UNA GUIDA PRATICA ALL'IDENTIFICAZIONE DELLE CLASSI DI ETÀ	20
SCHEDA 4.1 - Scheda di raccolta dati	22
SCHEDA 4.2 - Come organizzare una collezione di confronto ai fini della valutazione dell'età .	24
BIBLIOGRAFIA	27

1. PERCHÉ UNA GUIDA PRATICA PER LA VALUTAZIONE DELL'ETÀ

La valutazione dell'età attraverso l'esame della dentatura consiste nella valutazione dei cambiamenti che subiscono i denti con il trascorrere del tempo. Questi cambiamenti, tuttavia, non sono determinati solo dall'età. Molti altri fattori, infatti, contribuiscono a modellare la dentatura, rendendo variabile la relazione età-eruzione ed età-usura (De Marinis e Toso 2015). La valutazione dell'età è pertanto un problema complesso che deve prevedere innanzitutto una chiara definizione degli obiettivi, associata alla determinazione del livello di dettaglio che si vuole raggiungere, nonché un'attenta analisi, in termini di costi-benefici, della tecnica da adottare, associata alla determinazione del grado di accuratezza e precisione correlato. In questo senso un buon compromesso è raggiungibile attraverso la realizzazione di una guida pratica all'identificazione delle classi di età.

Una guida di questo tipo deve avere i seguenti requisiti.

- ▶ Derivare dall'esame della dentatura di un campione proveniente dalla stessa popolazione oggetto di monitoraggio e di età certa, cioè costituito da soggetti di età nota (ossia marcati alla nascita) e/o la cui età è stata determinata tramite tecniche di analisi microscopica opportunamente validate.
- ▶ Proporre una procedura per l'identificazione delle classi di età, basata sull'esame standardizzato della dentatura tramite caratteri diagnostici facilmente riconoscibili e oggettivi, correlati con il processo di eruzione e di usura.

Il presente volume analizza criticamente la letteratura scientifica disponibile sulle tecniche di determinazione dell'età tramite analisi microscopica di sezioni di denti (Capitolo 2), espone i risultati di *test* appositamente preparati per risolvere alcune delle criticità rilevate (Capitolo 2), predispone un protocollo di laboratorio per l'analisi microscopica di sezioni di denti (Capitolo 3) e infine indica come realizzare una guida pratica alla valutazione dell'età dei Cervidi (Capitolo 4).

I volumi dedicati alle singole specie (n. 90.2 e n. 90.3) definiscono la procedura per l'identificazione delle classi di età e descrivono i caratteri diagnostici specie-specifici.

2. ESAME MICROSCOPICO DI SEZIONI DELLA RADICE DI DENTI DECALCIFICATI: STATO DELL'ARTE E CRITICITÀ

La determinazione dell'età di un Cervide tramite il conteggio delle linee di incremento del cemento può essere effettuata mediante esame microscopico di denti decalcificati o non decalcificati. *Test* di laboratorio eseguiti nel corso del presente lavoro hanno evidenziato che la tecnica che prevede la decalcificazione dei denti consente, in genere, di ottenere preparati leggibili diversamente da quanto rilevato con la tecnica che non la prevede, dove la leggibilità del preparato è, invece, maggiormente condizionata dalla variabilità individuale (De Marinis e Toso 2015). Pertanto in questo capitolo, vengono analizzate solo le attività, di seguito elencate, connesse con l'esame microscopico di denti decalcificati.

- 2.1 Decalcificazione del dente o della radice.
- 2.2 Taglio della radice in sezioni.
- 2.3 Allestimento di preparati istologici.
- 2.4 Valutazione della leggibilità del preparato istologico.

2.1 Decalcificazione del dente o della radice

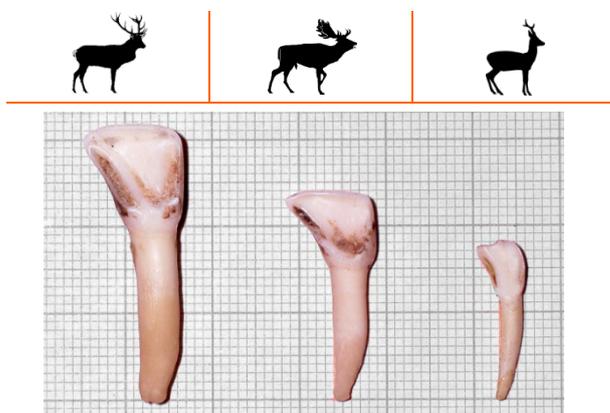
Nei Cervidi il dente che di solito viene sottoposto ad analisi è I_1 perché:

- ▶ è il primo dei denti incisiviformi ad erompere,
- ▶ è il dente di maggiori dimensioni tra i denti incisiviformi ed è, quindi, più facile da manipolare,
- ▶ la sua estrazione dalla mandibola non presenta, in genere, difficoltà,
- ▶ la sua decalcificazione è relativamente rapida,
- ▶ le linee di incremento del cemento sono ben evidenti nei preparati istologici (Klevezal 1996),
- ▶ il numero delle linee di incremento osservabili nel cemento corrisponde al numero degli anni vissuti dall'individuo (Klevezal 1996).

Il processo di decalcificazione di questo dente è difficilmente "standardizzabile" dal momento che la dimensione dell'incisivo e il protocollo adottato possono far variare il tempo di decalcificazione. La relazione tempo di decalcificazione-dimensione del dente viene discussa nel paragrafo seguente sulla base dei risultati ottenuti nel corso presente studio; la relazione tempo di decalcificazione-protocollo di laboratorio viene, invece, discussa nel paragrafo 2.1.2 attraverso una rassegna comparativa della letteratura disponibile e un *test* di laboratorio appositamente realizzato per risolvere alcune criticità rilevate nel corso della definizione dello stato dell'arte.

2.1.1 Dimensione di I_1

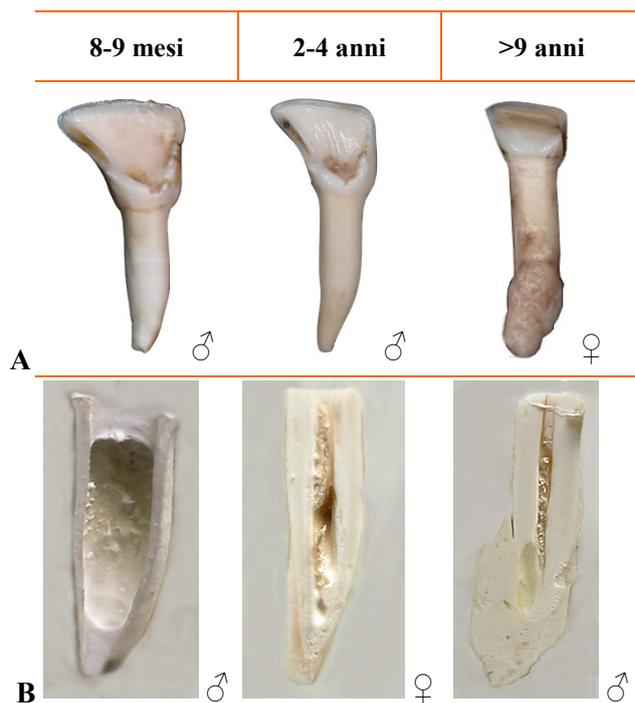
La dimensione di questo dente dipende in primo luogo dalla specie e in secondo luogo dalla classe di età, dal sesso e dall'individuo.



Specie - Il primo incisivo inferiore ha dimensioni molto diverse in Cervo, Daino e Capriolo (Fig. 2.1).

Nel corso del presente studio i denti del Capriolo si sono decalcificati in meno di un giorno, mentre la decalcificazione della maggior parte dei denti di Cervo e Daino ha richiesto più di un giorno.

Figura 2.1 - Dimensioni di I_1 a confronto in Cervo, Daino e Capriolo. Gli incisivi sono stati estratti da mandibole di femmine di 3-4 anni di età.



Classe di età - Nell'ambito della stessa specie la relazione tra il tempo di decalcificazione e la classe di età dell'individuo è influenzata da:

- ▶ una diminuzione della dimensione della corona dovuta ad usura,
- ▶ un aumento della dimensione della radice dovuto ad un incremento dello spessore del cemento che la riveste (De Marinis 2015a, 2015b),
- ▶ una riduzione dell'ampiezza del canale della radice dovuta alla deposizione degli strati di dentina (De Marinis e Toso 2015).

Questi fattori (Fig. 2.2) interagiscono tra loro in modo da determinare un progressivo aumento dei tempi di decalcificazione. I risultati del presente studio (Fig. 2.3) hanno evidenziato che il tempo medio di decalcificazione è minore di un giorno in daini di età inferiore a 3 anni e in cervi di età inferiore a 6 anni; è minore di due giorni per daini di 3-7 anni e per cervi di età superiore a 6 anni e infine, è maggiore di tre giorni in daini che hanno vissuto 7-18 anni.

Figura 2.2 - Conformazione della radice e della corona di I_1 (A) e corrispondente canale della radice (B) in funzione dell'età nel Daino. Le immagini in A e B relative alla medesima classe di età non sono rappresentate nello stesso rapporto di scala.

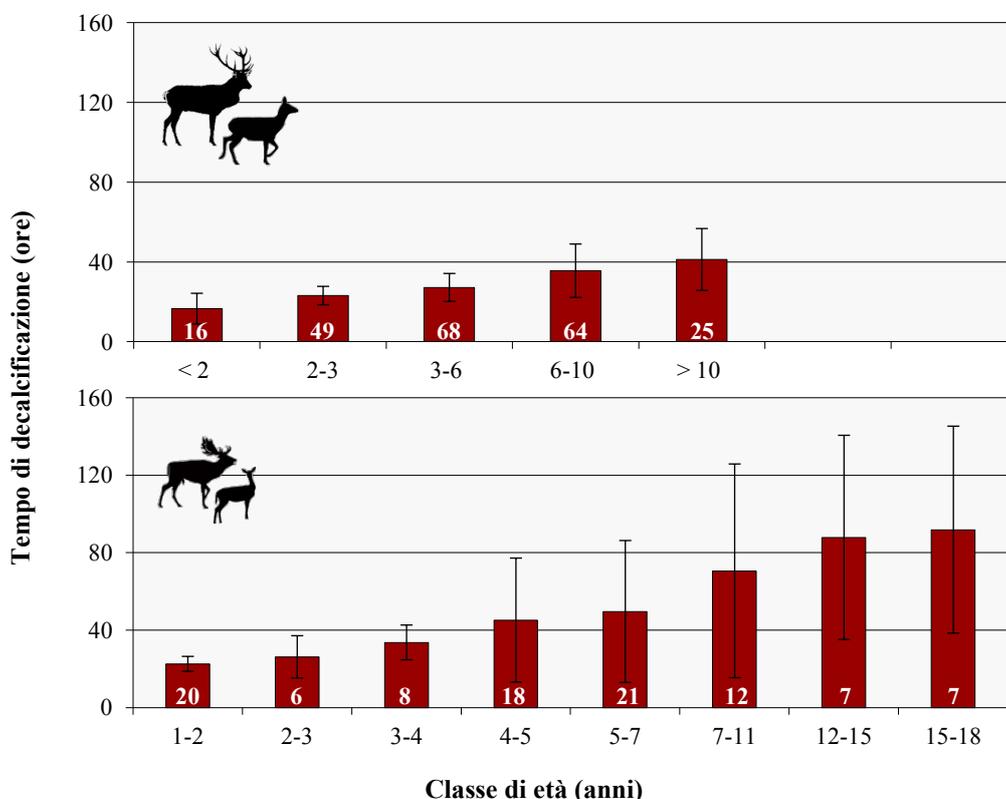


Figura 2.3 - Tempo di decalcificazione (media \pm deviazione standard) di I_1 per classe di età in un campione di 222 cervi (in alto) e 99 daini (in basso). I numeri all'interno delle barre indicano la dimensione del campione per classe d'età.

Sesso - Nel Cervo e nel Daino non sono state rilevate differenze sostanziali nei tempi di decalcificazione della radice per la medesima classe di età in funzione del sesso (Fig. 2.4). Si fa presente che l'analisi dei dati per il Daino è limitata nel caso delle femmine dalle ridotte dimensioni del campione per alcune classi di età e nel caso dei maschi dalla mancanza di campioni di età superiore a 11 anni. Secondo quanto sopra evidenziato, il tempo di decalcificazione varia in relazione alle dimensioni della corona, della radice e del canale della radice. Il tasso di usura a cui è soggetta la corona è minore nelle femmine di entrambe le specie rispetto ai maschi (Loe *et al.* 2003 per il Cervo, De Marinis e Toso 2015 per il Daino), mentre il progressivo ingrossamento dell'apice della radice che si verifica con il trascorrere degli anni sembra essere più accentuato nei maschi di quanto lo sia nelle femmine (Fig. 2.5). Le dimensioni del canale della radice variano in funzione dell'età fin quando il canale si chiude, dopodiché questo fattore non entra più in gioco nel processo di decalcificazione. Secondo i risultati ottenuti nel corso del presente lavoro la chiusura del canale si inizia a registrare nel Cervo in individui di età superiore a 7 anni ed è osservabile nel 100% del campione a partire da 11 anni. Non sono disponibili dati analoghi per il Daino, ma si può ragionevolmente supporre che l'andamento temporale della variazione delle dimensioni del canale della radice sia analogo. Ne consegue che il processo di decalcificazione è condizionato esclusivamente dalle dimensioni della radice e della corona nelle classi di età avanzata.

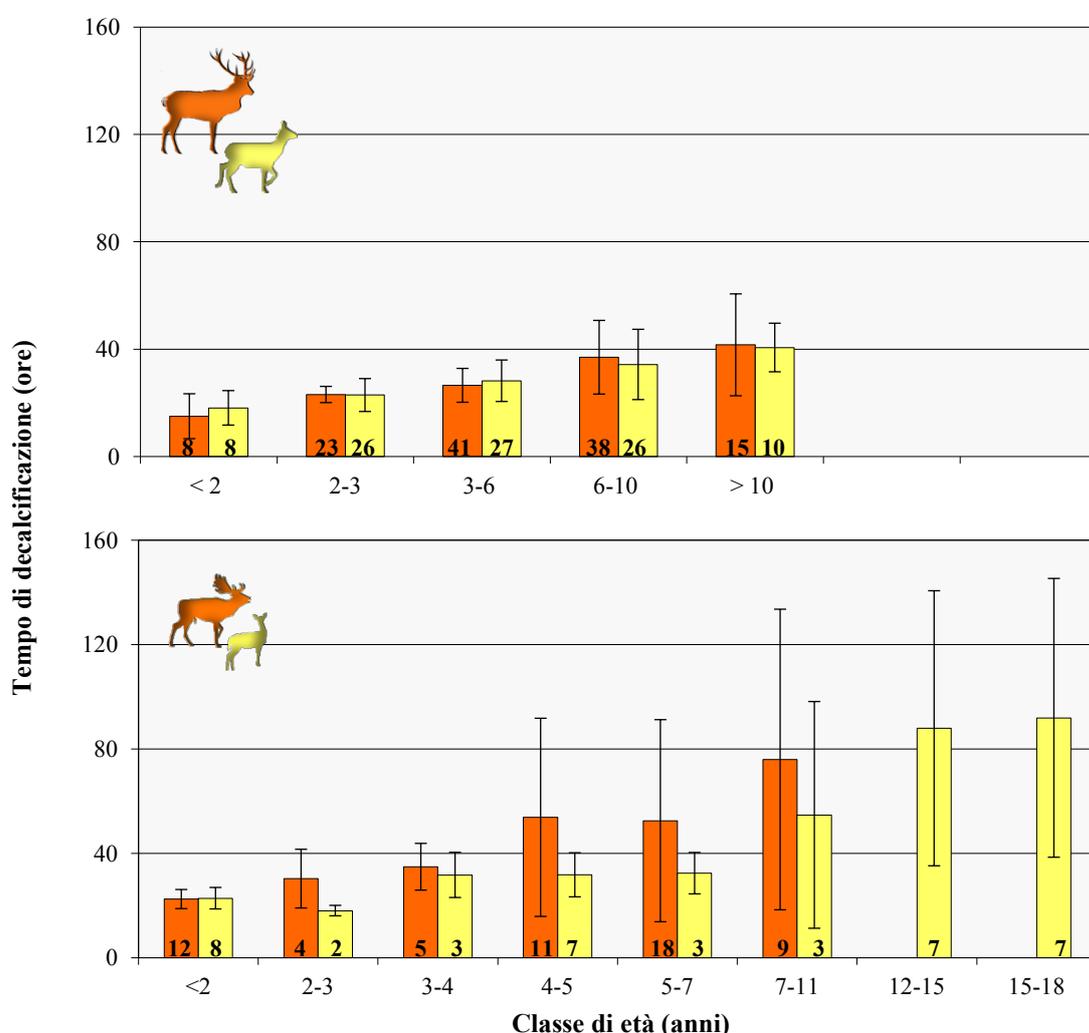


Figura 2.4 - Tempo di decalcificazione (media \pm deviazione standard) di I_1 per classe di sesso ed età in un campione di 222 cervi e 99 daini. I numeri all'interno delle barre indicano la dimensione del campione.

In base al protocollo di laboratorio (Capitolo 3) nel Cervo la corona viene tagliata prima che inizi il processo di decalcificazione, mentre nel Daino durante tale processo. Il tempo di decalcificazione,

(ovviamente fino a quando non viene tagliata) nel Daino. Il tasso di usura della corona è correlato alle abitudini alimentari e il tasso di deposizione del cemento sulla radice è correlato a sua volta con il tasso di usura (Mitchell 1967, White 1974). Pertanto avere un campione di adeguate dimensioni per classe di sesso ed età è utile sia per indagare in modo più approfondito quanto questi fattori condizionino il processo di decalcificazione sia per confrontare alcuni aspetti dell'ecologia di queste specie in funzione del sesso.

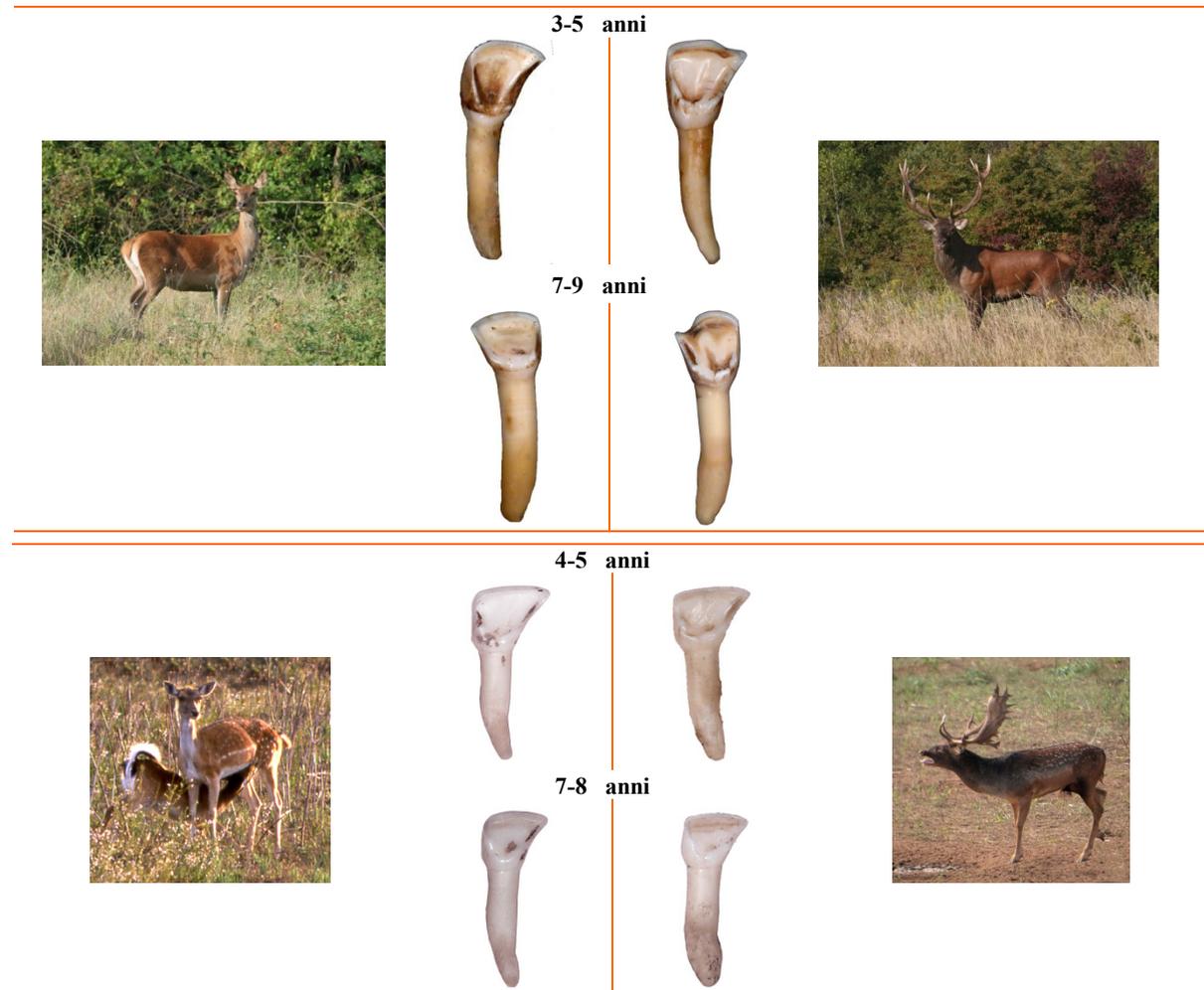


Figura 2.5 - Conformazione della radice e della corona di I_1 per classe di sesso ed età nel Cervo (in alto) e nel Daino (in basso). Le immagini degli incisivi delle due specie non sono rappresentate nello stesso rapporto di scala.



Figura 2.6 - Variazione intra-individuale nella conformazione della corona e della radice di I_1 in una femmina di Daino di 14-15 anni.

Individuo - Occorre tener presente che, a parità dei fattori precedentemente elencati, la dimensione di I_1 è condizionata anche dalla variabilità inter- e intra-individuale (Fig. 2.6), dipendente dalla forma, dal grado di mineralizzazione e dalla “storia” che caratterizzano ciascun dente.

2.1.2 Protocolli di laboratorio per la decalcificazione di I₁

I protocolli di laboratorio adottati nei diversi studi si differenziano in relazione al tipo di soluzione decalcificante nonché al volume della stessa soluzione. L'incisivo può essere interamente decalcificato o può essere decalcificata soltanto la sua radice (Klevezal 1996). La corona può essere tagliata prima di procedere alla decalcificazione, durante questo processo oppure quando la decalcificazione si è conclusa. Riducendo le dimensioni del dente si riducono i tempi di decalcificazione e il volume della soluzione decalcificante e quindi si ottimizzano il tempo lavoro e i costi in funzione del numero di denti che devono essere processati. La scelta di decalcificare o meno l'intero dente dipende dalla specie e quindi dalle dimensioni del dente nonché dalla soluzione decalcificante adottata. Nei protocolli di laboratorio descritti in letteratura, tuttavia, non è stata riscontrata uniformità in questo senso.

2.1.2.1 Tipo di soluzione decalcificante

La decalcificazione dei denti nei Cervidi viene eseguita con soluzioni diverse come ad esempio:

- ▶ acido formico (Low e Cowan 1963, Erickson e Seliger 1969: soluzione al 5%, Mc Ewan 1963, Gilbert 1966: soluzione al 30%);
- ▶ acido formico e formalina (Lockard 1972: 1 parte di formalina al 10%, 2 parti di acido formico e 20 parti di acqua distillata; Thomas 1977: 10% di acido formico e 5% di formalina);
- ▶ acido nitrico (Reimers e Nordby 1968, Szabik 1973, Miller 1974, Grue e Jensen 1979, Quéré e Pascal 1983, Hrabec e Koubek 1987, Klevezal 1996: soluzione al 5%; Rolandsen *et al.* 2008: soluzione al 6,5%);
- ▶ acido cloridrico (Godawa 1989: soluzione al 3,7%, Hall *et al.* 2012: soluzione al 10%);
- ▶ soluzioni commerciali per una rapida decalcificazione (Azorit *et al.* 2002a: TBD 1, utilizzato nei laboratori di anatomia patologica).

Tra le varie soluzioni usate, l'acido nitrico (HNO₃) consente una decalcificazione piuttosto rapida ed è economico (Morris 1972). Inoltre il *pattern* di deposizione delle linee di incremento appare ben distinto sul preparato istologico, diversamente da quanto accade se si usano altre soluzioni decalcificanti (Fancy 1980). Di conseguenza l'uso di una soluzione al 5% di acido nitrico risulta piuttosto comune. Tuttavia si evidenzia che, quando un dente viene sottoposto ad un processo di decalcificazione prolungato con questa sostanza, i suoi tessuti possono danneggiarsi al punto che i preparati istologici non risultano ben leggibili al microscopio (Morris 1972).

2.1.2.2 Volume della soluzione decalcificante

Si riportano di seguito i risultati di un *test* di laboratorio, eseguito variando i parametri sopra elencati, per dare un'idea di quali siano le relazioni tra il protocollo adottato e i tempi di lavoro.

Allo scopo di quantificare la relazione tra ore lavoro e millilitri di soluzione decalcificante sono stati estratti entrambi gli incisivi permanenti da un campione di mandibole di Daino che non hanno subito alcun trattamento. Il primo incisivo inferiore sinistro è stato decalcificato immergendolo in 5 ml di una soluzione di acido nitrico al 5%, mentre il primo incisivo inferiore destro è stato immerso in 10 ml della stessa soluzione. Durante il processo di decalcificazione è stato necessario sostituire la soluzione soltanto quando il volume della stessa era pari a 5 ml. In questi casi (46%) il calcio rimosso dal dente aveva saturato la soluzione, impedendo la prosecuzione del processo di decalcificazione o quantomeno rallentandolo fortemente. Confrontando i valori ottenuti con e senza la sostituzione della soluzione, sono state registrate notevoli differenze nei tempi di decalcificazione (Fig. 2.7). Escludendo i casi in cui la soluzione è stata sostituita non è stata registrata, invece, alcuna sostanziale differenza nei tempi di decalcificazione in funzione del volume.

Questi risultati possono essere spiegati da un diverso grado di mineralizzazione dei singoli denti dovuto a variabilità individuale. Quindi un volume pari a 5 ml di soluzione decalcificante non è sufficiente ad assicurare che la decalcificazione non sia condizionata dalla variabilità individuale che caratterizza il campione.

In conclusione, il volume della soluzione decalcificante dovrebbe essere di alcuni ordini di grandezza superiore al volume del dente da decalcificare (ossia maggiore o uguale a 10 ml) al fine di non aumentare eccessivamente i tempi di decalcificazione.

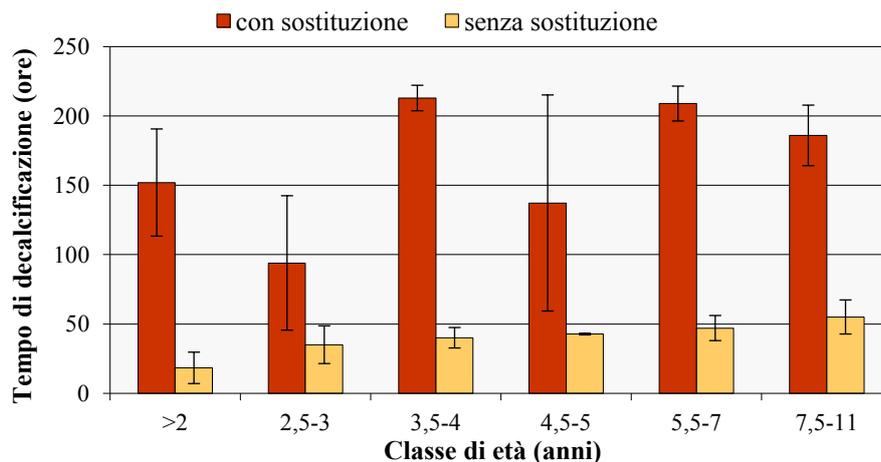


Figura 2.7 - Tempo di decalcificazione (media \pm deviazione standard) di I_1 per classe di età, con o senza sostituzione della soluzione di acido nitrico al 5%, registrato per un campione di 61 maschi di Daino provenienti da ambiente mediterraneo.

2.2 Taglio della radice in sezioni

Le radici possono essere sezionate tramite i seguenti strumenti.

▶ **Microtomo rotativo o a slitta.**

Prevede l'inclusione dei campioni in paraffina o in altro mezzo di inclusione, dopo averli disidratati, oppure in celloidina, senza disidratarli (Tumilson e McDaniel 1983). Lo spessore delle sezioni riportato in letteratura varia da 3 a 14 μ (Low e Cowan 1963, Gilbert 1966, Lockard 1972, Hamlin *et al.* 2000, Azorit *et al.* 2002a, Hall *et al.* 2012).

▶ **Microtomo congelatore.**

Non prevede l'inclusione dei campioni, bensì il loro congelamento tramite metodi criogenici non controllati come un getto di CO_2 gassosa. Lo spessore delle sezioni riportato in letteratura varia da 6 a 30 μ (Reimers e Nordby 1968, Szabik 1973, Grue e Jensen 1979).

▶ **Criostato.**

Prevede l'inclusione dei campioni e il loro congelamento all'interno di una camera refrigerata a $-25/-30$ °C dove è localizzato un microtomo. Lo spessore delle sezioni riportato in letteratura varia da 10 a 20 μ (Grue e Jensen 1979, Ashby e Henry 1979, Leader-Williams 1979, Rice 1980, Kovacs e Felek 1991).

Nel caso del microtomo rotativo o a slitta il tempo lavoro richiesto per il taglio è elevato a causa del complesso processo di inclusione. Durante le operazioni di taglio, inoltre, si è osservato che la radice all'interno del mezzo di inclusione può perdere il suo orientamento iniziale; ne consegue che il piano di sezione non risulta il medesimo per tutte le fette. A causa di un non corretto posizionamento del dente nel mezzo di inclusione Azorit e collaboratori (2002a) hanno registrato una perdita di campioni pari al 3% su di un totale di 521 incisivi di Cervo.

Attualmente la valutazione dell'età viene fatta sempre più di frequente servendosi del microtomo congelatore o del criostato che, non presentando i problemi suddetti, consentono di processare senza difficoltà anche un numero di denti molto elevato. Occorre sottolineare, comunque, che i costi da sostenere per acquistare un microtomo congelatore sono decisamente più contenuti se confrontati con quelli necessari per acquistare un criostato.

Diversi lavori dedicati alla valutazione dell'età affrontano il problema di quale sia il piano di taglio che assicuri la migliore leggibilità delle sezioni. Secondo molti autori (Miller 1974, Lieberman e Meadow 1992) la sezione longitudinale è preferibile alla sezione trasversa, nonostante la facilità di esecuzione di quest'ultima, poiché consente:

- ▶ di osservare l'intero spessore del cemento, dal colletto all'apice della radice;
- ▶ di identificare senza difficoltà la giunzione dentina-cemento;
- ▶ di leggere agevolmente le linee di incremento, in particolare la prima deposta, seguendone l'andamento lungo tutta la radice.

2.3 Allestimento di preparati istologici

La colorazione delle sezioni consente di evidenziare gli strati che formano il cemento. I coloranti menzionati in letteratura sono numerosi, ma quello più comunemente impiegato è senza dubbio l'ematossilina, sotto forma di soluzione alluminica o emallume con sali di alluminio come mordente. Di seguito alcuni esempi di emallumi:

- ▶ ematossilina di Harris [Keiss 1969, Erickson e Seliger 1969, Lockard 1972, Miller 1974 (in combinazione con Eosina Y)];
- ▶ ematossilina di Mayer (Reimers e Nordby 1968, Grue e Jensen 1979, Kovacs e Felek 1991);
- ▶ ematossilina di Ehrlich (Low e Cowan 1963, Leader-Williams 1979, Ashby e Henry 1979, Quéré e Pascal 1983, Hrabe e Koubek 1987);
- ▶ ematossilina di Delafield (Gilbert 1966, Szabik 1973).

In alternativa agli emallumi è stata utilizzata la colorazione di Giemsa, una miscela di coloranti diversi come l'azur B, l'eosina e il blu di metilene. Questo tipo di colorazione va usato con le dovute precauzioni in quanto facilmente infiammabile e tossico per inalazione, contatto con la pelle e ingestione; va immagazzinato in contenitori ermeticamente chiusi, in luogo fresco, ben ventilato e lontano da fonti di calore e va smaltito in conformità alla legislazione vigente e alle leggi locali come rifiuto speciale. Nel corso del presente lavoro, un'indagine condotta su di un campione di cervi (n=53) provenienti dall'Appennino tosco-emiliano, costituito da individui di età compresa tra 3 e 10 anni, equamente distribuiti tra le classi di età, ha evidenziato che per lo stesso individuo non esistono sostanziali differenze nella leggibilità se si confrontano preparati allestiti a partire dal medesimo incisivo, ma trattati con ematossilina di Ehrlich o con la colorazione di Giemsa. Considerando questi risultati e tenendo conto che la colorazione di Giemsa richiede, come già detto, particolari precauzioni di uso, stoccaggio e smaltimento, risulta preferibile colorare i preparati con una soluzione ematossilinica.

Thomas (1977) ha testato alcuni coloranti metacromatici su tre specie di Carnivori, nove specie di Ungulati (tra i quali quattro specie di Cervidi *Odocoileus hemionus*, *Rangifer tarandus*, *Cervus elaphus* e *Alces alces*) e sull'uomo, avendo come coloranti di confronto l'ematossilina di Ehrlich e di Harris. I coloranti metacromatici sono in grado di cambiare colore (viraggio) una volta assunti da determinati componenti istologici in maniera tale che il colore del complesso tessuto-colorante risulti diverso dal colore originale del colorante e da quello del restante tessuto. Il blu di toluidina, la tionina e il cristal violetto sono risultati i coloranti più promettenti, caratterizzati da una lunga vita, basso costo e buon contrasto. Tuttavia, quando i preparati permanenti vengono allestiti seguendo la procedura che prevede la disidratazione, le linee di incremento che sono state evidenziate con i coloranti metacromatici risultano meno nitide o addirittura non conservano la colorazione.

La colorazione del preparato non dipende soltanto dal colorante, ma anche dal trattamento subito dalla mandibola. La bollitura è senza dubbio uno dei trattamenti utilizzati più di frequente per facilitare l'estrazione dei denti. Secondo Low e Cowan (1963) tale trattamento altera nel Cervo mulo *Odocoileus hemionus* la struttura del cemento e quindi la colorabilità degli strati e finisce per rendere il preparato istologico difficilmente leggibile. Al contrario Reimers e Nordby (1968) sostengono, nel loro lavoro sulla valutazione dell'età della renna *Rangifer tarandus*, che la bollitura non sembra alterare la colorabilità del preparato. Analogamente Hall e collaboratori (2012) affermano che tale trattamento non determina nel Daino la distruzione del *pattern* di deposizione degli strati di cemento e che i preparati derivanti da denti che sono stati bolliti non sono diversi da quelli derivanti da denti che non lo sono stati.

Una mandibola può essere sottoposta ad un qualsiasi trattamento non solo per facilitare l'estrazione dei denti, ma anche per preparare il campione ai fini dell'allestimento di una collezione di confronto. In quest'ultimo caso le mandibole vengono di solito trattate anche con acqua ossigenata in modo tale da allestire rapidamente la collezione con campioni perfettamente puliti. Questo tipo di trattamento danneggia la struttura a strati del cemento (cfr. Matson *et al.* 1993) e rende la leggibilità dei preparati decisamente più difficoltosa mettendo a rischio l'attendibilità dei risultati (Klevezal 1996).

2.4 Valutazione della leggibilità del preparato istologico

È importante e utile associare alla valutazione dell'età di ciascun esemplare la stima della leggibilità degli strati e quindi dell'attendibilità della lettura attraverso una scala graduata di tipo qualitativo.

Ad esempio Klevezal e collaboratori (1981 in Klevezal 1996) identificano cinque gradi di leggibilità:

1. gli strati non sono leggibili;
2. gli strati possono essere distinti solo con grande difficoltà;
3. gli strati possono essere distinti solo arbitrariamente e il loro conteggio dà luogo a valutazioni diverse dell'età;
4. gli strati sono ben distinti, ma il loro conteggio non è del tutto attendibile;
5. gli strati sono ben distinti e facili da contare.

Matson e collaboratori (1993) hanno, invece, identificato una scala costituita da soli tre gradi di leggibilità:

- A. strati ben distinti e *pattern* di deposizione molto regolare;
- B. strati e *pattern* di deposizione non sempre ben distinti e regolari;
- C. strati non distinguibili e *pattern* irregolare.

Analogamente Azorit e collaboratori (2002a) hanno classificato i preparati in tre gruppi:

1. preparato da scartare;
2. preparato che consente una lettura non ottimale, soprattutto a causa della difficoltà di identificare la prima linea di cemento deposta;
3. preparato che consente una lettura ottimale con linee di incremento facilmente identificabili e quindi contabili.

I sistemi definiti da Matson e collaboratori (1993) e da Azorit e collaboratori (2002a) sono costituiti da gradi facilmente distinguibili per cui osservatori diversi possono senza difficoltà assegnare ai medesimi preparati lo stesso grado di leggibilità.

3. PROTOCOLLO DI LABORATORIO

In base a quanto esposto nel capitolo precedente, si propone il seguente protocollo per la determinazione dell'età dei Cervidi tramite il conteggio delle linee di incremento del cemento in sezioni della radice di I_1 .

1. Estrazione di I_1 dalla mandibola.
2. Decalcificazione della radice o dell'intero dente in almeno 10 ml di acido nitrico HNO_3 al 5%.
3. Lavaggio del dente o della radice in acqua corrente per 24 ore, una volta che il processo di decalcificazione si è concluso.
4. Inclusione del campione in un mezzo apposito per criostato.
5. Taglio longitudinale della radice in sezioni (14-16 μ) tramite criostato.
6. Allestimento di un numero fisso di preparati per ogni campione, con un numero fisso di sezioni centrali della radice del dente per vetrino.
7. Colorazione delle sezioni mediante ematossilina di Ehrlich.
8. Lavaggio delle sezioni colorate prima sotto un debole getto di acqua corrente e poi con acqua distillata.
9. Montaggio dei preparati con gelatina glicerinata secondo Kaiser, dopo che le sezioni si sono asciugate all'aria.
10. Osservazione del preparato al microscopio ottico.

Per dare un'idea del tempo lavoro necessario per eseguire questo protocollo si riporta il numero delle ore impiegate per processare gli incisivi di un maschio (classe 3,5-4 anni) e di una femmina (classe 7,5-11 anni) di Daino. La radice dell'incisivo è rivestita da pochi strati di cemento nel maschio e da diversi strati di cemento nella femmina in relazione alla classe di età. Per processare i due incisivi sono stati necessari, rispettivamente, 3 giorni e 18 ore e 4 giorni e 14 ore.

I singoli passaggi del protocollo vengono descritti di seguito. Si raccomanda di eseguirli con la massima attenzione, altrimenti si rischia di perdere i campioni e/o di avere preparati istologici non leggibili.

1. Estrazione di I_1 dalla mandibola.

È opportuno dedicare del tempo alla preparazione delle mandibole solo se si lavora su animali di età nota e/o si vuole realizzare una collezione di confronto (Scheda 4.2). Prima di procedere all'estrazione dell'incisivo, è utile fotografare la mandibola in visione laterale, mediale e dorsale (Scheda 4.2).

L'estrazione del dente dovrebbe avvenire in un laboratorio attrezzato prima di sottoporre la mandibola a qualsiasi tipo di trattamento, evitando così che il cemento (in particolare gli ultimi strati depositi) possa essere danneggiato. Se ciò dovesse accadere, il successivo esame al microscopio potrebbe risultare problematico a causa di una minore leggibilità del preparato e la valutazione stessa dell'età potrebbe essere compromessa. Quando l'estrazione è difficoltosa (in genere, negli individui più anziani), si può immergere l'arcata incisiva in acqua calda (50-60°C) per alcuni minuti o per alcune ore oppure per tutta la notte, dipende ovviamente dal caso specifico, in modo da facilitare la rimozione dei tessuti molli e quindi la stessa estrazione.

In caso di rottura della radice occorre tener conto che negli Ungulati lo spessore del cemento diminuisce gradatamente dall'apice della radice al colletto, di conseguenza se si ha a disposizione solo la porzione della radice vicina al colletto è necessario scartare il campione perché non più utilizzabile per un'analisi microscopica (Matson 1981).

In funzione degli obiettivi previsti dal monitoraggio, può essere utile fotografare l'incisivo (Scheda 4.2), misurare l'altezza della corona e/o della radice e registrare il grado di chiusura del forame dell'apice della radice (De Marinis 2015b).

Una volta puliti da qualsiasi residuo organico, i denti possono essere conservati a secco in bustine di carta che dovranno essere sempre corredate dei seguenti dati: nome della specie, sesso e numero di identificazione. Se il dente è stato perfettamente conservato può essere analizzato anche dopo qualche decennio (ad esempio sono stati esaminati denti conservati in collezioni museali per 50 anni), ma occorre tener conto che con il passare del tempo il dente diventa più fragile (Klevezal 1996). Nel caso in cui l'incisivo non sia perfettamente pulito può essere conservato in frigorifero oppure in etanolo al

70% allo scopo di evitare l'alterazioni dei tessuti. È opportuno non utilizzare la formalina al 10% per la conservazione dei campioni. Questa sostanza, infatti, è considerata pericolosa per la salute e il suo uso deve essere riservato a personale tecnico specializzato e limitato ai laboratori provvisti di cappa aspirante, il suo stoccaggio deve essere fatto in condizioni di sicurezza (in recipienti chiusi, in luoghi ben ventilati e al riparo dai raggi solari diretti) e il suo smaltimento deve essere affidato ad una società autorizzata alla gestione dei rifiuti, nel rispetto della normativa nazionale ed eventualmente locale. L'uso della formalina determina un considerevole allungamento dei tempi di decalcificazione, in relazione alle dimensioni del dente, e può alterare il campione al punto da comprometterne la colorazione (Klevezal 1996).

Nel Cervo, I_1 ha dimensioni tali (Fig. 2.1) che la sua decalcificazione richiede almeno sei giorni; pertanto, si consiglia di asportare la corona (ad esempio mediante una sega da traforo, Fig. 3.1) prima di immergere il dente nella soluzione decalcificante. La corona, infatti, essendo rivestita da un tessuto altamente mineralizzato qual è lo smalto, condiziona i tempi di decalcificazione, soprattutto nelle classi più giovani dove lo smalto è stato solo parzialmente consumato. Il taglio della corona modifica le dimensioni di I_1 e mette a contatto il canale della radice con la soluzione decalcificante, consentendo di ridurre il tempo di decalcificazione nonché la quantità dei reagenti richiesti. Va sottolineato che al fine di standardizzare il più possibile il materiale che sarà poi sottoposto ad analisi, il taglio va effettuato a livello del colletto. In individui di età avanzata le dimensioni della corona possono essere talmente ridotte a causa dell'usura che si può immergere nella soluzione decalcificante l'intero dente (Fig. 3.2). In questi casi, inoltre, asportando la corona si rischia di fratturare la radice e quindi di perdere il campione.



Figura 3.1 - Sega da traforo per separare la corona di I_1 dalla radice. I dispositivi di sicurezza sono stati spostati per esigenze fotografiche.



Figura 3.2 - I_1 estratto dalla mandibola di una femmina di Cervo di 10-11 anni con corona fortemente usurata (riquadro arancione).

2. Decalcificazione della radice o dell'intero dente in almeno 10 ml di acido nitrico HNO_3 al 5%.



Figura 3.3 - Vetreria e reagenti per la preparazione della soluzione decalcificante (HNO_3 al 5%). La soluzione deve essere preparata sotto cappa aspirante.

La decalcificazione (Fig. 3.3) è un processo che condiziona in modo determinante le successive attività di laboratorio. Se la decalcificazione non viene eseguita correttamente si può rischiare di perdere il campione, nel senso che l'iperdecalcificazione rende il campione inutilizzabile, mentre una decalcificazione non completa determina il danneggiamento della lama del criostato, il taglio non perfetto della radice in sezioni e come ultima conseguenza l'allestimento di un preparato istologico non leggibile.

Il processo di decalcificazione deve essere, quindi, seguito con grande attenzione, effettuando controlli periodici per verificarne lo stato di avanzamento.

Si può saggiare rapidamente la consistenza del dente o della radice servendosi di un ago (Klevezal 1996): se l'ago non incontra alcuna difficoltà nell'attraversare il dente in più punti, si può ritenere che la decalcificazione sia terminata (Fig. 3.4).



Figura 3.4 - Controllo dello stato di avanzamento della decalcificazione sulla radice di I_1 mediante infissione di un ago.

La maggiore o minore flessibilità del dente o della radice e la sua consistenza gommosa possono contribuire a dare un'idea dello stato di avanzamento della decalcificazione.

È possibile seguire l'andamento del processo anche osservando il colore del dente nel suo complesso oppure il colore della superficie di taglio, nel caso in cui si lavori sulla radice. Il processo può considerarsi concluso se il colore è completamente omogeneo (Fig. 3.5).

Esistono anche *test* specifici per monitorare il processo di decalcificazione la cui descrizione è reperibile in un qualunque manuale di tecniche istochimiche.



Figura 3.5 - A. I_1 (faccia labiale) di Capriolo non decalcificato (a sinistra) e decalcificato (a destra). B. Sezione trasversale della radice di I_1 di Daino: superficie di taglio non del tutto decalcificata (a sinistra) e decalcificata (a destra). Le immagini non rappresentano il medesimo dente prima e dopo la decalcificazione.

Il processo di decalcificazione per motivi di sicurezza deve svolgersi sotto cappa aspirante (Fig. 3.6), indossando guanti e occhiali protettivi, poiché l'acido nitrico è una sostanza corrosiva per inalazione, contatto e ingestione. Secondo le norme di sicurezza va immagazzinato in un contenitore ermeticamente chiuso, in un ambiente secco e ben ventilato (poiché si tratta di un comburente) e va smaltito in conformità alla legislazione vigente e alle leggi locali come rifiuto speciale.

Il dente può essere direttamente immerso nella soluzione decalcificante, se è stato conservato a secco, altrimenti deve essere prima immerso in acqua corrente per almeno 24 ore (Klevezal 1996).

Si può accelerare l'avanzamento della decalcificazione agitando la soluzione di tanto in tanto; se il processo non si conclude entro alcuni giorni è necessario provvedere alla sostituzione della soluzione in cui è immerso il dente.

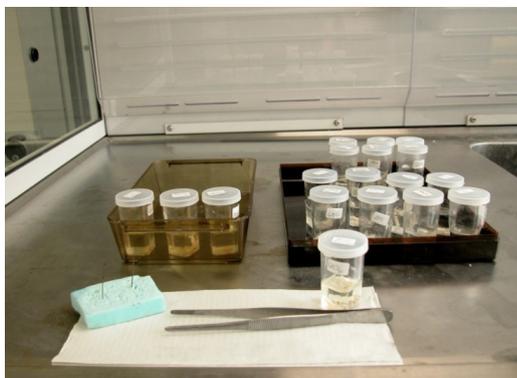


Figura 3.6 - Decalcificazione di incisivi di Daino sotto cappa aspirante. I campioni sono immersi nella soluzione decalcificante in contenitori chiusi, ciascuno contrassegnato da un numero identificativo. Gli aghi sono utilizzati per controllare lo stato di avanzamento della decalcificazione. Un blocchetto di polistirolo funge da porta aghi. La pinza serve per manipolare l'incisivo durante i controlli.

Sarebbe opportuno eseguire decalcificazioni di prova su gruppi di incisivi con dimensioni diverse della radice per quantificare, anche se grossolanamente, il tempo necessario alla decalcificazione stessa. Una volta che quest'ultimo è stato determinato, è possibile stabilire la periodicità dei controlli, considerando di aumentarne il numero quando il tempo previsto sta per scadere al fine di evitare di sottoporre il dente ad una decalcificazione prolungata. A questo proposito, si raccomanda di conservare il secondo I₁ di ciascun campione in modo che, in caso di danneggiamento del primo incisivo durante la decalcificazione oppure in caso di non leggibilità del preparato istologico, si possa avere a disposizione un secondo dente per la valutazione dell'età.

Nel caso del Daino, dal momento che le dimensioni di I₁ non sono così grandi come nel Cervo né così piccole come nel Capriolo, si consiglia di iniziare la procedura di decalcificazione lasciando il dente intero e di separare la radice dalla corona quando la decalcificazione, sebbene non completa, è tuttavia sufficientemente avanzata da permettere di eseguire il taglio con un bisturi durante il controllo periodico. Nel caso del Capriolo, invece, I₁ è abbastanza piccolo da poter essere decalcificato intero in tempi brevi.

In conclusione si suggerisce di procedere al taglio della corona per le diverse specie di Cervidi come indicato nella Tabella 3.1, al fine di ottimizzare i tempi di lavoro.

Tabella 3.1 - *Quando tagliare la corona di I₁ e cosa decalcificare di questo dente in funzione della specie.*

			
Taglio della corona	Prima della decalcificazione	Durante la decalcificazione	Dopo la decalcificazione
Decalcificazione	Radice	Intero dente (decalcificazione completa solo per la radice)	Intero dente

L'intervallo di tempo entro il quale si decalcificano gli incisivi registrato nel corso del presente lavoro è indicato nella Tabella 3.2 in funzione della specie e a prescindere dal sesso. Procedendo al taglio della corona come indicato, il 100% degli incisivi di Capriolo si decalcifica entro un giorno, mentre il 78% degli incisivi di Daino e il 90% di quelli di Cervo si decalcificano entro due giorni.

Si evidenzia che questi risultati dipendono dal campione analizzato per ciascuna specie in termini di distribuzione degli individui per classe di età. Occorre, inoltre, sottolineare che i dati in tabella caratterizzano le popolazioni che sono state oggetto di studio e possono differenziarsi in misura maggiore o minore dai dati rilevati su altre popolazioni. Ciò premesso, si è ritenuto comunque opportuno fornire questi dati, poiché possono rivelarsi utili per la pianificazione delle attività di laboratorio come per il loro coordinamento.

Tabella 3.2 - *Ripartizione percentuale del campione per specie in base al tempo di decalcificazione.*

Specie	Dimensione del campione	Tempo di decalcificazione (ore)			
		<24	24<x≤48	48<x≤95	48<x≤160
	222	46%	44%	10%	
	102	26%	52%		22%
	174	100%			

3. *Lavaggio del dente o della radice in acqua corrente per 24 ore, una volta che il processo di decalcificazione si è concluso.*

Il lavaggio può essere effettuato tramite un sistema a scomparti multipli che consente di processare più campioni contemporaneamente. Il flusso continuo di acqua permette di eliminare ogni traccia di acido dal dente o dalla radice. Se il lavaggio non è eseguito con accuratezza le tracce residue di acido possono danneggiare la lama del criostato oppure pregiudicare la successiva fase di colorazione. Dopo il lavaggio, i campioni possono essere conservati temporaneamente in congelatore fino al momento del taglio.

Nel caso del Capriolo, una volta effettuato il lavaggio, si può tagliare la corona tramite bisturi.

4. *Inclusione del campione in un mezzo apposito per criostato.*

La radice va posta sul portacampione, posizionando il dente come indicato nella Figura 3.7A, così facendo si ottengono sezioni in cui la leggibilità degli strati di cemento risulta ottimale. Il mezzo di inclusione è trasparente a temperatura ambiente (Fig. 3.7B) per cui è possibile verificare la posizione della radice e, se necessario, cambiarla. La caratteristica viscosità del prodotto favorisce l'adesione al portacampione.

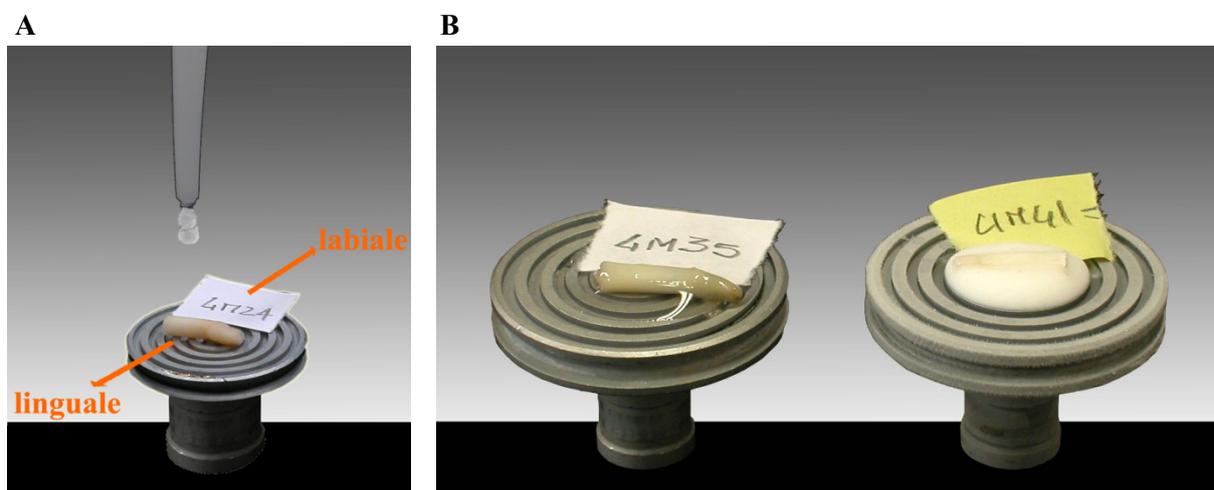


Figura 3.7 - A. Fase iniziale dell'inclusione del campione: le prime gocce del mezzo di inclusione stanno per cadere su I₁; la foto mostra come posizionare la radice sul portacampione (i termini si riferiscono all'orientamento che il dente ha sulla mandibola). B. Il mezzo di inclusione per criostato a temperatura ambiente (a sinistra) e a temperatura di congelamento (a destra). Ciascun incisivo ha il numero identificativo del soggetto che si sta processando.

5. *Taglio longitudinale della radice in sezioni (14-16 μ) tramite criostato (Fig. 3.8).*

Con un primo taglio si può asportare parte della radice (Fig. 3.9B) per poi procedere al taglio in sezioni solo della porzione centrale del dente (Fig. 3.9A e 3.10A), dove le linee di incremento del cemento sono ben individuabili e possono essere osservate per tutta o la maggior parte della loro lunghezza. Laddove il canale della radice è visibile, si può prendere come riferimento l'ampiezza di questa cavità: quando è massima ci si trova nella porzione centrale del dente.

Il mezzo di inclusione utilizzato è solubile in acqua, per cui non lascia alcun residuo quando le sezioni vengono immerse in acqua distillata dopo essere state tagliate (Fig. 3.10B).

6. *Allestimento di un numero fisso di preparati per ogni campione, con un numero fisso di sezioni centrali della radice del dente per vetrino.*

Per la preparazione delle guide pratiche all'identificazione delle classi di età sono stati allestiti due preparati per dente, con otto sezioni per ciascun vetrino (Fig. 3.11). Negli individui di età avanzata, a causa dell'ingrossamento subito dalla radice nel corso degli anni, sono stati preparati vetrini con sei sezioni.

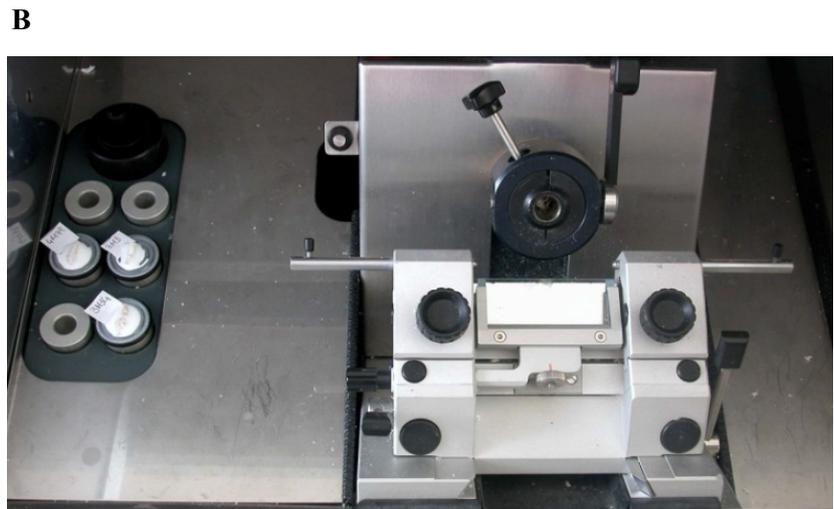


Figura 3.8 - A. Criostato. B. Camera del criostato (a sinistra portacampioni con radici di I_1 pronte per il taglio).

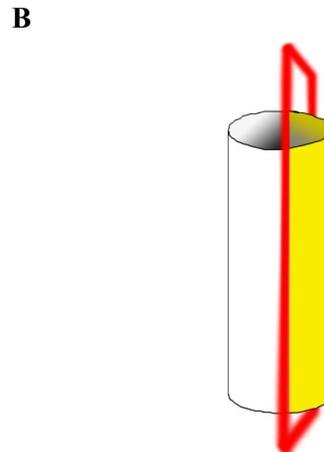
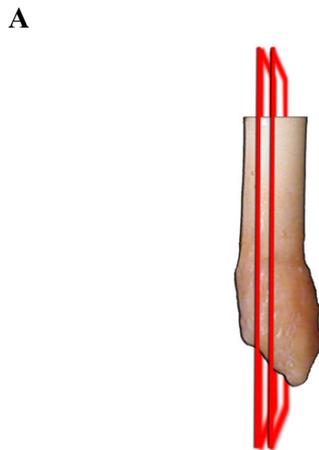


Figura 3.9 - A. Piani longitudinali di taglio della radice. B. Disegno schematico della radice che mostra il primo piano di taglio, utile ad eliminare la porzione che non verrà sottoposta ad analisi (in giallo).

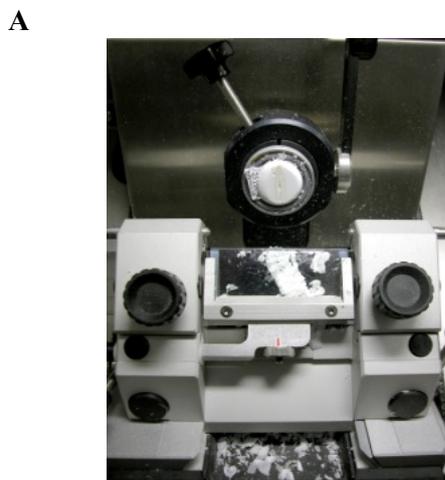


Figura 3.10 - A. Taglio della radice in sezioni all'interno della camera del criostato; via via che si procede con il taglio si ottengono "nastri" di sezioni. B. Prelievo del "nastro" e sua immersione in acqua distillata.

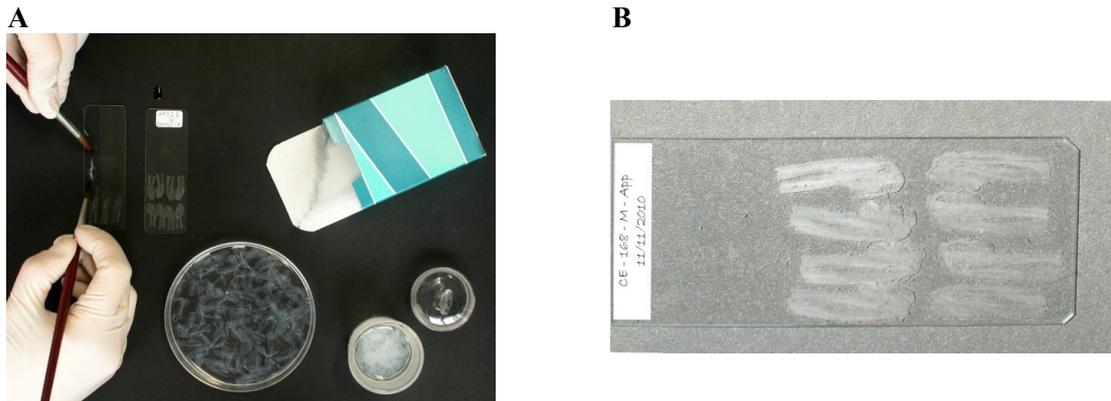


Figura 3.11 - A. Le sezioni vengono raccolte da una capsula Petri, dove sono immerse in acqua distillata, e distese sul vetrino portaoggetto con l'aiuto di un pennello. B. Preparato non colorato. Ciascun vetrino è provvisto di etichetta recante il nome della specie, il numero identificativo del soggetto che si sta processando, il sesso, la località di provenienza e la data di morte. Utilizzando etichette colorate, è possibile identificare con un colore il sesso oppure la località.

7. Colorazione delle sezioni mediante ematossilina di Ehrlich.

La soluzione può essere preparata in laboratorio sotto cappa aspirante (Fig. 3.12). Gli ingredienti per la preparazione dell'ematossilina di Ehrlich sono i seguenti: 100 ml di etanolo al 96%, 2 g di ematossilina, 100 ml di acqua distillata, 100 ml di glicerina, 10 ml di acido acetico glaciale e 3 g di solfato di potassio e alluminio dodecaidrato.

etanolo → ematossilina → acqua d → glicerina



acido acetico → solfato di K e Al → iodato di Na

Figura 3.12 - Preparazione dell'ematossilina di Ehrlich. Notare il viraggio del colore della soluzione durante il processo. La colorazione rosso scuro viene raggiunta solo a maturazione completata. d: distillata, K: potassio, Al: alluminio, Na: sodio.

Nella fase finale della sua preparazione, se si ha l'accortezza di aggiungere alla soluzione iodato di sodio, l'ematossilina può essere utilizzata immediatamente. Questo sale, infatti, è in grado di far maturare chimicamente il colorante, altrimenti è necessario aspettare 1-2 mesi (Klevezal 1996). Durante questo periodo il colorante va incontro ad un processo di maturazione naturale che si può considerare concluso quando la soluzione acquista un colore rosso dalla tonalità molto scura.

I preparati vengono immersi nel colorante solo dopo che si sono completamente asciugati all'aria (Fig. 3.13). È possibile "riciclare" l'ematossilina usata anche più volte, filtrandone la soluzione. Il tempo di colorazione può variare ed è preferibile definirlo nel corso di prove eseguite in condizioni controllate, evitando di inserire variabili che non sono oggetto di verifica, ma creano unicamente "disturbo". In ogni caso i preparati non si colorano sempre allo stesso modo a causa della variabilità individuale.

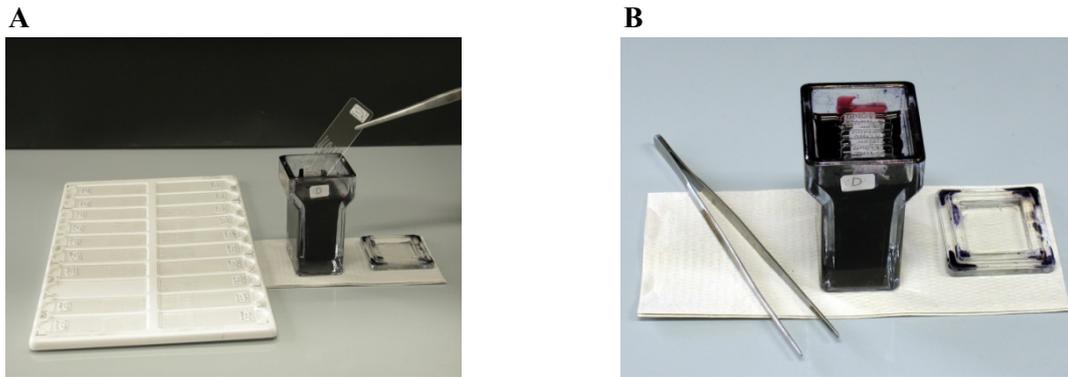


Figura 3.13 - A. Vassoio con vetrini (a sinistra) e vaschetta per la colorazione contenente ematossilina di Ehrlich (a destra). B. Dettaglio della vaschetta con una serie di vetrini immersi nel colorante.

8. Lavaggio delle sezioni colorate prima sotto un debole getto di acqua corrente e poi con acqua distillata.

Il lavaggio sotto acqua corrente di ciascun vetrino portaoggetto ha lo scopo di eliminare l'eccesso di colorante e deve essere fatto con grande attenzione per evitare di perdere alcune o addirittura tutte le sezioni della radice di I_1 .

9. Montaggio dei preparati istologici con gelatina glicerinata secondo Kaiser, dopo che le sezioni si sono asciugate all'aria.

Il montaggio deve essere eseguito in un area ben ventilata o sotto cappa aspirante, indossando occhiali e guanti, poiché la gelatina glicerinata contiene fenolo, sostanza che causa irritazione cutanea e oculare ed è sospettata di provocare alterazioni genetiche. Dopo aver scaldato la gelatina glicerinata a bagnomaria (Fig. 3.14A), evitando l'ebollizione e senza agitare la miscela per non provocare la formazione di bolle di aria, si esegue il montaggio. Si applica tramite una pipetta qualche goccia di gelatina sul vetrino portaoggetto, tenuto in posizione orizzontale, e poi si chiude il preparato con un vetrino coprioggetto pulito (Fig. 3.14B). La gelatina deve spandersi bene tra i due vetrini in modo da coprire completamente il preparato. Il montaggio va eseguito con attenzione allo scopo di evitare, anche in questo caso, la formazione di bolle di aria. Si può eventualmente scaldare il vetrino portaoggetto per facilitare l'operazione

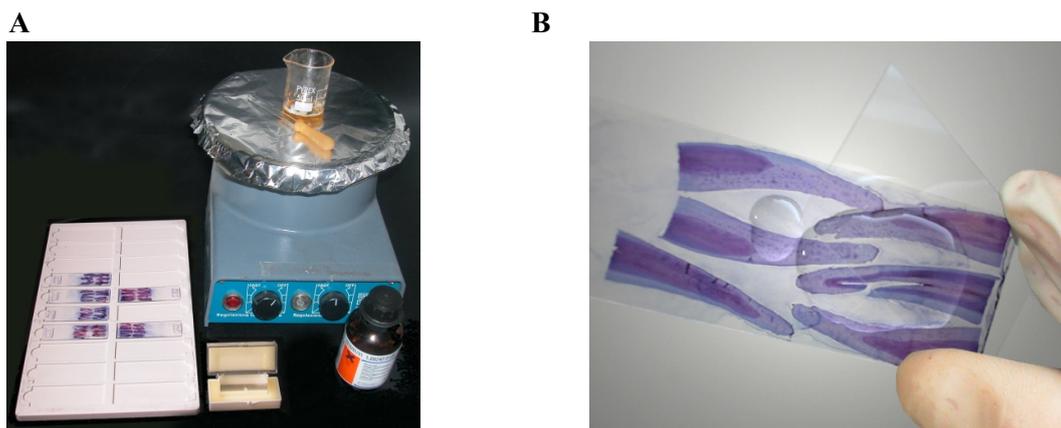


Figura 3.14 - A. Vetrini con sezioni colorate su di un vassoio portavetrini (a sinistra), gelatina glicerinata, piastra riscaldante e scatola contenente vetrini coprioggetto (a destra). B. Copertura del vetrino portaoggetto con un vetrino coprioggetto, dopo aver applicato alcune gocce di gelatina sul preparato.

Si lascia poi riposare il campione in posizione orizzontale per un tempo variabile in relazione alla temperatura dell'ambiente e, comunque, fino al completo indurimento della gelatina. Solo allora il preparato è pronto per l'esame al microscopio. Per avere preparati permanenti è necessario sigillare il vetrino, ad esempio con smalto da unghie trasparente (Ravikumar *et al.* 2014). L'impiego della

gelatina glicerinata consente di effettuare abbastanza rapidamente il montaggio ma i preparati che si ottengono tendono ad ingiallire e a perdere il colore dopo alcuni anni.

Per dare un'idea del tempo lavoro utile per processare i denti, una volta che questi siano stati decalcificati e sottoposti a lavaggio, si consideri che un tecnico esperto può tagliare, colorare e montare un *set* di circa 30 denti in un giorno di lavoro.

10. Osservazione del preparato al microscopio ottico (Fig. 3.15).

È opportuno effettuare una prima osservazione per individuare la porzione del preparato dove le linee di incremento sono ben distinguibili. Dopo questa osservazione preliminare, si conta il numero delle linee di incremento in due aree diverse per ciascuna sezione, avendo cura di esaminare con attenzione la giunzione dentina-cemento in prossimità della quale viene deposta la prima linea di incremento (ingrandimento 100x). Tale giunzione separa la dentina, che presenta un disegno striato, dal cemento che, invece, mostra un disegno "spugnoso". Si sottolinea che il risultato del conteggio delle linee di incremento può derivare da osservazioni condotte in punti diversi della stessa area, poiché le singole linee possono presentare una diversa leggibilità lungo la radice.

È possibile che si conti un numero differente di linee in sezioni diverse del medesimo preparato, in questo caso occorre esaminare nuovamente e con maggior attenzione le sezioni per comprendere le cause che hanno determinato tali differenze di lettura. A tale proposito è opportuno verificare che le sezioni derivino effettivamente dalla porzione centrale della radice.

Nei preparati ottenuti da radici con apice ingrossato, la leggibilità delle linee di incremento è migliore nella zona corrispondente all'ingrossamento (Low e Cowan 1963).

Sarebbe opportuno acquisire una certa esperienza nella lettura dei preparati istologici esaminando solo campioni, preferibilmente di età nota, provenienti dalla popolazione oggetto di monitoraggio ed esercitandosi esclusivamente sullo stesso tipo di dente (ossia l'incisivo secondo il protocollo proposto).

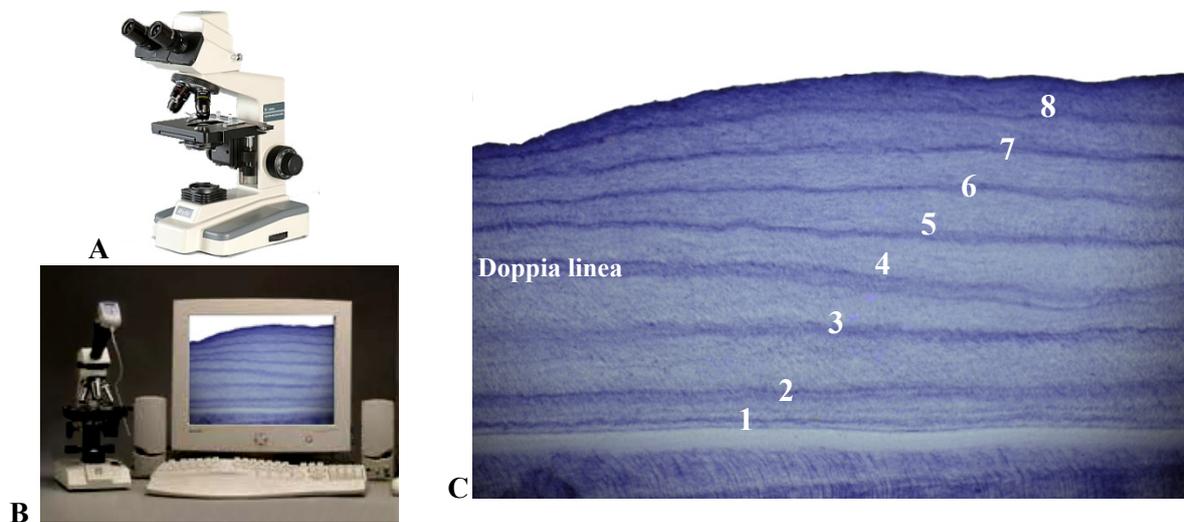


Figura 3.15 - A. Microscopio ottico. B. Microscopio collegato ad una camera digitale e ad un computer. C. Conteggio delle linee di incremento in un preparato. Notare la presenza di doppie linee.

Nei preparati si possono osservare linee di incremento doppie (Fig. 3.15C) in numero variabile da un individuo all'altro e indipendentemente dal sesso (Grue e Jensen 1979). La presenza di doppie linee è rilevabile non solo negli Ungulati ma anche in numerosi altri *taxa* di mammiferi (ad esempio Roditori e Carnivori). La formazione di queste linee sembrerebbe essere associata ad un complicato ritmo di accrescimento stagionale su base individuale (Klevezal 1996) oppure a particolari condizioni ambientali (Grue e Jensen 1979), ma non al ciclo riproduttivo. L'esame al microscopio ottico di preparati di individui di età nota consente di acquisire il colpo d'occhio necessario per distinguere questo tipo di linee di incremento.

Collegando una camera digitale al microscopio (Fig. 3.15B) è possibile osservare il preparato direttamente sullo schermo di un computer, contare più facilmente le linee di incremento e confrontarsi con altri osservatori sul numero e sulla posizione di queste linee. Scattando fotomicrografie si può allestire una collezione di confronto, realizzare una documentazione delle tecniche di microscopia adottate e preparare del materiale didattico ai fini della valutazione dell'età. La raccolta di immagini deve essere fatta seguendo una procedura standardizzata (Scheda 4.2).

Terminato il conteggio delle linee di incremento, è necessario assegnare il grado di leggibilità al preparato secondo una scala graduata precedentemente definita. I preparati che risultano non leggibili vanno ovviamente eliminati dalle analisi. I preparati per i quali il risultato del conteggio delle linee di incremento non è certo (ossia la classe di età è ampia ad esempio 2-5 anni) possono o meno essere eliminati dalle analisi in funzione degli obiettivi di monitoraggio.

Dopo aver assegnato il grado di leggibilità al preparato, è necessario registrare se l'ultima componente deposta dello strato di cemento è costituita da una banda poco colorata oppure da una linea di incremento colorata (Fig. 3.16).

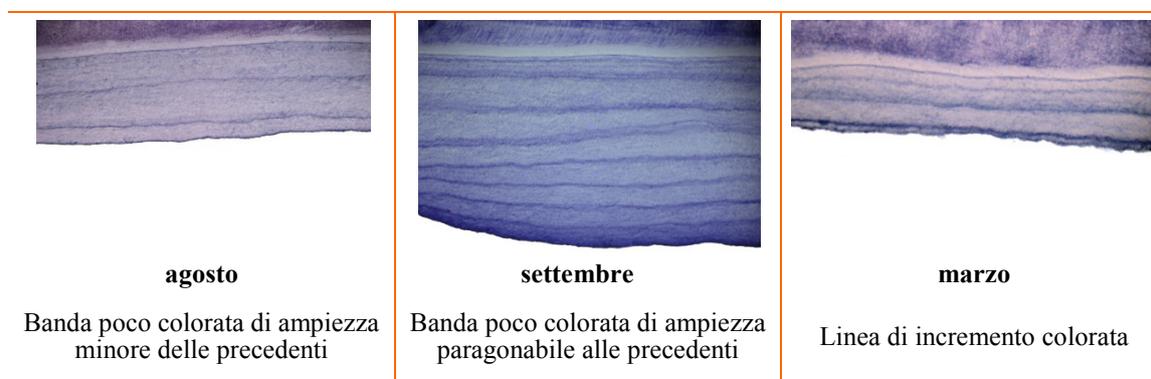


Figura 3.16 - Fotomicrografie di sezioni della radice di I_1 , in cui l'ultimo strato deposto ha caratteristiche diverse in relazione al mese di prelievo del soggetto in esame.

Nel primo caso occorre valutare l'ampiezza della banda facendo riferimento all'ampiezza delle altre bande precedentemente deposte e verificare se tale l'ampiezza è minore oppure paragonabile a quella delle altre bande. Registrando questi dati, è possibile ricostruire il ciclo annuale di deposizione degli strati di cemento. Avendo a disposizione queste informazioni si può determinare correttamente l'età di un individuo (si vedano le "Guide pratiche all'identificazione della classe di età" specie-specifiche).

4. COME REALIZZARE UNA GUIDA PRATICA ALL'IDENTIFICAZIONE DELLE CLASSI DI ETÀ

Il diagramma di attività mostrato nella Figura 4.1 illustra le fasi operative che portano alla realizzazione di una guida pratica per la valutazione dell'età. Questo processo ha permesso di produrre le guide dedicate alle singole specie di Cervidi.

La Fase I consente di standardizzare e validare la tecnica di analisi microscopica utilizzata per la determinazione dell'età tramite l'esame di preparati istologici di individui di età nota, ossia marcati alla nascita. Tale tecnica prevede, come illustrato nei capitoli precedenti, il conteggio delle linee di incremento del cemento in sezioni della radice di I_1 . Quando non si hanno a disposizione individui di età nota, si può assumere che soggetti che abbiano una dentatura con determinate caratteristiche siano assimilabili ad individui di età nota. Nel caso del Cervo e del Daino, questo può essere fatto utilizzando soggetti con dentatura in fase di sostituzione. In base allo stadio di eruzione dei molari e all'assenza di usura su tutte o su alcune creste dei premolari, si possono identificare tre classi di età nel Cervo (< 1 anno, 1-2 anni e 2-3 anni) e due classi di età nel Daino (< 1 anno e 1-2 anni). La validazione può essere, quindi, effettuata verificando se l'età determinata attraverso il conteggio delle linee di incremento è compatibile con la classe di età definita sulla base della sostituzione della dentatura decidua con la permanente. Nel caso del Capriolo, poiché la sostituzione della dentatura avviene nell'arco di circa 1 anno, si può identificare una sola classe d'età e ciò limita l'affidabilità della validazione. Pertanto, per costruire una guida per questa specie è necessario avere a disposizione individui marcati alla nascita.

La Fase II consente di elaborare una procedura per caratterizzare i processi di eruzione e usura di una popolazione e una seconda procedura per l'identificazione delle classi di età. Queste procedure si basano su caratteri diagnostici ben identificabili e oggettivi (morfotipi dentali), correlati con i processi di eruzione e di usura. Tali caratteri vengono definiti esaminando la dentatura degli individui la cui età è stata determinata tramite la tecnica di analisi standardizzata e validata nella Fase I.

La Fase III porta alla realizzazione della guida e si conclude con una prova di valutazione dell'età eseguita, con e senza l'ausilio della guida, da tecnici faunistici. La prova è prevista solo per la guida basata sull'esame dello stadio di usura, dal momento che questa è molto complessa e coinvolge numerose classi di età. La prova deve essere strutturata in modo da verificare se l'uso della guida consente di aumentare l'accuratezza della stima e di ridurre la variabilità inter-osservatore nella valutazione. È possibile così mettere a punto la versione definitiva, confrontando le osservazioni dei tecnici e tenendo in considerazione le eventuali difficoltà da loro riscontrate nell'applicazione.

Si sottolinea che è necessario lavorare su popolazioni selvatiche e non su animali vissuti in cattività o che sono stati foraggiati artificialmente in modo da non alterare la cronologia dell'eruzione, il tasso di usura dei denti e il processo di stratificazione del cemento. Inoltre la leggibilità dei preparati è migliore per i campioni provenienti da popolazioni selvatiche (Grue e Jensen 1979).

Una guida così realizzata consente di rendere applicabile sul campo, anche se indirettamente, la tecnica di valutazione dell'età basata sul metodo del conteggio delle linee di incremento del cemento su preparati istologici. Una guida di questo tipo, inoltre, assicura la standardizzazione dei metodi di valutazione e è utilizzabile oltre che per la popolazione oggetto di monitoraggio anche per quelle popolazioni che abbiano caratteristiche simili e vivano in ambienti analoghi, in mancanza di altre guide a scala locale. La realizzazione di una guida all'identificazione delle classi di età per una popolazione di Cervidi non corrisponde alla risoluzione del problema della valutazione dell'età per quella popolazione, ma rappresenta l'inizio di un percorso che porterà alla risoluzione di questo problema. La guida non deve rimanere inalterata nel tempo, ma deve essere integrata con nuove informazioni ed elementi diagnostici attraverso l'esame di altri campioni. Tanto più numeroso sarà il campione tanto più la schematizzazione del processo di usura che è alla base dell'identificazione delle classi di età riuscirà a cogliere la variabilità connessa con tale processo. La guida è quindi uno strumento di lavoro che deve avere caratteristiche dinamiche per assicurare che la valutazione dell'età diventi via via più accurata e precisa, la conoscenza della struttura di popolazione più attendibile e la stima dei parametri ad essa legati (sopravvivenza, produttività, ecc.) più corretta. Una guida così concepita può garantire una migliore programmazione a medio e lungo termine degli interventi di gestione secondo un approccio di tipo adattativo realmente rispondente alle caratteristiche della popolazione.

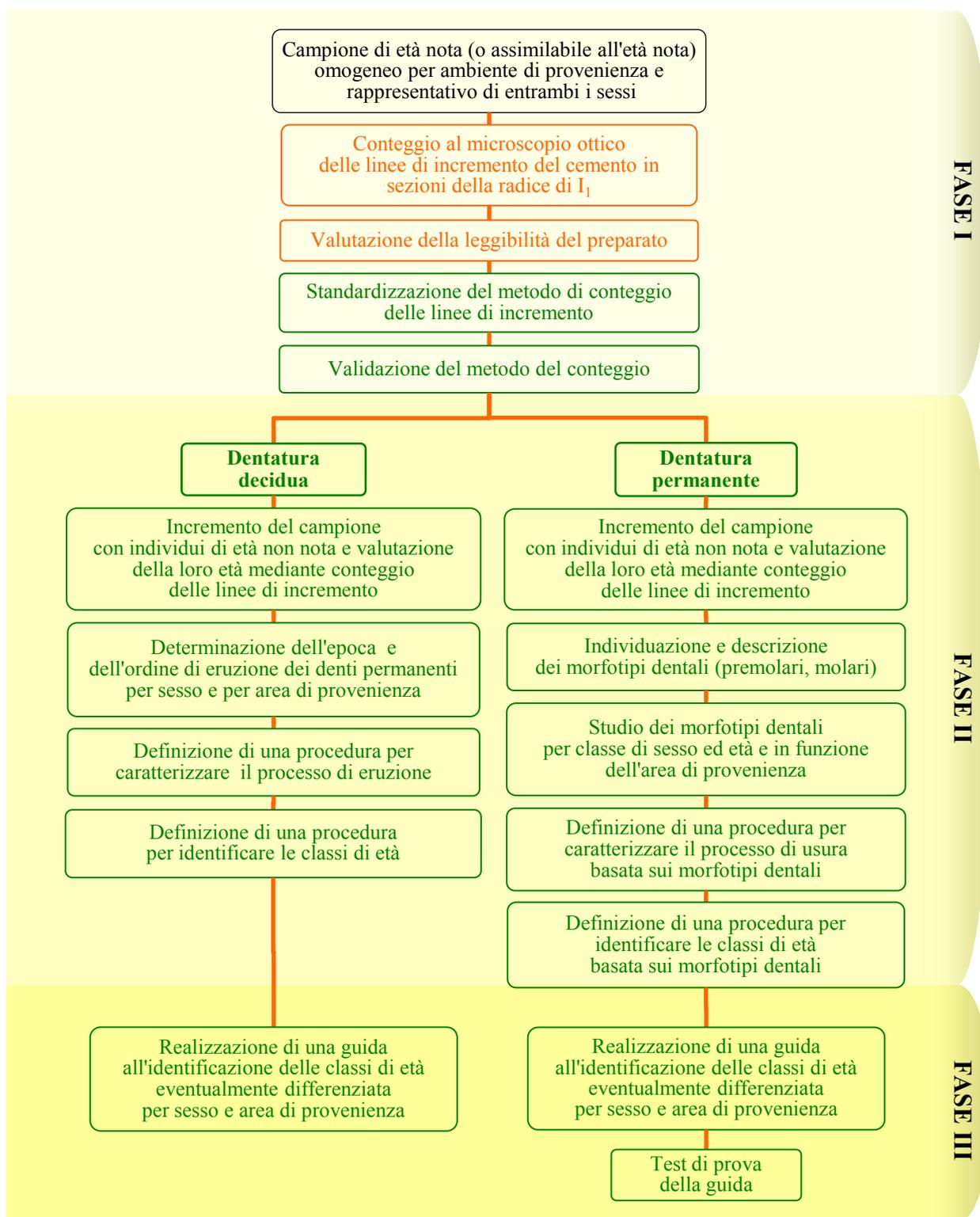


Figura 4.1 - Sequenza delle fasi operative del processo di realizzazione di una guida per la valutazione dell'età dei Cervidi in base allo stadio di eruzione e di usura dei denti permanenti. I riquadri arancioni indicano le azioni che sono state descritte nei Capitoli 2 e 3, mentre i riquadri verdi indicano le azioni che sono descritte nelle guide pratiche dedicate a ciascun Cervide allo scopo di evidenziarne le criticità specie-specifiche. Le guide possono essere differenziate per sesso e area geografica solo se lo studio della cronologia e dell'ordine di eruzione e lo studio dei morfotipi dentali hanno rilevato pattern sostanzialmente diversi in funzione di questi parametri.

SCHEDA 4.1

LA SCHEDA DI RACCOLTA DATI

La scheda deve essere costruita in modo da rispondere agli obiettivi previsti, deve risultare di facile compilazione e consultazione e deve comprendere le seguenti sezioni.

- ▶ Sezione di carattere generale relativa all'esemplare in esame.

Ciascun individuo deve avere un proprio numero identificativo che sarà poi utilizzato per contrassegnare qualsiasi campione biologico venga prelevato, evitando di dare identificativi diversi in funzione del reperto. I dati relativi al sesso e alla data di morte rivestono particolare importanza per la valutazione dell'età. A questo proposito è utile annotare se l'individuo è stato rinvenuto morto, dal momento che in questo caso la data del ritrovamento non fornisce lo stesso tipo di informazioni della data certa di morte; sarebbe, comunque, opportuno stimare il tempo trascorso tra la data del decesso e il ritrovamento.

- ▶ Sezione specifica per la valutazione dell'età.

Le procedure adottate nella stima o determinazione dell'età e, corrispondentemente, la classe di età o l'età assoluta ricavata dalle analisi devono essere riportate sulla scheda. È utile registrare se la mandibola o il preparato vengono conservati ai fini dell'allestimento di una collezione di confronto e se i campioni vengono fotografati (Scheda 4.2).

- ▶ Sezione per la raccolta di altri dati rilevabili sulla mandibola.

Si potrebbe, per esempio, prevedere di registrare la presenza e il tipo di anomalie dentarie (ad esempio Azorit et al. 2002b) oppure di inserire il rilevamento di parametri che siano indicatori della qualità dell'habitat e dello stress ambientale quali: la lunghezza della mandibola e/o l'altezza del diastema (ad esempio Nugent e Frampton 1994, Bertouille e De Crombrugghe 1995, Hewison et al. 1996) oppure i caratteri metrici e non metrici che quantificano l'asimmetria fluttuante (ad esempio Markowski 1993, Serrano et al. 2008).

Occorre porre molta attenzione nella raccolta dei dati perché gli errori fatti al momento della compilazione della scheda generano ulteriori errori nel corso delle analisi, di conseguenza è necessario effettuare sempre delle verifiche con controlli successivi, anche incrociati.

Tutti i dati archiviati su carta devono essere inseriti su fogli elettronici, appositamente predisposti, che andranno a costituire la banca dati dell'area di studio o dell'unità territoriale di gestione. La strutturazione dell'archivio elettronico deve rispondere a criteri di standardizzazione in modo tale che operatori diversi abbiano la possibilità di archiviare i dati sempre con la medesima procedura. Questi dati possono essere messi in relazione con altri archivi derivanti, ad esempio, da programmi di rilevamento biometrico (Fig. 4.2), allo scopo di ampliare le conoscenze sulla popolazione attraverso lo studio di set diversi di variabili.

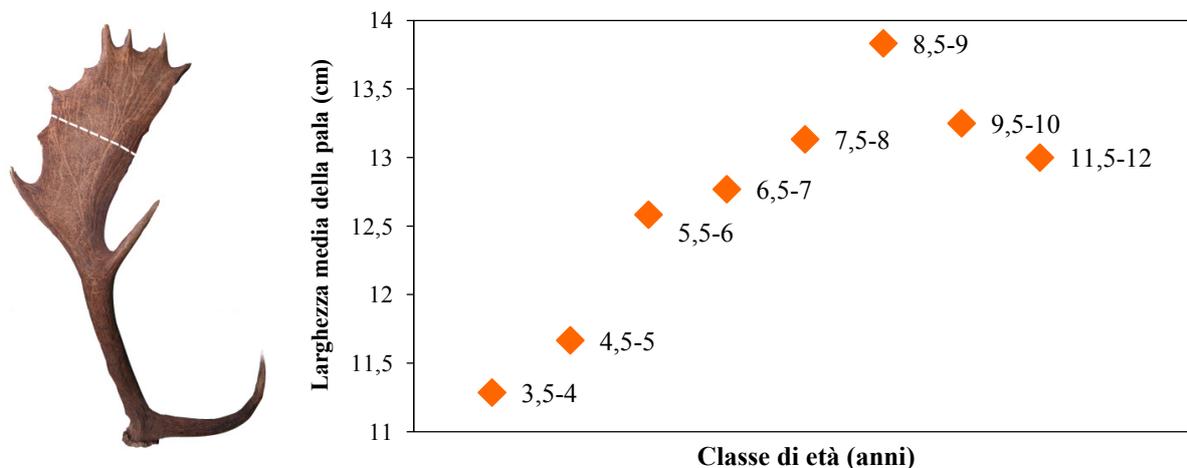


Figura 4.2 - Larghezza della pala (indicata dalla linea tratteggiata bianca) in funzione della classe di età in un campione di 72 daini, provenienti da ambiente mediterraneo.

Si riporta di seguito, a titolo esemplificativo, una scheda dedicata al Capriolo.

VALUTAZIONE ETÀ - Scheda n.



ENTE/UNITÀ DI GESTIONE _____

LOCALITÀ: _____ COORDINATE GPS: N _____ S _____
X _____ Y _____
COMUNE: _____ PROVINCIA: _____ ALTITUDINE: _____
N° IDENTIFICATIVO: _____ SESSO: F M
DATA di MORTE: _____ CAUSA di MORTE: abbattuto investito
In caso di rinvenimento della carcassa:
MESE PRESUNTO di MORTE: _____ CAUSA di MORTE: _____
COLLARE n°: _____ MARCA AURICOLARE: destra _____ sinistra _____
DATA DI CATTURA: _____ ETÀ ALLA CATTURA: _____
Data del rilevamento _____ Rilevatore _____

DATI GENERALI

DENTATURA DECIDUA DENTATURA PERMANENTE
STIMA DELL'ETÀ: _____
ESAME DELLO STADIO DI ERUZIONE Guida di riferimento _____
ESAME DELLO STADIO DI USURA Guida di riferimento _____
CLASSE DI ETÀ ATTRIBUITA _____
DETERMINAZIONE DELL'ETÀ:
ESAME MICROSCOPICO dopo DECALCIFICAZIONE DEL DENTE TIPO DI DENTE: _____
ESAME MICROSCOPICO senza DECALCIFICAZIONE DEL DENTE TIPO DI DENTE: _____
ETÀ DETERMINATA _____
Data del rilevamento _____ Rilevatore _____

VALUTAZIONE ETÀ - Dati

FOTO dell'esemplare: si no FOTO del trofeo: si no
MANDIBOLA in COLLEZIONE si no
FOTO della mandibola: visione dorsale laterale mediale
PREPARATO in COLLEZIONE si no FOTO del preparato: si no
Altre FOTO (specificare): _____

VALUTAZIONE ETÀ Foto

ANOMALIE DENTARIE
DI POSIZIONE: _____
DI NUMERO: _____
DI FORMA: _____
Data del rilevamento _____ Rilevatore _____

ANOMALIE DENTARIE

SCHEDA 4.2

COME ORGANIZZARE UNA COLLEZIONE DI CONFRONTO AI FINI DELLA VALUTAZIONE DELL'ETÀ

Una collezione di confronto (Fig. 4.3), se opportunamente costruita, rappresenta uno strumento indispensabile per valutare l'età degli individui appartenenti alla popolazione oggetto di monitoraggio nonché uno strumento utile per valutare l'età di individui appartenenti anche ad altre popolazioni con caratteristiche simili. E' importante ribadire che una collezione di confronto deve essere formata da un campione adeguato di reperti prelevati da individui di età certa (ossia marcati alla nascita oppure la cui età è stata determinata tramite tecniche validate) che provengono dalla medesima popolazione.

Il seguente diagramma e la descrizione di ciascuno degli elementi costitutivi di una collezione di confronto tengono conto che la determinazione dell'età può essere fatta tramite esame microscopico sia di denti decalcificati sia di denti non decalcificati.

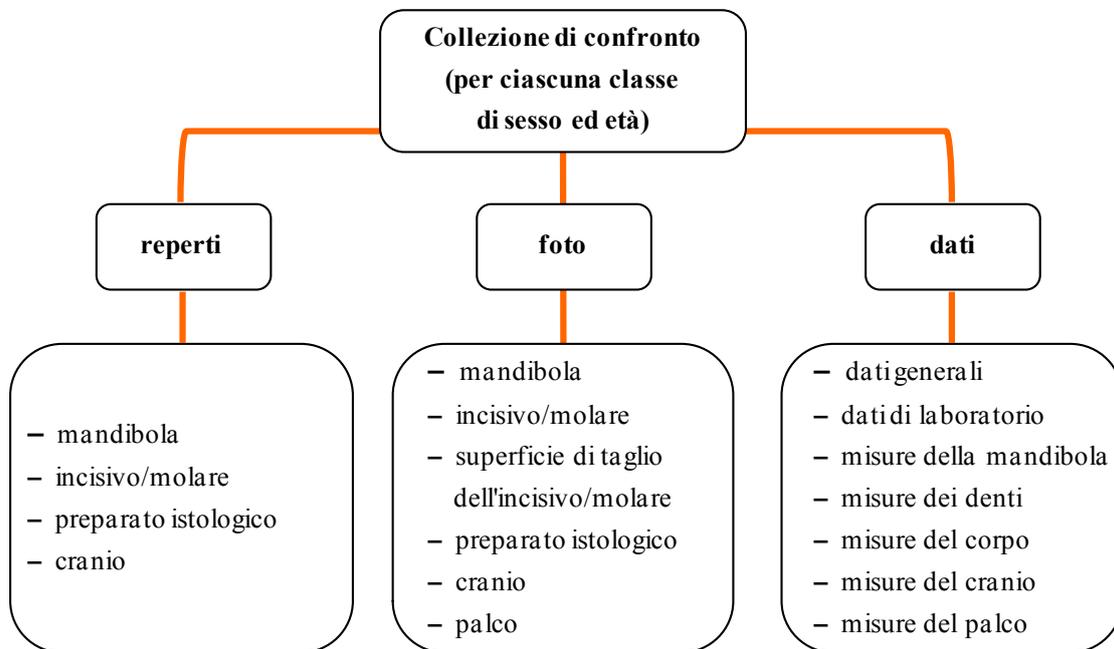


Figura 4.3 - Diagramma che illustra gli elementi costitutivi di una collezione di confronto.

Reperti

È preferibile conservare in collezione entrambe le mandibole dello stesso individuo, perché i denti di ciascuna mandibola possono trovarsi in uno stadio diverso di eruzione o di usura e possono presentare anomalie e/o patologie differenti. Inoltre, avendo a disposizione le due mandibole è possibile ripetere, se necessario, l'esame microscopico degli strati di cemento. Ad esempio nel caso in cui I_1 destro oppure M_1 destro siano andati persi a causa rispettivamente dell'iperdecalcificazione oppure della frattura della radice al momento dell'estrazione del dente, si può procedere ugualmente alla valutazione dell'età analizzando I_1 sinistro oppure M_1 sinistro. È utile conservare il secondo I_1 in bustine di carta etichettate con nome della specie, numero identificativo, sesso, località di provenienza e data di morte dal momento che questo dente, diversamente da M_1 , può essere smarrito facilmente. A questo proposito si raccomanda di conservare le mandibole di ciascun individuo in una busta allo scopo di evitare che uno o più denti (ad esempio: gli incisiviformi, i denti decidui o i premolari, in particolare P_2) vadano perduti con il passare del tempo.

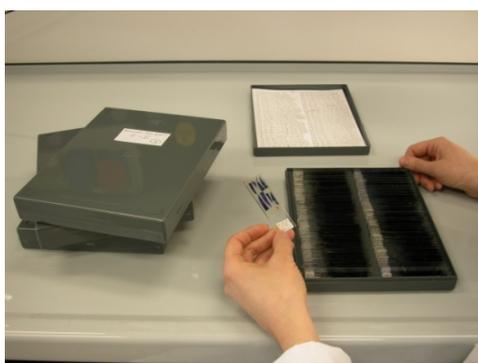


Figura 4.4 - Scatole portavetrini con posti numerati singolarmente e schede per la classificazione dei preparati.

I preparati istologici derivanti dalla sezione della radice di I_1 vanno conservati in apposite scatole portavetrini (Fig. 4.4). Nel caso in cui, invece, M_1 sia stato sottoposto ad esame microscopico, è importante conservare in bustine di carta, etichettate come sopra, entrambe le parti risultanti dal taglio del dente non decalcificato.

Foto

È utile associare a ciascun reperto una documentazione fotografica, per garantire la possibilità di effettuare un esame dello stesso campione anche tramite sistemi informatici e per avere l'opportunità di scambiare e confrontare dati.

Quando si vuole realizzare una documentazione fotografica, è indispensabile adottare sempre le medesime procedure per evitare la raccolta e l'archiviazione di materiale che si rivelerà poi inutilizzabile. Queste procedure, ovviamente, varieranno in relazione agli scopi da raggiungere nonché ai parametri biologici oggetto di monitoraggio. In ogni caso, occorre fotografare il soggetto in condizioni controllate, in modo da non introdurre elementi di variabilità nella raccolta dati. Ad esempio, quando si fotografa la mandibola l'altezza e le proporzioni delle cuspidi, la forma degli infundiboli e l'estensione della dentina possono apparire in maniera diversa in relazione all'inclinazione della branca mandibolare al momento dello scatto. Una documentazione fotografica realizzata secondo criteri standardizzati si rivela di estrema utilità quando si effettuano analisi comparative tra popolazioni o, nell'ambito della stessa popolazione, tra sessi o coorti.

La mandibola dovrà ovviamente essere fotografata prima di procedere alle analisi, mentre le foto dei singoli incisivi o molari dovranno essere scattate prima di procedere al taglio.

Si deve prevedere di fotografare la mandibola in visione laterale, mediale e dorsale e, in relazione al dente sottoposto ad analisi, la faccia linguale, labiale e mesiale di I_1 oppure la faccia occlusale, linguale e buccale di M_1 . È consigliabile spazzolare la faccia occlusale dei denti prima di fotografarli per eliminare eventuali residui di cibo o altro che possono rendere non visibile, in parte o totalmente, la stessa faccia occlusale.

Si può prevedere di realizzare anche una collezione di confronto di fotomicrografie, per disporre di materiale di studio con il quale acquisire esperienza nel conteggio delle linee di incremento nonché effettuare confronti inter-osservatore per valutare il grado di soggettività nella lettura degli strati di cemento. Si evidenzia la necessità che l'ingrandimento sia il medesimo per tutte le fotomicrografie (ad esempio per il microscopio ottico 100x e per lo stereomicroscopio 10x), avendo cura di registrare cambiamento effettuato.

Per quanto riguarda le foto del cranio, è opportuno riprendere il soggetto in visione frontale, ventrale e laterale (destra e sinistra) e, per quanto riguarda il palco, in visione frontale e laterale (destra e sinistra).

Ogniqualevolta si fotografa un reperto è fondamentale inserire nella foto anche un sistema di riferimento che consenta di ricavare le dimensioni reali dell'oggetto fotografato (Fig. 4.5). Potrebbe, inoltre, essere utile scattare la foto con il numero identificativo dell'animale collocato accanto al reperto (Fig. 4.5A); in ogni caso il nome del file dovrebbe comprendere l'identificativo del campione, oltre alla specie, il sesso e la popolazione, indicati attraverso l'iniziale dei rispettivi nomi.



Figura 4.5 - A. I_1 (faccia linguale) fotografato su carta millimetrata, ciascun dente è contrassegnato dall'iniziale del nome della specie e del sesso (C: Cervo, D: Daino e F: femmina) e dal numero identificativo dell'individuo. B. Crani di maschi di Cervo fotografati in visione frontale su di una griglia di riferimento per la valutazione delle dimensioni del palco.

Dati

I "dati generali" derivano dalla Scheda di raccolta dati (Scheda 4.1).

I "dati di laboratorio" dovrebbero contenere almeno le seguenti informazioni:

- ▶ quando viene estratto il dente (prima o dopo la preparazione della mandibola),
- ▶ la modalità di preparazione della mandibola,
- ▶ il numero degli strati di cemento,
- ▶ il componente dell'ultimo strato di cemento deposto,
- ▶ il grado di leggibilità degli strati secondo una scala precedentemente definita,
- ▶ ogni altra possibile informazione che possa essere utile, a distanza di tempo, per valutare il protocollo adottato.

Nel caso in cui si applichi la tecnica che prevede la decalcificazione del dente, dovrebbero essere registrati su foglio elettronico anche:

- ▶ la sostanza utilizzata per decalcificare il dente e il suo volume,
- ▶ l'eventuale sostituzione di questa sostanza durante la decalcificazione,
- ▶ il tempo di decalcificazione,
- ▶ il momento in cui viene tagliata la corona di I_1 (prima, durante o dopo la decalcificazione),
- ▶ la sostanza utilizzata per la colorazione del dente,
- ▶ il tempo di colorazione,
- ▶ il numero di preparati realizzati per individuo con il numero di sezioni per preparato.

Nel caso in cui, invece, si applichi la tecnica che non prevede la decalcificazione del dente si dovrebbe registrare su foglio elettronico se e con quale sostanza la superficie di taglio è stata trattata per migliorare la leggibilità degli strati di cemento.

Il numero e il tipo di misure rilevabili su denti, corpo, cranio e palco dipendono ovviamente dagli obiettivi del monitoraggio (Mattioli e De Marinis 2009).

In conclusione la collezione di confronto è costituita da reperti e da un archivio elettronico contenente i dati e le foto, ma potrebbe essere costituita anche dal solo archivio elettronico, se per ragioni diverse non è possibile conservare i reperti. Bisogna, comunque, tener conto che in quest'ultimo caso lo studio delle sole foto non offre la medesima varietà di informazioni e dettagli che può offrire ad esempio l'esame di una mandibola o di un preparato istologico.

BIBLIOGRAFIA

- ASHBY K.R., HENRY B.A.M., 1979. *Age criteria and life expectancy of Roe deer (Capreolus capreolus) in coniferous forest in North-Eastern England*. Journal of Zoology, 189: 207-220.
- AZORIT C., HERVAS J., ANALLA M., CARRASCO R., MUÑOZ-COBO J., 2002a. *Histological thin-sections: a method for the microscopic study of teeth in Spanish Red deer (Cervus elaphus hispanicus)*. Anatomia Histologia Embryologia, 31: 224-227.
- AZORIT C., MUÑOZ-COBO J., ANALLA M., 2002b. *Abnormal teeth in the Spanish Red deer (Cervus elaphus hispanicus)*. Zeitschrift für Jagdwissenschaft, 48: 252-260.
- BERTOUILLE S.B., de CROMBRUGGHE S.A., 1995. *Body mass and lower jaw development of the female red deer as indices of habitat quality in the Ardennes*. Acta Theriologica, 40 (2): 145-162.
- BERTOUILLE S.B., de CROMBRUGGHE S.A., 1995. *Body mass and lower jaw development of the female red deer as indices of habitat quality in the Ardennes*. Acta Theriologica 40 (2): 145-162.
- DE MARINIS A.M., 2015a. *Valutazione dell'età nei Cervidi tramite esame della dentatura. Guida pratica all'identificazione delle classi di età del Cervo*. Manuali e Linee guida n. 90.2/2013, ISPRA.
- DE MARINIS A.M., 2013b. *Valutazione dell'età nei Cervidi tramite esame della dentatura. Guida pratica all'identificazione delle classi di età del Daino*. Manuali e Linee guida n. 90.3/2013, ISPRA.
- DE MARINIS A.M., TOSO S., 2015. *Valutazione dell'età nei Cervidi tramite esame della dentatura*. Manuali e Linee guida n. 90/2013, ISPRA.
- ERICKSON J.A., SELIGER W.G., 1969. *Efficient sectioning of incisors for estimating ages of mule deer*. Journal of Wildlife Management, 33 (2): 384-388.
- FANCY S.G., 1980. *Preparation of mammalian teeth for age determination by cementum layers: a review*. Wildlife Society Bulletin, 8 (3): 242-248.
- GILBERT F.F., 1966. *Aging White-Tailed Deer by Annuli in the Cementum of the First Incisor*. Journal of Wildlife Management, 30 (1): 200-202.
- GODAWA J., 1989. *Age determination in the Red Deer (Cervus elaphus)*. Acta Theriologica, 34: 381-384.
- GRUE H.E., JENSEN B., 1979. *Review of the formation of incremental lines in tooth cementum of terrestrial mammals*. Danish Review of Game Biology, 11: 3-47.
- HALL G.P., MURRAY P.J., BYRNE M.J., LISLE A.T., 2012. *Is tooth wear a reliable means of aging wild European fallow deer in Tasmania, Australia?* Wildlife Society Bulletin, 36: 124-129.
- HAMLIN K.L., PAC D.F., SIME C.A., DeSIMONE R.M., DUSEK G.L., 2000. *Evaluating the Accuracy of Ages Obtained by Two Methods for Montana Ungulates*. Journal of Wildlife Management, 64 (2): 441-449.
- HEWISON A.J.M., VINCENT J.P., BIDEAU E., 1996. *Variation in cohort mandible size as an index of roe deer (Capreolus capreolus) densities and population trends*. Journal of Zoology, 239: 573-581.
- HRABE V., KOUBEK P., 1987. *A comparison of some ageing methods in male roe deer (Capreolus capreolus)*. Folia Zoologica, 36 (1): 1-12.
- KEISS R.E., 1969. *Comparison of eruption-wear patterns and cementum annuli as age criteria in elk*. Journal of Wildlife Management, 33 (1): 175-180.
- KLEVEZAL G.A., 1996. *Recording structures of mammals. Determination of age and reconstruction of life history*. A. A. Balkema Publishers, Rotterdam.
- KOVACS G., FELEK Z., 1991. *Reliability of the cementum annuli count and the hunter's age determination in the roe deer*. XX I.U.G.B. Congress, Gödöllő, Ungheria.
- LEADER-WILLIAMS N., 1979. *Age-related changes in the testicular and antler cycles of reindeer, Rangifer tarandus*. Journal of Reproduction and Fertility, 57 (1): 117-126.
- LIEBERMAN D., MEADOW R.H., 1992. *The biology of cementum increments (an archaeological perspective)*. Mammal Review, 22: 57-77.
- LOCKARD G.R., 1972. *Further studies of dental annuli for aging of white-tailed deer*. Journal of Wildlife Management, 46 (1): 46-55.
- LOE L.E., MYSTERUD A., LANGVATN R., STENSETH N.C., 2003. *Decelerating and sex-dependent tooth wear in Norwegian red deer*. Oecologia, 135: 346-353.
- LOW W.A., COWAN I.McT., 1963. *Age determination of deer by annular structure of dental cementum*. Journal of Wildlife Management, 27 (3): 466-471.

-
- MARKOWSKI J., 1993. *Fluctuating asymmetry as an indicator for differentiation among roe deer Capreolus capreolus populations*. Acta Theriologica, 38 (2): 19-31.
- MATSON G., van DAELE L., GOODWIN E., AUMILLER L., REYNOLDS H., HRISTIENKO H., 1993. *A laboratory manual for cementum age determination of Alaska brown bear first premolar teeth*. Alaska Department of Fish and Game, Division of Wildlife Conservation, Anchorage and Matson's Laboratory, Milltown, Montana, USA.
- MATSON, G., 1981. *Workbook for cementum analysis*. Matson's Laboratory, Milltown, Montana.
- MATTIOLI S., DE MARINIS A.M., 2009. *Guida al rilevamento biometrico degli Ungulati*. Documenti Tecnici n. 28, ISPRA.
- Mc EWAN E.H., 1963. *Seasonal annuli in the cementum of the teeth of barren ground caribou*. Canadian Journal of Zoology, 41 (1): 111-113.
- MILLER F.L., 1974. *Age determination of caribou by annulations in dental cementum*. Journal of Wildlife Management, 38 (1): 47-53.
- MITCHELL B., 1967. *Growth layers in dental cement for determining the age of red deer (Cervus elaphus L.)*. Journal of Animal Ecology, 36 (2): 279-293.
- MORRIS P., 1972. *A review of mammalian age determination methods*. Mammal Review, 2(3): 69-104.
- NUGENT G., FRAMPTON C., 1994. *Microgeographic and temporal variation in mandible size within a New Zealand fallow deer (Dama dama) population*. Journal of Applied Ecology, 31: 253-262.
- QUÉRÉ J.P., PASCAL M., 1983. *Comparaison de plusieurs méthodes de détermination de l'âge individuel chez le Cerf élaphe (Cervus elaphus L.)*. Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, Paris, 13 (5): 235-252.
- RAVIKUMAR S., SUREKHA R., THAVARAJAH R., 2014. *Mounting media: An overview*. Journal of Dr. NTR University of Health Sciences, 3, Supplement 1: S1-8.
- REIMERS E., NORDBY Ø., 1968. *Relationships between age and tooth cementum layers in Norwegian reindeer*. Journal of Wildlife Management, 32 (4): 957-961.
- RICE L.A., 1980. *Influences of Irregular Dental Cementum Layers on Aging Deer Incisors*. Journal of Wildlife Management, 44 (1): 266-268.
- ROLANDSEN C.M., SOLBERG E.J., HEIM M., HOLMSTRØM F., SOLEM M.I., SÆTHER B.E., 2008. *Accuracy and repeatability of moose (Alces alces) age as estimated from dental cement layers*. European Journal of Wildlife Research, 54 (1): 6-14.
- SERRANO E., ANGIBAULT J.M., CARGNELUTTI B., HEWISON A.J.M., 2008. *Density dependence of developmental instability in a dimorphic ungulate*. Biology Letters, 4 (5): 512-514.
- SZABIK E., 1973. *Age estimation of roe-deer from different hunting-grounds of South-eastern Poland*. Acta Theriologica, 18: 223-236.
- THOMAS D.C., 1977. *Metachromatic staining of dental cementum for mammalian age determination*. Journal of Wildlife Management, 41 (2): 207-210.
- TUMLISON R., MCDANIEL R.V., 1983. *A reliable celloidin technique for dental cementum analysis*. Journal of Wildlife Management, 47 (1): 274-278.
- WHITE G., 1974. *Age determination of roe deer (Capreolus capreolus) from annual growth layers in the dental cementum*. Journal of Zoology, 174: 511-516.

