



POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES

Celia Diez-Canseco Esteban

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

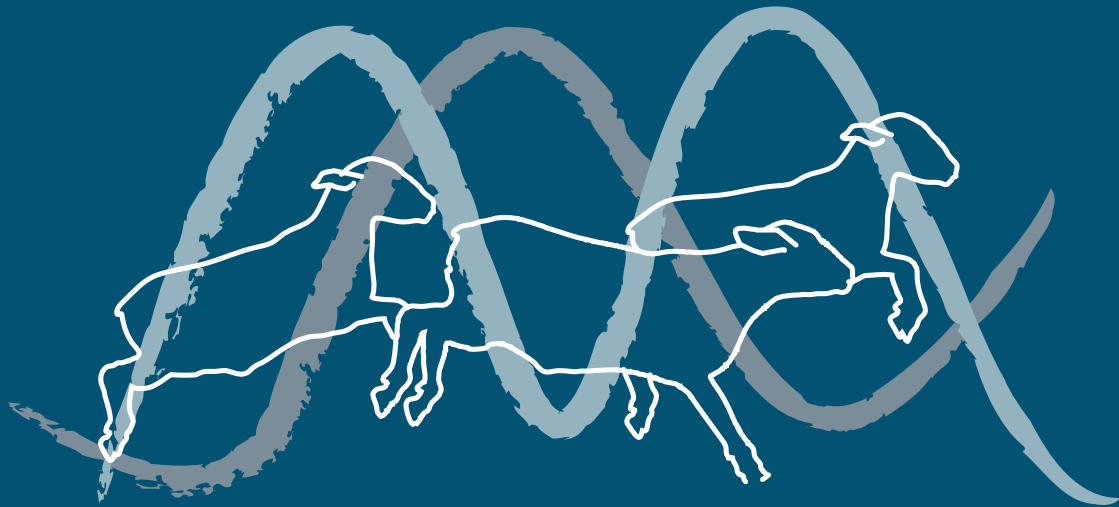


UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Possibilities of sequential isotope analyses of dentine for the study of life conditions of past animal populations

New approaches to obtain intra-tooth isotopic data from collagen (stable carbon and nitrogen isotopes) in hypsondont species

Celia Díez-Canseco



TESI DOCTORAL - TESIS DOCTORAL - DOCTORAL THESIS

2024

Celia Díez-Canseco Esteban

Possibilities of sequential isotope analyses of dentine for the study of life conditions of past animal populations:

New approaches to obtain intra-tooth isotopic data from collagen (stable carbon and nitrogen isotopes) in hypsondont species

Doctoral Thesis

Supervisors:

Dr Carlos Tornero

Dr Eudald Carbonell

Universitat Rovira i Virgili, Departament d'Història i Història de l'Art

Tarragona

2024



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**



IPHES^R

**Institut Català de Paleoecologia
Humana i Evolució Social**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "*Possibilities of sequential isotope analyses of dentine for the study of life conditions of past animal populations: New approaches to obtain intra-tooth isotopic data from collagen (stable carbon and nitrogen isotopes) in hypsondont species*" que presenta Celia Díez-Canseco per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament d'Història i Història de l'Art d'aquesta universitat.

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado "*Possibilities of sequential isotope analyses of dentine for the study of life conditions of past animal populations: New approaches to obtain intra-tooth isotopic data from collagen (stable carbon and nitrogen isotopes) in hypsondont species*" que presenta Celia Díez-Canseco para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Historia e Historia del Arte de esta universidad.

I STATE that the present study, entitled "*Possibilities of sequential isotope analyses of dentine for the study of life conditions of past animal populations: New approaches to obtain intra-tooth isotopic data from collagen (stable carbon and nitrogen isotopes) in hypsondont species*" for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Department of History and History of Art of this university.

Tarragona, 27/02/2024

El/s director/s de la tesi doctoral
El/los director/es de la tesis doctoral
Doctoral Thesis Supervisor/s

Dr Eudald Carbonell

Dr Carlos Tornero

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

Abstract

Intra-tooth or sequential stable isotope analyses are nowadays widely implemented in current zooarchaeological and paleontological studies. They are useful approaches for reconstructing paleoclimatic conditions, and to study animals' diet, mobility, or reproductive patterns at seasonal level. Since dental tissues do not remodel once formed, intra-tooth isotope analyses allow the reconstruction of animal's life conditions covering the whole dental growth period. In zooarchaeology, these analyses are commonly performed in hypsodont teeth of terrestrial macromammal species. They exhibit elongated molar crowns (high-crowned teeth) which develop in a short lapse of time, so they allow to obtain high temporal resolution, commonly seasonal. Moreover, hypsodonty is present in a wide range of herbivorous-grazing species, most of them involved in human subsistence or domestication processes.

Intra-tooth isotopic analyses have been mainly restricted to the mineral fraction of the enamel, while a wider implementation in dentine collagen has been generally eluded, despite conforming an essential organic compound for paleodietary studies. The isotopic composition of collagen represents specific life and dietary conditions that are not traceable through mineral compounds. However, intra-tooth isotope analyses of dentine have been scarcely developed during past decades in zooarchaeological studies. This is partially due to the complexities of performing a sampling strategy suitable for dentine's growth geometries, but also due to the shortage of methodological research focused in the development of this method.

This PhD thesis aims to contribute to the methodological development of sequential isotopic analyses of dentine, and to provide a referential corpus of data to promote its application in zooarchaeological studies. In particular, the thesis aims to address specific technical and methodological limitations faced when implementing this technique in high-crowned molars, and especially when oriented toward isotopic analysis of the organic fraction of dentine (i.e. collagen). These limitations are essentially related to the low temporal and isotopic resolution obtained with the currently available sampling strategies for these dentitions, which complicates the interpretation of isotopic results.

In this thesis, previous and new protocols of intra-tooth isotopic analysis of dentine-collagen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) are performed in modern sheep specimens coming from experimental programs specifically designed for isotopic research. Essential life information of these specimens (e.g. birth date and age at death) and their specific diet conditions (e.g. fodder's isotopic composition and diet schedule) are known and controlled. This is the first study implementing intra-tooth isotopic analyses of dentine in experimental sheep raised under controlled life and diet conditions.

We present a new sequential sampling strategy of dentine that enables performing stable carbon and nitrogen isotope analysis of collagen samples and which better fits molar growth in hypsodont species. This proposal highly reduces the isotopic attenuation caused by dentine admixture in comparison with previous sampling strategies, and yields similar isotopic resolution as enamel

sequential analyses. The method is especially useful when comparing data between individuals of different ages at death time. Moreover, the isotopic variation is represented more according to growth timings, providing data more susceptible to be accurately interpreted. The suitability of this protocol to identify an artificial weaning in sheep is also tested. Results show that the method offers enough resolution to track past weaning practices in medium-size dairy species as sheep.

The implementation of this method in zooarchaeological assemblages would enable exploring a new scope of possibilities for studying life conditions linked to environment, diet, mobility, or reproduction, in past animal populations. Tracking the isotopic variation of collagen through animals' life, offers new prospects for these studies, especially in the case of nitrogen isotopes which have been barely explored through sequential analyses. In particular, the implementation of the new protocol would allow exploring weaning management in past domestic caprines, and their role in past dairying systems.

Resumen

Los análisis intra-dentales o secuenciales de isótopos estables se integran actualmente de forma habitual en estudios arqueozoológicos y paleontológicos. Se trata de una aproximación muy útil para la reconstrucción de patrones de alimentación, movilidad o reproducción de los animales a una escala estacional. Estos análisis se realizan a partir de un muestreo secuencial siguiendo la dirección de crecimiento de los tejidos dentales, y permiten reconstruir las condiciones de vida de los animales a lo largo de todo el período de desarrollo del diente. En arqueozoología, son comúnmente implementados en especies de macromamíferos terrestres con denticiones hipsodontas, donde los molares, por su morfología alargada y su rápido desarrollo, permiten obtener una alta resolución temporal al aplicar análisis intra-dentales, a menudo una resolución estacional. Un amplio rango de especies herbívoras pacesadoras presentan hipsodoncia, muchas involucradas en la subsistencia humana o en los procesos de domesticación animal.

Los análisis isotópicos intra-dentales han estado principalmente limitados a la fracción mineral del esmalte, mientras que su implementación en el colágeno de la dentina ha sido generalmente eludida, a pesar de ser una proteína ampliamente utilizada en la reconstrucción de paleodietas. La composición isotópica del colágeno, representa condiciones específicas de la vida y alimentación de los individuos que son inaccesibles a partir de los compuestos minerales. Sin embargo, la integración de análisis secuenciales de dentina-colágeno en arqueozoología ha sido poco explorada a lo largo de las últimas décadas. Esto es en parte resultado de la complejidad que conlleva desarrollar una estrategia de muestreo adecuada para la dentina, pero también de la escasez de trabajos metodológicos que han estado orientados al desarrollo de este método.

Esta tesis doctoral tiene como objetivo contribuir al desarrollo metodológico de los análisis isotópicos secuenciales en dentina, de cara a proporcionar un conjunto de datos de referencia que promuevan su integración en estudios arqueozoológicos. En particular, la tesis tiene el objetivo de abordar las limitaciones técnicas y metodológicas específicas a las que se enfrenta la implementación de esta técnica en denticiones hipsodontas, y especialmente cuando se orienta al análisis isotópico de la fracción orgánica de la dentina (i.e. colágeno). Estas limitaciones están esencialmente relacionadas con la baja resolución temporal e isotópica obtenida con el protocolo de muestreo actualmente disponible para estas denticiones, la cual complica la interpretación de los resultados isotópicos.

A lo largo de esta tesis, se implementan análisis isotópicos intra-dentales de dentina-colágeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$), y se evalúan distintas estrategias de muestreo, en especímenes de ovejas modernas procedentes de programas experimentales específicamente diseñados para investigar el registro de la señal isotópica en los tejidos orgánicos. En estos programas, se controla información esencial vinculada a las condiciones de vida de estos especímenes (e.g. la fecha de nacimiento y edad en el momento de muerte), y a sus condiciones de alimentación (e.g. tipo de alimentación y composición isotópica de la misma). Este es el primer estudio donde se aplican análisis isotópicos

intra-dentales de dentina en ovejas experimentales criadas bajo condiciones de vida y de alimentación controladas.

Presentamos una nueva estrategia de muestreo secuencial de dentina que permite realizar análisis isotópicos de carbono y nitrógeno sobre muestras de colágeno y que se adapta mejor a la dirección de crecimiento de los molares en especies hipsodontas. Esta propuesta reduce la atenuación isotópica causada por la mezcla de dentina en comparación con las estrategias de muestreo disponibles hasta el momento, y produce una resolución isotópica similar a la obtenida en los análisis secuenciales de esmalte convencionales. El nuevo protocolo es especialmente útil cuando se comparan datos entre individuos con diferente edad en el momento de muerte. Además, la variación isotópica se representa más acorde a los tiempos de crecimiento del diente, proporcionando datos más susceptibles de ser correctamente interpretados. También se evalúa la validez del método para identificar prácticas de destete artificial en ovejas domésticas. Los resultados muestran que el método ofrece suficiente resolución para estudiar el proceso de lactancia y destete en especies lecheras de mediano tamaño como las ovejas.

La integración de este método en arqueozoología permitiría explorar un nuevo abanico de posibilidades para estudiar condiciones de vida vinculadas al medioambiente, la alimentación, movilidad, o reproducción, de poblaciones animales del pasado. Estudiar la variación isotópica del colágeno a lo largo del período de vida de los animales abre nuevas vías de estudio, especialmente en lo que refiere al estudio de la señal isotópica del nitrógeno, apenas explorada a partir de análisis intra-dentales. De forma particular, la aplicación del nuevo protocolo en conjuntos arqueozoológicos permitiría investigar, a partir del estudio del proceso de lactancia y destete, la explotación de caprinos domésticos vinculada a la producción láctea en sistemas ganaderos del pasado.

Agradecimientos

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el marco del programa de ayudas a la investigación de la Fundación Atapuerca. El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias al apoyo del Dr. Eudald Carbonell, y de su interés depositado en esta investigación. Agradezco enormemente a Eudald haberme ofrecido la posibilidad de desarrollarla.

La realización de esta tesis ha sido posible también gracias al apoyo de los siguientes proyectos de investigación: el proyecto *Eco-Social behaviour of the Sierra de Atapuerca hominins during the Quaternary VI* (PID2021-122355NB-C3), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación; y el proyecto *Arrels prehistòriques de la transhumància a l'Alt Ripollès: Projecte Arqueològic 2022-2025* (CLT009/22/00042), financiado por el Departament de Cultura de la Generalitat de Catalunya. En añadidura, el trabajo realizado en esta tesis se enmarca en el grupo de investigación *Group of Analyses on Socio-ecological Processes, Cultural Changes and Population dynamics during Prehistory* (2021-SGR-01237), financiado por el Departament de Cultura de la Generalitat de Catalunya. Quisiera agradecer a la Dra. Marina Mosquera, el Dr. Carlos Tornero y la Dra. Ethel Allué su disponibilidad y tiempo dedicado en hacerlo posible.

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias a la colaboración con diversos centros e instituciones de investigación públicos donde se ha desarrollado toda la actividad científica y técnica. Especialmente quisiera agradecer a todo el personal técnico involucrado, con mención especial de la Dra. Isabel Expósito (IPHES), la Dra. Nùria Moraleda y el Dr. Pau Comes (ICTA-UAB), y la Dr. Maria J. Hueso (ICIQ), por su dedicación y supervisión técnica. Mención especial merecen también el Dr. Ramon Costa, director técnico, y el Dr. José Luis de la Torre, asesor en bienestar animal, del Servei de Granges de la Universitat Autònoma de Barcelona, por su disponibilidad y por su supervisión profesional en todo lo relativo al programa de experimentación animal.

El proceso de investigación que nutre esta tesis doctoral surge de la constante formación, supervisión científica y apoyo del Dr. Carlos Tornero. No hubiera sido posible sin su bagaje científico, ni sin sus aportaciones al tema de investigación abordado, ni sin todo el tiempo –y paciencia– dedicados a apoyar el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer también toda la formación científica recibida por dos investigadores relacionados directamente con el desarrollo de esta tesis, el Dr. Lionel Gourichon y la Dr. Mònica Aguilera. También a aquellos investigadores del entorno académico que asimismo han supuesto una enorme formación científica colateral, en especial al Dr. Florent Rivals, y las sesiones organizadas bajo el grupo *ABiLis*. Agradezco también a Chiara Messana su firme (y obstinado) compañerismo, porque éste ha influido directamente en los logros de esta tesis.

Agradezco a los miembros del tribunal, la Dra. Maria Saña, la Dra. Teresa Fernández-Crespo, y el Dr. Florent Rivals, por acceder a evaluar la presente tesis doctoral.

Por último, quiero agradecer a todos los compañeros y amigos *iphesinos* que me han acompañado todos estos años, y que han hecho de esta fase una etapa que recordaré con mucho cariño y enorme nostalgia. Gracias a Carlos, a mi familia y amigos, por todo su apoyo y cariño.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

Índice

Listado de abreviaturas.....	14
Presentación y estructura de la tesis	16
CAPÍTULO I. Introducción al análisis secuencial de isótopos estables en dentina:	
Precedentes, principios, y estado de la cuestión.....	20
1. Los análisis intra-dentales de isótopos estables y su integración en arqueozoología.....	21
1.1. Principales líneas de estudio desarrolladas en arqueozoología.....	22
1.2. Tamaño del diente y resolución temporal: hipsodoncia y molares de coronas altas.....	23
2. Los análisis secuenciales de dentina: principales estudios e integración en arqueozoología	26
2.1. Estudios pioneros y aplicaciones en ecología.....	26
2.2. Primeras aplicaciones en arqueozoología: el estudio del momento de destete en vacas domésticas.....	27
2.3. El estudio del momento de destete en ovejas y cabras domésticas.....	30
2.4. Gestión de la alimentación de animales domésticos: posibilidades más allá del salto trófico.....	30
2.5. Estacionalidad y reconstrucción paleoambiental	31
2.6. La integración de DSA en arqueozoología: comentarios finales.....	32
3. Desafíos del DSA: el muestreo en coronas altas y la aplicación de protocolos de purificación del colágeno	34
3.1. Posibilidades biogeoquímicas de los tejidos dentales: el caso de la dentina	34
3.2. Desarrollo de la dentina y geometría de crecimiento en coronas altas.....	37
3.3. Protocolos de muestreo de dentina para análisis de colágeno en aplicaciones arqueológicas.....	39
3.4. Comentarios finales: la adaptación del muestreo a coronas altas.....	43
CAPÍTULO II. Proyecto de tesis y objetivos	44
CAPÍTULO III. Materiales y métodos.....	48
1. El programa experimental SUMA II	49
1.1. El rebaño de <i>Ovis aries</i> estudiado en SUMA II.....	50
1.2. Primera etapa: lactancia, destete y primera alimentación post-destete	52
1.3. Segunda etapa: alternancia de dietas monoespecíficas y muestreo de forrajes	52
1.4. Composición isotópica de los forrajes (segunda etapa).....	54
1.5. Estadio de formación de la dentición esperada en los especímenes.....	56

2. Elementos dentales seleccionados.....	59
2.1. Procesado de mandíbulas y estadio de desarrollo dental	59
2.2. Materiales seleccionados	60
3. Muestreo, análisis secuencial y tratamiento de los datos	62
3.1. Muestreo secuencial de esmalte y pretratamiento de muestras	62
3.2. Muestreo secuencial de dentina a partir de secciones: muestreo <i>slice</i>	63
3.3. Muestreo secuencial de dentina a partir de surcos: muestreo <i>drill</i>	64
3.4. Análisis isotópicos y formulación de los datos	66
3.5. Métodos estadísticos.....	66
3.6. Cálculo de la composición promedio de la DIETA3 (contribución de proteína de los dos componentes)	67
CAPÍTULO IV. Resultados	70
1. Intra-tooth isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth: a new experimental study with modern sheep specimens	72
1.1 Introduction	72
1.2. Materials and Methods	72
1.3. Results	74
1.4. Discussion.....	77
1.5. Conclusions.....	81
2. New methods for old challenges: a sampling protocol for sequential stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth.....	82
2.1. Introduction	82
2.2. Materials & Methods	82
2.3 Results	84
2.4. Discussion.....	86
2.5. Conclusions.....	91
3. Weaning time in domestic caprines through carbon and nitrogen isotopes: testing dentine sequential analyses in modern sheep specimens	92
3.1. Introduction	92
3.2. Materials & Methods	92
3.3. Results from dentine sequential stable isotope analysis	94
3.4. Discussion.....	96
3.5. Conclusions.....	100
CAPÍTULO V. Discusión	102

1. Principios básicos del DSA en coronas altas: efectos del muestreo en los resultados isotópicos.....	103
1.1. Muestreo de distintos momentos formativos: atenuación del rango de variación isotópica	103
1.2. Muestreo longitudinal: representación avanzada de los cambios isotópicos.....	105
1.3. Tasa de crecimiento dental y resolución diferencial a lo largo de la corona	107
1.4. Desarrollo de la dentina en grosor durante el crecimiento del diente.....	108
2. Lectura e interpretación temporal de las secuencias de DSA	109
2.1. Posición de los cambios isotópicos en las coronas y su representación en las secuencias (muestreo <i>drill</i>).....	109
2.2. Cambios isotópicos en las secuencias: cambio abrupto vs cambio gradual	111
2.3. Limitaciones en DSA: variabilidad intra-específica en el tamaño del diente y en los tiempos de desarrollo dental.....	112
3. Posibilidades del DSA en el estudio de la gestión de caprinos domésticos en arqueozoología	116
3.1. La aplicación del DSA en el estudio del proceso de destete.....	116
3.2. Otras posibilidades del DSA	118
Conclusiones y perspectivas de futuro	122
Conclusiones	123
Perspectivas de futuro	127
Referencias bibliográficas	130
ANEXOS	160
Anexo I. Composición isotópica de las muestras de forrajes de SUMAll	161
Anexo II. Desarrollo dental de los molares mandibulares en los individuos seleccionados.....	163
Anexo III. Resultados isotópicos de los valores de los estándares para todas las sesiones analíticas.....	165
Anexo IV. Resultados de los análisis isotópicos de las muestras de dentina obtenidas por el método de muestreo por secciones (<i>slice</i>) en los M2 y M3 izquierdos (Capítulo IV –1)	170
Anexo V. Resultados de los análisis isotópicos de las muestras de esmalte y de dentina-colágeno (método <i>drill</i>) en los M2 derechos (Capítulo IV – 2)	172
Anexo VI. Resultados de los análisis isotópicos de las muestras de dentina de los M1 (método <i>drill</i>) (Capítulo IV – 3).....	179
Anexo VII. Publicaciones	182

Listado de abreviaturas

CP. *Crude protein*, contenido de proteína bruta

DM. *Dry matter*

DMI. *Dry matter intake*

DSA. Análisis secuencial de dentina, por sus siglas en inglés: *dentine sequential analysis*

ESA. Análisis secuencial de esmalte, por sus siglas en inglés: *enamel sequential analysis*

ERJ. Línea de unión entre el esmalte y la raíz situada en la zona cervical del diente, por sus siglas en inglés: *enamel root junction*

EDJ. Zona de unión entre el esmalte y la dentina, por sus siglas en inglés: *enamel- dentine junction*

M. Abreviatura estándar de la concentración molar o molaridad (medida de concentración de un soluto en una solución)

M₁, M₂, M₃. Primer, segundo y tercer molar mandibular, respectivamente.

DS. Muestreo por surcos, por sus siglas en inglés: *drill sampling*

SS. Muestreo por secciones, por sus siglas en inglés: *slice sampling*

Min. Valores mínimos

Max. Valores máximos

SD. *Standard deviation*

Formulación:

C:N. Ratio atómico de carbono/nitrógeno

%C. Contenido de carbono en la muestra, en base a la proporción de su peso total.

%N. Contenido de nitrógeno en la muestra, en base a la proporción de su peso total.

$\Delta^{13}\text{C}_{a-b}$. Diferencia en la composición isotópica de carbono entre dos componentes (componente a-componente b), generalmente indicado para hablar del enriquecimiento o empobrecimiento en el ciclo isotópico.

$\Delta^{15}\text{N}_{a-b}$. Íbidem, respecto a la composición isotópica del nitrógeno.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

Presentación y estructura de la tesis

A lo largo de las últimas décadas, los análisis biomoleculares han mostrado una amplia capacidad para investigar y resolver problemáticas históricas y arqueológicas, pues permiten el estudio de aspectos muy concretos que son inalcanzables a partir de aproximaciones tradicionales. ADN, proteínas, lípidos, almidones, pueden preservarse en un amplio espectro de materiales arqueológicos, desde los propios elementos esqueléticos u otros restos orgánicos momificados, hasta los preservados en artefactos, suelos y sedimentos. El análisis de isótopos estables, conforma una de las líneas analíticas desarrolladas con mayor profusión dentro de la arqueología biomolecular. A casi cincuenta años de su primera aplicación en la reconstrucción de paleodietas humanas en un conjunto arqueológico (Vogel & Van der Merwe, 1977), los análisis de isótopos estables se han convertido hoy en día una analítica básica incluida en la mayoría de estudios multidisciplinares que se diseñan en arqueología, con el objetivo de contribuir a reconstruir patrones de alimentación, comportamientos u otras condiciones de vida de animales y humanos.

Desde los inicios de la aplicación de análisis de isótopos estables en ecología, paleontología o arqueología, se reconoce el potencial de los tejidos metabólicamente inertes para poder ser muestreados secuencialmente y ofrecer series temporales de información isotópica. A partir de los años '90 los análisis secuenciales en tejidos dentales pusieron en evidencia el gran potencial de estos análisis en la reconstrucción de hábitos alimenticios, patrones de migración, o paleoclima, especialmente a partir de macromamíferos con denticiones hipsodontas, donde los molares presentan coronas alargadas y su morfología facilita implementar muestreos en serie (molares de coronas altas). Los análisis secuenciales se desarrollaron principalmente a partir del análisis del esmalte, un tejido muy duro y resistente a la diagénesis. Los trabajos pioneros de M. Balasse y colegas (2001, 2002) sobre vacas domésticas, abrieron la puerta a la aplicación de estos análisis también en la dentina. Sin embargo, al contrario de las numerosas aplicaciones de análisis secuenciales de esmalte que se han realizado en arqueozoología a lo largo de las últimas décadas, los trabajos con secuenciales de dentina no han tenido a penas continuidad. Las aplicaciones en arqueozoología han estado reducidas a estudios puntuales.

Esta escasez de estudios es sorprendente, puesto que la dentina, por su importante composición de matriz orgánica, permite acceder al análisis del colágeno a una escala intra-individual, un análisis inaccesible a partir del esmalte donde el componente orgánico es mínimo. El colágeno es una proteína que se preserva con facilidad en los restos óseos y dentales arqueológicos, y es la fracción bioquímica mayoritariamente empleada en las reconstrucciones de paleodieta a partir de análisis de isótopos estables. Los análisis isotópicos realizados sobre el colágeno, principalmente carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) y azufre ($\delta^{34}\text{S}$), permiten el estudio de la alimentación vinculada a la parte proteica de la dieta, incluyendo las proteínas procedentes de plantas y animales, terrestres o acuáticas. El enriquecimiento de ^{15}N en cada peldaño de la cadena trófica, por su parte, permite, entre otras cosas, representar la posición de los individuos analizados en esa escala a partir de la composición de $\delta^{15}\text{N}$ de sus tejidos. Estos análisis se han visto generalmente limitados al estudio del colágeno óseo. El análisis secuencial de dentina, por su rica composición en colágeno, permite acceder a esa señal isotópica con una alta resolución temporal, una información inalcanzable a partir del hueso, considerando sus tasas de remodelación.

Sin embargo, la implementación de esta técnica analítica sobre restos de fauna, está limitada por la escasez de estudios metodológicos y experimentales que apoyen su posterior implementación en el registro arqueológico, y que aseguren una correcta interpretación de los datos. Por esta razón, y a diferencia del importante desarrollo que han tenido los análisis secuenciales de dentina sobre restos humanos arqueológicos, el desarrollo de estos análisis en aplicaciones arqueozoológicas se encuentra en un *impasse*. El desarrollo metodológico es por ello esencial, y además necesario por la complejidad que conlleva implementar un muestreo en la dentina, incluso a partir de denticiones hipsodontas, a priori, más fáciles de abordar. La histología particular de la dentina implica una serie de complicaciones a la hora de realizar un muestreo fiel a su dirección de crecimiento, pues su geometría de desarrollo complica aislar los diferentes episodios de crecimiento del diente. Aislar muestras de tejidos formados en distintos momentos de la vida del animal es el factor esencial del análisis secuencial de isótopos estables, pues en ello se basa su alta resolución temporal.

El desarrollo de esta tesis doctoral busca responder a esta necesidad metodológica. Se desarrolla en continuación al trabajo de Final de Máster presentado en 2020 con el título "*Revisión, estudio experimental y propuesta de integración del análisis secuencial de dentina ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) en el estudio de las estrategias de gestión y explotación ovina en arqueología*". El proyecto de tesis pretende contribuir a la necesidad de continuar con una línea de trabajo metodológica y experimental respecto a la aplicación de estos análisis sobre restos de fauna, concretamente a partir de molares de coronas altas, por las posibilidades que este tipo de denticiones ofrecen en arqueozoología. De forma concreta, la tesis nace con el objetivo contribuir a la resolución de las principales limitaciones que enfrentan los análisis secuenciales de dentina en este tipo de denticiones, de forma que permita impulsar una futura aplicación, sistemática, de estos análisis en arqueozoología.

Estructura de la tesis

La presente tesis doctoral se estructura en cinco capítulos principales.

En el Capítulo I se presenta una introducción a los análisis secuenciales de isótopos estables y su integración en arqueozoología, a partir de una breve revisión de las principales líneas de estudio

desarrolladas a partir de estos análisis. Se presentan los conceptos básicos relacionados con la línea de investigación de la tesis, y se ofrece una revisión de los principales estudios que han desarrollado análisis secuenciales de dentina sobre restos de fauna. Se presenta el estado de la cuestión actual en relación a su escasa implementación en arqueozoología, atendiendo a las complicaciones técnicas que enfrenta su aplicación.

En el Capítulo II se presenta el proyecto de tesis doctoral, y se definen los objetivos que se abordan y sobre los que se ha diseñado la investigación.

A lo largo del Capítulo III se presenta el programa experimental con rebaños ovinos modernos sobre el que se apoyan los distintos estudios desarrollados en la tesis. Se definen aspectos clave del programa experimental, como las variables controladas y la información relativa a los especímenes seleccionados para la investigación. A continuación, se describen en detalle los materiales seleccionados y la metodología empleada.

El Capítulo IV compone el cuerpo central de la investigación. En él se presentan los resultados de los tres estudios principales desarrollados, acompañados en cada caso de una discusión específica donde se interpretan los resultados en relación a sus objetivos concretos:

- 1. La aplicación del protocolo actualmente disponible de muestreo y análisis secuencial de dentina ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ colágeno) en el referencial ovino criado de forma experimental, donde se evalúa la resolución del muestreo, y se definen los efectos que tiene el mismo sobre los resultados isotópicos.
- 2. Desarrollo de un nuevo método alternativo de muestreo y análisis ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ colágeno) adaptado a la morfología de molares de coronas altas, que ofrece una mayor resolución temporal e isotópica. Se aplica sobre el conjunto referencial ovino para evaluar su efectividad, y se compara con los resultados del método de muestreo convencional.
- 3. Aplicación del nuevo método de análisis secuencial de dentina en el estudio del proceso de destete en ovinos domésticos. Se evalúa la validez del método para identificar la manipulación artificial de este proceso a partir de la señal isotópica del carbono ($\delta^{13}\text{C}$) y del nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) del colágeno.

Los resultados de estos estudios han sido ya parcialmente publicados (Anexo VII).

El Capítulo V compila una discusión general en torno a los principales resultados de los diferentes estudios realizados, que busca evaluar la significancia, posibilidades y limitaciones de los distintos métodos implementados a lo largo de la investigación respecto al estado actual de conocimiento. Por último, se realiza una síntesis de las principales conclusiones a las que ha llevado este proyecto de investigación, y se propone una serie de propuestas de futuro que permitirían la continuación de esta línea de investigación, algunas de las cuales, forman ya el devenir más inmediato de la continuación de esta tesis doctoral.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

CAPÍTULO I

Introducción al análisis secuencial de isótopos estables en dentina

Precedentes, principios, y estado de la cuestión

1

Los análisis intra-dentales de isótopos estables y su integración en arqueozoología

A finales de los años 70, los análisis de isótopos estables se revelaron como una herramienta de enorme potencial en la reconstrucción de paleodietas humanas y animales. Las primeras aplicaciones de Vogel y Van der Merwe (1977, 1978) sobre la introducción de los cultivos de maíz en Norteamérica, junto con los trabajos de De Niro y Epstein 1978, 1981, basados en alimentación experimental animal, sentaron las bases en el uso de estos análisis en la reconstrucción de dietas a partir de tejidos orgánicos animales. Las composiciones isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de las principales fracciones bioquímicas de los tejidos animales reflejaban directamente la composición isotópica de la dieta de los individuos analizados, revelándose como un “*fingerprint*” de los distintos grupos de alimentos consumidos en vida. Por razones de preservación y disponibilidad en el registro arqueológico, los elementos esqueléticos han sido los principales elementos analizados. Por su parte, la buena preservación del colágeno en los restos óseos arqueológicos (Collins et al., 2002), hizo del colágeno la principal fracción bioquímica utilizada en las aplicaciones de isótopos estables para la reconstrucción de paleodietas.

El análisis isotópico de elementos óseos, implementados mayoritariamente sobre su fracción orgánica (colágeno), representan una señal isotópica promedio de varios años de vida del individuo, que puede incluir períodos de más de 10 años (Hedges et al., 2007). La resolución temporal de estos análisis depende directamente de las tasas de remodelación del hueso, que pueden variar entre especies, en función de la edad, el tipo de hueso o el sexo del individuo (Geyh, 2001; Hedges et al., 2007; Matsubayashi & Tayasu, 2019). Por el contrario, los principales tejidos dentales, dentina y esmalte, se desarrollan de forma incremental (Dean, 2017; Dean et al., 2001), y una vez mineralizados, no se regeneran (Bada et al., 1990; Carlson, 1991; Nanci, 2013). Como resultado, los dientes registran la composición isotópica del agua y alimentación ingeridas a lo largo de todo su período de formación. Los análisis de isótopos estables realizados sobre esmalte y dentina, ofrecen la posibilidad de representar características medioambientales, paleoclimáticas, o de la dieta, en ventanas muy concretas del período de vida de los individuos.

Esta característica de los tejidos dentales ha sido utilizada para reconstruir la variación de la composición isotópica a escala intra-individual, a partir del muestreo y análisis de distintos dientes en una misma serie dental (Balasse et al., 1999; Bocherens et al., 1994, 1995, 1997; Drucker et al., 2001, 2012). Por su parte, cuando el tamaño de la pieza dental lo permite, realizar muestreos en serie en un mismo diente y acordes a su dirección y proceso de formación, permite obtener secuencias de variación isotópica representativas de todo el periodo de desarrollo dental. Se

conocen como muestreo o análisis secuencial (*sequential sampling*, Balasse, 2002), intra-dental (*intra-tooth analyses*, Balasse 2003b), o en serie (*serial sampling*, Makarewicz & Sealy 2015).

1.1. Principales líneas de estudio desarrolladas en arqueozoología

Los análisis intra-dentales de isótopos estables han sido ampliamente utilizados en especies de fauna para reconstruir cambios en los hábitos alimenticios, patrones de movilidad, o condiciones paleoclimáticas desde finales de los años '90 (Balasse et al., 2002; Fricke et al., 1998; Fricke & O'Neil, 1996; Kohn et al., 1998; Sharp & Cerling, 1998; Zazzo et al., 2002).

Principalmente a lo largo de las últimas décadas, la aplicación de análisis intra-dentales ha seguido una tendencia en aumento, especialmente a partir de especies comunes en el registro arqueozoológico europeo. La mayoría de aplicaciones se han realizado a partir de bovinos (e.g. Balasse et al., 2012a; Evans et al., 2007; Towers et al., 2014, 2017; Viner et al., 2010) y caprinos (e.g. Balasse et al., 2002b, 2003; Blaise & Balasse, 2011; Tornero et al., 2013, 2016b, 2016a), pero también a partir de especies de équidos (e.g. Britton et al., 2019; Julien et al., 2015), cerdos (Frémondeau et al., 2012), renos (Britton et al., 2011; Price et al., 2017), gacelas (Tornero et al., 2017) o ciervos (Stevens et al., 2011). La aplicación arqueológica de estos análisis ha venido acompañada de un extenso corpus de trabajos metodológicos que cubre varios aspectos fundamentales: se evalúa la validez de la medición de diferentes ratios isotópicos en los tejidos dentales como indicadores de características ambientales, climáticas o de alimentación (e.g. Bryant et al., 1996b, 1996a; Fricke & O'Neil, 1996; Sharp & Cerling, 1998; Stevens et al., 2011); se definen los protocolos de muestreo y la resolución de los mismos (e.g. Balasse, 2002, 2003b; Passey & Cerling, 2002; Zazzo et al., 2005, 2006, 2010); se desarrollan modelos de predicción (e.g. Balasse et al., 2012b; Bendrey et al., 2015; Passey et al., 2005); o se generan datos de referencia a partir de poblaciones modernas que sirvan como "guía" para la aplicación arqueológica en determinados casos de estudio (e.g. Balasse et al., 2012b, 2024; Blaise & Balasse, 2011; Tornero et al., 2018).

Los análisis isotópicos secuenciales han permitido abordar resoluciones temporales muy precisas, las cuales dependen de los tiempos de desarrollo dental de cada taxón, pero que generalmente permiten obtener una resolución estacional, o incluso mensual. Este filón ha sido ampliamente explorado en contextos arqueopaleontológicos para realizar reconstrucciones paleoclimáticas (concretamente de paleotemperaturas) a partir de la variación estacional del ratio isotópico del oxígeno (e.g. Britton et al., 2009, 2019, 2023; Fricke & O'Neil, 1996; Pederzani et al., 2021). Por su parte, la posibilidad que ofrecen estos análisis para acceder a la escala estacional de las variaciones isotópicas, ha sido utilizada para reconstruir patrones migratorios o de movilidad estacionales de taxones presa vinculados a actividades de caza humanas (Britton et al., 2011; Gignoux et al., 2019; Tornero et al., 2016a), u orientados a inferir la estacionalidad de la muerte (Julien et al., 2015). Identificar los aspectos que operan a nivel estacional es un factor clave en la reconstrucción de las condiciones de vida de las poblaciones animales, a menudo sometidas a estrictos ciclos anuales.

La capacidad de estos análisis de inferir condiciones de movilidad, reproducción o alimentación de las poblaciones animales estudiadas, permite inferir aspectos muy concretos relacionados con la gestión y explotación de los recursos animales por parte de las comunidades humanas. De forma

específica, la capacidad de los análisis intra-dentales para abordar estos aspectos (movilidad, reproducción y movilidad) los convierten en una herramienta esencial para estudiar los procesos de domesticación animal (Kinaston, 2023; Tornero, 2011) o los sistemas de gestión ganadera en el pasado (Balasse, 2014). En esta línea, a lo largo de las últimas décadas y cada vez con mayor profusión, se han desarrollado multitud de estudios vinculados a la gestión de los animales domésticos como, por ejemplo, la gestión de la estacionalidad de los nacimientos (Balasse et al., 2003, 2020; Blaise & Balasse, 2011; Martín et al., 2021; Sierra et al., 2021; Tornero et al., 2013, 2016b, 2020), la gestión del período de lactancia (Balasse & Tresset, 2002; Gillis et al., 2013; Wright, 2014), la gestión de la alimentación a escala estacional (Balasse et al., 2006, 2009, 2014; Gillis et al., 2021; Navarrete et al., 2019), o la implementación de pautas de movilidad altitudinal de los rebaños (Knockaert et al., 2018; Makarewicz et al., 2017b; Messana et al., 2023; Tejedor-Rodríguez et al., 2021), entre otros.

La mayoría de estas líneas de estudio se han desarrollado a partir de la aplicación de análisis secuenciales sobre el esmalte, y a partir del análisis de las composiciones isotópicas procedentes de su fracción inorgánica (principalmente $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$, o $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$). La aplicación de análisis secuenciales sobre la dentina, y principalmente sobre su fracción orgánica, formada mayoritariamente por colágeno, ha sido muy puntual en lo que refiere a conjuntos arqueozoológicos. Es necesario subrayar este aspecto, puesto que los análisis de isótopos estables del colágeno óseo (generalmente del carbono, nitrógeno, o azufre) son los más utilizados en la reconstrucción de paleodietas a partir de restos esqueléticos, y son frecuentemente empleados en arqueozoología, ya sea en estudios prácticos de gestión ganadera (e.g. Balasse et al., 2016, 2017; Makarewicz & Tuross, 2006; Navarrete et al., 2017; Pearson et al., 2007), o en reconstrucciones paleoambientales y paleoecológicas (e.g., Bocherens et al., 1994, 1996, 2014; Britton et al., 2012; Drucker et al., 2003; Jones et al., 2020, 2021; Stevens et al., 2006; Stevens & Hedges, 2004). Los análisis sobre el colágeno óseo no permiten, no obstante, alcanzar la resolución temporal que ofrecen los tejidos dentales.

1.2. Tamaño del diente y resolución temporal: hipsodoncia y molares de coronas altas

El esmalte y la dentina se desarrollan por acumulación de aposiciones, y preservan un tejido incremental que representa diferentes intervalos de tiempo (de diario a anual) (Dean, 2017; Dean et al., 2001). La resolución temporal de los análisis intra-dentales está esencialmente relacionada con los procesos propios de desarrollo y mineralización del tejido analizado (esmalte o dentina), pero también con la capacidad de implementar un muestreo que sea fiel al crecimiento incremental, y que permita aislar tejido relativo momentos precisos dentro del período de desarrollo dental. Por ello, el tamaño y la morfología del diente analizado, es el principal factor limitante de los análisis intra-dentales.

Los primeros trabajos secuenciales se realizaron a partir de especies de proboscídeos (mamut, mastodonte y elefante) donde el tamaño de la pieza dental facilitaba el aislamiento de incrementos durante el muestreo (Koch et al., 1989; 1995). Concretamente, el gran tamaño de los colmillos en estas especies, junto al largo período de desarrollo dental que abarcan (hasta varias décadas), permite generar registros isotópicos de resolución estacional (2 a 10 muestras por año) y a lo largo de distintos ciclos anuales en una sola pieza. Esta resolución permite inferir periodicidades anuales e intra-anales en la dieta y el clima (e.g. Cherney et al., 2017; Fisher et al., 2003; Fox et al., 2007;

Rountrey et al., 2007), y se han llegado a alcanzar resoluciones temporales bisemanales (Uno et al., 2020). No obstante, ni estas piezas dentales, ni en general estas especies, son un registro común y recurrente en los conjuntos arqueológicos.

La aplicación de análisis intra-dentales a una mayor diversidad de especies terrestres, sobre todo a partir de especies de menor talla, tiene que lidiar con la capacidad del método para aislar intervalos de tiempo precisos a lo largo de un mismo diente. Cuanto menor sea el período de desarrollo dental (ratio de crecimiento más rápido) y mayor sea el tamaño de la pieza dental, la posibilidad de alcanzar mayores resoluciones temporales mediante análisis intra-dentales será mayor. En este sentido, las denticiones de especies hipsodontas de macromamíferos, ofrecen un buen soporte para estos análisis.

La hipsodoncia es una característica muy común en denticiones de mamíferos herbívoros de presentar coronas elevadas, especialmente en especies pascadoras (*grazers*), muy expuestas al desgaste dental. Es el resultado de una adaptación evolutiva para prolongar la vida útil y funcional de los dientes ante condiciones de alimentación abrasivas (Hummel et al., 2011; Janis, 1988; Janis & Fortelius, 1988). Define aquellas denticiones con un prolongado período de formación de las coronas de los dientes mandibulares durante su período funcional, que continúan creciendo en el interior de la mandíbula después de la erupción, en función del desgaste de la corona y durante la etapa funcional del diente (Janis, 1988; Witzel et al., 2018) (Figura 1). Tienen por tanto un inicio tardío del desarrollo de las raíces durante la dentinogénesis (después de la erupción y después de iniciar su etapa funcional). Puesto que las coronas dentales de los molares (y en menor medida también premolares) suelen presentar una mayor dimensión en altura que en grosor (Van Valen, 1960), se conocen también como “coronas altas” (*high-crown teeth*). Este tipo de denticiones, presentan unas tasas altas de crecimiento que permiten la formación de las coronas en un período relativamente corto de tiempo (Kahle et al., 2018).

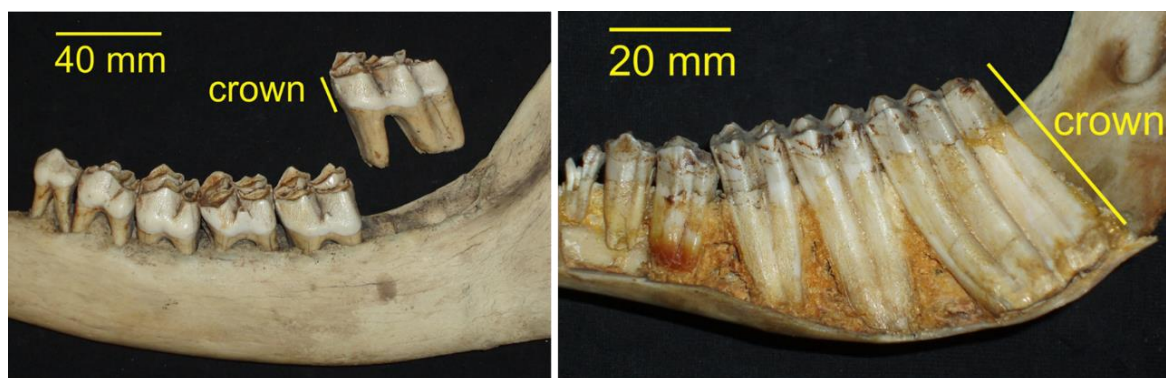


Figura 1. Comparación de la dentición mandibular de una girafa (*low-crowned teeth*) (izquierda), donde las coronas de molares y premolares ya han finalizado la erupción, con la dentición mandibular de un antilope americano (derecha), donde las coronas continúan la erupción y desarrollo según avanza el grado de desgaste (Sanson, 2023: Fig. 1, pp.1).

Los animales que presentan hipsodoncia ofrecen por tanto una morfología dental muy susceptible de aislar muestras relativas a cortos períodos de tiempo. Las coronas alargadas permiten un fácil muestreo de su dirección de crecimiento principal (es decir, longitudinal) y obtener largas series de muestras representativas de todo el período de desarrollo dental. Además, las altas tasas de formación permiten obtener una alta resolución temporal. A modo de ejemplo, las tasas de

posición del esmalte (tasa de secreción diaria) son entre tres y cuatro veces más altas en los molares de distintas especies de bóvidos (Jordana et al., 2014; Kierdorf et al., 2013) que en molares humanos (Dean & Scandrett, 1995).

Puesto que es una dentición común entre mamíferos herbívoros, los restos dentales de especies hipsodontas son muy comunes en el registro arqueozoológico (e.g. géneros *Bos*, *Capra*, *Ovis*, *Equus*, *Bison*, *Antidorcas*, *Gazella*). La mayor parte de las especies actuales de la familia Bovidae y todos los équidos y camélidos actuales presentan hipsodoncia, en mayor o menor grado (Hillson, 2005). Tras el trabajo pionero de Fricke & O'Neil (1996), que adaptó al esmalte de bisontes y ovejas la metodología de Koch et al. (1989) previamente desarrollada en colmillos de proboscídeos, las denticiones hipsodontas han sido ampliamente utilizadas en estudios paleoecológicos y arqueozoológicos desde el inicio de los análisis secuenciales (e.g. Balasse et al., 2002; Gadbury et al., 2000; Sharp & Cerling, 1998; Wiedemann et al., 1999)

2

Los análisis secuenciales de dentina: principales estudios e integración en arqueozoología

La dentina está compuesta entorno al 20% por contenido orgánico (mayoritariamente colágeno) (Frank & Nalbandian, 1989), por lo que permite obtener una representación intra-dental de la señal isotópica del colágeno, y por tanto de una parte de la alimentación ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ procedentes de las proteínas, entre otros isótopos) que es inaccesible a partir del análisis de la fracción mineral del esmalte. Por la posibilidad que ofrece la dentina de analizar la fracción orgánica, las aplicaciones de análisis secuenciales de dentina (DSA, por sus siglas en inglés, *dentine sequential analysis*) que se han desarrollado en arqueozoología han estado orientadas mayoritariamente a acceder al análisis de las señales isotópicas del colágeno,

A continuación, se hace una revisión de las distintas líneas de investigación que aplican DSA sobre denticiones de macromamíferos, con especial atención a aquellas desarrolladas sobre conjuntos arqueozoológicos. Al contrario de la amplia línea de desarrollo y estandarización que han seguido los análisis secuenciales en esmalte dental en los últimos años, la aplicación de estos análisis sobre dentina ha sido poco frecuente en lo que refiere a la arqueozoología.

2.1. Estudios pioneros y aplicaciones en ecología

La primera aplicación de análisis isotópicos intra-dentales se realizó sobre la dentina de colmillos de proboscídeos, aprovechando el tamaño de estos elementos dentales (Koch et al 1989). La dentina presenta un crecimiento incremental, que alterna ritmos de crecimiento rápido y lento, y que permite identificar visualmente episodios de crecimiento del diente en periodicidades anuales, bisemanales y diarias (Dean, 2017). La observación y cuantificación histológica de estas laminaciones de crecimiento intra-anual ya se venía utilizando en dientes de proboscídeos para inferir patrones de mortalidad estacionales (Fisher, 1987).

En el estudio de Koch et al. (1989) se realiza un muestreo secuencial de dentina en colmillos de mastodonte (*Mammuthus americanum*) y mamut (*Mammuthus jeffersoni*) y se analizan los valores de $\delta^{18}\text{O}$ procedentes de la fracción inorgánica de las muestras. La oscilación que mostraban los valores de $\delta^{18}\text{O}$ era consistente con la que presentan los valores de $\delta^{18}\text{O}$ en el agua de precipitación, relacionada con la variación estacional de la temperatura (Craig, 1961; Epstein et al., 1977). Este estudio supuso un método pionero que demostraba el potencial de los análisis

secuenciales de tejidos dentales para la reconstrucción paleoclimática a escala estacional, y la capacidad de la dentina para registrar secuencias de variación isotópica intra-individuales.

Desde entonces, la aplicación de análisis isotópicos incrementales en dentina en proboscídeos (principalmente colmillos) ha sido recurrente en estudios ecológicos (e.g. Koch et al., 1995; Uno et al., 2020) y, en menor medida, en reconstrucciones paleoecológicas (e.g. Fisher et al., 2003; Fox et al., 2007), centrados en el estudio de variaciones estacionales a nivel climático, ambiental o de alimentación de los individuos, y que además del análisis de $\delta^{18}\text{O}$ integran también el análisis de $\delta^{13}\text{C}$ (e.g. Fox & Fisher, 2004) y de $\delta^{15}\text{N}$ (e.g. Metcalfe et al., 2010; Rountrey et al., 2007).

Por su parte, el análisis intra-dental de la fracción orgánica de la dentina (colágeno) es un método de análisis muy explorado en el campo de la ecología de mamíferos marinos. El estudio pionero de Hobson & Sease (1998), aplica por primera vez un análisis de colágeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) siguiendo el crecimiento incremental de la dentina en los colmillos de varias especies de pinnípedos (león marino, elefante marino y foca). Desde entonces los análisis secuenciales de dentina-colágeno han sido ampliamente implementados en mamíferos marinos (e.g. Knox et al., 2014; Mendes et al., 2007), especialmente pinnípedos y cetáceos. La profusión de estos análisis en ecología marina se relaciona con el potencial de $\delta^{15}\text{N}$ para trazar comportamientos tróficos. El hecho de que se trate de elementos óseos o dentales modernos, que no han sufrido condiciones post-deposicionales, facilita implementar los análisis intra-dentales de colágeno. No presentan la complejidad añadida de tener que realizar procesos de purificación del colágeno – que afectan a la cantidad de colágeno que se obtiene finalmente de las muestras– para asegurar una composición isotópica fiable (Brault et al., 2014).

2.2. Primeras aplicaciones en arqueozoología: el estudio del momento de destete en vacas domésticas

La posibilidad de obtener un registro isotópico intra-dental del colágeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) en especies terrestres de menor tamaño que los proboscídeos, y orientado a la aplicación arqueológica, fue explorado por primera vez por Balasse et al. (2001). Se trata de un estudio realizado a partir de molares mandibulares de vacas domésticas modernas que procedían de una granja experimental donde se controlaba la composición isotópica de la alimentación. Marie Balasse y colegas aplican un muestreo longitudinal –cúspide-raíz– que permite obtener secuencias de variación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (colágeno) relacionadas con los cambios de alimentación acontecidos a lo largo del período de desarrollo de los molares mandibulares (M_1 , M_2). Concretamente, las secuencias de variación de $\delta^{15}\text{N}$ representaban el cese de la lactancia, por lo que podían utilizarse como marcador del proceso (y momento) de destete de los terneros.

Estudiar el proceso de destete en vacas domésticas a través de DSA buscaba explorar una línea de estudio concreta: evaluar el rol de la producción láctea en economías de subsistencia prehistórica, a partir de definir la cantidad de producción que se reserva al consumo humano. Las prácticas de destete artificial (i.e. antes de la finalización del período de lactancia) en especies lecheras están estrechamente vinculadas a aumentar la cantidad de leche destinada a consumo humano (Balasse, 2003a; Balasse & Tresset, 2002; Gillis, 2012). El estudio del momento del destete buscaba responder también al debate de cómo una explotación de las vacas con finalidad láctea debería representarse a partir de los perfiles de mortalidad: si a partir de un sacrificio de los terneros jóvenes, o a partir de un sacrificio tras la finalización del período de lactancia (*post-lactation culling*), teniendo en cuenta que sacrificar los terneros jóvenes podía comprometer la

correcta bajada de la leche y por tanto dificultar su ordeño (Balasse, 2003a; Balasse et al., 2000; Peske, 1994; Tresset, 1996).

Se estima que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ incrementan significativamente, entre 3 y 4‰ por cada salto en la cadena trófica (Bocherens & Drucker, 2003; DeNiro & Epstein, 1981; Minagawa & Wada, 1984; Schoeninger & DeNiro, 1984). Los individuos lactantes, cuya principal fuente de alimentación es la leche materna, están también aproximadamente un salto trófico por encima de las madres en sus valores de $\delta^{15}\text{N}$ (Fogel et al., 1989; Fuller et al., 2006). Durante el destete, el cambio de una lactancia exclusiva a una dieta sólida, lleva a un descenso gradual en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de las proteínas del lactante, hasta alcanzar valores similares a los de la madre (siempre y cuando ambos presenten dietas similares en su composición de $\delta^{15}\text{N}$). El uso de $\delta^{15}\text{N}$ en muestras de colágeno óseo ya habían sido previamente explorados como indicador de procesos de lactancia materna y destete en poblaciones arqueológicas, tanto a partir de restos humanos (Katzenberg & Pfeiffer, 1995; Schurr, 1997) como faunísticos (Balasse et al., 1997, 2000). La aplicación secuencial del análisis de $\delta^{15}\text{N}$ sobre determinados elementos dentales, permite representar ese proceso también a lo largo del crecimiento de la pieza dental. En el caso de los bovinos domésticos, los primeros y segundos molares mandibulares son los más indicados puesto que su período de formación que cubre desde varios meses de desarrollo *in utero* hasta los ~12 meses de vida (Brown et al., 1960; Soana et al., 1997).

Balasse & Tresset (2002) aplicaron por primera vez el método de DSA en conjuntos arqueológicos (*Bos taurus*) del yacimiento neolítico de Bercy (Paris, Francia, c. 4000 BC), con el objetivo de caracterizar el proceso de destete de los individuos a partir de las secuencias de $\delta^{15}\text{N}$. El estudio isotópico se apoyaba en los datos de referencia previamente desarrollados a partir de vacas experimentales modernas (Balasse et al 2001), que ofrecían una base de referencia sobre la que interpretar los datos arqueológicos. La previa aplicación de esta metodología de análisis en vacas experimentales ofrecía una referencia para determinar de forma relativa la edad de destete de los individuos en conjuntos arqueológicos. Los resultados obtenidos en el yacimiento de Bercy sugerían, aún con ciertas limitaciones, que los terneros pudieron ser destetados de forma temprana (antes del referencial moderno, i.e., antes de los 9 meses), pero mantenidos con vida varios meses más. Estos resultados, unidos al patrón de mortalidad post-lactancia representado en el yacimiento, sugerían que los terneros habían sido destetados de forma temprana de cara a ampliar la cantidad de leche reservada para consumo humano, a la vez que se mantenían con vida durante todo el período de lactancia para favorecer la bajada de la leche. En opinión de las autoras, la principal limitación del estudio se basaba en que los resultados también podían estar representando un período de lactancia más corto en los individuos arqueológicos que el de las razas actuales, pues se había sugerido que ésto podría darse entre razas primitivas (Peske, 1994; Tresset, 1996). El método no se diseñó para definir los meses de duración que abarcaban las lactancias en cada caso, pero permitía por primera vez identificar los eventos de destete en poblaciones arqueológicas y contraponerlos a los referenciales modernos.

	Referencia	Aspecto de estudio	Material	Especie	Elemento dental	Fracción analizada	Medición isotópica
High crowned teeth / hypsodont species	Balasse et al., 2001	Metodología, referencial moderno, destete, alimentación	Moderno (experimental)	<i>Bos taurus</i>	M ₁ , M ₂ , M ₃	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Balasse & Tresset, 2001	Momento de destete	Arqueológico (4000 BC)	<i>Bos taurus</i>	M ₁ , M ₂	Colágeno en dentina	$\delta^{15}\text{N}$
	Zazzo et al., 2006	Metodología	Moderno (experimental)	<i>Bos taurus</i>	M ₂	Bioapatitas en dentina	$\delta^{13}\text{C}$
	Kirsanow, et al., 2008	Metodología, variación climática estacional	Moderno	<i>Ovis aries</i> , <i>Capra hircus</i>	M ₁ , M ₂ , M ₃ , P ₂ , P ₃ , P ₄	Colágeno en dentina	$\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$
	Gillis, 2012, Gilis et al., 2013	Momento de destete, alimentación estacional	Arqueológico (5000-4000 BC)	<i>Bos taurus</i>	M ₁ , M ₂ , DP ₄	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Makarewicz, 2011	Momento de destete	Moderno y arqueológico (300 BC – 200 BC)	<i>Ovis aries</i> , <i>Capra hircus</i>	M ₁	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Makarewicz, 2014	Referencial moderno, alimentación y movilidad estacional	Moderno	<i>Ovis aries</i>	M ₂	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Makarewicz, 2017	Gestión alimentación y movilidad estacional	Arqueológico (300BC – 200AD)	<i>Ovis aries</i> , <i>Capra hircus</i>	M ₂	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Makarewicz et al., 2017a	Momento de destete, gestión alimentación	Arqueológico (6200-4500BC) y moderno	<i>Ovis aries</i> , <i>Capra hircus</i>	M ₁ , M ₂	Colágeno en dentina	$\delta^{15}\text{N}$
	Griffith & Muiville 2020	Momento de destete, gestión alimentación	Arqueológico (800 to 1300 AD)	<i>Bos taurus</i>	M ₁ , M ₂	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Hopper et al., 2018	Reconstrucción paleoambiental	Arqueológico (1400 to 1650 AD)	<i>Antidorcas marsupialis</i>	M ₁	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Stojanovski et al. 2020	Momento de destete, alimentación estacional	Arqueológico	<i>Bos taurus</i>	M ₁ , M ₂	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Morandi et al., 2021	Gestión alimentación y movilidad	Arqueológico (4000 – 2000 BC)	<i>Bos sp</i>	M ₁ , M ₂ , M ₃	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
Other teeth	Guiry et al., 2016	Metodología	Arqueológico (1600 – 1800 AD)	<i>Sus scrofa</i>	C	Dentina sin tratar (<i>raw dentine</i>)	$\delta^{15}\text{N}$
	Guiry et al., 2018	Gestión alimentación	Arqueológico (1684–1688 AD)	<i>Sus scrofa</i>	I ₁	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Losey et al., 2020	Gestión alimentación	Arqueológico (240 BC -140 AD)	<i>Canis familiaris</i>	I ³	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$
	Rogers et al 2019	Gestión alimentación	Arqueológico (5000 BC-4800 BC)	<i>Canis familiaris</i>	P ⁴	Colágeno en dentina	$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$

Tabla 1. Recopilación de estudios donde se integran análisis secuenciales de dentina aplicados sobre restos de fauna en casos de estudio arqueológicos u orientados a la creación de referenciales a partir de poblaciones modernas. Nota: se excluyen los estudios paleoecológicos realizados a partir de proboscídeos extintos (e.g. Koch et al., 1989).

Estos primeros trabajos mostraban el potencial de estos análisis secuenciales en dentina en la investigación de problemáticas arqueológicas específicas relacionadas con la gestión ganadera de los rebaños domésticos. Sin embargo, esta línea de estudio con DSA sólo ha sido explorada posteriormente de forma puntual a partir de otros conjuntos de bovinos domésticos de contextos neolíticos (Gillis, 2012; Gillis et al., 2013; Stojanovski et al., 2020). De forma similar al caso de Bercy, en éstos estudios continuistas se identifica el sacrificio de individuos inmaduros meses después del destete, incluso en individuos de 4 a 6 meses de edad en el momento de muerte. Los estudios actualmente disponibles, así como el tamaño de la muestra hasta ahora analizada, son aún muy escasos (Tabla 1). Sin embargo, demuestran cómo las prácticas de destete artificial podrían estar en mayor o menor grado presentes en contextos prehistóricos, al menos en el caso de las vacas, y que son explorables a partir de técnicas de DSA.

2.3. El estudio del momento de destete en ovejas y cabras domésticas

Estudios arqueozoológicos basados en el análisis de los patrones de mortalidad sugieren que los caprinos domésticos (oveja y cabra) podrían ser explotados para su producción láctea durante la Prehistoria, incluso desde las primeras economías agrícola-ganaderas (Gillis et al., 2022; Helmer et al., 2007; Sierra et al., 2019; Vigne & Helmer, 2007). A diferencia de las vacas, tanto ovejas como cabras implican un menor riesgo a la hora de estimular la bajada de la leche y de mantener el período de lactancia a partir de un ordeño artificial, sin la necesidad de la presencia de las crías (Balasse, 2003a; Halstead, 1998), por lo que estas especies podrían jugar un rol importante desde los primeros sistemas orientados a la obtención de recursos lácteos. Sin embargo, en caprinos domésticos, el proceso de destete no ha sido apenas explorado a partir de secuencias de dentina en comparación con el estudio de este proceso en vacas. El estudio del destete en estas especies con DSA se enfrenta a un desafío técnico mayor: los dientes presentan menor tamaño, lo que hace más complicado implementar un muestreo secuencial con similar resolución, y se persigue representar un período temporal más corto (los períodos de lactancia en ovejas y cabras, por lo general, son varios meses más cortos que en vacas actuales).

Los trabajos de Cheryl Makarewicz y colegas (Makarewicz, 2011; Makarewicz et al., 2017a) trasladan a caprinos domésticos, arqueológicos y modernos, la aplicación de DSA que se había venido haciendo en bovinos a partir de varios casos de estudio arqueológicos. Se trata de estudios preliminares, donde el número de ejemplares analizados es escaso, y donde no se dispone de un referencial moderno frente al que interpretar los resultados que permita estimar el momento de destete. Sin embargo, los resultados de estos estudios muestran cómo diferentes estrategias de destete podrían vislumbrarse también en el caso de ovejas y cabras a partir de DSA en molares mandibulares (concretamente el M₁), ya que los patrones isotópicos de nitrógeno que se representan las secuencias muestran cierta variabilidad en los procesos de destete entre los distintos individuos analizados.

2.4. Gestión de la alimentación de animales domésticos: posibilidades más allá del salto trófico

La línea de investigación más explorada a partir de DSA en arqueozoología ha sido el estudio del proceso de destete en especies domésticas. Sin embargo, las variaciones en $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ del

colágeno ofrecen también otras posibilidades en la caracterización de paleodietas. Los trabajos de Makarewicz (2014, 2017) muestran las posibilidades que ofrecen las variaciones de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ obtenidas con DSA en el estudio de la gestión de la alimentación de animales domésticos, particularmente en la gestión de rebaños herbívoros.

Estos estudios muestran cómo determinadas prácticas de gestión ganadera como el forrajeo estacional, o el pastoreo estacional, pueden identificarse a partir los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ obtenidos por DSA en caprinos domésticos, tanto a partir de especímenes modernos (Makarewicz, 2014) como arqueológicos (Makarewicz, 2017). El análisis de los ejemplares modernos sugiere que la variación de $\delta^{13}\text{C}$ permite diferenciar entre una alimentación basada en pastos, de una alimentación basada principalmente en forrajes durante el invierno, en función de la diferente proporción de plantas C_3/C_4 que conforman ambos tipos de alimentación en ese contexto ambiental. Por su parte, el $\delta^{15}\text{N}$ varía también entre pastos de verano y pastos de invierno, éstos últimos más enriquecidos en ^{15}N como resultado de un pastoreo más intensivo. La fertilización y abono intensivo de los suelos, ya sea por prácticas de abono artificial o por una alta intensidad de herbívoros pastando sobre una zona concreta, influye en el enriquecimiento en ^{15}N de las plantas (Schulze et al., 1998; Treasure et al., 2016). La principal aportación de los trabajos de Makarewicz es que los resultados muestran un alto rango de variación intra-individual e inter-individual en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, vinculados con variaciones propias de la dieta herbívora y basadas en las características de la alimentación, mostrando otras posibilidades en la caracterización de la alimentación en herbívoros más allá del destete. No obstante, la aplicación de DSA en la gestión de la alimentación de rebaños domésticos prácticamente se limita a estos dos estudios.

Por su parte, en los últimos años, también se ha explorado la aplicación de DSA para caracterizar la gestión de la alimentación de otros animales domésticos como cerdos (Guiry et al., 2016, 2018) o perros (Losey et al. 2020), a partir del análisis secuencial de incisivos o caninos. Estos estudios se basan en identificar, principalmente a partir del $\delta^{15}\text{N}$, cómo de estables son determinados patrones de alimentación a lo largo del período de vida de los individuos representado en el diente; e.g. una alimentación a base de pescado a lo largo del año (Losey et al., 2018). La adaptación de los protocolos de muestreo de Guiry et al. (2016, 2018) a la morfología de estas piezas dentales, permite en estos estudios alcanzar una resolución temporal adecuada para trazar la variación isotópica del colágeno a partir de caninos o incisivos de pequeño tamaño.

2.5. Estacionalidad y reconstrucción paleoambiental

El estudio de señales estacionales es un tema recurrente en los estudios arqueozoológicos que aplican análisis isotópicos secuenciales de esmalte, tanto a partir de especies salvajes (e.g. movilidad estacional, Tornero et al., 2016a) como de especies domésticas (e.g. estacionalidad de los nacimientos: Tornero et al., 2013; o estacionalidad de muerte: Lazzarini et al., 2021). A partir del DSA, también se observan variaciones en la alimentación que pueden tener un componente estacional (e.g. Makarewicz, 2017; o Stojanovski et al., 2020). Sin embargo, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, que generalmente se analizan sobre la dentina, no permiten vincular de forma directa la estacionalidad (i.e. el momento dentro del ciclo anual) de los eventos representados.

Los isótopos estables de oxígeno ($\delta^{18}\text{O}$) e hidrógeno ($\delta^2\text{H}$) analizados a partir de tejidos óseos o dentales son un buen marcador de estacionalidad. La composición isotópica de oxígeno y deuterio del agua de precipitación y de las plantas representan la oscilación estacional de la temperatura

(Craig, 1961; Epstein et al., 1977; Fricke & O'Neil, 1999), y esta composición isotópica se traslada a los tejidos del cuerpo de los organismos que las ingieren. Esta variación estacional se ha observado tanto en el caso de los valores de $\delta^{18}\text{O}$ de la bioapatita en el esmalte o la dentina (Fricke et al., 1998; Fricke & O'Neil, 1996; Koch et al., 1989; Sharp & Cerling, 1998), como en los valores de $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ del colágeno (Cormie et al., 1994; Hobson et al., 1999; Leyden et al., 2006). Los análisis isotópicos secuenciales, generalmente aplican análisis de $\delta^{18}\text{O}$ sobre la fracción inorgánica de los dientes, ya sea a partir de la bioapatita del esmalte, o también, aunque en menor medida, a partir de la bioapatita de la dentina (e.g. Koch et al 1989). No obstante, como resultado del menor desarrollo de los DSA en estudios arqueológicos, y de la mayor propensión de la fracción inorgánica de la dentina a la alteración de su composición isotópica (Lee-Thorp & van der Merwe, 1991), la variación de $\delta^{18}\text{O}$ como marcador de estacionalidad ha sido un tema que no ha sido abordado a partir de la dentina de forma significativa.

Actualmente sólo hay disponible un trabajo que aplique el DSA al análisis de $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ a partir del colágeno. Kirsanow et al., (2008) muestran que el análisis de ambas composiciones isotópicas a partir de DSA (colágeno) en animales de coronas altas, permite representar la variación climática estacional del agua y plantas consumidas. La principal aportación de este trabajo es que incluso en el caso de dietas manipuladas de forma antrópica (se analizan ovejas y cabras domésticas), las secuencias de variación de oxígeno y deuterio analizadas en el colágeno representan dicha estacionalidad. Puesto que la fracción inorgánica de la dentina es más propensa a la afectación diagenética de sus ratios isotópicos, el colágeno es una buena vía de inferir estacionalidad a partir de DSA. Este campo aún está por explorar en arqueología.

Por último, la aplicación de DSA a reconstrucciones paleoambientales ha sido prácticamente inexistente en estudios arqueológicos, con la excepción del estudio de Hopper et al., (2018), donde se infieren eventos de sequía a partir de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ (aridez y estrés hídrico) y $\delta^{13}\text{C}$ (tipo de vegetación disponible) obtenidos en gacelas (*Antidorcas marsupialis*). La escasez de estudios en esta línea es sorprendente en tanto que las reconstrucciones paleoambientales o paleoecológicas a partir de colágeno son recurrentes en arqueología. Además de su utilidad para definir redes tróficas (e.g. Bocherens & Drucker 2003), los ratios de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ analizados en el colágeno, especialmente a partir de especies herbívoras, pueden también representar condiciones medioambientales de aridez, humedad, y otras características del medio vegetal (Drucker et al., 2003) por lo que son también útiles para definir el fraccionamiento de nichos ecológicos entre especies (e.g. Britton et al., 2012, 2023; Jones et al., 2019, 2021), o reconstruir patrones de alimentación (e.g. Drucker et al. 2001, 2010).

2.6. La integración de DSA en arqueozoología: comentarios finales

Los muestreos secuenciales en dentina no se han desarrollado en arqueozoología con la misma profusión e intensidad que en el esmalte. Tampoco han seguido la misma tendencia en aumento que la que ha seguido la aplicación de DSA sobre molares humanos durante los últimos años. A pesar de la dificultad que presentaba muestrear la dentina en humanos debido al tamaño de las piezas dentales y el tamaño de la muestra necesaria para analizar colágeno (Fuller et al., 2003), el desarrollo de trabajos metodológicos en esta línea ha permitido estandarizar varios métodos de muestreo y análisis, y, de hecho, actualmente son implementados de forma habitual en estudios

arqueológicos (e.g. Beaumont & Montgomery, 2016; Fernández-Crespo et al., 2020; Henderson et al., 2014).

El desarrollo de DSA en arqueozoología, concretamente en especies hipsodontas, se ha visto limitado principalmente por la escasez de estudios metodológicos y experimentales que apoyen su implementación arqueológica y que garantice una correcta interpretación de los datos isotópicos. Los trabajos experimentales previos se reducen a Balasse et al. (2001), único estudio metodológico para secuenciar dentina-colágeno, y Zazzo et al. (2006), que se limita a analizar la fracción inorgánica. Posteriormente, las aplicaciones arqueológicas han sido escasas, básicamente reducidas a identificar el momento de destete en vacas domésticas a base de replicar la metodología del primer trabajo experimental de Balasse y colegas.

El desarrollo de trabajos experimentales es esencial para la aplicación de DSA por la complejidad que conlleva implementar un muestreo secuencial de la dentina que sea fiel a su eje de crecimiento, especialmente en animales hipsodontos. A pesar de presentar coronas alargadas, en estas denticiones la dentina crece en dirección oblicua al eje vertical del diente (Hillson, 2005; Kahle et al., 2018) y este patrón dificulta muestrear siguiendo su geometría de crecimiento a la par que se obtiene suficiente muestra para implementar los protocolos estándares de purificación de colágeno (e.g. en Zazzo et al., 2006, y en Guiry et al., 2016). En consecuencia, el protocolo de muestreo disponible hasta el momento, desarrollado por M. Balasse et al. (2001), genera la mezcla de dentina de distintos momentos formativos del diente, lo que deriva en una atenuación de los resultados isotópicos y una representación imprecisa de los cambios de dieta en las secuencias isotópicas. Esto conlleva ciertas complicaciones a la hora de interpretar los resultados, lo que ha limitado su aplicación en casos arqueológicos.

3

Desafíos del DSA: el muestreo en coronas altas y la aplicación de protocolos de purificación del colágeno

La dentina se desarrolla de forma incremental, a partir de ciclos de deposición de matriz orgánica y mineralización, y la resolución temporal de las técnicas de DSA dependerá de la capacidad de aislar incrementos durante el muestreo y análisis (e.g. estacional en Koch et al., 1989; o bisemanal en Uno et al., 2020). En muchos elementos dentales, y en particular en los molares de coronas altas, la dentina crece oblicua al eje vertical del diente (Hillson, 2005, Kahle et al., 2018) y este patrón dificulta muestrear siguiendo el eje de crecimiento de la dentina sin mezclar incrementos formados en distintos períodos de vida. Los DSA se enfrentan al dilema de conseguir muestras que representen intervalos cortos de tiempo y a la vez obtener una cantidad suficiente de muestra que permita implementar los protocolos de purificación de colágeno estándares.

A continuación, se define brevemente la composición de la dentina y las posibilidades analíticas de la misma, así como los principios básicos de su desarrollo, con especial atención a la geometría de formación que presenta en el caso de los molares de coronas altas. Por último, se hace una breve revisión de las principales propuestas metodológicas que se han realizado en arqueología para el desarrollo de análisis intra-dentales de dentina-colágeno, atendiendo a las posibilidades que ofrecen los protocolos disponibles hoy en día para la aplicación de DSA en especies hipsodontas de macromamíferos.

3.1. Posibilidades biogeoquímicas de los tejidos dentales: el caso de la dentina

Los tejidos dentales ofrecen una amplia diversidad bioquímica para realizar análisis isotópicos, con multitud de isótopos mesurables con aplicaciones útiles en arqueología. Algunos están presentes en ambas fracciones orgánica (mayoritariamente colágeno) e inorgánica (bioapatita), y otros sólo en una de ellas, y generalmente su análisis se realiza a base de aislar estas fracciones una de otra o aislando determinados componentes de las mismas a partir de diversos procedimientos químicos. En la Tabla 2, se resumen los principales ratios isotópicos analizados comúnmente en estudios arqueológicos y sus principales aplicaciones. Las aplicaciones más comunes se relacionan con la reconstrucción de la dieta, nivel trófico o movilidad de los individuos analizados, o con la reconstrucción del paleoclima. Las principales aplicaciones de análisis de isótopos estables que se han desarrollado en arqueología a partir de restos óseos o dentales, han sido recopiladas en

numerosos trabajos previos como Katzenberg (2008), Lee-Thorp (2008) Humphrey (2015), Makarewicz & Sealy (2015) o Richards (2019), entre otros.

En el caso de la fracción orgánica, los análisis isotópicos se realizan generalmente sobre su componente mayoritario, el colágeno. Los análisis de la composición isotópica del colágeno, y concretamente la composición isotópica del carbono ($\delta^{13}\text{C}$) y nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$), han sido los análisis predilectos en la reconstrucción de paleodietas humanas o animales desde los primeros estudios isotópicos aplicados en arqueología (Bocherens et al., 1991; Burleigh & Brothwell, 1978; DeNiro & Epstein, 1981; Van der Merwe & Vogel, 1978; Vogel & Van Der Merwe, 1977). Sus principales aplicaciones se relacionan con la capacidad de estas señales isotópicas para la caracterización del nivel trófico (e.g. posición en la cadena trófica, dieta marina vs terrestre, lactancia y destete) y de las plantas involucradas en la dieta (principalmente el tipo de planta y las condiciones medioambientales y climáticas que influyen en su composición isotópica). Los isótopos estables del azufre ($\delta^{34}\text{S}$), mesurables en el colágeno, también son comunes en la reconstrucción de paleodietas, puesto que permiten distinguir entre el consumo de recursos terrestres, marinos y de agua dulce (Privat et al., 2007; Richards et al., 2001). Los valores de $\delta^{34}\text{S}$ del colágeno reflejan también los valores medioambientales locales, y pueden utilizarse para inferir patrones de movilidad y residencia. Por su parte, la composición isotópica del hidrógeno ($\delta^2\text{H}$) y el oxígeno ($\delta^{18}\text{O}$) del colágeno, refleja aquella del agua de precipitación y de las plantas, lo que los convierte en un marcador de la oscilación estacional de la temperatura (Cormie et al., 1994; Hobson & Sease, 1998; Kirsanow & Tuross, 2011; Leyden et al., 2006), aunque la aplicación más recurrente del análisis de $\delta^2\text{H}$ en arqueología se centra en su capacidad para representar el salto trófico (Reynard & Hedges 2008).

En aplicaciones arqueológicas, la mayoría de estudios isotópicos analizan la totalidad del colágeno (*bulk analyses*), ofreciendo un promedio de la composición isotópica de todos los aminoácidos que lo constituyen (Hare et al., 1991; Macko et al., 1987). Sin embargo, el análisis de la composición isotópica de aminoácidos concretos (*compound specific isotope analyses*), ofrecen un marcador más directo de determinados componentes dentro de la dieta, y permiten elucidar aspectos concretos de la dieta que no se alcanzan con los análisis *bulk*. Por ejemplo, permiten diferenciar entre dietas basadas en plantas C_4 terrestres de dietas basadas en recursos marinos, en casos donde los valores *bulk* de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ del colágeno se solaparían (Corr et al., 2005).

En cuanto a la fracción mineral, las aplicaciones más recurrentes se centran en el análisis isotópico de elementos mayoritarios como el oxígeno ($\delta^{18}\text{O}$), procedente de fosfatos y carbonatos, y del carbono ($\delta^{13}\text{C}$) de los carbonatos. El análisis de los isótopos de elementos traza como el Sr ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$), conforma también uno de los análisis más comúnmente realizados sobre restos arqueológicos. Los isótopos de estroncio varían en función de la geología local, lo que los hace especialmente útiles en el estudio de pautas de movilidad, migración y procedencia geográfica en el pasado (Bentley, 2006). Más recientemente, los análisis de isótopos de calcio se han incorporado a la reconstrucción de paleodietas como marcador específico del consumo de lácteos (Chu et al., 2006; Reynard et al., 2011). Por su parte, en los últimos años, los isótopos de elementos minoritarios como el zinc (Zn), han mostrado también su potencial en la reconstrucción de paleodietas. Los isótopos de cinc ($\delta^{66}\text{Zn}$) son un indicador del grado de consumo de plantas, y por tanto un marcador del nivel trófico (Jaouen et al., 2016; Bourgon et al., 2021).

La mayor dureza y menor porosidad del esmalte respecto a la dentina, hacen que su contenido mineral sea menos propenso a la alteración diagenética (Kendall et al., 2017), y por tanto menos proclive a la afectación isotópica en restos fósiles o subfósiles (Lee-Thorp & Van der Merwe, 1991).

La mayor resistencia del esmalte respecto al hueso o la dentina se conoce desde los años '90 (Ayliffe et al., 1994; Daniel Bryant et al., 1994; Fricke et al., 1995) y la mayoría de análisis sobre la fracción mineral ($\delta^{18}\text{O}_{\text{bioapatita}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{bioapatita}}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, etc.) se realizan desde entonces sobre el esmalte, aunque la alteración de la fracción inorgánica de la dentina dependerá de las condiciones post-deposicionales específicas (Kendall et al., 2017; Stantis et al., 2021). Por el contrario, la dentina es un tejido dental que ofrece la posibilidad de analizar el colágeno y acceder a la medición isotópica de elementos que no están presentes en la fracción mineral, y por tanto inaccesibles a partir del esmalte donde el contenido orgánico es mínimo. La dentina es el único tejido esquelético que permite acceder a estos análisis con una perspectiva diacrónica, por lo que el análisis del colágeno suele ser el principal objetivo de los DSA.

Compound analysed	Isotope ratio	Proxy reconstruction, indicator
Collagen (or single aminoacids) & Carbonate in bioapatites	$^{12}\text{C} / ^{13}\text{C}$	Diet composition Plant type (C_3 , C_4) Marine vs terrestrial diets Paleoenvironmental conditions (water availability, hydric stress, canopy effect, salinity)
Collagen (or single aminoacids)	$^{14}\text{N} / ^{15}\text{N}$	Trophic level, food webs Diet composition Lactation and weaning Paleoenvironmental conditions (soil nitrogen content, water availability, aridity)
Collagen (or single aminoacids)	$^1\text{H} / ^2\text{H}$	Trophic level Paleoclimatic conditions
Carbonate and phosphate in bioapatites & Collagen (or single aminoacids)	$^{16}\text{O} / ^{18}\text{O}$	Paleoclimatic conditions Geographic origin Seasonality, seasonal fluctuation
Collagen (or single aminoacids)	$^{34}\text{S} / ^{32}\text{S}$	Aquatic vs terrestrial diets Mobility
Calcium phosphates in bioapatites	$^{44}\text{Ca} / ^{42}\text{Ca}$	Milk consumption and weaning
Calcium phosphates in bioapatites	$^{87}\text{Sr} / ^{86}\text{Sr}$	Geographic origin Mobility
Calcium phosphates in bioapatites	$^{66}\text{Zn} / ^{64}\text{Zn}$	Plant consumption (trophic level)

Tabla 2. Principales ratios isotópicos estudiados en arqueología en función del compuesto analizado, y sus principales aplicaciones (modificado a partir de Hillson, 2005). Nota: las aplicaciones sobre apatitas se realizan principalmente sobre esmalte (ver texto).

La dentina es un tejido mineralizado que presenta una importante matriz orgánica, formada mayoritariamente por colágeno. La dentina es un tejido similar al hueso en su composición (Tabla

3), y el tamaño y dimensiones de sus cristalizaciones minerales son aproximadamente las mismas. La dentina es, no obstante, más dura y compacta que el hueso, pues está ligeramente más mineralizada y contiene menos materia orgánica (Carlson, 1991). La dentina se conforma en un 70% de contenido inorgánico, mientras que el orgánico supone el 20% de su peso en estado fresco, y el 10% restante es agua (Carlson, 1991; Frank & Nalbandian, 1989; LeGeros, 1981; Skinner, 2005). El esmalte, en contraposición, presenta una fracción orgánica mínima, del 1%.

	Hueso		Dentina		Esmalte	
	wt.%	vol.%	wt.%	vol.%	wt.%	vol.%
Inorgánico	70	49	70	50	96	90
Orgánico	24	38	20	30	1	2
Agua	6	13	10	20	3	8
Densidad (g/cm ³)	2.35		2.51		2.92	

Tabla 3: Composición orgánica e inorgánica en hueso, dentina y esmalte (Skinner, 2005: Tabla 3, pp. 634).

La matriz orgánica de la dentina está formada mayoritariamente por colágeno (principalmente colágeno de tipo I), una proteína de estructura fibrilar que constituye entorno al 90% de la fracción orgánica. El resto lo componen otras proteínas no colagenosas (~10%), como la osteocalcina, y lípidos (~2-3%) (Carlson, 1991; Frank & Nalbandian, 1989). La fracción inorgánica consiste principalmente en cristales de bioapatita, mineralizados dentro de la matriz orgánica previamente desarrollada (Carlson, 1991). La bioapatita, es una forma impura de hidroxiapatita [$Ca_5(PO_4)_3(OH)$], conformada principalmente por minerales de fosfato de calcio con sustituciones de carbonatos (Humphrey 2015). Además de los fosfatos de calcio y los carbonatos, hay presencia de al menos 35 elementos traza en los tejidos dentales en concentraciones medibles (Kohn et al., 2013), por ejemplo, el sodio, magnesio, potasio, estroncio, bario, o cinc. La composición de la fase inorgánica de la dentina es similar a la del esmalte, aunque tiene mayor concentración de carbonatos y los cristales son mucho más pequeños que los del esmalte (Carlson 1991; LeGeros 1981); la menor dureza y mayor porosidad de la dentina, hacen su contenido mineral más propenso a la alteración diagenética (Kendall et al., 2018) y por tanto más proclive a su afectación isotópica (Lee-Thorp & Van der Merwe, 1991).

3.2. Desarrollo de la dentina y geometría de crecimiento en coronas altas

La formación de la dentina es un proceso basado en una primera deposición de una matriz orgánica, formada principalmente por colágeno (pre-dentina), y su posterior mineralización (Nanci, 2013). El frente de mineralización sucede al frente de formación de la matriz. Ambos frentes de secreción (matriz orgánica y mineralización) se suceden a un mismo ritmo, de tal forma que el grosor de la pre-dentina se mantiene siempre constante puesto que la cantidad que se calcifica está equilibrada con la adición de nueva matriz orgánica (Engel & Hilding, 1984; Frank & Nalbandian, 1989; Kahle et al., 2018; Nanci, 2013).

La dentinogénesis es un proceso rítmico que alterna períodos de crecimiento rápido y lento, y que va dejando marcas de crecimiento incremental en la dentina (Dean, 2000). Bajo condiciones normales, y a diferencia del hueso, la dentina no se remodela una vez mineralizada (Carlson, 1991; Frank & Nalbandian, 1989; Kahle et al., 2018; Nanci, 2013), aunque nuevo tejido reparativo pueda formarse ocasionalmente entorno a la cavidad pulpar. La dentina depositada antes de que el diente alcance un contacto oclusal completo, se denomina dentina primaria, mientras que a la dentina formada por los mismos odontoblastos, siguiendo el mismo frente regular de secreción, pero de forma más lenta y durante períodos más tardíos de desarrollo dental (después de la formación de la raíz), se le denomina dentina secundaria. Sin embargo, existen formas de dentina secundaria irregular (comúnmente referidas como dentina reparativa o terciaria) que pueden formarse localmente en reacción a estímulos externos nocivos tales como la abrasión, estrés químico o mecánico, caries, etc. (definiciones de dentina primaria, secundaria y terciaria según Frank & Nalbandian 1989, y Nanci, 2013).

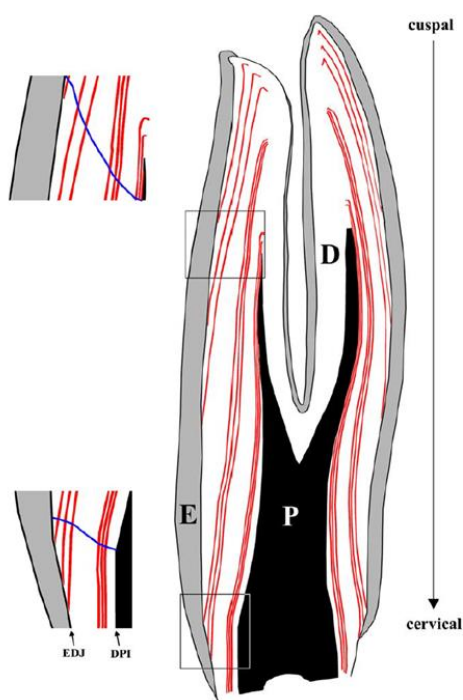


Figura 2. Representación de una sección buco-lingual de un molar mandibular que muestra la dirección de deposición de la dentina, y las tasas diferenciales de deposición en distintas partes de la corona. Dentina (D), esmalte (E) y cavidad pulpar (P). Las líneas rojas representan grupos de incrementos formados en un mismo período de tiempo, pero a diferente tasa de deposición. Ilustración de Kahle et al. (2018; pp 910).

Las células encargadas de la secreción de la dentina (odontoblastos) recubren la cavidad pulpar, formando un frente de deposición que avanza progresivamente alejándose de la unión entre dentina y esmalte (EDJ, *enamel-dentine junction*). En los molares de coronas altas, la cavidad pulpar de las distintas cúspides que los conforman tiene una forma cónica alargada (Figura 2) por lo que las continuas aposiciones de dentina se suceden a partir de esta misma geometría cónica (Hillson, 2005). Según se va formando la dentina, los odontoblastos se van desplazando hacia el interior del diente, reduciendo el diámetro de la cavidad pulpar de forma continua hasta que la cavidad queda rellena. Paralelamente a este crecimiento en grosor, nuevos odontoblastos se van incorporando los extremos, desarrollando la corona también en un sentido longitudinal. El frente de crecimiento de la dentina presenta por tanto un ángulo oblicuo respecto al eje vertical de la corona, desarrollándose en grosor mientras en el diente continúa creciendo longitudinalmente.

Las tasas de crecimiento de los molares decrecen progresivamente hacia las partes más cervicales del diente, según avanza el estadio de desarrollo dental (Jordana & Köhler, 2011; Kierdorf et al.,

2013; Witzel et al., 2018). Concretamente, en la dentina, las tasas de deposición decrecen en dos direcciones: en dirección longitudinal, de la cúspide al área cervical de la corona, y hacia el interior del diente, según los odontoblastos se alejan de la EDJ (Kahle et al., 2018). De esta forma, la dentina que conforma los incrementos más cercanos a la EDJ y de las partes superiores de la corona, ha sido depositada más rápido y en momentos anteriores que la dentina procedente de partes interiores y más cervicales del diente, formada de forma más lenta y en estadios más tardíos de desarrollo dental (Figura 2).

La principal complicación de DSA está relacionada con la geometría de crecimiento que presenta la dentina. La dirección de aposición en oblicuo es además especialmente acentuada en coronas altas, donde la cavidad pulpar presenta una morfología alargada. El doble desarrollo, en vertical y en grosor, no permite sacar partido fácilmente del crecimiento longitudinal del diente (que es el interesante en coronas altas).

3.3. Protocolos de muestreo de dentina para análisis de colágeno en aplicaciones arqueológicas

Los análisis secuenciales de dentina orientados al análisis del colágeno, se enfrentan a la complicación de obtener muestras de pequeño tamaño que representen reducidos intervalos temporales, y a la vez obtener la suficiente cantidad de muestra necesaria para implementar los protocolos de extracción de colágeno estándares.

Estos protocolos generalmente incluyen: 1) la desmineralización de la muestra mediante HCl (Bocherens et al., 1988, 1991; DeNiro & Epstein, 1978, 1981; Longin, 1971) o EDTA (Tuross, 2012; Tuross et al., 1988); 2) tratamientos limpieza y purificación con NaOH o ultrafiltración, para eliminar proteínas no colagenosas, lípidos, y contaminantes exógenos como los ácidos fúlvicos o húmicos (Ambrose, 1990; Brown et al., 1988; DeNiro & Epstein, 1978, 1981; Guiry & Szpak, 2020; Jørkov et al., 2007); y 3) la solubilización de la muestra a determinada temperatura (entre 70° a 100°C) que permita su homogeneización, y su filtración para eliminar contaminantes (Bocherens et al., 1991; Longin, 1971). La aplicación de estos protocolos debe producir suficiente colágeno para superar el mínimo peso requerido por los espectrómetros de masas para producir valores isotópicos fiables (e.g., 0.3 mg en el caso de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$). Los principales pasos de desmineralización en HCl, tratamiento de NaOH, y la solubilización, son los más sensibles, puesto que pueden desnaturalizar las proteínas, afectando de forma directa al *yield* de colágeno que finalmente se obtiene (Cheung et al., 2022; Chisholm et al., 1983; Collins & Galley, 1998; Liden et al., 1995; Longin, 1971; Semal & Orban, 1995; Szpak et al., 2017).

A lo largo de este apartado se revisan brevemente las principales propuestas metodológicas actualmente disponibles para implementar DSA sobre restos dentales arqueológicos, y cómo se ha solventado en cada caso el dilema que supone equilibrar un muestreo fiel a la dirección de crecimiento de la dentina con el tratamiento de muestras de pequeño tamaño.

3.3.1. Protocolos de DSA desarrollados en restos de fauna

El protocolo de muestreo desarrollado por Balase et al. (2001) y mayoritariamente implementado hoy en día en arqueozoología, secciona todo el lóbulo de un molar mandibular (en este caso de vaca), en dirección cúspide-base. Con el objetivo de limitar la afectación del proceso de desmineralización sobre muestras de pequeño tamaño, el muestreo se realiza después de la

desmineralización del diente por EDTA. Mediante este protocolo se generan unas muestras con peso suficiente para aplicar tratamientos posteriores como el baño de NaOH y la solubilización. Sin embargo, como consecuencia de la estrategia de muestreo (secciones horizontales de todo el lóbulo), las muestras representan largos periodos de tiempo, lo que genera una atenuación de las señales isotópicas que puede hacer difícil interpretar los resultados isotópicos.

De cara a obtener muestras de menor tamaño, y por tanto de mayor resolución temporal, Zazzo et al., (2006) presentaron una propuesta alternativa para el muestreo de molares de bóvidos basada en la aplicación de técnicas de micro-muestreos (*micro-milling*), que permiten hacer muestreos muy precisos (a nivel de micras). Lo aplican sobre secciones transversales al lóbulo del diente, muestreando en dirección EDJ a cavidad pulpar. Se trata de un muestreo preciso, pero el tamaño de la muestra obtenida limita el estudio al análisis de $\delta^{13}\text{C}_{\text{bioapatita}}$. El muestreo se realiza sobre el diente sin desmineralizar, y se obtienen muestras en polvo, y de pequeño tamaño. Además del tamaño, las muestras en polvo tienen la desventaja de que son más susceptibles a la pérdida del colágeno por hidrólisis durante la aplicación de procesos de tratamiento con ácido clorhídrico (Collins & Galley, 1998), lo que imposibilita la desmineralización de las muestras en este protocolo. La reciente propuesta de Uno et al (2020) para implementar análisis intra-dentales de dentina en colmillos de elefante (actuales) también aplican este muestreo por *micro-milling* (100 μm de diámetro de muestra por 1 mm de profundidad), alcanzando una resolución bi-semanal en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{18}\text{O}$, pero donde el análisis está limitado a la fracción inorgánica.

La siguiente propuesta para obtener muestras de menor tamaño se hizo por parte de Kirsanow et al., (2008). En este estudio se realiza la desmineralización previa de todo el lóbulo seleccionado (molares mandibulares de caprinos domésticos), y, a continuación, se aplica un muestreo longitudinal a base de perforaciones de 1 mm de diámetro (*punch tool*) realizadas sobre la faceta bucal. El tamaño de la muestra no permite más tratamientos, y se omite la solubilización. Esta estrategia de muestreo no supone grandes diferencias en cuanto a la resolución temporal obtenida en relación con el protocolo de Balasse et al., (2001) puesto que, aunque la muestra es de menor diámetro, sigue incorporando dentina de todo el grosor del diente, por lo que no soluciona el problema de mezclar dentina formada en distintos momentos de desarrollo.

La propuesta metodológica más reciente se ha hecho por parte de Guiry et al., 2016. Este trabajo está aplicado al análisis de $\delta^{15}\text{N}$ en colmillos de cerdo, pero las dificultades que enfrentan siguen la misma lógica que en el caso de molares hiposodontos: el objetivo es aprovechar la mayor longitud del diente para representar isotópicamente todo su período de formación, pero tratando de evitar la mezcla de dentina y la inclusión de incrementos del interior del diente. De cara a obtener muestras de pequeño tamaño y mayor resolución temporal, estos autores proponen implementar un muestreo secuencial por "*drill*", basado en la realización de surcos por abrasión del diente (de forma similar al protocolo de muestreo de esmalte de Balasse et al 2003). Por las dificultades que implica desmineralizar una muestra de dentina en polvo, Guiry y colegas (2016) proponen analizar los valores de $\delta^{15}\text{N}$ directamente la muestra sin tratar (*raw dentine*), bajo el razonamiento de que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ representarán mayormente la fracción orgánica de la dentina. Sin embargo, este protocolo tiene dos problemas: implica descartar los valores de $\delta^{13}\text{C}$, que principalmente vienen de la fracción inorgánica, y la fiabilidad de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ podría estar comprometida por la presencia de compuestos ricos en nitrógeno exógenos en las muestras, sobre todo en el caso de muestras arqueológicas (Brault et al, 2014).

Posteriormente se ha propuesto una modificación de este protocolo donde las muestras de dentina en polvo obtenidas eran desmineralizadas con una pequeña cantidad de ácido clorhídrico (Guiry

et al., 2018), lo que permitía obtener también unos valores de $\delta^{13}\text{C}$ representativos mayoritariamente del colágeno. No obstante, según el estudio de Losey et al., (2020), donde se aplica este protocolo sobre incisivos de perro, el tamaño de muestra que se obtiene no permite tratamientos adicionales (e.g. tratamiento con NaOH) para eliminar contaminantes exógenos potencialmente presentes tras la exposición de los restos a condiciones post-depositacionales.

No se han hecho más propuestas metodológicas relacionadas con la implementación de análisis secuenciales de colágeno-dentina ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) orientados a su aplicación en arqueozoología. En el caso de otro tipo de denticiones, recientemente algunos estudios han aplicado protocolos previamente desarrollados para humanos a molares de perro (Rogers et al., 2019), aunque estos protocolos no parecen potenciales de generar una mayor resolución en molares de coronas altas, debido a las diferentes geometrías de crecimiento de la dentina existente entre estas denticiones.

3.3.2. Los protocolos de DSA desarrollados para molares humanos

A lo largo de las últimas décadas, los análisis secuenciales de dentina han visto una gran profusión en su aplicación sobre restos humanos arqueológicos. Las propuestas metodológicas han sido abundantes (e.g. Beaumont et al., 2013, 2014; Curtis et al., 2022; Czermak et al., 2018, 2020; Eerkens et al., 2011; Fernández-Crespo et al., 2018), y estos análisis son hoy en día implementados frecuentemente en conjuntos arqueológicos (e.g. Beaumont & Montgomery, 2016; Eerkens et al., 2018; Fernández-Crespo et al., 2020; Goude et al., 2020; Stantis et al., 2021). La mayoría de estas aplicaciones han estado orientadas a caracterizar la dieta de los primeros años de vida de los individuos, con especial atención al proceso de lactancia y destete. Por ello, estas aplicaciones de DSA han tenido como objetivo el análisis de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ del colágeno. El uso de $\delta^{15}\text{N}$ en muestras de colágeno, a menudo en combinación con los valores de $\delta^{13}\text{C}$, han sido ampliamente explorado como indicador de procesos de lactancia materna y destete en poblaciones humanas arqueológicas, tanto a partir de muestras de colágeno óseo (e.g. Katzenberg & Pfeiffer, 1995; Nitsch et al., 2011; Richards et al., 2002; Schurr, 1997) como a partir de análisis incrementales de dentina, que permiten inferir con mayor resolución temporal el proceso de destete (e.g. Beaumont et al., 2013; Czermak et al., 2018; Eerkens et al., 2011; Fernández-Crespo et al., 2020; Henderson et al., 2014).

De forma breve, son dos los protocolos de muestreo secuencial de dentina que comúnmente se aplican actualmente en humanos: por secciones (*micro-slices*) o por perforaciones (*micro-punches*) (Cheung et al., 2022). La base de estos protocolos es que implementan el muestreo después de la desmineralización del diente (Eerkens et al., 2011; Beaumont et al., 2013) evitando así la afectación de las muestras pequeñas a un proceso de desmineralización post-muestreo (similarmente al protocolo desarrollado en vacas por Balasse et al., 2001). La desmineralización pre-muestreo del diente (o una porción del mismo) se realiza comúnmente con HCl, y en esta fase se incluye a menudo también un baño de NaOH para eliminar ácidos húmicos o fúlvicos (e.g. Czermak et al., 2020; Scharlotta et al., 2018)

Generalmente, se prepara la porción del diente que desea muestrearse antes de su desmineralización, para minimizar la mezcla de incrementos que se produce durante el muestreo. Una práctica común en este sentido es cortar el diente a modo de secciones longitudinales (de unos 2 mm de grosor), sobre las que se realiza después el muestreo una vez han sido desmineralizadas (Czermak et al., 2018; Eerkens et al., 2019; Fernández-Crespo et al., 2018). Muestrear sobre estas secciones, facilita seguir el eje de crecimiento de la dentina, y se reduce la cantidad de incrementos que son muestreados, obteniéndose una mayor resolución temporal. El

muestreo se realiza bien mediante la realización de secciones horizontales (1 a 2 mm) mediante un bisturí (*micro-slices*) (Beaumont et al., 2013; Czermak et al., 2018; Eerkens et al., 2011, 2019) o bien por perforaciones mediante instrumental para biopsias (*punch tool*), que permite obtener muestras muy pequeñas y además de forma sistemática (1 mm diámetro) (Czermak et al., 2020; Fernández-Crespo et al., 2018, 2020).

El segundo protocolo de muestreo (*micro-punches*) omite la solubilización, lo que permite obtener muestras de mucho menor tamaño durante la fase de muestreo. Las muestras son analizadas directamente tras el muestreo o tras la aplicación de un ligero tratamiento de HCL (Czermak et al., 2020). La omisión de la solubilización no afecta *per se* a la integridad de los valores isotópicos obtenidos a partir de muestras de dentina previamente desmineralizadas (Beaumont et al., 2014; Cheung et al., 2022). Sin embargo, la afectación que puede tener la solubilización, sobre los valores isotópicos del colágeno (Sealy et al 2014; Cheung, et al 2022; Beaumont et al 2014), ha de tenerse en cuenta a la hora de comparar directamente resultados obtenidos con o sin solubilización.

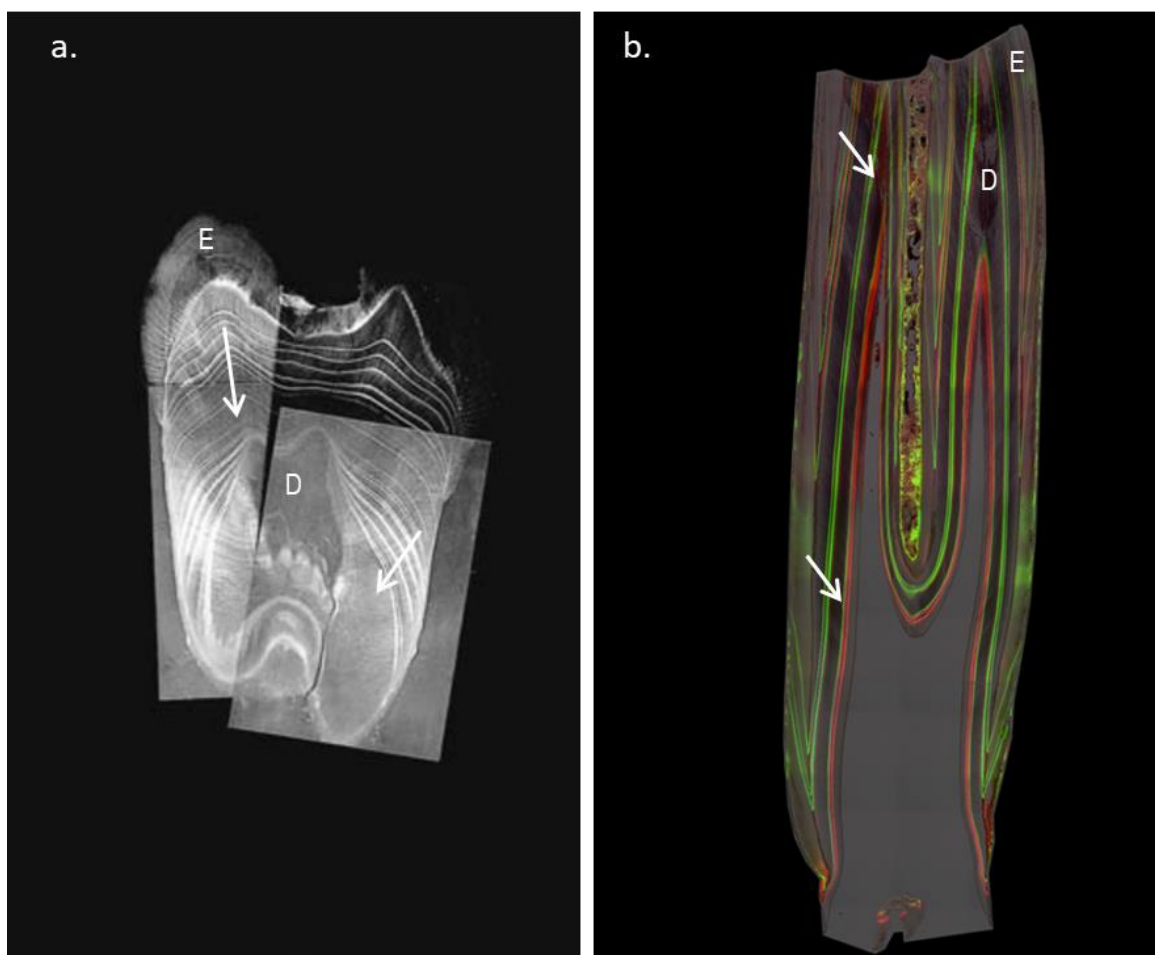


Figura 3. Trabajos de histología dental que muestran la dirección de crecimiento de la dentina en molares humanos (a) (Dean, 2000; Fig.9.5., pp. 125) y en molares de ovejas (b) (Witzel et al., 2018; Fig. 2, pp. 6). Los incrementos están representados a partir de marcadores de tetraciclina que representan episodios de mineralización. Las imágenes muestran secciones buco-linguales de los molares, donde E es esmalte y D es dentina. Las flechas marcan la dirección de deposición de los incrementos; nótese la dirección de crecimiento diferencial entre ambos tipos de molares.

Hoy en día, únicamente hay un estudio que aplica protocolos de DSA desarrollados para molares humanos a otras especies animales (Rogers et al., 2019), que aplica un muestreo por secciones a un molar de cánido. Sin embargo, estos protocolos no parecen adecuados para obtener mejoras significativas (mayor resolución temporal) en la aplicación de DSA en molares hipsodontos, por varios factores. En molares de coronas altas, los incrementos siguen una dirección de deposición mucho más oblicua a la cavidad pulpar que en molares bunodontos, donde únicamente los extremos de las raíces pueden llegar a presentar un ángulo similar (Figura 3). La adaptación de un muestreo manual y por secciones a esta geometría de las coronas altas es extremadamente complicado, en tanto que los incrementos pueden estar acumulados en un grosor de 1 a 2 mm, y además dificultaría realizar un muestreo homogéneo y sistemático entre diferentes individuos, incluso utilizando como referencia una imagen de microscopio realizada a partir de una lámina delgada del diente (Czermak et al., 2018). Por su parte, en molares de coronas altas, las morfologías curvas de cada cúspide (en forma de luna creciente desde su vista cenital) impide generar una sección buco-lingual del diente de suficiente grosor para muestrear mediante perforaciones: el grosor de esta sección en coronas altas afectará mucho más a la resolución temporal obtenida que en molares humanos. Ésto, unido al diámetro de la herramienta (1mm) respecto al total del grosor de la dentina, no parece indicar que el protocolo de *micro-punches* permita obtener una resolución apropiada para estas denticiones.

3.4. Comentarios finales: la adaptación del muestreo a coronas altas

La principal complicación que enfrenta la aplicación de técnicas de DSA en coronas altas está relacionada con la geometría particular de crecimiento que presenta la dentina en este tipo de molares. El desarrollo en oblicuo no permite sacar ventaja fácilmente del crecimiento longitudinal del diente (que es el interesante en estas denticiones), y los muestreos que atraviesan todo el grosor de la dentina (e.g. Balasse et al., 2001, y Kirsanow et al., 2008) generan una atenuación de los valores isotópicos, y una representación distorsionada de los cambios isotópicos en las secuencias. Por su parte, los protocolos que muestrean todo el grosor de la dentina complican la comparabilidad de los resultados entre individuos con distinto grado de desarrollo de la dentina en grosor (i.e. con distinta edad de muerte), lo que supone una limitación en su aplicación a conjuntos arqueológicos donde el número de individuos disponibles puede ser limitado.

Lo más apropiado sería implementar protocolos tipo *drill* (Guiry et al., 2016, 2018) a lo largo del eje longitudinal del diente, que eviten la inclusión de dentina interna a la vez que se saca ventaja del crecimiento prolongado que presentan las coronas altas. No obstante, estos protocolos han de hacer frente a la desmineralización y tratamiento de muestras en polvo y de pequeño tamaño que permitan obtener valores isotópicos del colágeno. La aplicación de técnicas de DSA en arqueozoología en general, y en molares de coronas altas en particular, se ha visto en parte limitada por la escasez de trabajos metodológicos centrados en solventar estos aspectos. El desarrollo de protocolos de muestreo mejor adaptados al crecimiento de coronas altas facilitaría la interpretación de los resultados isotópicos y podría impulsar la aplicación de DSA en problemáticas arqueozoológicas.

CAPÍTULO II

Proyecto de tesis y objetivos

El contexto es esencial en arqueología, y dotar de resolución espacial, pero también temporal, a los procesos sociales que se pretende estudiar es fundamental para obtener aproximaciones realmente representativas. La integración de análisis biogeoquímicos en arqueología ha permitido explorar las condiciones de vida de las poblaciones (humanas, animales y vegetales) desde nuevas perspectivas. La posibilidad de implementar esta aproximación a partir de análisis que tienen en consideración las dinámicas de crecimiento de los tejidos analizados abre, además, la posibilidad de representar a escalas temporales, y realmente operativas, éstos aspectos.

Esta tesis doctoral parte de la premisa de que los análisis secuenciales de dentina son una herramienta analítica útil para contribuir a la construcción de conocimiento histórico, y que su aplicación a conjuntos arqueozoológicos puede ayudar a la resolución de problemáticas concretas. El presente proyecto de tesis persigue contribuir a resolver la problemática actual por la cual hay una escasa aplicación de estos análisis en arqueozoología, concretamente en especies hipsodontas, y que se relaciona con la escasez de trabajos metodológicos desarrollados hasta el momento. El propósito es contribuir al desarrollo metodológico de estos análisis, dotar al método de un cuerpo de datos de referencia que promuevan su aplicación en estudios arqueozoológicos, y evaluar sus posibilidades en la reconstrucción de las condiciones de vida de poblaciones animales del pasado.

La tesis tiene como objetivo general resolver determinadas limitaciones técnicas y metodológicas que enfrenta la implementación de protocolos de DSA en especies con denticiones hipsodontas y molares de coronas altas, y especialmente cuando se orientan al análisis isotópico de la fracción orgánica de la dentina (i.e. colágeno). Estas limitaciones se relacionan esencialmente con la resolución temporal e isotópica que se obtiene a partir de las estrategias de muestreo actualmente disponibles para este tipo de denticiones, la cual complica la interpretación de los resultados. Para contribuir a resolver estas limitaciones, se persiguen los siguientes objetivos concretos:

- (1) Definir la resolución del protocolo de muestreo y análisis secuencial de colágeno generalmente implementado hasta ahora en estudios arqueozoológicos (Balasse et al 2001), y en concreto en su aplicación a molares de ovejas, puesto que no hay estudios disponibles que definan su resolución en taxones de este tamaño. El objetivo es comprender cómo las variaciones de la señal isotópica de la alimentación (concretamente composición de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) y registradas en la dentina, se representan en los resultados isotópicos obtenidos a lo largo de la secuencia intra-dental. Definir esta relación *-input* isotópico original y composición isotópica de las muestras- es esencial para posibilitar la interpretación de los resultados que se obtienen a partir de este protocolo de muestreo. De forma específica, se busca definir esta relación a dos niveles:

a nivel isotópico, evaluando la atenuación del input isotópico original; y a nivel temporal, evaluando cómo determinados periodos temporales se representan en las secuencias intra-dentales finalmente obtenidas.

- (2) Desarrollar un nuevo procedimiento de muestreo secuencial que facilite la lectura e interpretación de los resultados isotópicos al aplicar análisis de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (colágeno) en molares de coronas altas. El objetivo es desarrollar una estrategia de muestreo que se adapte mejor a la dirección de crecimiento del diente, que permita obtener muestras de colágeno de mayor resolución temporal e isotópica, y que permita obtener unos resultados isotópicos que sean independientes al grado de desarrollo de la dentina en grosor (i.e. independientes al estadio de desarrollo del diente). De forma específica, el objetivo es desarrollar un procedimiento de muestreo que no atraviese todo el grosor de la dentina, y que reduzca el intervalo temporal que reflejan las muestras.
- (3) Evaluar la capacidad del análisis secuencial de dentina-colágeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) para contribuir a una problemática arqueozoológica concreta: la gestión de los caprinos domésticos, y de forma concreta las ovejas, para su explotación lechera, a partir del estudio de la gestión de la lactancia y el destete de los individuos infantiles. El objetivo es valorar si el nuevo procedimiento de muestreo tiene la resolución necesaria para estudiar estos procesos en estos taxones, a partir de valorar tres aspectos esenciales:
 - El método permite reconocer y distinguir patrones de destete a partir de los resultados isotópicos
 - El método permite atribuir información temporal a los resultados isotópicos obtenidos; es decir, no sólo reconocer variaciones isotópicas en las secuencias sino situarlas también temporalmente a lo largo del periodo de desarrollo dental, y del periodo de vida del individuo analizado
 - El método permite obtener unos resultados isotópicos comparables entre elementos dentales con distinto grado de grosor de la dentina (i.e. entre individuos con distinto estadio de desarrollo dental)

Para alcanzar esta serie de objetivos, a lo largo de esta tesis se desarrollan y evalúan distintos procedimientos de muestreo y análisis secuencial de dentina ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ del colágeno), y a partir del estudio de una población moderna de ovejas domésticas (*Ovis aries*). Se trata de un conjunto de ovejas criadas de forma experimental, donde se controlan las condiciones de vida y de alimentación de los individuos, y donde el input isotópico es conocido. El uso de este tipo de poblaciones modernas criadas bajo control es imprescindible para poder abordar los objetivos planteados.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

CAPÍTULO III

Materiales y métodos

1

El programa experimental SUMA II

Desde el año 2017, se han desarrollado varios programas de experimentación bioarqueológica a partir de rebaños de ovejas domésticas (*Ovis aries*), criadas en los Servicios de Granjas y Campos Experimentales de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Estos experimentos tienen el objetivo de generar conjuntos de datos referenciales de apoyo para estudios bioarqueológicos que persiguen la aplicación de diversos análisis tales como el mesodesgaste y microdesgaste dental, el análisis patologías óseas, el análisis de isótopos estables en tejidos animales o vegetales, o el análisis de fitolitos.

Los Servicios de Granjas y Campos Experimentales (SGCE) son una unidad de apoyo técnico a la docencia y la investigación realizadas en la UAB y u otros centros de investigación externos, donde se mantienen y crían diversas especies animales, principalmente domésticas. Los rebaños criados en estas instalaciones permiten desarrollar programas experimentales donde controlar en detalle los parámetros de interés, relacionados con el metabolismo o fisiología animal, o aspectos específicos de sus condiciones de nutrición y alimentación. Este nivel de control de los parámetros permite generar un corpus de datos de gran utilidad para el desarrollo de investigación bioarqueológica relacionada con el registro de determinadas condiciones de vida y/o alimentación en los tejidos esqueléticos animales. Durante los últimos años, diversos rebaños de diferentes razas ovinas (Ripollesa, Manchega, Lacaune) y con diferentes regímenes de alimentación y movilidad han sido involucrados en el desarrollo de varios programas experimentales con diversos objetivos y líneas de estudio bioarqueológicas (eg. Gallego-Valle et al., 2020). El diseño y la ejecución de estos programas fueron llevados a cabo bajo la supervisión y asesoramiento del personal veterinario responsable, siguiendo los protocolos establecidos por el SGCE y Comité de Ética en Experimentación Animal de la UAB.

Concretamente, entre febrero de 2017 y noviembre de 2018, se desarrolló un programa experimental a partir de un rebaño de ovejas de raza Ripollesa, criado en exclusivo régimen de estabulación. Este programa se enmarcaba en el proyecto de investigación *Integrated analysis on transhumance activities in the Eastern Pyrenees: enhancing mountain Cultural Landscapes*, dirigido por Dres. J.M. Palet y C. Tornero, y financiado por CERCA a través del programa SUMA(R3) (SUMA-R3-2017-2). A este programa experimental se le denominó SUMA II, y fue diseñado específicamente para investigar ciertos aspectos metodológicos relacionados con el registro isotópico de ciertas condiciones de alimentación en los tejidos dentales, pero también con otros estudios relacionados con el meso y microdesgaste dental (Gallego-Valle et al., 2020), y el análisis

de fitolitos (muestras de heces) (Burguet et al., inédito) realizados sobre el mismo rebaño. El régimen de estabulación permitía hacer un control exhaustivo de las condiciones de alimentación de los individuos. El programa experimental se llevó a cabo con un rebaño de 12 individuos (*Ovis aries*), y alterna 2 etapas principales. La primera etapa corresponde a los primeros 8 meses de vida, donde se controlan aspectos como el momento de nacimiento, el momento de destete, y la alimentación de los especímenes. La segunda etapa comprende los últimos 12 meses de vida de los individuos, desde noviembre de 2017 hasta noviembre de 2018. Durante esta segunda etapa se realizaron además muestreos periódicos de agua y forrajes de cara a controlar también la composición isotópica de la alimentación y del agua ingeridas, así como muestreos de heces para el análisis de fitolitos.

De aquí en adelante, el programa experimental realizado con este rebaño de 12 ovejas entre 2017 y 2018 será referido como SUMA II. Únicamente se presentan los datos del experimental relacionados con los estudios isotópicos realizados en esta tesis doctoral.

1.1. El rebaño de *Ovis aries* estudiado en SUMA II

El programa experimental SUMA II fue desarrollado con un rebaño de 12 especímenes de *Ovis aries* nacidos en fechas similares (máximo tres semanas de diferencia). El conjunto experimental de ovejas se mantuvo en régimen de estabulación dentro las instalaciones del SGCE, con condiciones de vida y alimentación controladas (Figura 1). La ejecución del experimental se desarrolló bajo supervisión del personal veterinario responsable, y siguiendo los protocolos establecidos por el SGCE y el Comité de Ética en Experimentación Animal (CERec-UAB).



Figura 1. Ovejas de raza Ripollesa en las instalaciones del SGCE de la UAB.

Los ejemplares de *Ovis aries* eran todas hembras y de raza Ripollesa. La Ripollesa es una raza autóctona del Pirineo catalán y el nordeste de Catalunya, tradicionalmente orientada a la cría de corderos y la producción cárnica. Es una raza de tamaño mediano, con pesos entorno a los 50 kg (hembras) y 70 kg (machos) en estado maduro, que presenta unas características manchas negras en las cabezas y patas (Esquivelzeta et al., 2011). Esta raza es considerada una raza “primitiva” o *unimproved* (EFSA, 2014), lo que las hace especialmente atractivas para la investigación arqueológica, puesto que es potencial de mostrar características osteológicas o dentales (tiempos de formación, sutura, erupción, etc.) más similares a poblaciones pre-industriales en oposición a muchas razas recientes que presentan ratios de crecimiento muy altos producto de la acumulación

de procesos de selección artificial (Upex & Dobney, 2012; Witzel et al., 2018). Hoy en día la cría y explotación de Ripollesa ha disminuido de forma significativa y su presencia en la industria ganadera es minoritaria, en gran medida como resultado del progresivo descenso en la producción ovina de las últimas décadas (Milán et al., 2003).

Todos los especímenes (N=12) nacieron entre el 28 de febrero y el 15 de marzo de 2017, con menos de tres semanas de diferencia entre cada uno de los nacimientos. Los primeros dos meses de vida, los corderos permanecieron estabulados junto a las madres, con lactancia natural. A los dos meses de vida, los corderos fueron destetados y separados de las madres, y pasaron a formar un sólo rebaño que fue criado bajo condiciones exclusivas de estabulación. Estos primeros meses de vida, relacionados con el período de lactancia, destete y primera alimentación post-destete, conformaban la primera etapa del experimental (apartado 1.2). A partir de noviembre de 2017, se inició la segunda etapa, que cubría los últimos doce meses de vida de los individuos y durante la cual los forrajes fueron muestreados y analizados isotópicamente ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) (apartado 1.3).

El sacrificio de las ovejas del rebaño experimental se organizó en dos grupos (Tabla 1). El grupo 1 (N=6) fue sacrificado escalonadamente en diferentes momentos, entre enero y mayo de 2018, entre los 10 y los 15 meses de edad. El grupo 2 (N=6), fue sacrificado varios meses más tardes, en noviembre de 2018 (en diferentes sesiones), a los 20.5 -21 meses de vida. Todos los especímenes fueron sacrificados en la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria por parte del personal profesional de la misma, siguiendo los protocolos establecidos (SGCE y Comité de Ética en Experimentación Animal de UAB).

A los especímenes se les atribuye un código de identificación basado en una numeración consecutiva en función de la fecha de sacrificio (OV-01 a OV-12). Esta referencia será la utilizada de aquí en adelante para hacer referencia a los distintos especímenes objeto de estudio. La relación de esta numeración con los códigos de identificación del SGCE (sistema de identificación por crotal establecido de acuerdo a la legislación vigente relacionada con la trazabilidad del ganado ovino) se muestra en la Tabla 1.

	ID (este estudio)	ID (SGCE)	Vet ID 2	Sexo	Raza	Nacimiento	Eutanasia	Edad (meses)	Edad(días)
Grupo 1	OV-01	705	170067	H	Ripollesa	03/03/2017	19/12/2017	9,7	291
	OV-02	702	170022	H	Ripollesa	28/02/2017	18/01/2018	10,8	324
	OV-03	712	170122	H	Ripollesa	15/03/2017	01/03/2018	11,7	351
	OV-04	707	170100	H	Ripollesa	08/03/2017	03/04/2018	13	391
	OV-05	708	170101	H	Ripollesa	08/03/2017	04/05/2018	14,1	422
	OV-06	701	170020	H	Ripollesa	28/02/2017	31/05/2018	15,2	457
Grupo 2	OV-07	704	170048	H	Ripollesa	02/03/2017	07/11/2018	20,5	615
	OV-08	711	170110	H	Ripollesa	09/03/2017	07/11/2018	20,3	608
	OV-09	703	170037	H	Ripollesa	01/03/2017	14/11/2018	20,8	623
	OV-10	710	170109	H	Ripollesa	09/03/2017	14/11/2018	20,5	615
	OV-11	706	170080	H	Ripollesa	05/03/2017	21/11/2018	20,9	626
	OV-12	709	170106	H	Ripollesa	09/03/2017	21/11/2018	20,7	622

Tabla 1. Individuos del rebaño SUMAll: códigos de identificación (de este estudio y del SGCE), fechas de nacimiento y eutanasia, y edad en el momento de sacrificio.

1.2. Primera etapa: lactancia, destete y primera alimentación post-destete

La primera etapa del experimental cubre los principales hitos en la vida y alimentación de los corderos vinculados con el período de lactancia y con el proceso de destete. Se registra la alimentación proporcionada durante el destete, el momento y el tipo de destete (destete temprano), así como la alimentación proporcionada durante los primeros meses tras el destete. Un esquema de las dos etapas del experimental y los períodos de alimentación se muestra en la Figura 2.

Durante los primeros dos meses de vida, los corderos permanecen con las madres, a base de lactancia materna. A partir del primer mes de vida, cuando aún están mamando, se les proporciona también formulado y heno de alfalfa (*Medicago sativa*), con el objetivo de iniciar la alimentación sólida antes del destete. La incorporación de sólido a la dieta antes del destete, es una condición imprescindible para estimular la adaptación del sistema digestivo al consumo de alimento sólido e iniciar la activación del rumen (Lynch et al., 1992). A los dos meses de vida, los corderos fueron destetados de forma abrupta mediante la separación de la madre, y todos los corderos pasaron a formar un mismo rebaño, alimentados a base de una mezcla de alfalfa y pienso proporcionado *ad libitum*. El pienso se proporciona hasta que los corderos tienen cuatro a cinco meses de vida, y a partir de entonces se alimentan únicamente a base de alfalfa. El pienso proporcionado a los corderos desde el segundo al quinto mes de vida, es un pienso de engorde formulado. Tiene un 15.6% de contenido de proteína, y está compuesto por una mezcla de plantas C₃ y C₄, incluyendo maíz, cebada, harina de soja, trigo, melaza de caña de azúcar y aceite de soja.

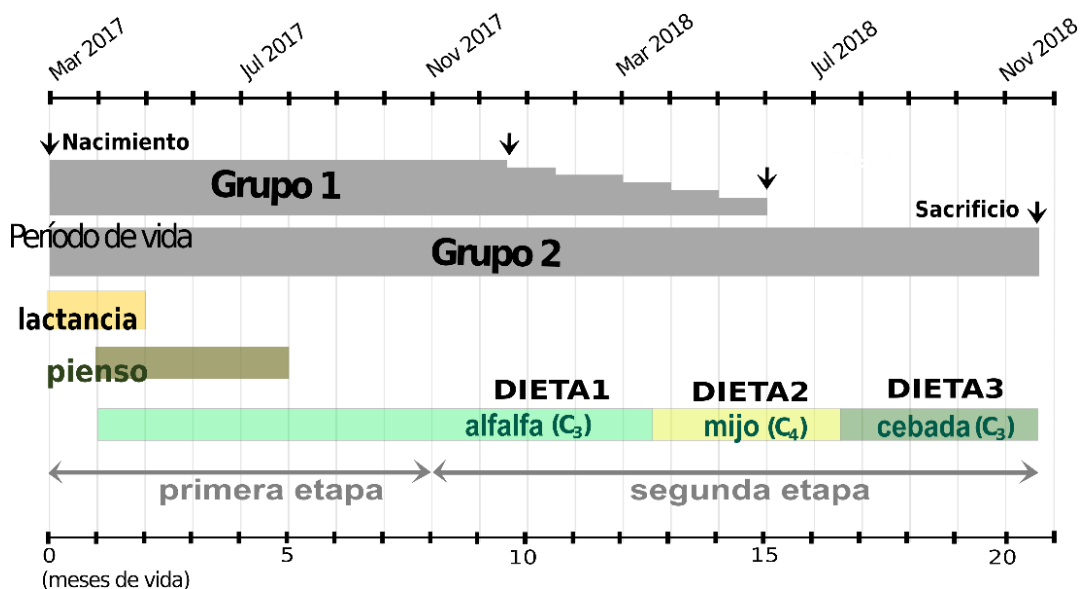


Figura 2. Esquema del desarrollo del experimental: períodos de vida del grupo 1 y grupo 2, etapas del experimental, y régimen de alimentación. Nota: los meses de vida de los individuos son aproximados pues éstos presentan distinta fecha de nacimiento.

1.3. Segunda etapa: alternancia de dietas monoespecíficas y muestreo de forrajes

A partir de noviembre de 2017, cuando los corderos tienen entre 7,5 y 8 meses de edad, se inició la segunda etapa del experimental. Esta segunda etapa cubre un período de 12 meses durante el

cual se controló en detalle el input isotópico de las ovejas a partir de muestreos periódicos de los forrajes. Tiene el objetivo de evaluar cómo las señales isotópicas de la dieta son registradas en los dientes durante el desarrollo dental (concretamente los segundos y terceros molares). Se alternaron tres periodos de dieta isotópicamente diferentes entre sí. Tres parámetros principales fueron controlados: la composición isotópica de la dieta, el momento en el que se producen los cambios de dieta, y la edad de muerte de los individuos.

1.3.1. Periodos de dieta y muestreo de forrajes

Para el desarrollo del experimental se programaron tres periodos de dieta sucedidos a lo largo de los doce meses del experimental, desde noviembre de 2017 a noviembre de 2018. Se trata de tres periodos de dieta monoespecificos (i.e. formados por una única especie de planta), basado cada uno en una especie forrajera diferente:

- DIETA1. Compuesta por alfalfa (*Medicago Sativa*) en forma de heno. Desde el 1/11/2017 hasta el 22/03/2018: periodo de 4,6 meses (141 días). Puesto que la alimentación previa al inicio del programa consistía en alfalfa (ver apartado 1.3), este primer periodo de dieta realmente se extiende durante un periodo de 8,5 meses.
- DIETA2. Compuesta por mijo menor (*Setaria italica*) en forma de heno. Desde el 22/03/2018 hasta el 10/07/2018: periodo de 3,6 meses (110 días).
- DIETA3. Compuesta por cebada (*Hordeum vulgare*) en forma de paja y grano. Desde el 10/07/2018 hasta el sacrificio del individuo: periodo de 3.9 a 4,4 meses según el individuo (120 a 134 días).

La Tabla 2 resume la información básica de los tres periodos de dieta. El forraje era proporcionado por compañías agrícolas locales a través de balas de heno o paja numeradas. El origen del forraje era relativamente estable durante cada periodo de dieta: cada tipo de forraje procedía de un mismo proveedor y de un mismo lote. El forraje se proporcionaba diariamente en los comederos del rebaño donde las ovejas comían *ad libitum*. Tanto la alfalfa como el mijo, se proporcionaba en forma de heno, por lo que incluía toda la planta. La cebada se proporcionaba en forma de paja (mayormente hojas y tallos), pero se complementaba diariamente con 1 kg de grano por espécimen. El suplemento de grano fue recomendado por el personal técnico del SGCE para contrarrestar el bajo aporte nutricional de la cebada. Los dos cambios de dieta que separan estos tres periodos de alimentación se llevaron a cabo de forma abrupta el 22/03/2018 y el 10/07/2018, cuando las ovejas tenían 12 y 16 meses de edad, respectivamente.

Los tres periodos de dieta fueron diseñados para conformar dietas monoespecificas (i.e. están compuestas por una única especie de planta), de cara a favorecer la comprensión del registro de la señal isotópica en los tejidos analizados: una composición isotópica similar a lo largo de todo el periodo y una única y constante fuente de carbono y nitrógeno. Además, la alternancia de las tres especies de plantas, fue diseñada para proporcionar diferentes concentraciones isotópicas en el input de la alimentación de los individuos a lo largo del programa.

La elección de las tres especies forrajeras y el orden de sucesión de las mismas fue diseñada en base a la señal isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ que era esperable obtener del análisis isotópico de estas especies. Por un lado, los tres periodos fueron programados en un esquema de alternancia de especies con diferente vía fotosintética del carbono, siguiendo un esquema de plantas tipo $\text{C}_3\text{-C}_4\text{-C}_3$, esperando obtener altas diferencias en la concentración isotópica del carbono entre cada una de las dietas. La alfalfa (*Medicago sativa*) y la cebada (*Hordeum vulgare*) son plantas con vía

fotosintética del carbono tipo C_3 , un tipo de plantas que presentan una composición más empobrecida en ^{13}C (valores más bajos de $\delta^{13}C$) que la plantas con de tipo C_4 , como el mijo menor empleado en la DIETA2 (*Setaria italica*) (Farquhar et al., 1989; O'Leary, 1981). Se esperaba, por tanto, que plantas tipo C_3 como la alfalfa y la cebada (DIETA1 y DIETA3), mostrasen una composición isotópica en torno a -26‰ en sus valores de $\delta^{13}C$ (rangos C_3 entre -22 a -34‰), mientras el mijo menor (DIETA2), una planta de tipo C_4 , presentaría valores de $\delta^{13}C$ en torno a -12.5‰ (Vogel & Van der Merwe, 1977). Por su parte, la alfalfa es además una planta leguminosa. Las leguminosas son plantas fijadoras de N_2 (*N₂-fixing-plants*), un tipo de plantas que presentan un fraccionamiento mínimo en su proceso de asimilación del nitrógeno y por tanto presentan valores de $\delta^{15}N$ significativamente reducidos (normalmente próximos al 0‰) (Kohl & Shearer, 1980; Virginia & Delwiche, 1982). Se esperaba que presentase los valores más bajos de $\delta^{15}N$ en relación con las otras dos especies forrajeras.

Con el objetivo de controlar la composición isotópica de la alimentación a lo largo del experimental, se realizaron muestreos periódicos del forraje proporcionado a lo largo de los tres periodos de dieta (alfalfa, mijo menor y cebada). Aunque se trataba de dietas basadas en una única especie de plantas, su muestreo periódico persigue obtener un registro de la variabilidad isotópica intra-específica de cada uno de los forrajes suministrados. Los muestreos se realizaron entre noviembre de 2017 y noviembre de 2018, aproximadamente cada 15 días, y se realizaban a partir del forraje recogido directamente de los comederos (en el caso de la cebada, paja y grano por separado).

Período	Duración (meses)	Meses de vida (edad individuos)	Especie forrajera			Forraje	
DIETA1	01/11/2017 - 22/03/2018 (4.6 m)	8 a 13	Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	C_3 - leguminosa	Heno	<i>Ad libitum</i>
DIETA2	22/03/2018 - 10/07/2018 (3.6 m)	13 a 16	Mijo menor	<i>Setaria italica</i>	C_4 - gramínea	Heno	<i>Ad libitum</i>
DIETA3	10/07/2018 - 21/11/2018 (4.4 m)	16 a 20	Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	C_4 - gramínea	Paja	<i>Ad libitum</i>
						Grano	1 kg diario

Tabla 2. Alternancia de dietas mono-específicas de la segunda etapa: periodos de duración, meses que abarcan en el período de vida de los individuos, especie forrajera empleada y tipo de forraje proporcionado.

1.4. Composición isotópica de los forrajes (segunda etapa)

Un total de 52 muestras de los forrajes fueron seleccionadas para analizar su composición isotópica ($\delta^{13}C$ y $\delta^{15}N$). Las muestras corresponden a los cuatro componentes principales de los tres periodos de dieta monoespecíficos de la segunda etapa: alfalfa (N=15), mijo menor (N=9), cebada-paja (N=12) y cebada-grano (N=16).

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo por parte de la Dr. Mònica Aguilera en las instalaciones del Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal -AGROTECNIO de la Universidad de Lleida (Lleida). Cada muestra incluía un mínimo de 5 individuos, e incluía una representación de todas las partes de la planta en el caso de la alfalfa y el mijo, de las hojas y tallos en el caso de la paja de cebada, y de todo el grano en el caso de los granos de cebada. El objetivo

de este muestreo era obtener un promedio de todo el rango de variabilidad isotópica intra-individual relacionada con la potencial diferencia en las señales de las distintas partes anatómicas de la plana (tallo, raíz y hojas) (Codron et al., 2005; Heaton, 1999; Lightfoot et al., 2016). Las muestras fueron secadas en una estufa, molidas, pesadas y encapsuladas en cápsulas de estaño para su posterior análisis isotópico.

El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Análisis de Isótopos Estables (LAIE) del Instituto de Ciencia y Tecnología Ambiental (ICTA-UAB). El contenido de carbono (%C), el contenido de nitrógeno (%N), y los ratios isotópicos de carbono ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) y nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) de las muestras de forraje fueron analizados utilizando un analizador elemental Thermo Flash 1112, acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS) con un preparador Conflo III. Los resultados de los análisis isotópicos y elementales de las muestras de forraje se incluyen en el Anexo I.

Un sumario de los resultados isotópicos de los forrajes suministrados a las ovejas a lo largo de los tres períodos de alimentación se muestra en la Tabla.3. La alfalfa (DIETA1), el mijo (DIETA2), y la cebada-paja (DIETA3) presentan unos valores promedio de $\delta^{13}\text{C}$ de $-29,4 \pm 0,3\text{‰}$, $-13,1 \pm 0,3 \text{‰}$, y $-28,2 \pm 0,4\text{‰}$, respectivamente. En cuanto a los valores de $\delta^{15}\text{N}$, la alfalfa, el mijo y la cebada-paja, presentan unos valores de $+2,7 \pm 1,3\text{‰}$, $+11,8 \pm 0,7\text{‰}$ y $+3,6 \pm 1,8 \text{‰}$, respectivamente. El mijo es el componente con valores más altos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. Las muestras de cebada-grano presentan valores más altos que las muestras de cebada-paja, tanto en $\delta^{13}\text{C}$ ($-25.6 \pm 0.1\text{‰}$) como en $\delta^{15}\text{N}$ ($+7.5 \pm 0.3\text{‰}$).

		N	$\delta^{13}\text{C} \text{‰}$				$\delta^{15}\text{N} \text{‰}$			
			Prom.	SD	Min	Max	Prom.	SD	Min	Max
DIETA1	Alfalfa	15	-29,4	0,3	-30,0	-29,0	+2,7	1,3	-0,5	+4,9
DIETA2	Mijo	9	-13,1	0,3	-13,5	-12,6	+11,8	0,7	+10,6	+12,8
DIETA3	Cebada -paja	12	-28,2	0,4	-28,7	-27,5	+3,6	1,8	+1,5	+7,0
	Cebada -grano	16	-25,6	0,1	-25,8	-25,4	+7,5	0,3	+7,1	+8,2

Tabla 3. Resultados isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) de los componentes de los tres períodos de alimentación.

Las dos especies de plantas de tipo C_3 , alfalfa y cebada, muestran grandes diferencias en los valores de $\delta^{13}\text{C}$ con respecto a la especie C_4 (mijo), tanto en sus valores de $\delta^{13}\text{C}$ como en $\delta^{15}\text{N}$ (Figura 3). El contenido en ^{13}C de las tres especies está en concordancia con las diferentes vías fotosintéticas de las plantas tipo C_3 y C_4 (Farquhar et al., 1989; Kohn, 2010). Ambas especies de plantas C_3 , presentan valores de $\delta^{13}\text{C}$ alrededor de -28‰ (-25‰ en el caso del grano).

En cuanto a la composición isotópica del nitrógeno, la alfalfa muestra los valores de $\delta^{15}\text{N}$ más bajos, en concordancia con su condición de planta leguminosa fijadora de nitrógeno (Kohl & Shearer, 1980; Virginia & Delwiche, 1982). Las diferencias presentes entre los valores de $\delta^{15}\text{N}$ del mijo y de la cebada, ambas especies gramíneas (*Poaceae*), probablemente esté relacionada con la diferente composición isotópica del suelo existente entre campos de cultivo, tanto por la abundancia natural de ^{15}N en los suelos, como por un uso diferencial (tipo e intensidad) de fertilizantes y abonos entre cultivos (Bogaard et al., 2007; Handley et al., 1999; Handley & Scrimgeour, 1997; Treasure et al., 2016). Es común encontrar el mijo menor o *paniset* cultivado en campos intensamente abonados, posiblemente relacionado con la mayor respuesta del mijo a la fertilización del suelo en términos

de producción de heno y grano, en relación con otras especies de gramíneas (Terra et al., 2000). Esta misma explicación relacionada con los flujos de ^{15}N en los suelos, aplica también a la variabilidad intra-específica (entre muestras de una misma especie forrajera) existente en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ (Figura 3), puesto que diferentes balas de heno y de paja fueron empleadas a lo largo de cada uno de los períodos de dieta.

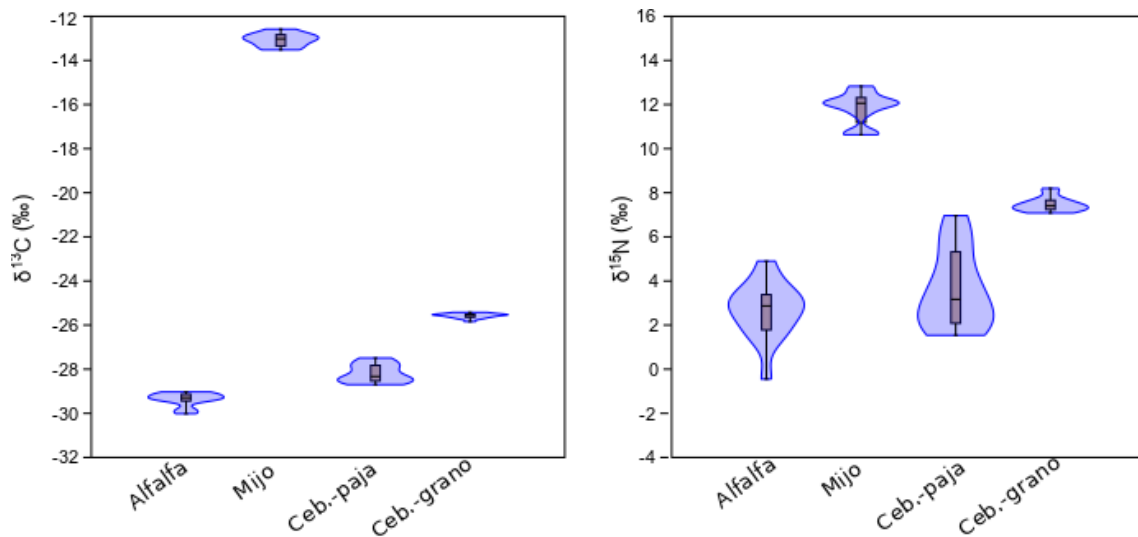


Figura 3. Diagrama de violín con los valores isotópicos (izquierda $\delta^{13}\text{C}$; derecha $\delta^{15}\text{N}$) de los componentes de los tres períodos de alimentación.

Los distintos componentes de la cebada analizados, paja y grano, presentan distinta composición isotópica, tanto en sus valores de carbono como de nitrógeno. En el caso de la cebada analizada durante la DIETA3, el grano presenta valores más enriquecidos de nitrógeno y carbono que las hojas y tallos analizados en las muestras de paja: $\Delta^{13}\text{C}_{\text{grano-paja}} = 2,6\text{‰}$; $\Delta^{15}\text{N}_{\text{grano-paja}} = 3,9\text{‰}$. Las plantas pueden mostrar cierta variabilidad isotópica entre sus distintas partes anatómicas (Codron et al., 2005; Heaton, 1999; Lightfoot et al., 2016), aunque no podemos descartar que la paja y el grano, aunque procedieran de un mismo proveedor, pudieran provenir también de diferentes cosechas o campos de cultivo con diferente abundancia de ^{15}N en los suelos. El grano es el componente que menor rango de variación presenta: $0,4\text{‰}$ en $\delta^{13}\text{C}$ y $1,1\text{‰}$ en $\delta^{15}\text{N}$. Posiblemente esté relacionado con una procedencia similar para todos los sacos de grano empleados en el forraje de la DIETA3 (e.g. procedentes de una misma cosecha en un mismo campo), mientras que las balas de paja tuvieran una procedencia más diversificada.

1.5. Estadio de formación de la dentición esperada en los especímenes

De acuerdo a los tiempos de desarrollo dental observados en estudios previos para las distintas razas de ovejas domésticas, se esperaba que el período de crecimiento de los molares mandibulares (del primer al tercer molar mandibular) abarcara todo el período del programa experimental, desde el nacimiento hasta el momento de muerte, de tal forma que los tejidos dentales de estos elementos registraran a nivel de composición isotópica las condiciones de vida y alimentación desarrolladas durante todo el programa experimental (Figura 4.).

La formación del primer molar mandibular (M_1) en ovejas domésticas se inicia durante la gestación, entorno a los 20 a 49 días antes del nacimiento (Green et al 2017; Kahle et al. 2018), y completa la formación de la corona (es decir, la parte del diente que comprende el esmalte, hasta el contacto con la raíz del diente) entre los 7 y los 9 meses (Weinreb & Sharav 1964; Witzel et al., 2018; Zazzo et al 2010;), variando en función de la raza. Los segundos molares mandibulares (M_2) empiezan a desarrollarse a lo largo del segundo y tercer mes de vida. El momento de formación de las coronas se ha observado que varía entre razas, pudiendo completarse a los 12 meses en algunas razas “mejoradas” (*improved breeds*) que presentan un crecimiento muy rápido (Milhaud & Nezit, 1991; Zazzo et al., 2010), o extendiéndose hasta los 18 meses en razas con un crecimiento más lento (Upex & Dobney, 2012; Witzel et al., 2018). Por último, los terceros molares mandibulares (M_3), presentan una mayor variabilidad en sus tiempos de formación, variando incluso entre individuos de una misma población (Milhaud & Nezit 1991; Weinrab & Sharav 1963, Blaise & Balasse 2011; Tornero et al 2013). Su desarrollo se inicia entre los 10 y 13 meses, y su formación puede extenderse hasta los 20-25 meses, aunque se ha visto un crecimiento de los M_3 prolongado hasta los 30 y 33 meses en algunas razas como la *Shetland* (Upex and Dobney, 2012).

Estos tiempos hacen referencia al período necesario para que se complete la formación de las coronas en cada uno de los molares. Sin embargo, el proceso de mineralización del esmalte se completa con cierto retraso respecto a la formación del diente, y este proceso se extiende varios meses más, dependiendo del molar y de la especie. Se ha observado que, en el caso de las ovejas, la mineralización del esmalte puede extenderse entre 2 a 6 meses más (Balasse et al., 2012b; Zazzo et al., 2010).

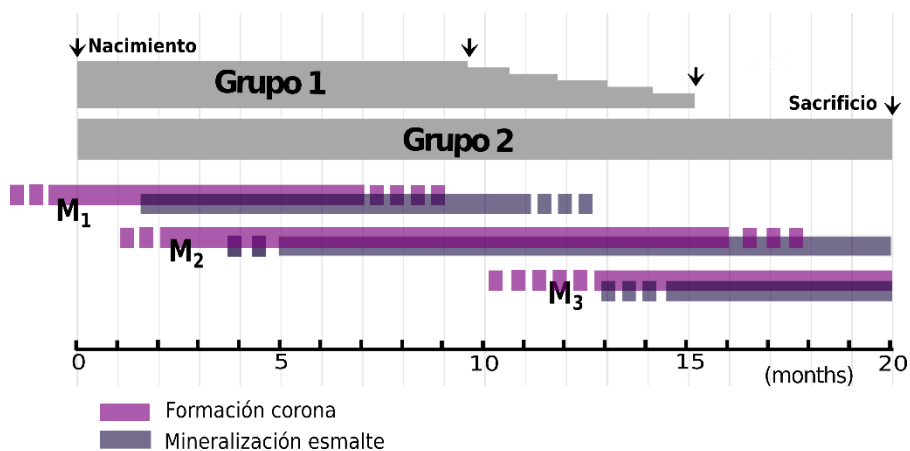


Figura 4. Períodos de formación y mineralización de los molares mandibulares esperados para los individuos de SUMAII, en relación a las edades de sacrificio del grupo 1 y grupo 2. Las barras discontinuas responden a la variabilidad observada entre diferentes estudios.

Los especímenes de ovejas del programa SUMA II presentan una edad en el momento de muerte comprendida entre los 10 y los 21 meses. Se esperaba que el M_1 estuviera ya formado en todos los individuos, y registrara las condiciones de alimentación producidas desde el nacimiento hasta los 7 - 9 meses. Por su parte, se esperaba que la corona del M_2 cubriera la mayor parte del programa experimental, desde el mes 2 hasta los meses 12-18, mientras que el esmalte de este molar registraría unos meses más, hasta los 16-20 meses. Se esperaba que el M_2 presentaran distinto estadio de desarrollo entre los individuos del Grupo 1, y que estuviera formado por completo en los individuos del Grupo 2. Por último, el M_3 , presentaría un momento de desarrollo

próximo al final de la formación de la corona en los especímenes del Grupo 2, aunque también podría presentar las coronas todavía no formadas por completo. El M₃ cubriría únicamente los últimos meses del experimental.

2

Elementos dentales seleccionados

2.1. Procesado de mandíbulas y estadio de desarrollo dental

Las mandíbulas de los 12 individuos procedentes del rebaño de SUMA II fueron procesadas en el Laboratorio de Zooarqueología del Instituto Catalán de Paleoecología Humana y Evolución Social (IPHES, Tarragona). Las 12 mandíbulas fueron separadas del cráneo, parcialmente descarnadas y hervidas en agua (100°C) durante dos horas, para evitar someterlas a excesivos tiempos de cocción. Los tejidos blandos remanentes tras este proceso fueron eliminados manualmente. Las mandíbulas fueron posteriormente secadas a temperatura ambiente. Los molares seleccionados para análisis fueron extraídos de las hemimandíbulas correspondientes utilizando un taladro eléctrico portátil (modelo Dremel 400) acoplado a un disco de diamante (20 mm de diámetro y 0,5 mm de grosor), a partir de la realización de cortes en el lado bucal de las hemimandíbulas.

Los individuos de SUMA II presentaban diferentes fases de desarrollo de los molares mandibulares, especialmente marcadas entre los diferentes individuos del grupo 1 (sacrificados escalonadamente entre los 10 y 15 meses de edad), y entre los individuos del grupo 1 y el grupo 2 (sacrificados a los 20-21 meses de edad) (Figura 5). El estadio de desarrollo dental se ha definido por el grado de desgaste en base a los criterios de Payne (1973) (Tabla 4).

Los individuos del grupo 1 (con edades comprendidas entre los 11 y 15 meses de edad en el momento del sacrificio) presentan M_1 con coronas completas, con grados de desgaste entre C y DEF, y con las raíces en diferente fase de desarrollo, excediendo varios milímetros la unión entre esmalte y raíz (ERJ, por sus siglas en inglés, *enamel-root junction*), desde 1.0 mm (en el individuo más joven) hasta 5.7 mm (en el individuo de mayor edad). Los M_2 presentan grados de desgaste entre BC y D, y presentan las coronas en proceso de formación, formándose la parte más cervical de la corona. Los M_3 no han comenzado a formarse en algunos de los individuos (OV-01, OV-02, OV-03), mientras que en otros presenta hasta 1/3 de las coronas formadas (OV-06), y en ningún caso han iniciado la erupción.

Los individuos del grupo 2 muestran los M_2 con un desgaste de fase D (Payne, 1973), las coronas completas, y las raíces en un estadio muy inicial de desarrollo, apenas excediendo la ERJ en 1 - 2 mm. Los M_3 presentan un estadio inicial de erupción, con las cúspides sin desgaste o con un desgaste incipiente grado E, y presentan alrededor de 2/3 partes de la corona formadas.



Figura 5: Estado de desarrollo de los molares mandibulares en un individuo del grupo 1 (OV-03) de 12 meses de edad, y un individuo del grupo 2 (OV-08) de 20 meses de edad.

	ID	Meses	M ₁	M ₂	M ₃
Grupo 1	OV-01	9,7	C	BC	*
	OV-02	10,8	C	BC	*
	OV-03	11,7	C	BC	*
	OV-04	13	C	D	CD
	OV-05	14,1	CD	D	**
	OV-06	15,2	DEF	D	CD
Grupo 2	OV-07	20,5	DEF	D	CD
	OV-08	20,3	DEF	D	E
	OV-09	20,8	DEF	D	CD
	OV-10	20,5	DEF	D	E
	OV-11	20,9	DEF	D	CD
	OV-12	20,7	DEF	D	CD

Tabla 4. Estado de desarrollo dental según el grado de desgaste (Payne 1973). M₃ sin desarrollar (*), o en fase inicial de desarrollo (**).

2.2. Materiales seleccionados

En total, fueron seleccionados para su análisis secuencial 17 molares mandibulares de 10 individuos procedentes del rebaño de SUMAII (OV-02, OV-03, OV-04, OV-05, OV-06, OV-08, OV-09, OV-10, OV-11). Las mandíbulas de los individuos seleccionados del grupo 1 y del grupo 2 se muestran en el Anexo II.

Los M₁ de 6 individuos fueron seleccionados para su análisis secuencial de dentina con el objetivo de estudiar la variación isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) vinculada a la primera etapa del experimental, relativa a los primeros meses de vida: periodos de lactancia, destete y primera dieta post destete. En total, los M₁ izquierdos de 5 individuos del grupo 1 (OV-02, OV-03, OV-04, OV-05 y OV-06) y el M₁ izquierdo de 1 individuo del grupo 2 (OV-08) fueron seleccionados (N=6). Los M₁ de los individuos del grupo 1 presentaban un desgaste oclusal menor, por lo que resultaban más apropiados para realizar análisis intradentales (mayor longitud de la corona).

Los M₂ y los M₃ de 5 individuos del grupo 2 fueron seleccionados para su análisis secuencial de dentina y/o esmalte, con el objetivo de estudiar la variación isotópica (i.e. $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) relativa a la segunda etapa del experimental, concretamente a las tres dietas monoespecíficas pautadas a lo largo de los últimos doce meses de vida de los individuos. En total, los M₂ derechos de 5 individuos (OV-07, OV-08, OV-09, OV-10 y OV-11), y los M₂ y M₃ izquierdos de 3 individuos (OV-07, OV-08, OV-11) fueron seleccionados para análisis (N=11) (Tabla 5).

La Tabla 5 muestra los individuos y molares seleccionados en función de cada objetivo abordado, y con indicación del análisis implementado en cada caso. Los M₂ y M₃ izquierdos fueron seleccionados para implementar análisis secuenciales de dentina ($\delta^{13}\text{C}_{\text{colágeno}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{colágeno}}$) a partir del método de muestreo previamente desarrollado por Balasse et al. (2001). Esta selección está orientada a perseguir el objetivo 1 de la presente tesis (cf. Capítulo II): definir cómo las variaciones en la señal isotópica registradas en la dentina -derivadas las condiciones de vida y alimentación del individuo analizado- son registradas en la dentina, y posteriormente representadas a partir de la aplicación del DSA.

		Mandíbula izquierda			Mandíbula derecha		
		Elemento	Análisis	Objetivo	Elemento	Análisis	Objetivo
Grupo1	OV 02	M ₁	DSA	[3]			
	OV 03	M ₁	DSA	[3]			
	OV 04	M ₁	DSA	[3]			
	OV 05	M ₁	DSA	[3]			
	OV 06	M ₁	DSA	[3]			
Grupo2	OV 07	M ₂ , M ₃	DSA	[1]	M ₂	DSA + ESA	[2]
	OV 08	M ₁ , M ₂ , M ₃	DSA	[1][3]	M ₂	DSA + ESA	[2]
	OV 09				M ₂	DSA + ESA	[2]
	OV 10				M ₂	DSA + ESA	[2]
	OV 11	M ₂ , M ₃	DSA	[1]	M ₂	DSA + ESA	[2]

Tabla 5. Individuos y molares seleccionados para su análisis según los objetivos con los que se relacionan (ver texto). DSA, análisis secuencial de dentina; ESA, análisis secuencial del esmalte.

Los M₂ derechos fueron seleccionados para desarrollar y evaluar un nuevo protocolo de muestreo de DSA ($\delta^{13}\text{C}_{\text{colágeno}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{colágeno}}$) que permitan obtener una mayor resolución temporal e isotópica en los resultados, en línea con el objetivo 2 de la tesis. A su vez, estos mismos molares fueron seleccionados para la aplicación de análisis secuencial de esmalte ($\delta^{13}\text{C}_{\text{bioapatita}}$), también en línea con el objetivo 2, en tanto que persigue servir como “blanco” para evaluar la resolución de los nuevos protocolos desarrollados de DSA.

Por su parte, los M₁ fueron seleccionados para implementar análisis secuencial de dentina ($\delta^{13}\text{C}_{\text{colágeno}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{colágeno}}$) en línea con el objetivo 3 de la tesis doctoral: evaluar la aplicación de DSA en el estudio del período de lactancia y destete en ovejas, y evaluar la capacidad del análisis para representar los momentos de cambio de dieta en el diente, independientemente de la fase de desarrollo dental (i.e. edad en el momento de muerte del individuo).

3

Muestreo, análisis secuencial y tratamiento de los datos

3.1. Muestreo secuencial de esmalte y pretratamiento de muestras

Todo el proceso de muestreo y pretratamiento de las muestras de esmalte fue realizado en el Laboratorio de Biomarcadores del IPHES-CERCA (Tarragona). El muestreo del esmalte se implementó en el lado bucal del lóbulo posterior de los M_2 seleccionados (M_2 derechos de OV-07 a OV-11; N=5). El lóbulo posterior presenta una mayor longitud que el anterior, y la faceta bucal de los molares presenta un mayor grosor que la lingual. En el área de muestreo seleccionada, los tejidos orgánicos blancos adheridos al esmalte, así como el cemento dental, se limpiaron utilizando un taladro eléctrico portátil (modelo Dremel™ 400) acoplado a una fresa de tungsteno. El muestreo del esmalte se realizó utilizando el mismo taladro, acoplado a una fresa de diamante cilíndrica (diámetro de 1 mm). El muestreo se realizó a partir de surcos horizontales, de 0.5 -1.0 mm de profundidad y ~5 mm de longitud, transversales al eje vertical del diente, y realizados en secuencia cada 1.5 – 2 mm en dirección longitudinal, comenzando en la parte superior del lóbulo y cubriendo toda la longitud de la corona. Cada muestra de esmalte en polvo (peso medio de 5.3 ± 1.2 mg) se recogía en un papel de pesado y se encapsulaba en microtubos de polipropileno Eppendorf™. Entre 23 y 29 muestras fueron obtenidas en cada molar. Las muestras reciben una numeración consecutiva por cada secuencia en base a la dirección del muestreo. La posición de las muestras en el diente fue anotada como la distancia (en mm) desde la ERJ. La ERJ es un punto de referencia ampliamente utilizado en los análisis intra-dentales realizados en molares hipsodontos (Balasse, 2003b). Una vez formada, la ERJ no se modifica por el desgaste dental ni a lo largo del resto de período de crecimiento del diente, lo que permite utilizarla como punto de referencia a la hora de realizar comparaciones interindividuales.

Las muestras de esmalte fueron posteriormente tratadas químicamente siguiendo los protocolos publicados en Balasse et al. (2002) y Tornero et al. (2013) para la purificación de muestras de bioapatita. Las muestras fueron tratadas con una solución de ácido acético (CH_3COOH) con concentración 0.1 M, durante 4h a temperatura ambiente. Cada muestra es tratada con 0.1 ml de solución por cada 1 mg de la muestra. A continuación, las muestras se centrifugan, se retira el ácido por pipeteado y se lavan 5 veces con agua Milli-Q, mediante un proceso consecutivo de centrifugado y pipeteado. Las muestras se secan posteriormente en una estufa durante 48h a 70°C. El tratamiento de las muestras puede afectar ligeramente a la relación isotópica original a través de nuevos fraccionamientos, por ello la pérdida de peso de las muestras fue monitoreada

para asegurar una reacción similar entre las muestras (Balasse et al., 2002). Las muestras perdieron un $45.9 \pm 9.2\%$ de peso durante el tratamiento. Esta pérdida de peso, relacionada con el tratamiento químico de la muestra en polvo, pero también con la pérdida mecánica de muestra, es similar a la observada previamente durante la realización de este protocolo (Balasse et al., 2002; Tornero et al., 2013).

3.2. Muestreo secuencial de dentina a partir de secciones: muestreo *slice*

El proceso de muestreo, desmineralización y tratamiento de las muestras de dentina fue también realizado en el Laboratorio de Biomarcadores del IPHES-CERCA (Tarragona). El lóbulo posterior de los M_2 , y el lóbulo anterior de los M_3 seleccionados (M_2 y M_3 izquierdos de OV-07, OV-08 y OV-11; N=6) fueron separados del resto del diente mediante un corte longitudinal realizado con un taladro eléctrico (modelo Dremel™ 400) acoplado a un disco de diamante de 20 mm de diámetro y 0,5 mm de grosor. El muestreo de la dentina se realizó siguiendo el protocolo publicado en Balasse et al. (2001) y Balasse & Tresset (2002). La Figura 6 muestra un esquema del protocolo implementado. Los lóbulos seleccionados se dispusieron en placas de Petri de vidrio y fueron desmineralizados en una solución de EDTA con concentración 0.5 M (pH 8) a temperatura ambiente (Tuross et al., 1988). La solución se renovaba cada 2 a 5 días. La completa desmineralización llevó alrededor de 2 meses para los lóbulos de los M_2 , y alrededor de 1 mes para los lóbulos de los M_1 , al tratarse de lóbulos más pequeños y de menor grosor. Una vez desmineralizados, los lóbulos se lavaron con abundante agua destilada, incluyendo un baño durante una semana, para eliminar por completo el EDTA de las muestras. Previos estudios advierten de la necesidad de implementar intensos lavados para la correcta eliminación del EDTA (Tuross, 2012; Tuross et al., 1988).

Tras la desmineralización, el esmalte y la fracción inorgánica de la dentina queda eliminada, y los lóbulos presentan una apariencia de gelatina que guarda la morfología original del diente. El cemento que recubre el diente y el presente en el infundibulum que separa la faceta bucal y lingual de los lóbulos, queda se desprende durante el proceso y se desechó manualmente. Utilizando un bisturí, la mitad bucal de cada lóbulo se separa de su mitad lingual, y se secciona en secciones de ~2mm en orden descendente desde la cúspide hasta la base de los molares. Cada muestra es individualizada en tubos de ensayo de vidrio diferenciados y se le asigna una numeración consecutiva en base a la dirección del muestreo. Entre 18 y 20 muestras fueron obtenidas en cada M_2 y 14 muestras en cada M_3 , y se obtuvieron un total de 80 muestras.

Durante el muestreo de los M_2 la base del lóbulo es considerada como referencia para anotar la posición de las muestras. Puesto que la distancia entre la ERJ y la base del lóbulo se anota previamente a su desmineralización, tras el muestreo se calcula la posición de las muestras con respecto a la ERJ para posibilitar la comparación entre individuos. En los M_3 , la cúspide del lóbulo muestreado fue utilizada como referencia para anotar la posición de las muestras. Puesto que no se ha producido aún la erupción de estos molares y sus cúspides no presentaban desgaste en su superficie oclusiva, las cúspides se emplean como punto de referencia en las comparaciones inter-individuales. Las distancias de las muestras respecto a los puntos de referencia se consideran desde punto central de cada sección (secciones de ~2mm).

Cada muestra de dentina fue tratada en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) con concentración 0.125M durante 20h a temperatura ambiente, con el objetivo de eliminar proteínas

no colagenosas y algunos lípidos solubles en bases (Ambrose, 1990; Ambrose & Norr, 1993; Guiry & Szpak, 2020), y después lavadas intensamente con agua destilada. A continuación, las muestras fueron homogeneizadas por solubilización en una solución de ácido clorhídrico (HC) con concentración 10^{-2} M (pH 2), a 100°C durante 17h (Longin, 1971; Bocherens et al., 1991). Las muestras solubilizadas se filtraron con filtros Millipore de $5\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro, de cara a eliminar los residuos no disueltos y posibles contaminantes externos. Por último, las muestras fueron congeladas y después liofilizadas durante 48h. El proceso de liofilización se realizó en los equipamientos de la unidad de *Chromatography, Thermal Analysis & Electrochemistry* del Instituto Catalán de Investigación Química (ICIQ, Tarragona).

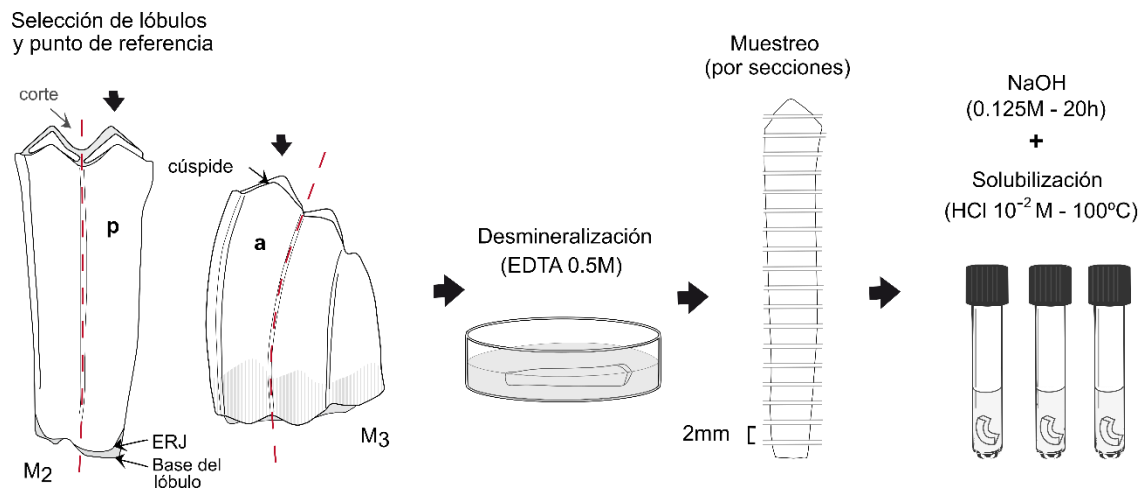


Figura 6. Esquema del muestreo por secciones y del protocolo de purificación de colágeno implementado, con indicación de los molares y lóbulos seleccionados: posterior (p) y anterior (a).

3.3. Muestreo secuencial de dentina a partir de surcos: muestreo *drill*

La desmineralización del diente, el muestreo de dentina y el tratamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Biomarcadores del IPHES-CERCA (Tarragona). El lóbulo posterior de los M₁ y M₂ seleccionados (M₁ izquierdos y M₂ derechos; N=11) fueron separados del resto del diente con ayuda de un taladro eléctrico acoplado a un disco de diamante. Los lóbulos seleccionados fueron desmineralizados en EDTA siguiendo los protocolos de Tuross et al. (1988) y Balasse et al. (2001) descritos en detalle en el apartado anterior. La solución de EDTA se renovaba cada 2-3 días y la desmineralización tomó entre 6 y 8 semanas. Una vez desmineralizados, los lóbulos se lavaron intensamente con agua Milli-Q, incluyendo un baño en agua Milli-Q durante una semana. A continuación, los lóbulos fueron tratados con una solución de NaOH con concentración 0.125M durante 20h a temperatura ambiente, y después lavados de nuevo con agua Milli-Q. Los lóbulos fueron congelados y liofilizados durante 48h. El proceso de liofilización se realizó en los equipamientos y del Laboratorio de Análisis de Isótopos Estables del Instituto de Ciencia y Tecnología Ambiental (ICTA-UAB, Bellaterra). La Figura 7 muestra un esquema de este protocolo.

El muestreo de la dentina se realizó utilizando el mismo taladro ya descrito, acoplado a una fresa de diamante cilíndrica de 1 mm de diámetro. El muestreo se llevó a cabo en la parte bucal del lóbulo

a partir de realizar una secuencia de surcos horizontales -transversales al eje vertical del diente- separados entre sí cada 1.5 mm, cubriendo toda la longitud del diente y siguiendo la dirección cúspide – base del lóbulo. La profundidad del muestreo se controlaba utilizando la fresa de diamante como referencia, realizándose surcos de entre 0.3 y 0.5 mm de profundidad. Cada muestra de dentina en polvo se recogía en un papel de pesado y se encapsulaba en microtubos de polipropileno Eppendorf™. Las muestras pesan una media de 1.0 ± 0.3 mg. Entre 16 y 21 muestras fueron obtenidas en cada M_1 , y entre 23 y 26 muestras fueron obtenidas en cada M_2 . Las muestras reciben una numeración consecutiva por cada secuencia en base a la dirección del muestreo.

La posición de las muestras en el diente fue anotada como la distancia (en mm) desde la base del lóbulo muestreado. Puesto que los lóbulos se encogen ligeramente al deshidratarse durante el proceso de liofilización (promedio de 3.3 ± 0.5 mm en los molares analizados), la distancia de las muestras desde la base del lóbulo se corrige considerando la longitud total de cada lóbulo antes y después de la liofilización. La fórmula de corrección que se aplica es la siguiente: $d_0 = (d_1 * l_0) / l_1$; donde 'd₀' es la distancia desde la base antes de la liofilización, 'd₁' es la distancia desde la base después de la liofilización, 'l₀' es la longitud del lóbulo antes de la liofilización, y 'l₁' es la longitud del lóbulo después de la liofilización. Por último, la posición de las muestras se calcula como distancia desde la ERJ a partir de la distancia existente entre la ERJ y la base de cada lóbulo (anotada previamente a la desmineralización de los lóbulos).

Tras el muestreo, las muestras de dentina en polvo fueron tratadas con una solución de HCl con concentración 0.5M durante 30 minutos, siguiendo las recomendaciones de Czermak et al. (2020) para el tratamiento de muestras de dentina-colágeno en protocolos donde se omite la solubilización. Este paso se realiza de cara a evitar la potencial contaminación de CO₂ atmosférico precipitado en la muestra durante el período de tratamiento con bases (Hatté et al., 2001), en nuestro caso EDTA y NaOH. Las muestras fueron después lavadas con agua Milli-Q, congeladas y liofilizadas durante 48h. A lo largo de la presente tesis, referiremos como colágeno el residuo orgánico obtenido en las muestras de dentina a partir de este protocolo, aunque ha sido previamente observado que otras proteínas no colagenosas del diente pueden estar presentes en la muestra después de implementar los protocolos de desmineralización (Ambrose, 1990; Cleland et al., 2021; Guiry & Szpak, 2020; Masters, 1987; Tuross et al., 1988).

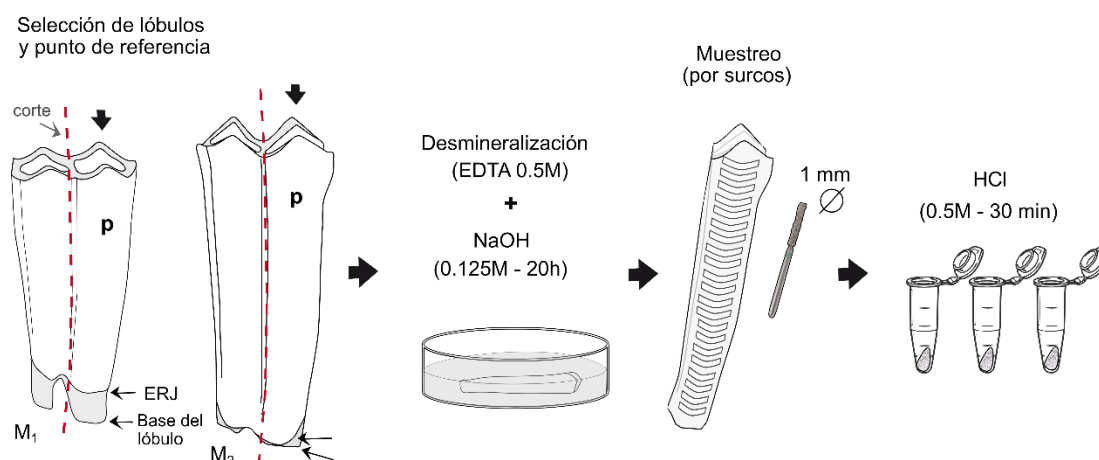


Figura 7. Esquema del protocolo de muestreo *drill*, con indicación de los molares y lóbulos posteriores (p) seleccionados.

Para diferenciar este protocolo de muestreo de dentina del descrito anteriormente en el apartado 3.2., de aquí en adelante nos referiremos como muestreo *slice* al protocolo que corta la dentina en secciones de 2 mm, mientras que nos referiremos como muestreo *drill* al protocolo donde las muestras se obtienen a partir de realizar surcos de 0.3-0.5 mm de profundidad en la parte más superficial de la dentina.

3.4. Análisis isotópicos y formulación de los datos

Un total de 127 muestras de esmalte (bioapatita) fueron seleccionadas para análisis. El ratio isotópico de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de las muestras de bioapatita fue analizado en el *Environmental Isotope Laboratory (Department of Geosciences)* de la Universidad de Arizona (Tucson, USA), utilizando un dispositivo para la preparación de carbonatos Kiel-III acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS) Thermo Finnigan MAT 252. Entorno ~600 µg de cada muestra fueron sometidos a reacción con ácido fosfórico a 70°C bajo vacío. El estándar internacional NBS-19 (valores teóricos de $\delta^{13}\text{C} = +1.95\text{‰}$) fue utilizado para la calibración y para monitorizar la precisión de los análisis isotópicos. La precisión analítica media fue $\pm 0.05\text{‰}$ (1σ) para las mediciones de $\delta^{13}\text{C}$, determinada a partir de la repetición de la medición del estándar por cada tanda de análisis. Los resultados isotópicos de los valores de los estándares para todas las sesiones analíticas están recogidos en Anexo III-Tabla 1.

Un total de 319 muestras de dentina (colágeno) fueron seleccionadas para su análisis isotópico. Una cantidad de ~350 µg de cada muestra de colágeno fue encapsulada en cápsulas de estaño. El contenido de carbono (%C), el contenido de nitrógeno (%N), los ratios atómicos de carbono/nitrógeno (C:N), y los ratios isotópicos de carbono ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) y nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) fueron analizados en el Laboratorio de Análisis de Isótopos Estables de ICTA-UAB (Bellaterra). El instrumental utilizado consistía en un analizador elemental Thermo Flash 1112 acoplado con un sistema ConFlo III a un IRMS Thermo Delta V Advantage. El estándar internacional IAEA 600 (cafeína) fue utilizado para la calibración de los datos (valores teóricos: $\delta^{13}\text{C} = -27.77 \pm 0.04\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = +1.0 \pm 0.2\text{‰}$) y para monitorizar la precisión de los análisis. La precisión analítica media fue $\pm 0.08\text{‰}$ (1σ) para las mediciones de $\delta^{13}\text{C}$ y $\pm 0.11\text{‰}$ (1σ) para las mediciones de $\delta^{15}\text{N}$, determinada a partir de la repetición de la medición del estándar por cada tanda de análisis. Los resultados isotópicos de los valores de los estándares para todas las sesiones analíticas están recogidos en Anexo III-Tablas 2, 3.

Los ratios isotópicos de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ se expresan como $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ respectivamente y se calculan en base a los estándares de Vienna Pee Dee Belemnite (V-PdB) ($\delta^{13}\text{C}$) y del nitrógeno atmosférico (AIR) ($\delta^{15}\text{N}$) según la fórmula: $\chi = (R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1) * 1000\text{‰}$, donde χ es $\delta^{13}\text{C}$ o $\delta^{15}\text{N}$; y R es $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

3.5. Métodos estadísticos

La comparación estadística de los valores isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) entre distintos grupos (entre tipos de forrajes, entre molares, o entre individuos) se describe cuando es necesario utilizando la prueba no-paramétrica U Mann-Whitney (p), y estableciendo la significancia en <0.05 . Para probar la correlación entre el grado de desarrollo de los molares (i.e. edad de los individuos) y los resultados isotópicos (atenuación de valores absolutos o posición de valores mínimos o máximos en las secuencias) se calcula el coeficiente de correlación de Pearson (r) y la significancia del

coeficiente (p), establecida en <0.05 . Se emplea como variable 1 la edad del individuo (en días) y como variable 2 la posición de los valores máximos o mínimos o el rango de variación intra-dental, tanto para los valores isotópicos de carbono como de nitrógeno. Ambos métodos estadísticos se calculan utilizando el software Past (4.03).

3.6. Cálculo de la composición promedio de la DIETA3 (contribución de proteína de los dos componentes)

Los tres períodos de dieta de la segunda etapa del programa experimental SUMAII fueron diseñados para conformar dietas mono-específicas (i.e. compuestas por una única especie de planta), de cara a favorecer la comprensión de la relación entre la señal isotópica de la dieta y la señal isotópica registrada en los tejidos animales. Los períodos de DIETA1 y DIETA2 son además dietas mono-isotópicas, es decir, que presentan una única fuente de composición isotópica (Ambrose & Norr, 1993), puesto que cada una se constituye por único componente (paja de alfalfa o de panís, respectivamente). Por ello, el valor isotópico promedio calculado para cada uno de estos componentes puede considerarse como representativo del input isotópico que reciben los individuos durante cada período.

Por el contrario, la DIETA3, basada en cebada, se aporta en dos tipos de forraje -paja y grano- los cuales presentan diferencias en su composición isotópica de carbono y nitrógeno (cf. apartado 1.4.). El grano presenta valores más altos de nitrógeno y carbono que las muestras de paja (tallos y hojas de la planta): $\Delta^{13}\text{C}_{\text{grano-paja}} = 2,6\text{‰}$; $\Delta^{15}\text{N}_{\text{grano-paja}} = 3,9\text{‰}$. Además, paja y grano se aportan a la dieta de las ovejas en diferentes cantidades diarias: 1kg de grano por individuo y paja *ad libitum*. De cara realizar una estimación de la composición isotópica promedio de toda la DIETA3, es necesario calcular el aporte de cada componente. Es necesario subrayar en este punto que el colágeno refleja principalmente la fracción proteica de la dieta (Ambrose & Norr, 1993; Codron et al., 2018; Jim et al., 2004; Tieszen & Fagre, 1993). Puesto que el objetivo de esta tesis es evaluar cómo se registran las variaciones isotópicas en el colágeno de la dentina, el promedio isotópico de la DIETA3 se realiza en función de la contribución de proteína de cada componente.

Por tanto, la estimación de la composición isotópica promedio de la DIETA3 ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$), se ha realizado considerando la diferente contribución de proteína por parte del grano y de la paja en base a (1) su contenido de proteína bruta y (2) la diferente contribución en peso (g) de materia seca:

- (1) El contenido de proteína bruta (CP) de cada componente ha sido calculado a partir del contenido de nitrógeno (valores de %N) de las muestras de cebada, paja y grano, datos obtenidos a partir de los análisis elementales realizados (Anexo I). El %N es multiplicado por el factor de conversión tradicional de 6.25 del método Kjeldahl, una conversión ampliamente utilizada para calcular el CP de los alimentos (Conklin-Brittain et al., 1999).
- (2) Puesto que la paja se suplía *ad libitum*, se ha calculado la ingesta diaria voluntaria de materia seca (DMI, *dry matter intake*) por cada individuo siguiendo el método de Minson (1990): $\text{DMI} = 60 \text{ g/kg } W^{0.75}$, donde W es el peso corporal de los individuos (60kg). Se estima que el DMI de las ovejas de nuestro programa experimental serían unos 1300g/día. Del DMI, gran parte procede del grano, puesto que las ovejas ingerían todo el suplemento de grano diario (1kg). La contribución de materia seca (DM) del grano de cebada se ha calculado en función de los datos publicados por el *National Research Council Committee on Animal Nutrition* (NRC, 1985), por los cuales 1 kg de grano equivaldría a 880g de DM.

La contribución de proteína proporcional de cada componente, y la estimación de la composición isotópica de carbono y nitrógeno de la parte de proteína de la DIETA3, se muestra en la Tabla 6. La mayor contribución de proteína a la dieta de las ovejas procede del grano (92%), considerando los dos factores analizados: (1) el grano tiene un mayor contenido de proteína (CP de 12.3%) que la paja (CP de 2.5%), calculado a partir de los valores de %N; y (2) el grano supone una mayor proporción de la ingesta diaria de DM que la paja (880 g de DM de los 1300 g del DMI diario).

		Peso (g)	DMI (g)	%N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Contribución de proteína
Cebada	Paja	<i>Ad lib.</i>	420	0.4	-28.2	+3.6	8%
	Grano	1000	880	2.0	-25.6	+7.5	92%
Composición isotópica de la fracción de proteína de DIETA3					$\delta^{13}\text{C}_{\text{proteína}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{proteína}}$	
					-25.8‰	+7.2‰	

Tabla 6. Composición isotópica promedio de DIETA3 (cebada) en base a la contribución de proteína diferencial entre componentes, calculada a partir del %N y de su aporte diario en DM. El $\delta^{13}\text{C}_{\text{proteína}}$ es una estimación (ver texto).

Por último, es importante señalar que las distintas fracciones bioquímicas de las plantas pueden presentar diferencias en su composición isotópica (Fagre et al., 1991). Los valores isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) pueden variar entre proteínas y el resto de constituyentes, y por tanto, la composición isotópica de las proteínas puede diferir de la que se obtienen al analizar toda la planta (i.e. $\delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}_{\text{proteína}} \neq \delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}_{\text{totalplanta}}$). En el caso de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ no se esperan grandes diferencias en esta línea, puesto que el N analizado procede mayoritariamente de las proteínas de la planta (Conklin-Brittain et al., 1999). Sin embargo, el carbono analizado en una muestra *bulk* (toda la planta) procede también de otros constituyentes muy abundantes, como los carbohidratos, que pueden diferir en sus valores de $\delta^{13}\text{C}$. Estas diferencias entre el $\delta^{13}\text{C}_{\text{proteína}}$ y el $\delta^{13}\text{C}_{\text{totalplanta}}$ pueden oscilar entre -1,0 a -4,5‰ (Ambrose & Norr, 1993; Tieszen, 1991). Este es un factor importante a tener en cuenta al considerar el valor estimado de $\delta^{13}\text{C}_{\text{proteína}}$ de la DIETA3, pero también al considerar los valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos en la DIETA1 y DIETA2 a partir de análisis *bulk*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

CAPÍTULO IV

Resultados

A lo largo de este capítulo se presentan los resultados de los tres estudios realizados en esta tesis doctoral. El primer apartado presenta los resultados de la aplicación del método de análisis secuencial ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de colágeno) previamente desarrollado en vacas domésticas por Balasse et al. (2001), basado en un muestreo por secciones de la dentina. El protocolo se implementa sobre los segundos y terceros molares mandibulares (M_2 y M_3) de tres especímenes de oveja doméstica del Grupo 2 (20.5 meses de edad). Los resultados se comparan con los datos de composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) de los forrajes, analizados durante un año de vida de los individuos y cubriendo el período formación de los M_2 y M_3 .

En el segundo apartado, se presentan los resultados isotópicos obtenidos a partir de la aplicación del nuevo protocolo de muestreo de dentina por surcos (método *drill*) ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de colágeno), junto a los resultados obtenidos a partir de la aplicación de análisis secuenciales de esmalte ($\delta^{13}\text{C}_{\text{bioapatita}}$) sobre los mismos molares. Ambos análisis intra-dentales se aplican sobre los segundos molares mandibulares (M_2) de 5 especímenes del Grupo 2 (20.5 meses de edad). Los resultados isotópicos de las muestras de dentina obtenidas con el protocolo *drill* se comparan con los obtenidos a partir del protocolo por secciones (*slice*) en los mismos individuos, de cara a comparar la resolución de ambos protocolos de DSA. Por su parte, los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{colágeno}}$ obtenidos a partir del método *drill*, se comparan con los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{bioapatita}}$ obtenidos a partir del análisis secuencial de esmalte en los mismos molares.

Por último, y en el tercer apartado, se presentan los resultados isotópicos obtenidos ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de colágeno) a partir de la aplicación del nuevo protocolo de muestreo de dentina a los primeros molares mandibulares (M_1). Los M_1 pertenecen a 6 individuos sacrificados de forma escalonada entre los 13 y 20 meses de vida (Grupo 1 y 2) y presentan por tanto distinto estadio de desarrollo dental.

1

Intra-tooth isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth: a new experimental study with modern sheep specimens

1.1 Introduction

This study aims to develop a referential set of data for implementing sequential analysis of dentine collagen in hypsondont species, caprines in particular, to support its later archeological implementation. The specific objective is to refine a main aspect related to the methodology: the relation between the isotopic input and the isotopic composition of the collagen serial samples obtained through the standard sampling and treatment protocol first developed by Balasse et al. (2001).

To achieve this proposal, we performed sequential stable isotope analyses ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) on tooth dentine collagen of several modern sheep specimens coming from the SUMA II experimental program. This is the first study implementing intra-tooth analysis of dentine in experimental sheep raised under controlled life conditions and where the diet isotopic composition is known. This study covers the diet from last 12 months of life (from 8 to 20-months-old) where three fodder types with different isotopic compositions are alternated, introducing abrupt changes on sheep's diet in a one-year time span.

1.2. Materials and Methods

1.2.1. Modern sheep specimens selected, diet schedule, and fodder sampling

The specimens used in this study come from the modern sheep flock of Ripollesa breed raised between 2017 and 2019 under the SUMA II experimental program. Detailed information about the experimental program is available in Chapter III. Three specimens of this flock (Group 2) were selected to perform the isotopic analyses: OV-08 (ID 711-170110), OV-07 (ID 704-170048, and OV-11 (ID 706-170080). They were born in March 2017 and they were slaughtered in November 2018, at 20.3 - 20.9 months of age (specific information about the sheep specimens is shown in Chapter III-Table 1).

Post-weaning consisted of three different monospecific diet periods, which alternate C_3 and C_4 plants. The sheep fed on alfalfa hay (*Medicago sativa*) (DIET1) during the first 10.5 months of life following weaning; C_4 diet period based on foxtail millet hay (*Setaria italica*) (DIET2) followed during

the next 4 months; the last 4.5 months' period the sheep fed on barley, both grains and straw (*Hordeum vulgare*) (DIET3) (the diet schedule is shown in Chapter III-figure 2).

Fodder supplied to sheep during the three diet periods was sampled for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analyses. Fodder samples were collected from troughs from November 2017 until sheep's slaughtering, and they belong to the four diet components: alfalfa, foxtail millet, barley straw, and barley grains. Isotopic results from fodder samples are shown in Chapter III-section 1.4. The two barley components –grain and straw– involved in DIET3 present large differences in their $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values. The isotopic composition estimated for the whole DIET3 according to the different protein contribution of the two components is shown in Chapter III-Table 6. We are aware that some differences could exist between $\delta^{13}\text{C}_{\text{whole-plant}}$ (bulk sample) and $\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}$ (Fagre et al., 1991), so plant carbon isotopic results are not fully representative of the real isotopic contribution coming from protein.

1.2.2. Dentine sampling and collagen isotopic analyses

Sheep mandibles were separated from the skull, partially defleshed, and boiled in distilled water for several hours. Second (M_2) and third (M_3) left mandibular molars were selected for analysis. At the time of death, the M_2 were partially worn and enamel-root junction (ERJ) was recently formed. Roots were in an early stage of development at the time of death, barely exceeding the ERJ. M_3 presents an early stage of eruption, the cuspids are slightly or not worn, and around 2/3 parts of the crown are formed (the teeth development stage of the selected sheep is shown in Annex II-figure 2).

The posterior lobe of M_2 and anterior lobe of M_3 were cut and separated from the tooth using a diamond disc. Teeth sampling and samples treatment were performed at the Biomolecular Laboratory of the Catalan Institute of Human Palaeoecology and Social Evolution (Tarragona, Spain). Dentine was sampled following Balasse et al. (2001). The selected lobes were demineralized in EDTA (0.5M, pH 8) at room temperature (Tuross et al., 1988). The solution was renewed every 2-5 days. Complete demineralization took about 2 months for the M_2 lobe and about 1 month for the M_3 lobe. Once demineralized, the lobes were intensely rinsed with distilled water, including a soak in distilled water for a week, in order to remove EDTA completely. Sampling was then performed with a scalpel by cutting the buccal part of each lobe in 2mm sections, following the vertical axis (i.e. from the top to the bottom of the tooth). A total of 18 to 20 samples were obtained in M_2 molars and 14 samples in M_3 . In M_2 lobes, the distance of the root base from ERJ was measured before demineralization. During sampling, the base of the sampled buccal lobe was considered as reference. Sample position was then expressed as distance from ERJ to allow for comparison between molars. Cuspid was used as reference for M_3 sampling, since M_3 molars were not worn or presented slight wear without compromising the tooth length. Each sample was soaked in 0.125M NaOH for 20h at room temperature in order to remove some lipids (Ambrose, 1990a; Ambrose & Norr, 1993), and then rinsed again with distilled water several times. Samples were homogenized by solubilization in a HCl 10^{-2} M solution (pH 2), at 100°C for 17h (Bocherens et al., 1991), then filter and freeze-dried.

A total of 80 samples were taken for isotopic analyses. Around 300 μg of collagen was weighed into 6x4 mm tin capsules. Carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) stable isotope ratios were measured using a Thermo Flash 1112 elemental analyzer (EA) coupled to a Thermo Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer (IRMS) with a ConFlo III interface at the Institute of Environmental Science and Technology (ICTA-UAB) (Barcelona, Spain). The international standard laboratory IAEA 600 (caffeine) was used as control. The average analytical error was $<0.15\%$ (1σ) calculated

for each isotopic measurement, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ separately. $\delta^{13}\text{C}$ values are expressed relative to Vienna PeeDee Belemnite (V-PDB) standard and $\delta^{15}\text{N}$ values relative to air N_2 (AIR). The reliability of the isotopic signatures of the collagen extracts was addressed using carbon and nitrogen content values, and the atomic C/N ratio, settled $3.1 < \text{C/N} > 3.5$. It was not possible to calculate the % of collagen yield since sampling was carried out once the whole tooth was demineralized.

1.3. Results

1.3.1. Dentine collagen $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values

Carbon and nitrogen isotopic composition, carbon and nitrogen content values, and C:N ratios from dentine collagen samples are presented in Annex IV. All samples present carbon content values, nitrogen content values and C:N ratios according to modern collagen data (Ambrose, 1990b; Van Klinken, 1999). All samples yield C:N ratios between 3.1 and 3.4. Carbon content (in wt % C) ranges from 44.8% to 24.9% (mean $36.8 \pm 3.45\%$) and nitrogen content (in wt % N) ranges from 16.2% to 9.3% (mean $13.5 \pm 1.21\%$).

Collagen samples from M_2 molars present mean values of $-19.0 \pm 2.04\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $+10.3 \pm 2.46\%$ in $\delta^{15}\text{N}$ (Table 1). Collagen samples from M_3 are slightly enriched in ^{13}C , showing mean values of $-16.4 \pm 2.42\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $+13.8 \pm 0.92\%$ in $\delta^{15}\text{N}$. Serial samples yield high intra-tooth isotopic variation in both second and third molars (figure 1) as a consequence of the different feeding periods involved in sheep's diet: in M_2 samples, $\delta^{13}\text{C}$ values range from -21.5% to -14.4% and $\delta^{15}\text{N}$ values range from $+6.9\%$ to $+14.9\%$; in M_3 samples, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values range from -22.2% to -12.7% , and from $+11.3\%$ to $+15.1\%$, respectively.

The three sheep individuals show similar intra-tooth isotopic variation as expected from animals raised and fixing isotopic signatures under identical conditions: 1) the range of variation for the three individuals present mean values of 6.2 ± 0.26 and 7.4 ± 1.77 in $\delta^{13}\text{C}$, and 7.2 ± 0.38 and 2.9 ± 0.93 in $\delta^{15}\text{N}$, M_2 and M_3 respectively; 2) according to maximum values, inter-individual variability is $\leq 0.7\%$ and $\leq 1.8\%$ in $\delta^{13}\text{C}$, and $\leq 0.8\%$ and $\leq 0.7\%$ in $\delta^{15}\text{N}$, M_2 and M_3 respectively; according to minimum values, inter-individual variability is $\leq 0.8\%$ and $\leq 1.8\%$ in $\delta^{13}\text{C}$, and $\leq 1.0\%$ and $\leq 1.1\%$ in $\delta^{15}\text{N}$, M_2 and M_3 respectively.

Intra-tooth isotopic sequences for each individual are presented in figure 2. In all sampled specimens, isotopic variation along the M_2 molars follows a progressive increase in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values along most part of the crown, followed by an abrupt decrease represented in the last 2-4 mm. In the M_3 crowns, sequences show a short ascendant trend in $\delta^{13}\text{C}$ values during the first 8 mm (except for OV-11) then interrupted by a sudden deviation into a trend of decreasing values. In $\delta^{15}\text{N}$ values, the M_3 sequences show a short increase until forming a "plateau" in the middle of the crown, followed by a less accentuated decrease -both in amplitude and extension- than in $\delta^{13}\text{C}$ values.

		N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		
			Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
OV-07	M ₂	14	-18.7	1.8	5.9	+10.7	2.5	7.6
	M ₃	11	-16.5	2.3	6.4	+13.8	0.9	2.9
OV-08	M ₂	15	-18.5	2.1	6.3	+10.8	2.4	6.9
	M ₃	11	-15.8	2.1	6.4	+14.1	1.1	3.8
OV-11	M ₂	17	-19.7	2.1	6.4	+9.6	2.4	7.1
	M ₃	11	-16.9	3.0	9.5	+13.6	0.7	1.9

Table 1. Summary table showing mean collagen isotopic values, standard deviation and range for the three individuals and teeth analyzed.

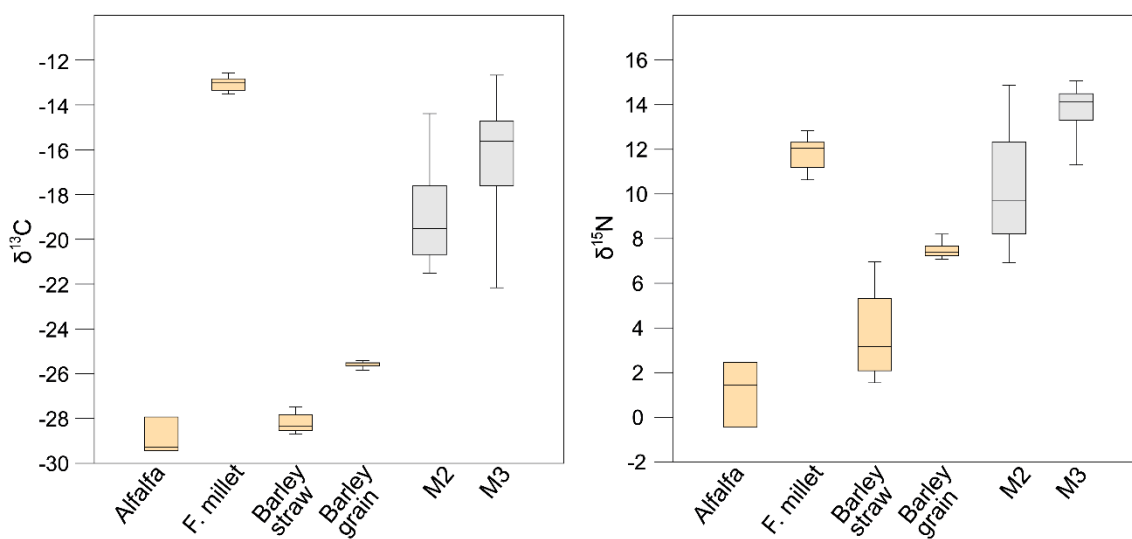


Figure 1. Box plot showing $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for the four fodder types analysed and for the collagen samples of the three sheep specimens plotted by sampled molar.

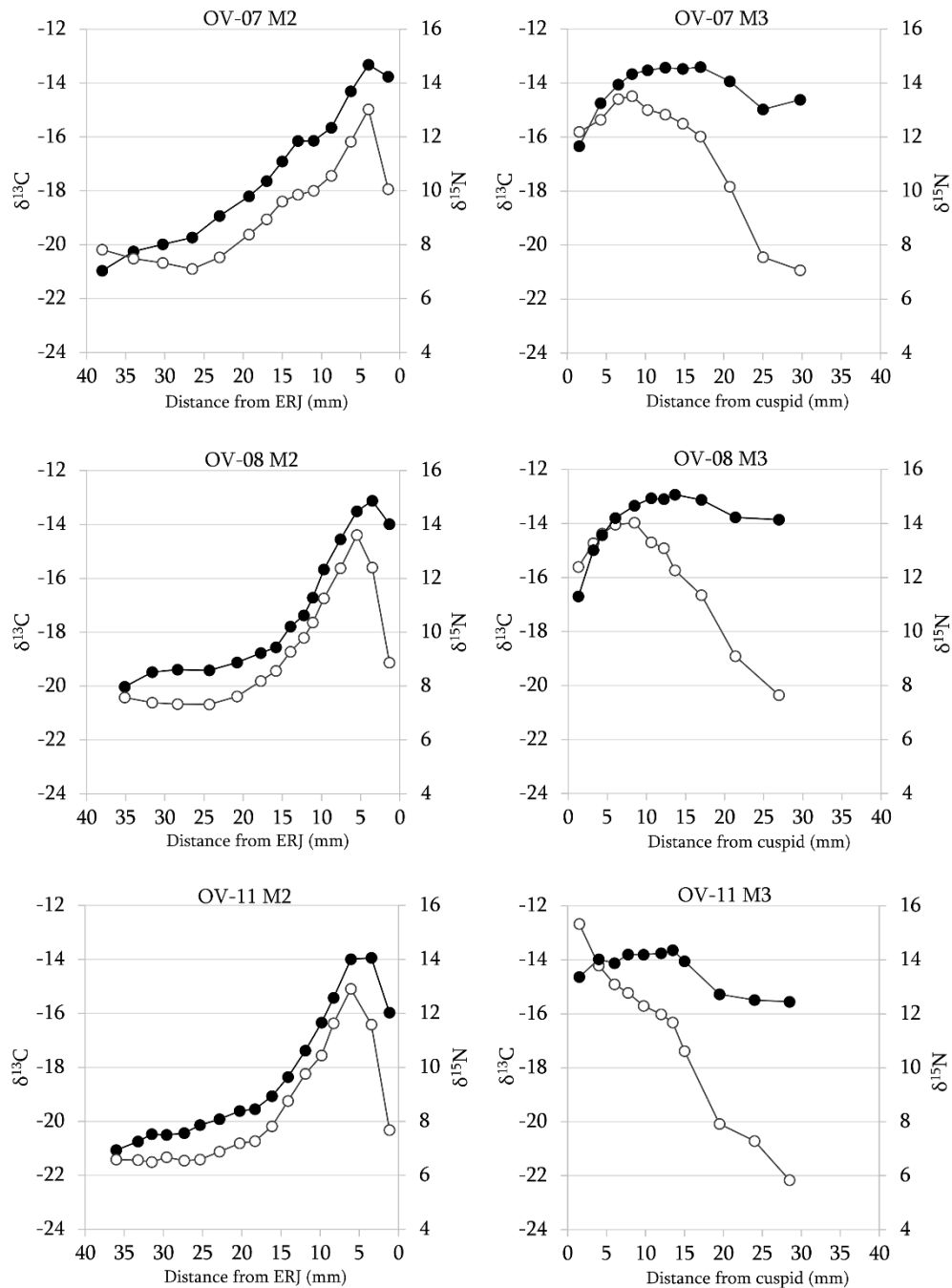


Figure 2. Sequential $\delta^{13}\text{C}$ (white) and $\delta^{15}\text{N}$ (black) values measured in collagen along the crown of the second (M_2) and third (M_3) molars of the three sheep specimens analyzed (OV-07, OV-08, OV-11).

Minimum $\delta^{13}\text{C}$ values recorded in sheep dentine samples from the first part of the M_2 sequences show a mean of $-21.0 \pm 0.43\text{‰}$, consistent with a C_3 diet. Mean maximum $\delta^{13}\text{C}$ values in all M_2 ($-14.8 \pm 0.38\text{‰}$) and M_3 s ($-13.7 \pm 0.93\text{‰}$) are consistent with an important intake of C_4 plants in sheep's diet. Last samples of M_2 and M_3 crowns show again low $\delta^{13}\text{C}$ values closer to a consumption of C_3 plants ($-19.1 \pm 1.19\text{‰}$ and $-21.1 \pm 0.92\text{‰}$, respectively). As for $\delta^{15}\text{N}$, minimum values are recorded in the first part of M_2 crowns and show a mean of $+7.3 \pm 0.58\text{‰}$, while the maximum values recorded in the last mm of all M_2 show a mean of $+14.5 \pm 0.43\text{‰}$. In M_3 crowns,

maximum values of $\delta^{15}\text{N}$ provide a mean of $+14.7 \pm 0.36\text{‰}$, while last samples yield $\delta^{15}\text{N}$ mean values of $+13.3 \pm 0.84\text{‰}$.

1.4. Discussion

1.4.1. Intra-tooth isotopic variation related to diet shifts

The pattern of intra-tooth variation of $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$ obtained through dentine sequential sampling fits well with the differences observed between fodder types in their carbon and nitrogen isotopic composition. Diet shifts –succession of DIET1, DIET2, and DIET3– are recorded in the M_2 and M_3 isotopic sequences along two progressive trends of increasing-decreasing values in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Collagen highest isotopic values recorded in both molars necessarily correspond to the DIET2 signature entirely based on a C_4 plant enriched in ^{15}N (foxtail millet). DIET1 period based on alfalfa is mainly recorded in the first half of M_2 crown by low values, while DIET2 and DIET3 (barley) are mainly recorded through the last part of the M_2 and along the whole crown of the M_3 . In third molars samples, the smaller range of variation of nitrogen isotopic values compared with carbon values is also consistent with plant data, where the isotopic variation between DIET2-millet and DIET3-barley is much larger in $\delta^{13}\text{C}$ values than in $\delta^{15}\text{N}$ values.

The oscillation pattern of carbon and nitrogen values found along the M_2 and M_3 sequences is highly uniform for all three sampled individuals. In addition to the identical dietary conditions existing for all sheep, this aspect suggests that sampled animals followed similar patterns of crown formation. Inter-individual variability in maximum and minimum values is $\leq 1.0\text{‰}$ for all M_2 and $\leq 1.8\text{‰}$ for all M_3 , in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$; however it is worth noting that excluding OV-11, inter-individual variability in M_3 s is reduced to $\leq 0.6\text{‰}$ in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Similar small inter-individual isotopic differences between same species specimens raised under the same dietary conditions have already been noticed in collagen composition (for small mammals with monoisotopic diets: Ambrose & Norr, 1993; Tieszen & Fagre, 1993; for medium-large mammals with non-monoisotopic diet: Balasse et al., 2001; Doherty et al., 2022; Von Holstein et al., 2013; Webb et al., 2016) or other proteinaceous tissues (Sponheimer et al., 2003a, 2003b), as a result of individual metabolic and physiological factors affecting the final tissue isotopic composition. Moreover, the dissimilarities seen in the M_3 of OV-11 against the others M_3 of OV-07 and OV-08 –both in the oscillation pattern and in the Max. (maximum) and Min. (minimum) isotopic values– are probably related to a slightly-later development of this third molar in OV-11, a scenario where the first diet isotopic signature previous to the 13th month would be absent. Previous studies have shown a larger variability in the M_3 growth timing than in M_2 within sheep populations (Milhaud & Nezeit, 1991; Weinreb & Sharav, 1964; Zazzo et al., 2010), a feature also observed through isotopic approaches (Blaise & Balasse, 2011; Tornero et al., 2013).

DIET2 and DIET3 periods are represented in the isotopic sequences over a different length (in mm) between second and third molars, despite representing the same time span in both molars (four months span each period). This fact is well consistent with the variable tooth growth rates existing along the crown, where the deposition rate of dentine is higher during the first months of tooth development than towards the latest growth stages when the growth rate decreases (Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018). This histological feature (i.e. attenuation of the crown growth rate) results in a more prolonged representation of a certain isotopic signature in the upper part of the crown, while the same time span would be cramped in the last part of the tooth. This trend has also been

highlighted in previous works implementing enamel sequential analysis in hypsodont species, due to similar differential growth rates of this tissue along the tooth crown (Balasse, 2003b; Bendrey et al., 2015; Zazzo et al., 2010). Our study found that, as for enamel, when implementing dentine sequential analysis in sheep, the dental growth stage when diet variations occur determines the representation of the isotopic signatures in the sequences, not only in their position in the crown but also in their length. Hence, dentine growth rates must be considered in final interpretations.

1.4.2. Effects of the sampling approach on intra-tooth isotopic variation

In both M₂ and M₃, δ¹³C and δ¹⁵N values obtained from collagen samples show a quite reduced range of variation in contrast with the large isotopic differences existing between each diet period (figure 1). Results from fodder analysis show that diet changes entailed drastic shifts in the sheep's isotopic input. For the first and second diet change respectively, an input variation of around ~15.8‰ and ~12.7‰ in δ¹³C and ~10.5‰ and ~4.5‰ in δ¹⁵N could be expected. However, dentine samples obtained through sequential sampling hardly reach such ranges of variation in their isotopic values. Collagen shows, in M₂ and M₃ respectively, a maximum range of 7.1‰ and 9.5‰ in δ¹³C values and a maximum range of 7.9‰ and 3.8‰ in δ¹⁵N values.

This observation is mainly related to the effect that the sampling procedure here implemented is having on the isotopic intra-tooth variation. Dentine is deposited by apposition of layers oblique to pulp cavity and therefore oblique to the tooth vertical axis, a growth model previously demonstrated through histological observations (Kahle et al., 2018; Weinreb & Sharav, 1964; Witzel et al., 2018) and through dentine isotopic data (Balasse et al., 2001; Balasse & Tresset, 2002; Zazzo et al., 2006). As a result, when a longitudinally sampling procedure cross-cuts the whole dentine thickness it causes the admixture of dentine increments synthesized in different moments of life. Therefore, it is expectable that in our study –performed during one year– dentine samples from M₂ and M₃ may yield isotopic values from more than one feeding period, depending on the position of the samples in the tooth crown. When this dentine admixture affects samples yielding maximum and minimum isotopic values, it results in shorter ranges of intra-tooth variation than expected based on diet input.

This fact is most evident in the highest δ¹³C_{collagen} values, too depleted to represent the C₄ diet period exclusively (DIET2), both in M₂ samples (mean observed diet-collagen enrichment: Δ¹³C_{diet2-collagen} = -1.7±0.38‰) and M₃ samples (mean observed diet-collagen enrichment: Δ¹³C_{diet2-collagen} = -0.6±0.93‰). These values seem quite depleted taking into account that a diet-collagen enrichment of 3-5‰ should be expected in δ¹³C in primary consumers (Ambrose & Norr, 1993; Bocherens & Mariotti, 2002; Froehle et al., 2010; Lee-Thorp et al., 1989; Tieszen & Fagre, 1993). Considering dentine growth geometry, in these samples the DIET2 isotopic signature is probably attenuated because of some incorporation of later increments representing DIET3, more depleted in ¹³C. As a sampling-related issue, similar attenuation may exist in maximum values of δ¹⁵N_{collagen}, although in this case, the diet-collagen differences are larger (attending max. values: Δ¹⁵N_{diet2-collagen} = 1.4±0.43‰ in M₂ and Δ¹⁵N_{diet2-collagen} = 1.6±0.36‰ in M₃) and somewhat more coherent with usual δ¹⁵N enrichment values. The interference of DIET3 signature in maximum values of δ¹⁵N is here less evident, probably because DIET2 and DIET3 present more similar isotopic values in δ¹⁵N than in δ¹³C.

A similar sampling effect could also be expected in both minimum δ¹⁵N and δ¹³C values of all M₂, according to the dentine growth pattern and the position of these samples in the first part of M₂ crowns. Here they may include some dentine increments developed during the following diet periods, therefore yielding higher isotopic values than expected from DIET1 when isolated. For the

same histological reason, samples from the last part of the crown should, in contrast, include less dentine admixture, since dentine is here thinner and represents only the final growth development (for illustrating dentine growth geometry, cf. Kahle et al., 2018, and Witzel et al., 2018).

Finally, it is worth noting that in the 20 months-old sheep specimens analyzed here, dentine does not exceed ERJ either in second or third molars at death time. However, dentine continues developing along the whole life of the individuals, conforming the roots and narrowing the pulp chambers and the root canal (Hillson, 2005; Milhaud & Nezit, 1991). Therefore, when applying this sampling procedure, isotopic variations obtained from dentine will be progressively attenuated as the tooth continues developing and growing in thickness with the apposition of new dentine. Our study suggests that tooth development stages should be considered in order to implement dentine isotopic sequential analysis in sheep and younger specimens should be preferably selected when possible.

1.4.3. Temporal resolution

The diet changes induced on sheep were abrupt, produced in one day. However, diet changes are apparently represented in intra-tooth isotopic sequences along two progressive trends of increasing-decreasing values. Around 1.5 and 2 months of diet-tissue isotopic equilibration is expected (Jones et al., 1981; M. Sponheimer et al., 2003b), but effects of the longitudinal sampling procedure should also be considered to explain this observation. Considering the dentine growth geometry of hypsodont molars, it is reasonable to assess that the isotopic variation observed in the intra-tooth sequences starts with the incorporation of inner and later-formed dentine to the sample, thus representing the progressive admixture of subsequent increments instead of the actual collagen variation through time (i.e. equilibration period). Although the equilibration process is indeed recorded in dentine collagen, the admixture of dentine derived from the longitudinal sampling necessarily overstates this 2 month process, resulting in an earlier and longer representation of the isotopic variation. This aspect had been previously noticed in cattle molars by M. Balasse et al. (2001) where diet shifts were represented in dentine intra-tooth sequences earlier than expected according to crown development timings known for cattle.

In the sheep specimens analyzed in this study, these effects are well evident in the representation of the first change of diet –occurring at the 13th month of life– along the M₂ crown. The ascending trend in isotopic values starts around 25 mm from ERJ, while it would be expectable that this moment of life would be represented much onwards in the crown, in the last 1/5 part according to crown growth rates reported in sheep in previous studies (Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018). When considering these dentine growth timings reported for M₂ and M₃ crowns, in contrast, the moments on sheep's life when diet shifts occurred seem to fit better with the final position of ascending/descending trends instead of the starting point of variation (figure 3). This fact is coherent with the dentine growth geometry and the sampling implemented: final points of the variation trends should correspond to the crown's position where the previous diet signature is no longer sampled, i.e., the part of the crown first developing –in length– under the new isotopic background.

Taking this into account, we suggest that final points of the ascending/descending trends reached in intra-tooth sequences obtained through this sampling may coincide with the part of the crown growing in length when collagen is being synthesized under the new period isotopic composition, thus representing that particular period of life after the equilibration period. This is an important aspect since it entails that through sequential dentine analysis it could be possible to situate at a

temporal level different diet periods existing in the animal's life, provided that dental growth timings are known in detail. Moreover, it is worth noting that since dentine collagen is synthesized during the first phase of pre-dentine deposition (Carlson, 1991; Nanci, 2013), it is expectable that the later mineralization process does not distort the isotopic signature of the organic fraction. More specific knowledge of dentine development would allow for determining in a precise way the temporal resolution of the sampling (i.e. when diet changes occurred in the animal's life period).

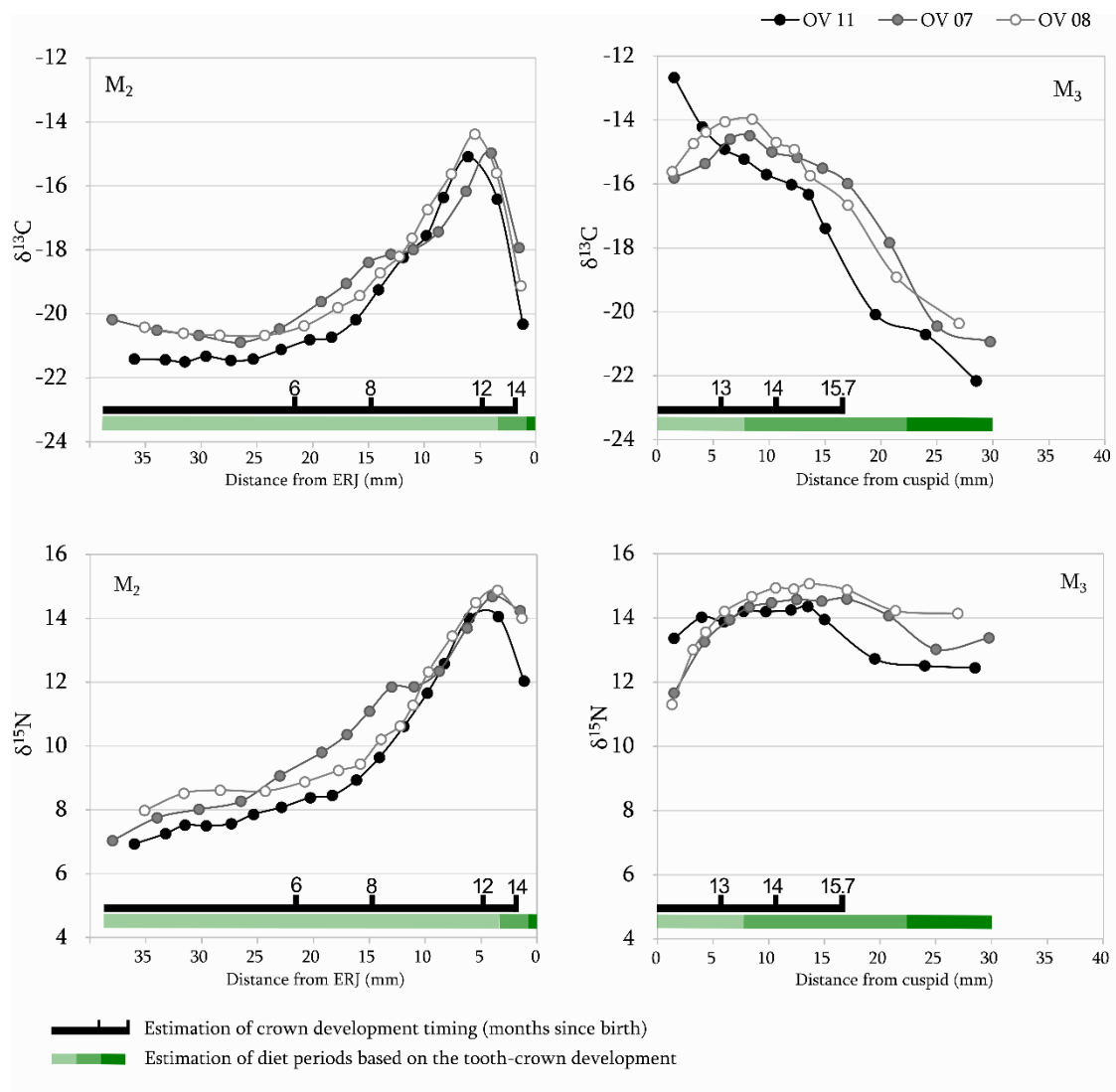


Figure 3. Sequential $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values measured in dentine-collagen of second (M₂) and third (M₃) molars. The horizontal black bars represent an estimation of the crown development timing in the tooth vertical axis (months since birth), according to dentine growth rates reported by Witzel et al. (2018) for sheep's M₂ and M₃ molars. The horizontal green bars indicate an estimation of the three diet periods. Note that isotopic variations are represented earlier than expected.

1.5. Conclusions

The sampling procedure implemented in this study enables obtaining isotopic data based on the longitudinal growth dynamics of high-crowned molars, a key feature in performing high-resolution analysis on tissues developing progressively during annual time spans. Results from this study show that this procedure is suitable for representing a minimum of three different scenarios of dietary conditions in sheep's life along second and third molars, even when they present different tooth growth stages. Furthermore, it allows identifying intra-tooth isotopic variation patterns within populations, since inter-individual differences are not related to sampling and rely on uncontrollable factors like metabolism or growth timing differences. Although the admixture of dentine increments is also represented in the isotopic sequences, it is possible to assign temporal information to the intra-tooth isotopic data obtained. Methodological efforts are needed in this direction.

Regardless of the growth-geometry handicap, the main strength of implementing a longitudinal post-demineralization sampling is obtaining dentine samples susceptible to be treated with the standard protocols of collagen purification, supporting its applicability to the archaeological record where some collagen preservation problems may exist and where it becomes essential to guarantee reliable $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$ values.

2

New methods for old challenges: a sampling protocol for sequential stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth

2.1. Introduction

In this study, we present a new sequential sampling strategy of dentine which allows for performing stable carbon and nitrogen isotope analysis and which better suits molar growth in hypsondont species than the standard method of DSA previously developed for these species (Balasse et al 2001). Since the inner dentine is not sampled through the new sampling strategy, it allows to take advantage of the longitudinal development in high-crowned teeth, while obtaining better resolution than previous sampling protocols. This method is tested in 5 modern sheep specimens coming from the SUMA II experimental program, where diet conditions and isotopic inputs are known. The results are compared with standard methods of dentine and enamel sequential analyses performed in the same specimens to evaluate the resolution of this new method. We evaluate the sampling resolution and its potential biases in the implementation in the archaeological record.

2.2. Materials & Methods

The sheep specimens selected for the present study come from the sheep flock of Ripollesa breed raised under the SUMA II experimental program (Group 2). Detailed information about the experimental program is included in Chapter III. A total of five sheep specimens from this flock were selected for the present study (OV-07, OV-08, OV-09, OV-10, OV-11), all of them slaughtered at 20.5-21 months old (detailed information for each specimen is given in Chapter III-Table 1).

Post-weaning diet was based on three monospecific diets alternated as follows: DIET1, based on alfalfa hay (*Medicago sativa*); DIET2, based on foxtail millet hay (*Setaria italica*); DIET3, based on barley (*Hordeum vulgare*) supplied in the form of straw and grain (the diet schedule is shown in Chapter III-figure 2). These three diets were scheduled in a C_3 -leguminous- C_4 - C_3 plant scheme, thus expecting major differences in the isotopic signature between these periods. Diet changes were abruptly performed on March 22nd and July 10th, when sheep were 12 and 16 months old, respectively. Fodder samples from the three monospecific diets (alfalfa, foxtail millet, barley-straw and barley-grains) were periodically collected from troughs from November 2017 until sheep's slaughtering –thus covering the last year of sheep's life– and were subjected to stable carbon and

nitrogen isotope analysis. Main isotopic results from fodder analyses are shown in Chapter III-Table 3.

The mandibles from the five selected sheep specimens were separated from the skull, partially defleshed and boiled in water (100°C) for two hours; the remaining soft tissues were then removed manually. M₂ molars were extracted from right hemi-mandibles. At the time of death, M₂ showed a wear stage D following criteria in Payne (1973), and crown was recently completed; roots were in an early stage of development, barely exceeding the enamel-root junction (ERJ). Posterior lobes of right M₂ (N=5) were selected for sequential stable isotope analysis of enamel and dentine tissues.

2.2.1. Enamel sequential sampling

Enamel sampling was performed on the buccal side of the posterior lobes of right M₂, using a Dremel tool coupled to a diamond bit. Between 23 and 29 samples were obtained mechanically in each sequence. Samples weighing 5.3 ± 1.2 mg were obtained each 1.5-2 mm along the crown's longitudinal axis. The position of samples was noted as the distance (in mm) from the ERJ. Powder samples were then chemically treated following protocols published by Balasse et al., (2002) and Tornero et al., (2013). Briefly, samples were treated for 4 h in 0.1 M acetic acid [CH₃COOH] (0.1 ml solution/1 mg of sample), rinsed five times with Milli-Q water, and dried in an oven for 48h at 70°C. During chemical treatment, samples (N=127) lost an average of $45.9 \pm 9.2\%$ of their weight.

2.2.2. Dentine sequential sampling

Posterior lobes were separated from the tooth mechanically. Lobes were demineralized in EDTA (0.5M, pH=8) for several weeks at room temperature following criteria from Tuross et al. (1988) and Balasse et al. (2001). Demineralized lobes were then intensively rinsed with Milli-Q water, including a one-week soak, and then placed in a 0.125M NaOH solution at room temperature for 20h, rinsed again several times and lyophilized. The buccal part was then sampled using a cylindrical diamond point of 1 mm of diameter, sampling each 1.5 mm along the tooth's vertical axis and obtaining powder samples weighing 1.0 ± 0.3 mg. Depth sampling was homogenized using the point diameter as reference, resulting in grooves of about 0.3 to 0.5 mm deep. Between 23 and 26 samples were obtained in each sequence.

The position of samples was noted as distance (in mm) from the base of the sampled lobe (i.e. root base). Since demineralized lobes slightly shrink during freeze-drying (3.3 ± 0.5 mm), the distances are corrected considering the total length of each lobe before and after freeze-drying as follows: $d_0 = (d_1 * l_0) / l_1$, where 'd₀' is distance from root-base before lyophilization, 'd₁' is distance from root-base after lyophilization, 'l₀' is length of the lobe before lyophilization, and 'l₁' is length of the lobe after lyophilization. The distance of the root base from ERJ was measured before demineralization, so dentine samples position may be also expressed as distance from ERJ to allow comparisons between molars, and between enamel and dentine series.

Powder samples were treated with a 0.5M HCL solution for 30 min following criteria in Czermak et al. (2020) to avoid potential contamination of precipitated atmospheric CO₂ (Hatté et al., 2001). Samples were then rinsed in Milli-Q water, and freeze-dried. Here, we refer as collagen the EDTA insoluble residue obtained after this treatment protocol, although other minor non-collagenous tooth proteins may be present in the sample after demineralization steps (Ambrose 1990; Cleland et al., 2021; Guiry and Szpak 2020; Masters 1987; Tuross et al., 1988).

To test the resolution of this sampling strategy, this method (hereinafter “drill-sampling” or DS) is compared with the standard dentine sampling previously implemented in zooarchaeological studies for sequential isotopic analysis, which obtains “chunk” samples by slicing the lobe into 2 mm sections once demineralized (Balasse et al., 2001). This standard method (hereinafter “slice-sampling” or SS) was also tested in the same sheep individuals used in this study, but using the posterior lobes of left M_2 teeth (results given in section 1 from this Chapter) instead of right M_2 teeth (results in this section).

2.2.3. Isotopic measurements

A total number of 127 enamel bioapatite samples and 125 dentine collagen samples were subjected to isotopic analysis. Each sample was measured once. Carbon isotope ratios of treated enamel bioapatite samples were measured using an automated Kiel-III Carbonate Device coupled to a Finnigan MAT 252 isotope ratio mass spectrometer (IRMS) at the Environmental Isotope Laboratory (Department of Geosciences) of the University of Arizona (USA). Samples weighting ~600 μg were reacted with dehydrated phosphoric acid under vacuum at 70°C. Measurements' accuracy and precision were checked and calibrated using NBS-19 (theoretical $\delta^{13}\text{C}$ values = +1.95‰) international standard. All measured values of the standard are shown in Annex III-Table 1. The mean analytical precision varies by $\pm 0.05\%$ (1σ) for $\delta^{13}\text{C}$, determined within each run and from replicate measurements of standards.

For dentine samples, ~350 μg of collagen were weight into tin samples. Carbon and nitrogen content (%), and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures were measured using a Thermo Flash 1112 elemental analyzer (EA) coupled to a Thermo Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer (IRMS) with a ConFlo III interface at the Institute of Environmental Science and Technology (ICTA-UAB) (Barcelona, Spain). The international standard IAEA 600 (caffeine) (theoretical values: $\delta^{13}\text{C}$ = -27.77 \pm 0.04‰, $\delta^{15}\text{N}$ = +1.0 \pm 0.2‰) was used for data calibration. All measured values of the standard are shown in Annex III-Tables 2, 3 (session 1 to 5). The mean analytical precision was $\pm 0.08\%$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\pm 0.11\%$ $\delta^{15}\text{N}$, determined within each run and from repeated measurements of standards. Isotope ratio is reported in δ notation: $\delta^{13}\text{C}$ values are expressed relative to Vienna PeeDee Belemnite (V-PDB) standard and $\delta^{15}\text{N}$ values relative to air N_2 (AIR).

2.3 Results

2.3.1. Results from sequential $\delta^{13}\text{C}$ analysis of enamel

Results from stable carbon isotope analysis of all enamel bioapatite samples are shown in Annex V. The Table 2 shows a summary with the minimum (Min.) and maximum (Max.) $\delta^{13}\text{C}$ values, and the maximum range of variation per each sheep specimen. Enamel samples yielded $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from -14.4 ‰ to -2.5‰. All teeth yield similar absolute carbon values, where Min. values range from -14.4‰ to -13.3‰, and Max. values range from -3.5‰ to -2.5‰. All specimens show a high intra-tooth variation in their $\delta^{13}\text{C}$ values: the mean amplitude is 10.9 \pm 0.4‰. Inter-individual variation (considering Min. and Max. values) is less than 1.1‰.

The distribution of $\delta^{13}\text{C}$ values along the M_2 crowns is shown in figure 4. Every tooth shows a similar variation of the carbon isotopic values, where the highest and lowest values are located in similar positions of the tooth crown. The carbon values in all teeth vary in accordance with the dietary

conditions induced to sheep during the last year of life, when three monospecific-forage periods were alternated in a C₃-C₄-C₃ plant scheme. The lowest δ¹³C values of the first part of the sequence represent DIET1, while the increase of values at the middle of the sequence and the following decrease represents the changes into DIET2 and DIET3, respectively.

Specimen	δ ¹³ C _{bioapatite} (‰)			δ ¹³ C _{collagen} (‰)			δ ¹⁵ N _{collagen} (‰)		
	Min.	Max.	Range	Min.	Max.	Range	Min.	Max.	Range
OV-07	-14,0	-3,5	10,4	-22,9	-12,1	10,8	+7,0	+16,3	9,3
OV-08	-13,3	-2,5	10,7	-22,4	-11,9	10,5	+7,4	+15,7	8,3
OV-09	-13,8	-3,3	10,5	-22,8	-11,4	11,5	+7,2	+16,4	9,2
OV-10	-14,2	-2,8	11,4	-23,0	-11,7	11,3	+7,0	+16,2	9,2
OV-11	-14,4	-3,1	11,3	-23,2	-11,6	11,5	+6,5	+15,8	9,3
Mean	-13,9	-3,1	10,9	-22,9	-11,7	11,1	+7,0	+16,1	9,1
std	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4

Table 2. Summary table with isotopic results from sequential analysis of enamel (δ¹³C_{bioapatite}) and dentine (δ¹³C_{collagen} and δ¹⁵N_{collagen}). Minimum values (Min.), maximum values (Max.), and maximum range of variation (Range) are shown per specimen, with mean values and standard deviation for all specimens.

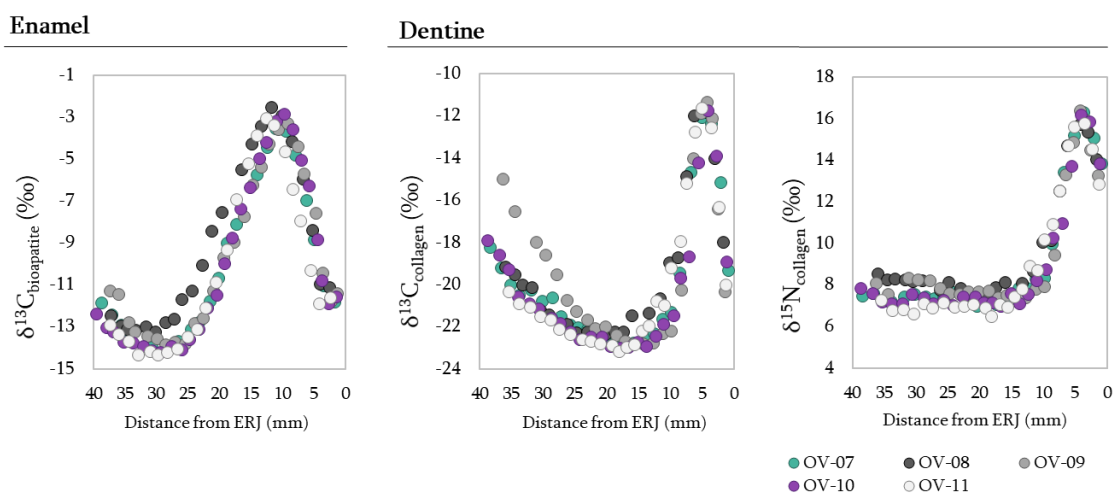


Figure 4. Distribution of isotopic values obtained by sequential sampling of enamel (δ¹³C) and dentine (δ¹³C and δ¹⁵N) along the M₂ crown of all specimens analysed.

2.3.2. Results from sequential δ¹³C and δ¹⁵N analysis of dentine

Stable carbon and nitrogen isotope ratios, carbon and nitrogen content, and C:N ratios of dentine collagen samples are presented in Annex V-Table 2. All samples yield carbon content values (in wt %C) ranging from 40.8% to 45.1% (average 43.6 ± 0.8%) and nitrogen content values (in wt %N)

ranging from 14.7 % to 16.8% (average $15.7 \pm 0.4\%$). C:N ratios range from 3.10 to 3.44 (average 3.23 ± 0.07). Dentine collagen samples yield $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from -23.2% to -11.4% , and $\delta^{15}\text{N}$ values ranging from $+6.5\%$ to $+16.4\%$. All five M_2 dentine series present high intra-tooth variation, with a mean amplitude result of $11.1 \pm 0.4\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ values, and $9.1 \pm 0.4\%$ in $\delta^{15}\text{N}$ values. Table 2 shows a summary with minimum (Min.) and maximum (Max.) isotopic values, and the maximum range of variation per each sheep specimen.

The variation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values along the tooth is shown in figure 4. Overall, all dentine sequences present small inter-individual variation, showing a similar fluctuation of isotopic values along the crown. When considering Min. and Max. isotopic values, all sequences differ inter-individually $\leq 0.8\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $\leq 0.9\%$ in $\delta^{15}\text{N}$. The major discrepancy is present in OV-09, which slightly deviates in the $\delta^{13}\text{C}$ values along the first part of the crown. A higher resolution is expected in this part of the crown, as it presents a faster tooth growth (Jordana and Köhler 2011; Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018), and inter-individual disparities (e.g. dental growth timings, or specific behavioural or metabolic differences affecting the final isotopic composition of collagen) may be here amplified.

Isotopic results from collagen samples are in accordance with the dietary conditions induced to sheep during the experimental program. In all teeth, two main diet changes (C_3 - C_4 - C_3 alternation) are represented in the second half of the tooth, in accordance with the timings of the three monospecific diets. Clear maximum peaks are present in the final part of the crown, in accordance with the DIET2 period (based on a C_4 plant highly enriched in ^{15}N), while the lowest isotopic values are located previous to the C_4 maximum peak, which fit with the previous DIET1 (alfalfa-based) period.

2.4. Discussion

2.4.1. Evaluation of the drill-sampling strategy for dentine sequential analyses

The incremental growth of dentine in high-crowned teeth is oblique to the vertical axis, so dentine continues developing in thickness while the teeth develop in high. The main advantage of sampling dentine by drilling is to obtain small-size samples where the inclusion of inner dentine increments, formed in later stages of dental development, is highly reduced. In figure 5 we compare the intra-tooth series of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values obtained in dentine by drill-sampling or slice-sampling in the M_2 of the same sheep specimens (right or left M_2 , respectively). The main effects of the slice-sampling previously observed (Balasse et al., 2001; Díez-Canseco et al., 2022) are now largely reduced as follows:

- (i) Drilled series show less attenuation of diet isotopic signatures. In both carbon and nitrogen signatures DS yields a higher range of variation than SS series ($11.1 \pm 0.4\%$ in front of $6.2 \pm 0.3\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ values, and $9.1 \pm 0.4\%$ in front of $7.2 \pm 0.4\%$ in $\delta^{15}\text{N}$ values), therefore closer to the original isotopic amplitude existing between diets (DIET1-DIET2: $\sim 15.8\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $\sim 10.5\%$ in $\delta^{15}\text{N}$). Also, DS yields a fluctuation of $\delta^{13}\text{C}$ values along the first part of the crown which is not recorded in the sliced series.
- (ii) Abrupt diet changes are represented in shorter spans in the crown, reducing the over-representation of dietary changes along the sequences. In DS series, the increasing trends of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values – i.e. isotopic change into DIET2 signatures – start in lower positions

of the crown (14.0 ± 2.1 mm and 13.9 ± 2.4 mm from ERJ, respectively), while in sliced series they start in upper parts of the crown (22.2 ± 1.3 mm and 24.2 ± 3.0 mm from ERJ, respectively) or directly after the first samples (e.g. $\delta^{15}\text{N}$ in OV-11).

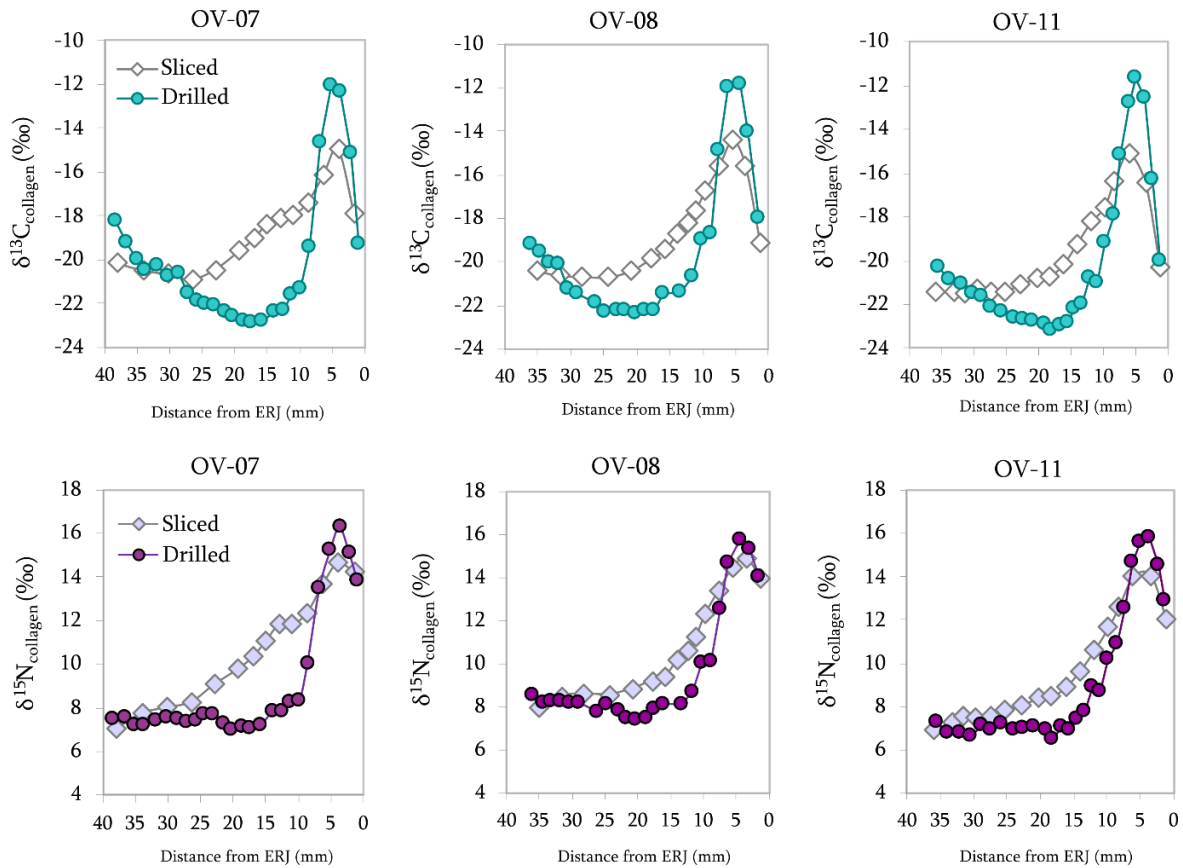


Figure 5. Sequential $\delta^{13}\text{C}$ values (upper row) and $\delta^{15}\text{N}$ values (lower row) of dentine collagen obtained by slice-sampling (rhomboid symbol) and drill-sampling (circle symbols) in M_2 molars of same specimens.

On DS series, samples incorporate a small proportion of the total dentine thickness commonly sampled by SS strategy. It entails obtaining a more faithful picture of the original isotopic variation recorded along a vertical axis of the tooth crown, since the sampling of large time-spans, which may involve different isotopic scenarios, is avoided. The more time-accurate samples of drilled series also engender that changes in diet –i.e. the shifts into new isotopic signatures– are not represented in such advanced positions of the sequences, but more accordingly to the real growth timings of the tooth crown (i.e. in height) (figure 6).

In both incremental dentine strategies, part of the isotopic variation observed in the sequences is the result of the sampling procedure rather than the actual collagen isotopic variation over time (i.e. the equilibration period between isotopic input and tissue synthesis) (Díez-Canseco et al., 2022). Considering the growth pattern of dentine in high-crowned teeth, it is expectable that the observed changes into new isotopic values are mostly reflecting the gradual admixture of subsequent dentine increments. Increments synthesized in earlier periods are progressively sampled in less proportion in favour of later increments, until the first period is not sampled anymore. This is an important

aspect to consider when interpreting the isotopic results, since the position of diet changes in the crown corresponds, if visible, to the final point of the variation observed in the sequences (commonly Max. or Min. values), instead of the starting point. However, high rates of dentine admixture may alter the position of diet changes in the sequences, as it can be observed in slice-series where the minimum $\delta^{13}\text{C}$ values of DIET1 are completely blurred.

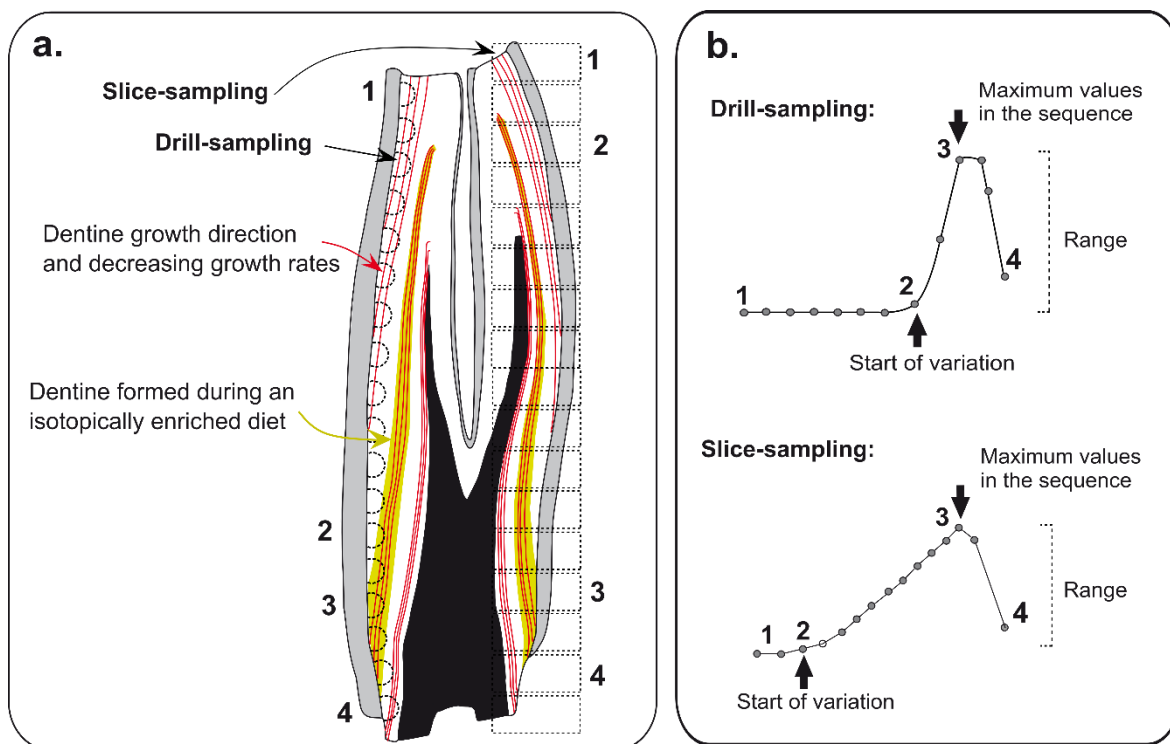


Figure 6. Representation of diet changes in the isotopic results depending on the sampling strategy implemented in dentine. a) Scheme of a bucco-lingual section of a mandibular molar. Dentine growth direction and decreasing growth rates are shown: red lines represent different groups of increments laid down in equal time spans but in different parts of the crown (edited and modified from Kahle et al., 2018). The yellow band represents a hypothetical scenario of an isotopically enriched diet during the final months of tooth crown development. b) Intra-tooth isotopic variation obtained after slice-sampling (SS) or drill-sampling (DS) approaches: changes in diet are located more accordingly to growth timing in DS series, while Max. values fit with the moment of the new diet in both SS and DS approaches.

In general, our drill-sampling allows a better representation of the original isotopic signature recorded in dentine, especially in the case of existing several dietary scenarios with different isotopic signatures. Besides, it may provide a huge advantage when sampling molars in a population where different development stages are present in teeth: the drill method provides sequences which are independent to the addition of new inner increments during growth, and thus comparable between individuals of different ages. In contrast, the slice-sampling obtains bigger size samples, presumably easier to apply to archaeological assemblages where some preservation issues may occur, but the attenuation of the input isotopic signal should be highly considered when the slice method is applied: some isotopic variations could be highly blurred or could result indistinguishable, especially along the first part of the crown or in those teeth where dentine is well developed (older specimens). Different stages of development should be avoided when implementing the slice method in inter-individual comparisons.

2.4.2. A comparison with enamel sequential analysis: histological implications, time resolution, and comparability of isotopic results

In figure 7 we compare the carbon isotope results from the sequential sampling of enamel (bioapatite $\delta^{13}\text{C}$) and dentine drill-sampling (collagen $\delta^{13}\text{C}$) performed in the same tooth. Both approaches, dentine and enamel sequential sampling, show clear similarities in their pattern of distribution of $\delta^{13}\text{C}$ values, in accordance with the alternation of $\text{C}_3\text{-C}_4\text{-C}_3$ diets induced to sheep during the experimental program. However, it is quite surprising that dentine-drilled series, despite the admixture of dentine increments, have provided a similar range of intra-tooth variation in $\delta^{13}\text{C}$ values than the one obtained in enamel through the standard protocol of sequential analysis. All dentine collagen sequences present a mean $\delta^{13}\text{C}$ amplitude of $11.1 \pm 0.4\text{‰}$, in front of the $10.9 \pm 0.4\text{‰}$ represented in enamel (actual DIET1-DIET2 $\delta^{13}\text{C}$ spacing = 15.8‰), showing a similar attenuation of the original amplitude in both approaches. This data suggests that by drilling, dentine sequential sampling is capable to represent changes in isotope ratios along the tooth crown with similar resolution as enamel standard protocols, at least in terms of the range of intra-tooth variation.

Although both approaches seem to converge in a similar damping of the isotopic sequences, different histological factors relating dentine and enamel development are involved, and the time span represented in samples is not the same in both tissues. The complexities of the enamel mineralization process, proceeding in two phases –matrix formation and a secondary mineralization or maturation– engender that the final and fully-mineralized enamel accumulates carbonate from several months, which results in a subsequent time-averaged isotope ratio (Balasse 2002, 2003b; Passey & Cerling 2002; Zazzo et al., 2010; Zazzo et al., 2005). In sheep, this whole enamel developmental process covers about 5-6 months (Balasse et al., 2012b). In the case of dentine, conversely, the attenuation of diet isotopic signatures strictly derives from the sampling performance, from mixing collagen from different increments and therefore synthesized in different moments.

Dental growth rates decrease progressively during later stages of tooth formation (Witzel et al., 2018), so the time span represented in dentine samples is not constant along the crown. Previous studies focusing on dental growth rates in Soay sheep show that the mineral apposition rates of dentine vary from $21 \mu\text{m}$ to $<2 \mu\text{m}$ per day in a first mandibular molar, decreasing along the vertical axis of growth, i.e. from cuspal to cervical, and from the enamel-dentine junction towards the pulp chamber, i.e. from outer to inner parts of the crown (Kahle et al., 2018). Considering these data, by performing a drill-sampling of $\sim 500 \mu\text{m}$ depth, samples may involve time spans which vary from 24 days (in upper parts of the crown developed during first months of dental growth) to ≥ 8 months (later formed dentine of lower and inner parts of the crown). These decreasing trends in growth ratios entail that the time span involved in each dentine sample is *gradually* enlarged in a serial sampling, increasing while approaching cervical parts of the crown. Lower growth rates are also present in enamel in the final part of the crown (Witzel et al., 2018; Zazzo et al., 2010), but due to the extended length of the maturation front, a more constant isotope-mixing and time-average along the crown should be expected in enamel samples than in dentine. This feature should be considered when interpreting isotopic data from dentine sequential analyses.

The time frame involved in dentinogenesis and enamel mineralization processes also affects directly the position of the different diet scenarios along the isotopic sequences, i.e. along the crown. In dentine sequences the position of the Min. and Max. $\delta^{13}\text{C}$ values is uniformly located in lower positions of the crown than in enamel sequences: respectively, $13.7 \pm 1.7 \text{ mm}$ and $6.7 \pm 0.8 \text{ mm}$ closer to ERJ. As a consequence of the extended period of enamel maturation, the carbon isotopic

composition from the mineral fraction of enamel represents mineralization moments occurring later in time than the development of that part of the crown (formed during a previous phase of enamel matrix formation). As a result, diet changes represented in enamel are “displaced”, and we cannot infer the age at which a diet change occurred directly from the position of isotopic changes in the tooth (Balasse 2002, 2003b). In contrast, the analyses of dentine collagen will represent the predentine apposition phase (organic-matrix formation), thus representing crown development with no delay. When analysing dentine collagen, isotopic signatures timing may be inferred directly from the position in the tooth. In this line, in agreement with Stojanovski et al. (2020), diet at death time could be also inferred from last samples in the case of still-growing teeth. However, as discussed above, time resolution decreases in the final parts of the crown, and a larger attenuation of the isotope signatures should be considered here.

The comparison of both approaches suggests that dentine sequential analyses performed by a drill-sampling may be as capable as the standard protocols of enamel sequential analyses to represent the diachronic isotopic variation recorded along the tooth crown. Even when samples do not isolate short amounts of time, these analyses allow for representing life conditions and diet variations of specimens over time.

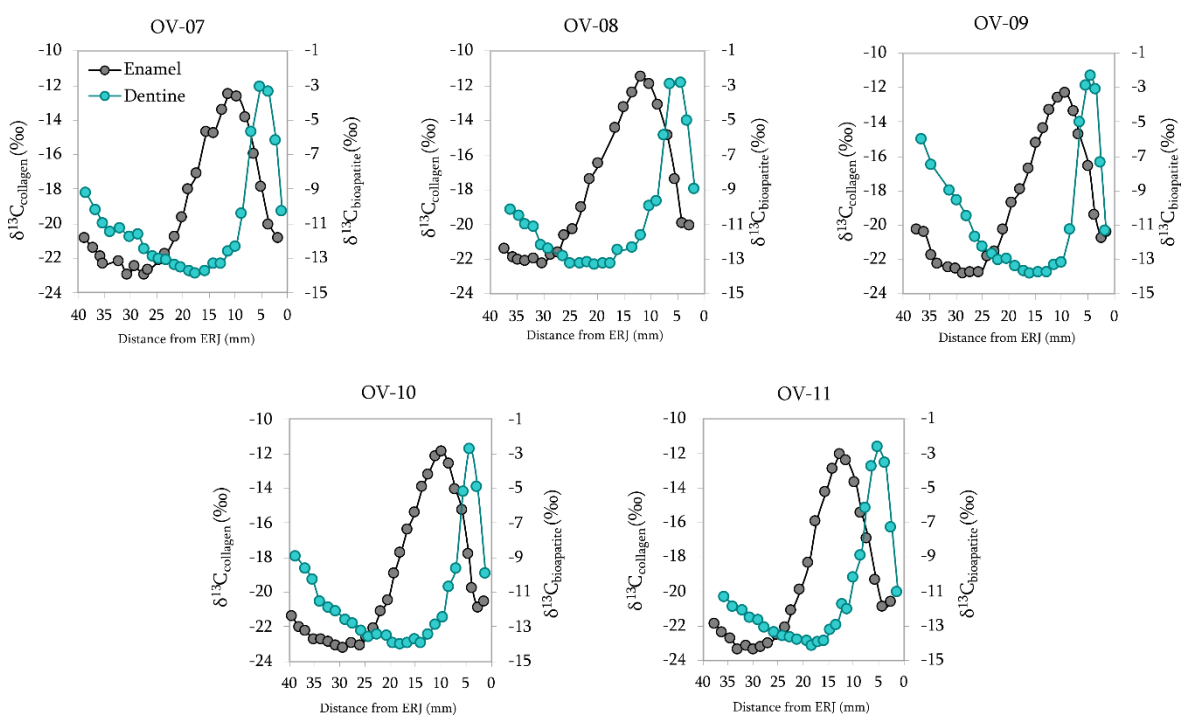


Figure 7. Carbon isotope values of dentine (blue symbol, left axis) and enamel (grey symbol, right axis) obtained by drilling in the same specimen and same tooth (all sampled sheep individuals, right M₂).

2.5. Conclusions

In this study we provide a new sampling protocol to implement sequential stable isotope analysis of dentine collagen in high-crowned teeth. This proposal highly reduces the isotopic attenuation caused by dentine admixture in comparison with previous sampling strategies, and yields similar resolution as enamel sequential analyses. A high uniformity between sampled individuals is shown in dentine isotopic results, indicating that the protocol is reproducible in different specimens while yielding comparable isotopic data. We highly recommend performing a dentine drill-sampling when possible, especially when comparing data between individuals of different ages. The method offers better guarantees than the slice-sampling procedure to represent the actual isotopic composition of collagen recorded along the tooth crown. Moreover, the isotopic variation is represented more accordingly to growth timings, providing data more susceptible to be accurately interpreted.

The implementation of this method may encourage future zooarchaeological studies to explore the uses and possibilities of stable isotope analyses of incremental dentine collagen. The protocol may also be applicable to other bovid species, although more methodological work will be needed in this line. The resolution of the strategy could be higher when implemented in bigger size species than sheep, as e.g. cattle.

3

Weaning time in domestic caprines through carbon and nitrogen isotopes: testing dentine sequential analyses in modern sheep specimens

3.1. Introduction

The role of caprines, especially sheep, in milk exploitation has been widely claimed through zooarchaeological studies from the beginning of Neolithic onwards (Gillis et al., 2022; Helmer et al., 2007; Saña & Tornero, 2008, 2012; Sierra et al., 2019; Vigne & Helmer, 2007). Artificial weaning of lambs (i.e. forced cessation of suckling before natural weaning age) is well documented ethnographically in pastoral systems where sheep dairy products are targeted (Hadjikoumis, 2017; Halstead, 1998; Makarewicz, 2011; Vigne & Helmer, 2007), but the historical transcendence of this practice is still unknown. Weaning management in caprines has been barely studied through dentinal collagen, with few data available at the moment (Makarewicz, 2011; Makarewicz et al., 2017a). The study of this process in caprines faces technical challenges: teeth present small size, which makes the sampling performance complicated, and monthly temporal resolution is targeted.

In this study, we perform dentine sequential analyses of dentine collagen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values) in early-weaned modern sheep specimens (*Ovis aries*) coming from the SUMAII experimental program, to test the ability of the technique to study lactation and weaning management in domestic sheep. We implement the *drill* method, which avoids the sampling of inner dentine and yields shorter-time span samples. Sheep were weaned 2 months after birth, raised in a stall under controlled diet and weaning conditions, and consecutively slaughtered being 11- to 20-month-old. We test the drill method as a useful tool to track weaning through carbon and nitrogen isotopes in dentine-collagen of first mandibular molars of medium-size species, and to represent diet changes independently to the developmental stage of the teeth. The study also aims to provide a reference data set (concerning the position and representation of isotopic changes in intra-tooth dentine sequences) of an early weaning in domestic sheep.

3.2. Materials & Methods

The sheep specimens selected for this study come from the SUMA II experimental program. Detailed information about the experimental program is given in Chapter III-section 1. Lambs remained with the mother for their first two months of life, raised mainly on milk (suckling). After the first month of life, while still suckling, lambs were also fed with pellet and alfalfa hay. Lambs were weaned by abrupt separation from the mother at two months of age, and then fed with a mixture of

alfalfa hay and pellet provided *ad libitum* until they were four/ five months old, and then changed into alfalfa hay only. The diet schedule is shown in Chapter III-figure 2.

A total of six sheep were selected for this study: OV-02, OV-03, OV-04, OV-05, OV-06 and OV-08. These specimens were between 11 and 20 months old at death time (Table 3). Left M₁ molars were selected for dentine sequential analysis. The M₁ showed a wear stage varying progressively -with age at death- from C to DEF (following criteria in Payne, 1973).

ID specimen	OV-02	OV-03	OV-04	OV-05	OV-06	OV-08
Age at dead (days)	324	351	391	422	457	608
Age at dead (months)	10.8	11.7	13.0	14.1	15.2	20.3
M1 wear stage (Payne, 1973)	C	C	C	CD	DEF	DEF

Table 3. Sheep specimens selected for this study: birth date, slaughter date, age at death, and wear stage of M₁ teeth.

3.2.1. Dentine sequential sampling and isotopic measurements

Dentine sampling was performed following the drill method described in detailed in Chapter III-section 3.3, and this Chapter (section 2.2.2). Posterior lobes of M₁ were separated from the tooth, and placed in a EDTA solution (0.5M, pH=8) for several weeks at room temperature. Once demineralized, the lobes were intensively rinsed with Milli-Q water, treated with a NaOH solution (0.125M) at room temperature for 20h, rinsed again and lyophilized. The buccal part of the lobes was sequentially sampled along its vertical axis using a cylindrical diamond point of 1 mm of diameter, performing grooves of 0.3 to 0.5 mm deep, and separated by 1.5 mm. Between 18 and 22 samples were obtained in each tooth. Sample position was noted as distance (in mm) from the base of the sampled lobe. Powder samples were treated with a HCL solution (0.5M) for 30 min, rinsed in Milli-Q water, and freeze-dried. The EDTA insoluble residue obtained after this protocol is thereafter referred as collagen.

During the lyophilization process, lobes shrunk 3.5 ± 0.5 mm, so the sample position -initially noted as distance from base - was corrected considering the total length of each lobe before and after freeze-drying as previously described (section 2.2.2). The corrected distances are then expressed as distance from ERJ to allow comparison between molars.

About 350 µg of collagen was weight into tin samples. Carbon and nitrogen content (%), carbon isotope ratio (¹²C/¹³C) and nitrogen isotope ratio (¹⁵N/¹⁴N), were measured using a Thermo Flash 1112 elemental analyser (EA) coupled to a Thermo Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer (IRMS) with a Conflo III interface at the Institute of Environmental Science and Technology (ICTA-UAB) (Barcelona, Spain). The international standard IAEA 600 (caffeine) (theoretical values: $\delta^{13}\text{C} = -27.77 \pm 0.04\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = +1.0 \pm 0.2\text{‰}$) was used for data calibration. All measured values of the standard are shown in Annex III (session 6 to 8). The mean analytical precision was $\pm 0.08\text{‰}$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\pm 0.11\text{‰}$ $\delta^{15}\text{N}$, determined within each run and from repeated measurements of the standard. Isotope ratio is reported in δ notation: $\delta^{13}\text{C}$ values are expressed relative to Vienna PeeDee Belemnite (V-PDB) standard and $\delta^{15}\text{N}$ values relative to air N₂ (AIR).

3.2.2. Statistic procedure

To test the correlation between age at death and isotopic results (attenuation of absolute isotopic values and position of main peaks of minimum or maximum values in the sequences) we calculated the Pearson correlation coefficient (r value) and the significance of the coefficient (p value) with Past (4.03). We used as variable 1 the days at death of the specimens, and as variable 2 the range of intra-tooth isotopic variation, or the position of the main isotopic features observed in the sequences, for both carbon and nitrogen isotope values separately. The significance was set at $p < 0.05$.

3.3. Results from dentine sequential stable isotope analysis

Carbon and nitrogen content values, C:N ratios, and carbon and nitrogen isotopic composition from all measured collagen samples are shown in Annex VI. All collagen samples present C:N ratios ranging from 3.01 to 3.54 (mean 3.21 ± 0.08), mean carbon content values of $45.4 \pm 1.1\%$, and mean nitrogen content values of $16.5 \pm 0.4\%$. Samples yield $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from -23.4‰ to -13.7‰ , and $\delta^{15}\text{N}$ values ranging from $+6.3\text{‰}$ to $+11.0\text{‰}$. All teeth yield similar minimum (Min.) and maximum (Max.) values, both for carbon and nitrogen isotopic values (Table 4), and all teeth yield similar intra-tooth isotopic variation, higher in carbon isotope values (mean range of $7.4 \pm 1.3\text{‰}$) than in nitrogen isotope values (mean range of $2.6 \pm 0.6\text{‰}$).

All teeth show similar pattern of distribution of isotopic values along the sequences, in both carbon and isotope values (Figure 8). Carbon isotope values vary from low values in the first samples ($-21.3 \pm 0.5 \text{‰}$) towards a peak of maximum values ($-15.1 \pm 0.9 \text{‰}$) located at the middle of the sequence which represents the C_4/C_3 mixed diet. A sudden shift into lower $\delta^{13}\text{C}$ values follows, with last samples yielding $-22.5 \pm 0.8\text{‰}$.

The maximum nitrogen isotope values ($9.7 \pm 0.7\text{‰}$) are located in the upper part of the sequence in all teeth. A decreasing trend in $\delta^{15}\text{N}$ values of $2.3 \pm 0.6\text{‰}$ (1.9 to 3.4‰) follows until a first peak of minimum values ($+7.4 \pm 0.3\text{‰}$) located at 14.1 ± 1.6 mm. $\delta^{15}\text{N}$ values increase again at the middle of the sequence, in parallel to the increasing trend of $\delta^{13}\text{C}$ values. Along the second half of the crown, $\delta^{15}\text{N}$ values vary a mean of 1.4‰ , with a pattern repeated in most specimens, likely relating to intrinsic variation of the diet nitrogen composition, also observed in the first part of M_2 crown of sheep from the same flock (cf. previous section 2.3).

The inter-individual variability in absolute isotope values varies 2.5‰ in Max. $\delta^{13}\text{C}$ values, 1.9‰ in Max. $\delta^{15}\text{N}$ values, and 0.8‰ in the first peak of Min. $\delta^{15}\text{N}$ values. The inter-individual variability in the position of these three values, varies 4.8 mm, 5.7 mm and 4.9 mm, respectively. Overall, the different level of dentine development between teeth (different age at death), does not affect the pattern of distribution of isotopic values along the sequences, although the higher occlusal wear in OV-08 results in a shorter sequence. Age at death (days) show no significant correlation with the position of the main isotopic features represented: max $\delta^{13}\text{C}$ values ($r = -0.14$, $p = 0.80$), or min $\delta^{15}\text{N}$ values located in the first half of the crown ($r = 0.25$, $p = 0.65$). It is not observable any attenuation of the isotopic values in relation to age at death, which shows no significant correlation with the range of intra-tooth variation ($r = 0.04$, $p = 0.95$ for $\delta^{13}\text{C}$; $r = 0.64$, $p = 0.18$ for $\delta^{15}\text{N}$).

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		
	Min.	Max.	Range	Min.	Max.	Range
OV-02	-21,4	-16,2	5,2	+7,3	+9,7	2,4
OV-03	-23,4	-15,1	8,3	+6,3	+9,2	2,9
OV-04	-22,8	-15,4	7,5	+6,9	+9,3	2,4
OV-05	-22,8	-14,6	8,2	+7,2	+9,1	1,9
OV-06	-22,3	-13,7	8,6	+7,4	+10,1	2,7
OV-08	-22,4	-15,9	6,5	+7,5	+11,0	3,5
mean	-22,5	-15,1	7,4	+7,1	+9,7	2,6
SD	0,7	0,9	1,3	0,5	0,7	0,6

Table 4. Summary table showing isotopic results (stable carbon and nitrogen isotopes) from dentine sequential analyses in M₁ teeth. Minimum values (Min.), maximum values (Max.) and range of intra-tooth variation per specimen, with mean values and standard deviation (SD) for all individuals.

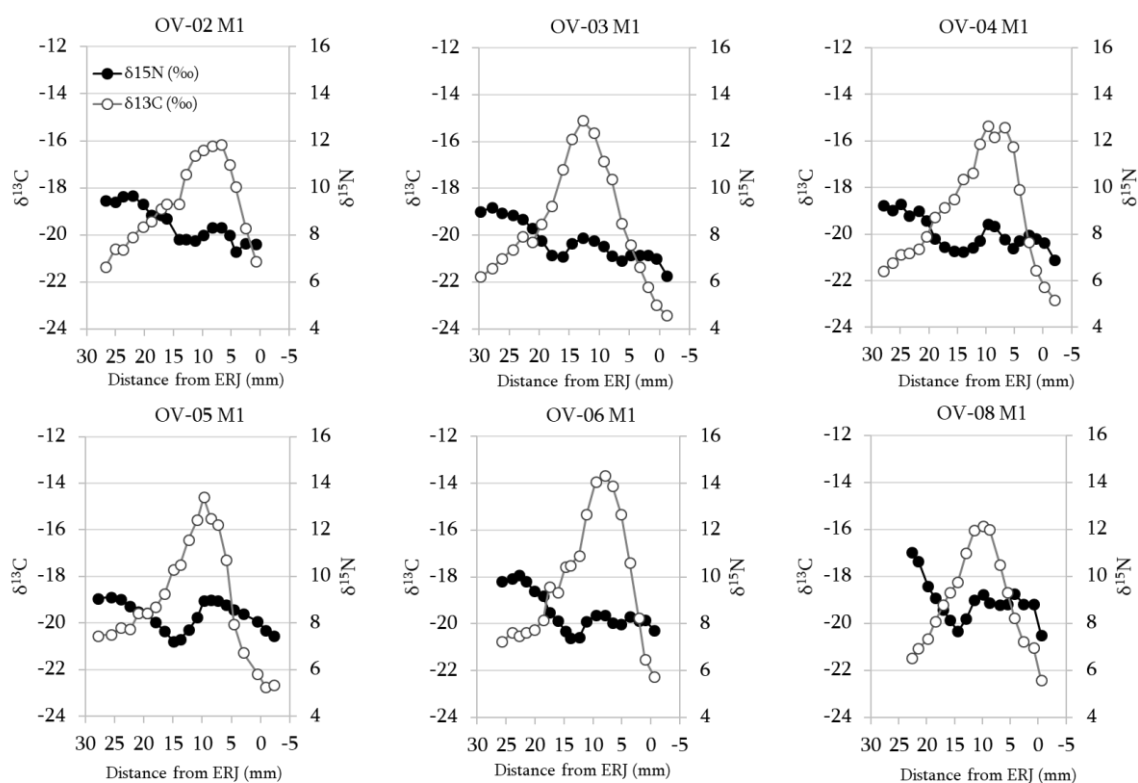


Figure 8. Sequential $\delta^{13}\text{C}$ values (white circles) and $\delta^{15}\text{N}$ values (black circles) measured in dentine collagen along the M₁ teeth of all specimens analysed, ordered by age at death. The dashed orange line highlights the highest wear of the M₁ in OV-08, indicating the position of first samples in the previous specimen.

3.4. Discussion

3.4.1. The representation of weaning process in the sequences (nitrogen and carbon values)

All sampled specimens show similar intra-tooth isotopic sequences, where two main diet shifts linked to the weaning process are traceable through carbon and nitrogen isotope values. Firstly, the shift from exclusive suckling to the incorporation of solid diet after first month of life, and secondly, the cessation of lactation (weaning) at second month of life, i.e. the shift into a post-weaning diet exclusively based on pellet and alfalfa.

Carbon isotope values of dentine collagen samples show an increasing - decreasing trend, varying from $\sim -21\text{‰}$ to $\sim -15\text{‰}$, and then again to $\sim -22\text{‰}$. Max $\delta^{13}\text{C}$ values are located at the middle of the crown and fit with a C_4/C_3 mixed diet. One of the main components of pellet was maize, so high $\delta^{13}\text{C}$ values likely represent the presence of pellet in diet. Pellet is provided from the beginning of second month of life, while lambs are still suckling. It is expectable that the intake of solid food becomes progressively more important in sheep's diet along the second month of life as suckling time starts decreasing (Arnold et al., 1979). After weaning, pellet becomes the main protein source of diet, together with alfalfa, so the max values of $\delta^{13}\text{C}$ likely represent this period of diet after cessation of suckling.

The highest nitrogen values are located at the tip of the crown in all sampled specimens, fitting well with suckling values occurring during first period of tooth formation. The M_1 starts developing 20-50 days before birth, so it would be also expectable that dentine records a pre-natal signature in the tip of the crown. M_1 s show wear at different stages, but a slight increase of 0.2 – 0.3‰ is observed in the first samples of some teeth that could be reflecting the residue of some prenatal signature. In humans it has been observed that new-borns present similar nitrogen values as mother, which is followed by an increase in $\delta^{15}\text{N}$ during breastfeeding (Fuller et al., 2006). The isotopic relation mother-foetus is not known for sheep, although it has been observed that calf and sheep foetus bone collagen could be isotopically enriched 2.6 to 2.7‰ over the mother (Balasse, 1999; Gillis et al., 2013). This would result in a more nuanced shift between pre-natal and suckling nitrogen signatures.

Maximum $\delta^{15}\text{N}$ values in the upper part of M_1 crowns are followed by a shift into lower values, which are depleted by 1.9 to 3.4‰ ($2.3 \pm 0.6\text{‰}$). This step in $\delta^{15}\text{N}$ values is similar to the previously observed between suckling and post-weaning diet in intra-tooth dentine sequences of caprine M_1 teeth (1.4‰ to 3.5‰, Makarewicz et al., 2017a) and M_1 and M_2 cattle teeth (2.7‰ in Gillis et al., 2013; 3.1‰ in Stojanovski et al., 2020; 2.5‰ in Balasse et al., 2001; 2.1‰ in Balasse & Tresset, 2002). A higher variation of around +3 to +4‰ in $\delta^{15}\text{N}$ values could be expected between suckling and herbivorous diet when considering a theoretical trophic step (DeNiro & Epstein, 1981; Minagawa & Wada, 1984; Schoeninger & DeNiro, 1984) and some attenuation of the intra-tooth isotopic range of variation may be present as a result of the sampling strategy performed. However, several factors must be also taken into account in this line which are independent to the sampling performance. Firstly, this hypothetical trophic step depends of both mother and lambs having similar diets, but if post-weaning diet is enriched in relation to the mother's diet, the expected trophic step would be attenuated (Balasse et al., 2001; Makarewicz, 2011). The ewes' diet was not monitored during this experimental study, and they could have been fed with grass or fodder depleted in $\delta^{15}\text{N}$ in relation to lambs' post-weaning diet. Secondly, the diet enrichment existing between mother's milk and nursing infant collagen is not strictly a 'trophic step', since milk may have different isotopic

composition than mother's collagen and (if depleted) lead to lower trophic level enrichments (Jenkins et al., 2001; Reynard & Tuross, 2015).

It is known that stable carbon and nitrogen isotope values from collagen represent mainly protein fraction of diet (Ambrose & Norr, 1993; Codron et al., 2018; Froehle et al., 2010; Jim et al., 2004; Tieszen & Fagre, 1993). When offspring are weaned into a protein-poor diet, $\delta^{15}\text{N}$ traces the cessation of suckling instead of the ingestion of the solid diet along the weaning process (Balasse et al., 2001; Fuller et al., 2006). In this study, the solid food provided to sheep before weaning has a high protein content (both pellet and alfalfa), so $\delta^{15}\text{N}$ values may also track the intake of solid food while still suckling, independently of the cessation of lactation. Nitrogen values may then represent in dentine sequences the solid diet signature provided along the second month of life even if milk is still the main source of feed, resulting in a decreasing trend in $\delta^{15}\text{N}$ values before actual weaning.

This fact would explain why the “weaning moment” – decreasing $\delta^{15}\text{N}$ values after suckling period – is represented in the sequences before Max. $\delta^{13}\text{C}$ values from pellet, despite that pellet intake occurs before actual weaning and not the other way around (figure 9). The peak of $\delta^{13}\text{C}$ values represents the cessation of milk intake after second month, since this is the moment when pellet's maize C_4 values are better represented: C_3 values from milk are no longer diluted in the carbon pool and pellet becomes the solely source of protein together with alfalfa. In contrast, the Min. $\delta^{15}\text{N}$ values represent a previous moment when both milk and solid diet are a source of protein nitrogen in diet, likely a gradual process in favour to solid diet. Probably, pellet C_4 values coming from this period (solid intake while suckling) are also represented along the increasing trend of $\delta^{13}\text{C}$ values. In addition, this later representation of C_4 values also fits with the fact that the metabolic pool takes longer to reach Max $\delta^{13}\text{C}$ values since the range between both diets is larger than the present in $\delta^{15}\text{N}$ (Fuller et al., 2006; Zazzo et al., 2010).

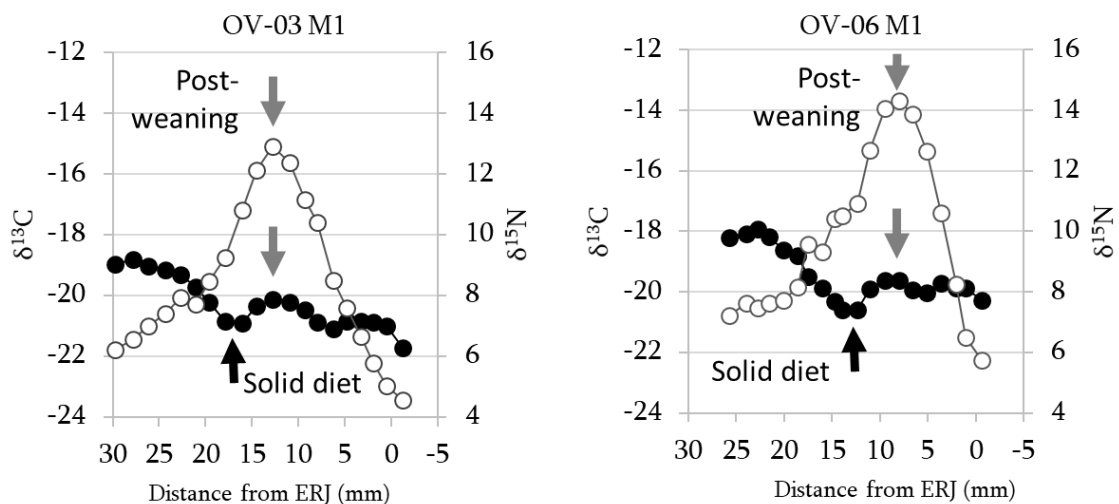


Figure 9. Main isotopic features linked to weaning process and represented in the intra-tooth sequences: grey arrows, post weaning diet; black arrows, incorporation of solid diet during lactation.

However, what is surprising, is that the minimum $\delta^{15}\text{N}$ values reached during weaning in all sequences, are lower and more depleted than those of post-weaning diet reached later (enriched by 1.1‰). We cannot explain it as a sampling effect since it is not reflected in $\delta^{13}\text{C}$ values. Besides, higher time resolution is expected in samples from this part of the crown with higher growth rates

(Kahle et al., 2018), so dentine admixture shouldn't be too problematic in this line. These Min. $\delta^{15}\text{N}$ values are present in all specimens and in the same position, suggesting that this variation is actually recorded in collagen. A possible explanation is that alfalfa/pellet proportion intake varied between both moments, or that different $\delta^{15}\text{N}$ compositions were present in pellet and alfalfa through the experiment. The isotopic composition of pellet was not monitored during the experimental, and it is possible that some variability in $\delta^{15}\text{N}$ values is present throughout the whole 5 months of pellet diet. The $\delta^{15}\text{N}$ variation is within a possible range of variation within a same diet: a $\delta^{15}\text{N}$ range of variation of 2.9‰ has been observed within monospecific diets based on alfalfa (Díez-Canseco et al., 2022). The abundance of ^{15}N in farming products and plant-based feeds are strictly linked to agricultural conditions (fertilizers) and other N fluxes existing between and within farms (Schwertl et al., 2005). A second hypothesis, is that this effect in nitrogen values may be related with the rumen development, which starts with the increase of solid consumption during second month of life (Lyford, 1988). Differences between ruminant and non-ruminant digestive systems has been previously seen in $\delta^{13}\text{C}$ values from enamel (Towers et al., 2014), and it could also affect $\delta^{15}\text{N}$ values; $\delta^{15}\text{N}$ in body tissues vary with diet conditions but also with metabolic and physiological factors (Fuller et al., 2005; Sponheimer et al., 2003b; Warinner & Tuross, 2010). Further work would be needed to assess this idea.

3.4.2. Testing dentine sequential as a useful tool to identify weaning moment in sheep

3.4.2.1. Addition of inner dentine during tooth growth

In high-crowned teeth, dentine grows by the addition of increments which are laid down oblique to the vertical axis of growth, so dentine continues developing in thickness while the teeth develop in high. Previous sampling strategies performing intra-tooth analyses of dentine collagen in high-crowned teeth slice the whole dentine thickness. As a result, later formed dentine may blur the isotopic signatures from first moments of dentine development (Balasse & Tresset, 2002; Díez-Canseco & Tornero, 2024). In addition, the pattern of isotopic variation may be altered with the continue addition of inner dentine with age. It is a disadvantage when sampling molars in a population where different age at death is present.

In this study, M_1 dentine of several specimens with same diet conditions and different age at death were sequentially sampled by drilling. Drill sampling allows to obtain small-size samples where the inclusion of inner dentine increments, formed in later stages of dental development, is highly reduced. Since this sampling strategy does not cut the entire dentine thickness, it was expectable that the addition of new inner dentine during advanced stages of teeth development does not affect the pattern of isotopic variation. Results show that the position of diet changes is located in the same position of the crown independently to the age of death, and it shows no significant affection by new dentine addition in older specimens in relation to younger ones (figure 8). Any pattern of attenuation of the absolute isotopic values in relation to the age at death is observed. Inter-individual differences in position of diet changes, specially marked on OV-03, are likely related to different tooth size, or different onset in the M_1 formation (previously observed by Kahle et al., 2018). Differences in the absolute isotopic values between individuals may be related with different milk isotopic composition between ewes, and with different preferential feeding habits between lambs, since diets were based in several components (milk, pellet and alfalfa). Small inter-individual differences in collagen isotopic composition (around 1‰) are also expected between specimens

raised under same diets (e.g. Balasse et al., 2001; Doherty et al., 2022; Von Holstein et al., 2013; Webb et al., 2016), as a result of individual, behavioural, metabolic and physiological factors.

The drill method provides samples where the rate of dentine admixture, and the sample's temporal and in isotopic resolution, is independent to the addition of new inner increments during growth, and thus comparable between individuals of different ages and teeth with different development stages. However, it must be noted that by drilling, all the dentine thickness may be also sampled in developing teeth with thin dentine walls. This stability in isotopic results between development stages are only expectable in dentine thick enough (~0.5 mm) where drilled-samples do not pierce all dentine thickness (e.g. completed crowns).

3.4.2.2. Position of the weaning moment in M_1 crowns

M_1 crown starts developing in utero, 20 to 49 days before birth (Green et al., 2017; Kahle et al., 2018). When sheep reach 2 months of age, M_1 molars have been developing for 3 - 3.5 months of a total period of 8 to 10 months. An early weaning occurring at second month of life should be then represented in middle positions of the crown, considering a period of metabolic equilibration in isotopic values of 1.5 – 2 months (Jones et al., 1981; Sponheimer et al., 2003b). In this study, the position of the main isotopic features representing weaning process (Min. $\delta^{15}\text{N}$ values and Max. $\delta^{13}\text{C}$ values), fits well with this timing of M_1 crowns development.

In light of previous studies performing dentine sequential analyses in sheep molars (Díez-Canseco et al., 2022; Díez-Canseco & Tornero, 2024) we assume that the position of the isotopic changes in the crown corresponds –roughly– to the final points in the trends of isotopic variation represented in the intra-tooth sequences, instead of the starting ones which mainly reflect the incorporation of later formed dentine in the samples). In this study, as previously discussed, the first peak with minimum $\delta^{15}\text{N}$ values represent the solid intake along second month of age, while maximum $\delta^{13}\text{C}$ values represent a maize-based pellet diet without lactation signature after weaning. We estimate that the position of the weaning moment occurring at the end of 2nd month, should fit between these both features (between 14.1 ± 1.6 mm and 9.7 ± 1.7 mm from ERJ). These estimations fit well with previous data obtained by thin sections in Soay sheep, a non-improved sheep breed with prolonged teeth crown formation times, where middle parts of the M_1 crowns are formed at around 60 days after birth (formation of the infundibular floor between 56 and 69 days) (Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018).

The advanced position of an early weaning in the crown suggest the use of combined analysis of M_1 and M_2 crowns to study weaning process in sheep, since it may be delayed until 5 months of age. We hypothesize that position of natural or late weaning should be present in final parts of the M_1 crown and along upper parts of the M_2 crown. Cervical parts of the M_1 crown may yield large-time span samples, as a result of the lower dentine growth rates present in this part of the crown (Kahle et al., 2018), so weaning moment could be blurred, especially in teeth with advanced root development. In contrast, the first part of M_2 crown will yield higher time and isotopic resolution. Further work would be needed in this line.

In this study, all sheep are female and they come from a same population, and there are no large differences in tooth size between specimens. However, differences in tooth size between sheep populations or sheep breeds should be always kept in mind when studying weaning position through dentine sequential analyses. The estimation of the mean crown height (e.g. in M_1 teeth) within a population could be used to compare isotopic results between teeth with different crown's length.

The estimation of maximum crown's height has been already performed in previous studies to normalize isotopic or histological data coming from specimens with different tooth size (Blaise & Balasse, 2011; Frémondeau et al., 2012; Upex & Dobney, 2012). Possible differences in dental growth timings between modern and past sheep breeds should be also considered when inferring weaning time directly from sample position in the tooth. However, in agreement with Balasse & Tresset (2002), this is not a caveat of the sampling but from every zooarchaeological study based on dental growth timings.

Artificial weaning may be an abrupt or a gradual process (Freitas-de-Melo et al., 2022). In this study, weaning (cessation of suckling) was abrupt, although solid intake was –relatively– gradual. However, differences between progressive/abrupt diet shifts might be difficult to recognise in dentine-collagen sequences. Independently to the gradualness of the process, it will be reflected in the sequences as a progressive variation, as a result of the metabolic equilibration period of the body isotopic pool, but also of the sampling strategy implemented (Balasse et al., 2001). Our experimental data does not allow us to discern metabolic equilibration vs sampling in the isotopic sequences obtained. However, it is expectable that upper parts of the crown, which show fast growth and high rates of dentine apposition (Jordana & Köhler, 2011; Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018) yield higher temporal resolution, probably at a monthly scale (Díez-Canseco et al., 2022, Díez-Canseco & Tornero, 2024). A metabolic equilibration period could be more reflected in these parts of the crown. In contrast, as dentine growth rates decreases into lower parts of the crown, isotopic variation will be progressively more affected by sampling strategy (dentine admixture).

3.5. Conclusions

The dentine sequential analysis performed in this study shows enough isotopic and temporal resolution to identify an early weaning process in M₁ crowns of medium-size species as sheep. The trophic step between suckling moment and fodder based diet is represented in nitrogen isotope values of dentine sequences, and diet changes are located in similar position of the crown independently to the age of death of the specimens. Several dietary (and metabolic) factors are involved in the isotopic composition of collagen samples, which might complicate the interpretation of dentine sequences. Nitrogen isotope values may represent solid intake instead of lactation when forages with high protein content are provided during suckling. A combined used of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values is recommended in order to discern between solid intake and cessation of lactation (Fuller et al., 2006). The use of trace elements has been also suggested in this line (Balasse et al., 2001; Tornero, 2011), and the use of multi-isotopic approaches including calcium isotopes (Wright, 2014) and zinc isotopes (Jaouen et al., 2016) could also contribute to carbon and nitrogen isotopic signatures from collagen.

In this study, we provide a set of data coming from a non-improved sheep breed, where weaning was performed at 2 months' age, the earliest weaning possible to ensure lambs surviving without providing artificial lactation or formulated feeds (Freitas-de-Melo et al., 2022). This is a first experimental study where an early weaning process is controlled in sheep, but further work will be needed providing natural and progressive weaning to use as blanch of non-manipulated weaning process. The second mandibular molar could be also used combined with M₁ to study weaning process. The performance of new experimental studies with other non-improved sheep breeds is also imperative to explore the potential intra-species variability of teeth development timings.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

CAPÍTULO V

Discusión

1

Principios básicos del DSA en coronas altas: efectos del muestreo en los resultados isotópicos

La dentina se desarrolla de forma incremental, en base a ciclos de deposición de predentina (matriz orgánica) y mineralización que tienen una periodicidad diaria (Dean, 2000; Nanci, 2013). Esta periodicidad es extremadamente complicada de asilar mecánicamente a partir de un muestreo manual y a la vez que obtener la suficiente cantidad de muestra necesaria para su análisis isotópico, incluso en el caso de aplicaciones en especies de gran tamaño, como proboscídeos, donde la máxima resolución obtenida ha sido bisemanal (e.g. Uno et al., 2020). En molares de coronas altas, la dentina se desarrolla además por aposición progresiva de incrementos en dirección oblicua respecto a la cavidad pulpar (Kahle et al., 2018; Weinreb & Sharav, 1964; Witzel et al., 2018), y por tanto, oblicua al eje vertical del diente, lo que dificulta implementar un muestreo secuencial que siga estrictamente la dirección de crecimiento del diente (Balasse et al., 2001; Balasse & Tresset, 2002; Zazzo et al., 2006).

Como consecuencia de estos dos factores, con la implementación de los métodos de DSA aquí aplicados se produce una mezcla de incrementos de dentina en las muestras obtenidas secuencialmente. Al incluirse dentina sintetizada en diferentes momentos, y por tanto con diferente señal isotópica, se generan cierta “distorsión” o “ruido” en la representación de la variación isotópica en las secuencias intra-dentales respecto a la realmente registrada en el tejido durante el desarrollo dental. Al interpretar los resultados obtenidos a partir de protocolos de DSA, ya sea a partir de *drill* o *slice method*, es fundamental comprender en qué grado éstos aspectos relacionados con el muestreo y las características histológicas de la dentina influyen de forma decisiva en la representación de la variación isotópica obtenida en cada caso, con el objetivo de identificar de la forma más precisa y correcta posible la señal biogeoquímica incorporada por el animal en vida.

1.1. Muestreo de distintos momentos formativos: atenuación del rango de variación isotópica

Los resultados isotópicos obtenidos representan valores promedio de toda la dentina incorporada a la muestra analizada. La mezcla de dentina de distintos momentos formativos afecta a los datos isotópicos obtenidos en un aspecto fundamental: el rango de variación isotópica obtenido en las secuencias no representa el rango máximo de variación originalmente fijado en la dentina, sino que se produce una “atenuación” del mismo.

Esta atenuación puede observarse cuando se compara las diferencias existentes en la composición isotópica de los forrajes entre distintos períodos de dieta (DIETA1, DIETA2, DIETA3), con el rango máximo de variación obtenido en las secuencias cuando éstas representan esos cambios de dieta. En los M_2 , aplicando *slice method*, los valores isotópicos del carbono y nitrógeno presentan un rango máximo de variación que supone una atenuación promedio del 62% y 22%, respectivamente, respecto al rango existente entre los períodos de DIETA1 y DIETA 2, que es el cambio de dieta principalmente representado a lo largo de este molar. Puesto que la atenuación se relaciona directamente con el grado de mezcla de incrementos, el *drill method* genera resultados más próximos al valor teórico esperado. La atenuación del rango en los M_2 mediante el *drill method* es mucho menor, de un 32% en los valores $\delta^{13}\text{C}$, y sólo un 1% en los $\delta^{15}\text{N}$ respecto al rango existente en la alimentación.

Al evaluarse el grado de atenuación presente en las diferentes secuencias isotópicas intra-dentales obtenidas parece observarse que la atenuación no es constante, si no variable y dependiente de la composición isotópica de la alimentación, y de cómo se alternan (en el tiempo) las diferentes señales isotópicas existentes en el *input* procedente de la pauta de alimentación. La mayor atenuación de $\delta^{13}\text{C}$ respecto $\delta^{15}\text{N}$ (cf. Figura 1 Capítulo IV), sugiere que una mayor alternancia de composiciones isotópicas diferentes en la dieta genera mayor atenuación que en aquellas situaciones donde la alternancia de dietas sigue una tendencia más “unidireccional” (e.g. hacia señales más enriquecidas) (Figura 1). Es decir, la alternancia de hasta tres dietas con señales muy enriquecidas o muy empobrecidas en $\delta^{13}\text{C}$, derivadas de un patrón abrupto de $\text{C}_3\text{-C}_4\text{-C}_3$, resulta en una mayor atenuación de los valores $\delta^{13}\text{C}$ en las secuencias que en la generada en los valores de $\delta^{15}\text{N}$. Otros factores como el tiempo de exposición del individuo a la señal isotópica posiblemente influyen también en el grado de atenuación, como ha sido observado en el análisis isotópico de esmalte (Zazzo et al., 2010): la atenuación de señal isotópica tiende a presentar una relación inversamente proporcional al tiempo de exposición a esa señal.

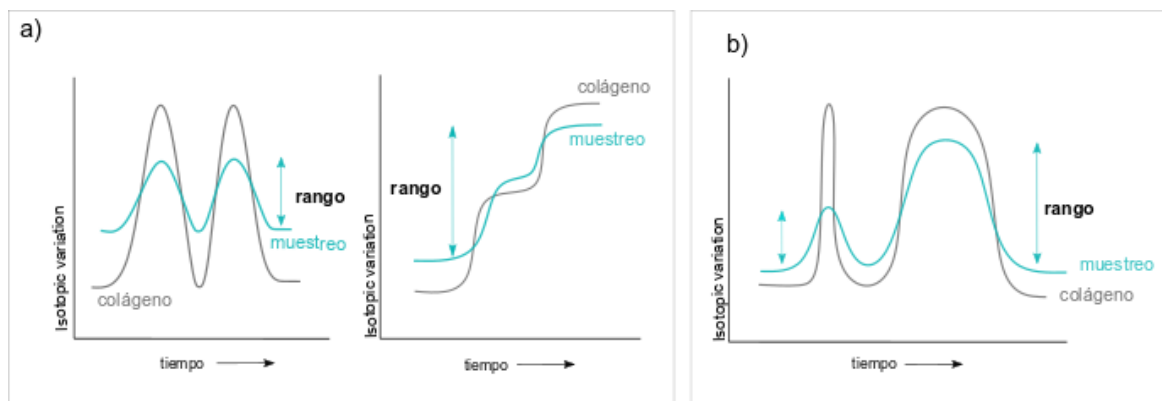


Figura 1. Atenuación del rango isotópico en el muestreo en función de a) la alternancia de composiciones isotópicas, y b) el tiempo de exposición a la señal.

En las secuencias de $\delta^{13}\text{C}_{\text{bioapatita}}$ obtenidas a partir del análisis de los M_2 de nuestro conjunto experimental, se ha observado también una atenuación similar respecto a la señal isotópica del *input*, aunque responden a factores histológicos distintos (cf. Capítulo IV-sección 2.4.2). Mientras que en la dentina es resultado del muestreo, en el caso del esmalte la atenuación del input isotópico es resultado del propio proceso de mineralización. Durante la fase de amelogenénesis, cada capa de esmalte es depositada como una matriz escasamente mineralizada que acumula mineral a lo largo

de un extendido periodo de tiempo; como resultado, el análisis de la fracción mineral de una muestra de esmalte produce unos valores isotópicos representativos de todo ese lapso temporal (Balasse, 2002, 2003b; Fisher & Fox, 1998; Passey & Cerling, 2002; Zazzo et al., 2005, 2010). En base al estudio detallado de los procesos de mineralización del esmalte (ratio y frente de mineralización), se han generado modelos de predicción que permiten estimar el input isotópico original a partir de cómo se representa en las secuencias intra-dentales en función del muestreo implementado (Bendrey et al., 2015; Passey et al., 2005; Passey & Cerling, 2002). La aplicación de estos modelos es hoy en día recurrente en estudios isotópicos a partir de esmalte (e.g. Britton et al., 2019, 2023; Pederzani et al., 2021). En análisis secuenciales de dentina podrían generarse también similares modelos de predicción, siempre y cuando se conozca en detalle el periodo de tiempo que abarcan las muestras a lo largo de la corona. No obstante, ésto sólo es posible a partir del método *drill* u otros protocolos de muestreo donde el tamaño (y profundidad) de la muestra sea constante a lo largo del eje longitudinal del diente. Con el método *slice*, el grado de mezcla de dentina siempre será variable en función de su grosor (i.e. en función del estadio de desarrollo dental y en función de la parte de la corona analizada) lo que hace mucho más complejo predecir el lapso temporal que abarcarán en las muestras en cada escenario.

Por último, cabe mencionar que la estimación de la atenuación isotópica aquí realizada es sólo orientativa. Puesto que sólo conocemos la composición isotópica de los distintos forrajes involucrados en la alimentación, pero no se ha monitorizado la composición isotópica que finalmente se fija en el colágeno tras todo el proceso metabólico, no podemos calcular de forma absoluta la atenuación que es directamente resultado del muestreo y no resultado de otros factores. Como ya se ha descrito previamente, la composición isotópica del colágeno refleja la parte proteica de la dieta (Ambrose 1993; Tieszen & Fagre, 1993), y la señal isotópica de esta fracción de la planta puede diferir de aquella obtenida a partir del análisis de muestras *bulk* de los forrajes donde toda la planta es analizada (cf. Capítulo III-sección 3.6). Por su parte, el fraccionamiento isotópico dieta-tejido puede no ser estable a lo largo de todo el periodo de vida del individuo, y puede diferir en función de factores metabólicos (Warinner & Tuross, 2010) o en función del tipo de alimentación (e.g. contenido de proteína: Sponheimer et al., 2003b; Cantalapedra-Hijar et al., 2015), lo que puede llevar a diferentes fraccionamientos isotópicos entre distintos periodos de dieta. Una cuantificación de la atenuación presente en técnicas de DSA requeriría la monitorización no sólo de la composición isotópica de los forrajes, sino de la registrada progresivamente por los tejidos proteínicos, ya sea a partir de la monitorización de la variación del colágeno óseo o de otras proteínas estructurales como la queratina (e.g. análisis periódico de pelo, Sponheimer et al., 2003a, 2003b.).

1.2. Muestreo longitudinal: representación avanzada de los cambios isotópicos

Aunque los cambios de alimentación sean abruptos, los cambios isotópicos siempre se representan en el colágeno de forma gradual. En torno a 1.5 y 2 meses de periodo de equilibrio metabólico es necesario para que una nueva composición isotópica se refleje en el *pool* del cuerpo y por tanto quede reflejado en la síntesis del colágeno u otros tejidos proteínicos (Jones et al., 1981; Sponheimer et al., 2003b). Sin embargo, en el caso de las secuencias de DSA, la representación gradual de los cambios isotópicos no es únicamente resultado del periodo de equilibrio isotópico, sino que responde también a la aplicación de un protocolo de muestreo que no sigue estrictamente la dirección de deposición de la dentina.

Con la aplicación de un muestreo longitudinal de DSA, la incorporación de dentina procedente de áreas interiores del diente en las muestras, y por tanto formada en momentos más tardíos de desarrollo, genera que las muestras reflejen una variación isotópica que es producto de la mezcla de incrementos en vez de la realmente registrada a lo largo del crecimiento de la corona. A partir de aplicar un muestreo secuencial en dirección cúspide-base, la dentina más interna, sintetizada en momentos posteriores de desarrollo dental, va ganando progresivamente presencia en las muestras, generando una representación artificial del cambio isotópico. Si bien la variación isotópica obtenida representa fundamentalmente la registrada en la dentina, lo hace de forma distorsionada. El resultado es que los cambios isotópicos se representan de forma “prematura”, en posiciones avanzadas de la corona, y los comienzos de la variación se sitúan en partes de la corona (en altura) que se han desarrollado mucho antes de que se produzca ese cambio isotópico (Figura 2a).

Esta representación avanzada de los cambios isotópicos respecto al período de formación real de la corona ya se había advertido en trabajos previos implementando DSA en vacas domésticas (Balasse et al., 2001; Balasse & Tresset, 2002), donde los cambios de dieta se representaban en las secuencias antes de lo esperado de acuerdo a los tiempos de crecimiento dental conocidos para vacas. Este efecto sobre la representación del cambio isotópico es mucho más acentuado en las secuencias obtenidas con el método *slice*, donde se profundiza todo el grosor de la dentina y por tanto las muestras pueden incorporar dentina de momentos muy dispares dentro del período de crecimiento del diente. Con el método *drill*, esta sobre-representación se reduce en las secuencias, y los cambios isotópicos se representan más acordes con el crecimiento del diente en su eje longitudinal. Los cambios hacia nuevas composiciones isotópicas no se representan en posiciones tan avanzadas en la corona, sino más acorde con los tiempos de crecimiento reales de la corona en altura (cf. Capítulo IV-Figura 6) (Figura 2b). El muestreo *drill* se adapta mejor al crecimiento de la dentina en su eje longitudinal del diente, y en consecuencia genera resultados isotópicos mucho más susceptibles de ser interpretados correctamente.

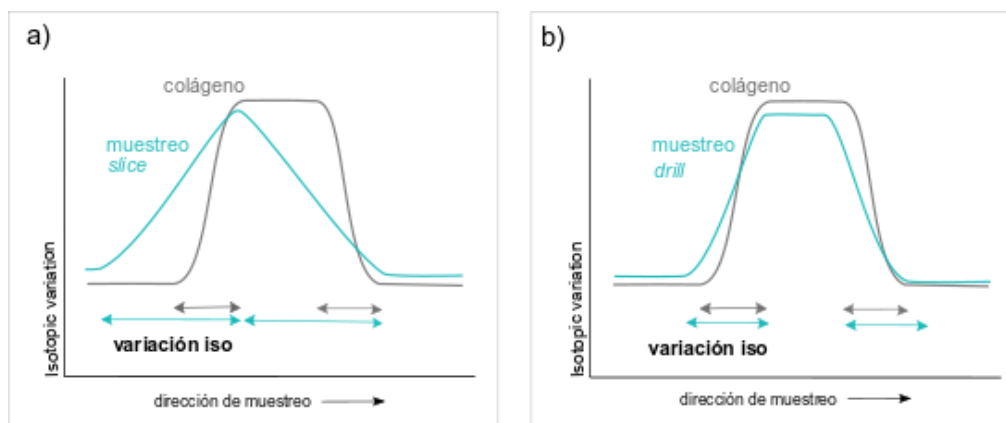


Figura 2: Representación avanzada de los cambios isotópicos en las secuencias y la diferencia esperada entre método *slice* (a) y método *drill* (b).

1.3. Tasa de crecimiento dental y resolución diferencial a lo largo de la corona

En molares hipsodontos, la tasa de crecimiento del diente varía a lo largo de su eje longitudinal, siendo progresivamente menor a medida que se aproxima a la región cervical del diente (Jordana & Köhler, 2011; Kahle et al., 2018; Kierdorf et al., 2013; Witzel et al., 2018). Durante los primeros meses de desarrollo dental, y por tanto durante la formación de las partes superiores de las coronas, la tasa de deposición de la dentina es mucho más alta (se forma más rápido) que durante la formación de las partes más cervicales en los últimos estadios de desarrollo, donde el ratio de crecimiento es menor (cf. Capítulo I-Figura 2). Esto se debe a que en la dentina hay una relación inversa entre la edad funcional de las células encargadas de su aposición (odontoblastos) y su tasa de secreción (Molnar et al., 1981). En molares mandibulares de ovejas, la tasa de aposición mineral de la dentina puede variar de $\sim 20 \mu\text{m} / \text{día}$ en la cúspide a $\sim 4 \mu\text{m} / \text{día}$ en la parte más basal de la corona, con tasas muy similares reportadas para los distintos molares mandibulares permanentes (M_1 , M_2 y M_3) (Kahle et al., 2018).

En consecuencia, cuando se aplica un muestreo que no se adapta a esa tasa de crecimiento diferencial a lo largo de la corona, se obtienen secuencias donde un mismo período de tiempo (y una determinada señal isotópica) puede representarse en diferente extensión (en mm) según la parte de la corona analizada (Figura 3). Las muestras incluyen progresivamente mayor lapso temporal a medida que disminuyen la tasa de crecimiento, por lo que la atenuación del input isotópico se verá también afectada a lo largo de la corona. Aunque es un factor esencialmente histológico, esta distorsión está relacionada también con el muestreo, pues es la estrategia de muestreo la que no se adapta a la menor tasa de aposición de la dentina: ni el tamaño de muestra ni la distancia entre muestras se adapta a estas ratios de crecimiento variables, ni el tratamiento visual de los resultados (secuencias intra-dentales) corrige la distancia de las muestras (en mm) a una perspectiva “temporal”. El mejor ejemplo lo vemos en la representación diferencial de la DIETA2 entre el final del M_2 y la parte superior del M_3 (cf. Capítulo IV-Figura 2). Esta distorsión de las secuencias isotópicas intra-dentales ha sido también observada a partir de la aplicación de análisis isotópicos secuenciales de esmalte en molares hipsodontos, relacionados con las tasas de crecimiento decrecientes presentes similarmente en el esmalte (Balasse, 2003b; Bendrey et al., 2015; Zazzo et al., 2010).

Es fundamental considerar el momento de desarrollo dental en el que se registran las señales isotópicas de cara a interpretar de forma correcta los resultados de las secuencias obtenidas con DSA. La aplicación de protocolos de mayor resolución de muestreo (e.g. mediante dispositivos MicroMill; Curtis et al., 2022; Zazzo et al., 2006) podría reducir esta distorsión en tanto que obtiene mayor resolución en las partes de la corona con menor ratio de crecimiento. Sin embargo, como se comenta a lo largo del Capítulo I, estas técnicas de muestreo se enfrentan a las complicaciones que implica implementar protocolos de purificación (principalmente desmineralización, y eliminación de ácidos fúlvicos o húmicos en el caso del colágeno) sobre muestras de muy pequeño tamaño.

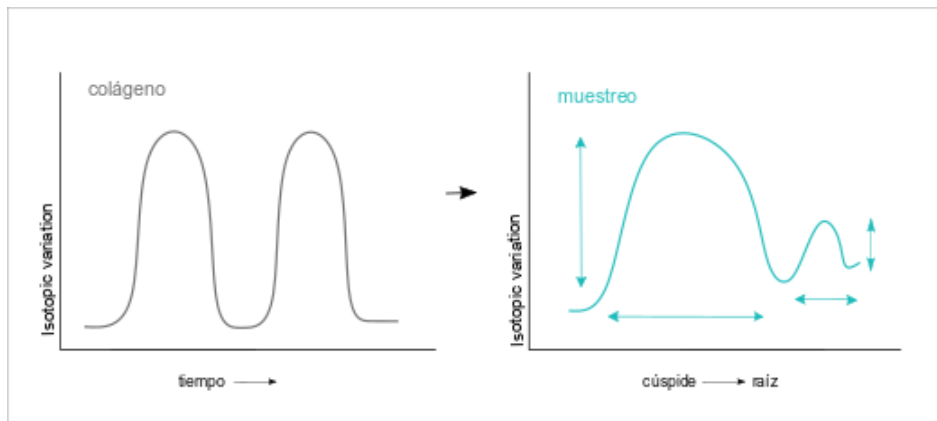


Figura 3. Representación de los cambios isotópicos en función de la parte de la corona analizada, i.e., en función de las tasas de crecimiento de la dentina. Nota: no siempre es aplicable al muestreo *slice*: la mayor resolución que tiene el diente en la parte superior de la corona, resultado de unas mayores ratios de crecimiento, no es accesible con el muestreo *slice*, excepto en el caso de coronas en estadios de formación incipientes.

1.4. Desarrollo de la dentina en grosor durante el crecimiento del diente

La dentina continúa creciendo una vez formada la corona, ensanchando las paredes y cerrando la cavidad pulpar (Hillson, 2005; Milhaud & Nezit, 1991). Esto tiene consecuencias directas en el *slice method*, puesto que los efectos del muestreo mencionados anteriormente se acentúan progresivamente según avanza el desarrollo dental. En consecuencia, la resolución isotópica del *slice method* depende directamente del estadio de crecimiento dental, especialmente en la parte superior de la corona. Como resultado del crecimiento de la dentina de forma 'cónica', las partes superiores del molar tienden a presentar una mayor acumulación de dentina, por lo que, mediante este muestreo, las muestras procedentes de esta parte de la corona presentarán la mayor afectación, e incluso determinados patrones de variación isotópica pueden ser difuminados o resultar indistinguibles (Capítulo IV-Figura 5). Sin embargo, una de las implicaciones fundamentales de este aspecto (la continua adición de dentina) en las secuencias obtenida con *slice-method*, es que un mismo patrón de variación isotópica puede representarse de forma diferente entre individuos de distinta edad. Esto complica la interpretación cuando el método se aplica a individuos con distinto estadio de desarrollo dental, lo que puede suponer una importante limitación en su aplicación en el registro arqueológico.

Con la aplicación del *drill method*, los resultados isotópicos de las muestras son en cierto modo independientes al grado de desarrollo de la dentina, pues la profundidad del muestreo es constante a lo largo del eje longitudinal de la corona. Los resultados isotópicos se mantienen invariables entre diferentes estadios de desarrollo dental, lo que permite comparar individuos con distinta edad en el momento de muerte. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que en dientes donde la dentina no presente suficiente grosor (e.g. en coronas en proceso de desarrollo), el método *drill* podría perforar la totalidad y no una parte de la dentina allá donde las paredes sean más finas (i.e. menos de 0.5 mm), lo que también puede llevar a ciertas irregularidades entre molares con distinto grado de desarrollo. No obstante, en base a los resultados obtenidos, cabe esperar que estas incidencias sean mucho menores en *drill method*, donde el muestreo se reduce a una profundidad de 0.3-0.5 mm, y queden principalmente restringidas a las partes más inferiores del diente, potencial de presentar un menor grado de deposición de dentina.

2

Lectura e interpretación temporal de las secuencias de DSA

La dentina crece incrementalmente, a partir de ciclos rítmicos diarios de aposición de pre-dentina (formación de matriz orgánica, principalmente colágeno) y su mineralización, siguiendo frentes de deposición-mineralización regulares (Dean, 2000; Engel & Hilding, 1984; Frank & Nalbandian, 1989; Kahle et al., 2018; Nanci, 2013). Esto permite asignar el momento de fijación de determinada señal isotópica a un momento concreto de la formación del diente, tanto a partir del análisis de la fracción orgánica de la dentina (Bada et al., 1990; Hobson & Sease, 1998), como de la fracción mineral (Koch et al., 1989). Las secuencias de DSA permiten atribuir una temporalidad a las señales isotópicas representadas directamente a partir de su posición en el diente, es decir, situarlas temporalmente dentro del período de desarrollo dental, y en función de esto situarlas dentro del período de vida del individuo analizado.

Situar la señal isotópica de cada muestra dentro del período de desarrollo dental, requiere evaluar cómo afecta el muestreo a la representación de la señal isotópica a nivel temporal, teniendo en cuenta que las variaciones isotópicas se representan antes de lo esperado. Por su parte, vincular determinadas señales isotópicas al período de vida del individuo analizado, requiere conocer los tiempos de desarrollo dental, es decir, en qué momento y durante qué períodos se forman los elementos dentales en el taxón analizado, considerando también la posible variabilidad intra-específica existente.

2.1. Posición de los cambios isotópicos en las coronas y su representación en las secuencias (muestreo *drill*)

Si bien la dentina se desarrolla en base a deposiciones oblicuas, la dentina mantiene una dirección de crecimiento principalmente longitudinal a lo largo de la formación del diente, sobre todo en molares hipsodontos donde el crecimiento prolongado de la corona está orientado a equilibrar su alto grado de desgaste. En las secuencias intra-dentales de DSA, los datos isotópicos se procesan en base a su posición en la corona (mm de ERJ), pero esta información puede trasladarse a nivel temporal dentro del período de desarrollo dental, siempre y cuando se conozcan en detalle los tiempos de formación de la corona en longitud. Una de las principales ventajas del método *drill* es que facilita esta 'traslación' al priorizar el eje de crecimiento longitudinal de la dentina frente a su crecimiento en grosor.

Sin embargo, el hecho de que los muestreos en DSA no sean estrictamente fieles a la dirección de crecimiento de la dentina, genera un 'obstáculo' al establecer esa relación entre la posición del cambio isotópico en el diente y su representación en las secuencias intra-dentales. Concretamente,

complica identificar la posición del cambio isotópico en las secuencias puesto que los cambios se representan en posiciones avanzadas: las variaciones isotópicas registradas en la dentina se representan en las secuencias antes de lo esperable según el tiempo de formación del diente (en altura), puesto que las muestras incluyen dentina interna formada en momentos posteriores (apartado 1.2).

Los tiempos y ratios de crecimiento dental de los molares mandibulares en ovejas domésticas han sido previamente reportados en estudios basados en la cuantificación del ratio o tasa de aposición de la dentina y el esmalte en ovejas de raza Soay (Kahle et al., 2018; Kierdorf et al., 2013; Witzel et al., al 2018). Cuando consideramos estos datos de crecimiento dental, y los confrontamos a las secuencias isotópicas obtenidas en nuestros especímenes de Ripollesa, se observa que las partes de la corona que se desarrollaban en los momentos de cambio de dieta (principales cambios en el input isotópico durante el experimental) parecen coincidir mejor con la máxima representación de las señales isotópicas (i.e. los máximos y/o mínimos después de una tendencia de variación), que no con el inicio de la variación isotópica.

Este factor es coherente con la geometría de crecimiento de la dentina y el muestreo implementado (cf. Capítulo IV-Figura 6). El final de las tendencias de variación representa la parte de la corona donde la señal isotópica relativa a un momento previo de formación deja de ser muestreada, y coincide con la parte del diente desarrollándose –en altura– bajo una nueva señal isotópica (es decir, después del período de equilibrio). De esta forma, sugerimos que la posición del momento de cambio isotópico (después del período de equilibrio) en las coronas puede identificarse a partir de las secuencias intra-dentales obtenidas con DSA, pero que en las secuencias se representa –*grosso modo*– en el final de las tendencias de variación (ascendentes o descendentes) y no con el inicio de la variación (Figura 4).

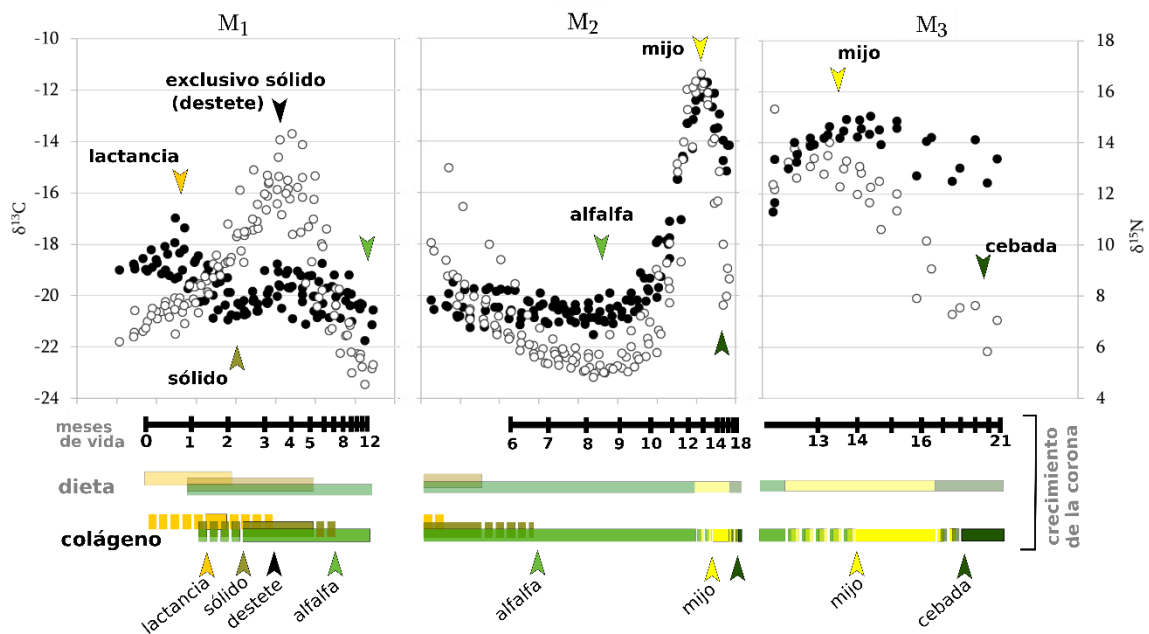


Figura 4. Representación de los cambios isotópicos en las secuencias intra-dentales en relación a la posición del cambio isotópico en el diente según los tiempos de crecimiento dental. Los períodos que abarca el crecimiento dental (barras negras = meses desde el nacimiento) se han estimado en base a las tasas de crecimiento de dentina (en su eje vertical) publicadas en Witzel et al., (2018) (M₂ y M₃) y Kahle et al., (2018) (M₁). Puesto que ambas razas (Ripollesa y Soay) presentan diferente tamaño del diente, las tasas de crecimiento se han ajustado

proporcionalmente a la mayor altura de la corona en Ripollesa a partir de individuos con el mismo grado de desgaste (misma edad de muerte). Las barras de color indican los períodos de alimentación del experimental, y las barras discontinuas representan lo registrado en el colágeno en función de un período de equilibrio de 1,5 meses.

Sin embargo, observamos que en determinadas situaciones la posición del cambio isotópico en la secuencia puede sobre-escribirse, a partir de un alto grado de mezcla de dentina, como ocurre en las muestras del método *slice* del M₂ donde los valores mínimos de $\delta^{13}\text{C}$ la DIETA1 están completamente difuminados. Es una de las ventajas del *drill-method*, pues ofrece mayores garantías de identificar la posición de los cambios isotópicos en las coronas a partir de generar secuencias intra-dentales de mayor resolución. A partir de la aplicación del *drill method* en los M₁, puede verse cómo la posición de los cambios isotópicos en las secuencias no se sobre-escribe con el continuo crecimiento de la dentina ni en individuos que tienen hasta 8 meses más de vida.

2.2. Cambios isotópicos en las secuencias: cambio abrupto vs cambio gradual

Un aspecto difícil de evaluar es cómo se representa la gradualidad con la que se producen los cambios en las señales isotópicas originales. A partir de los datos que disponemos, pensamos que los cambios de alimentación abruptos pueden ser difíciles de diferenciar de cambios de alimentación progresivos en las secuencias de DSA. Independientemente de la gradualidad del proceso, éste quedaría reflejado en las secuencias como un proceso progresivo, tanto por el período de equilibrio metabólico, como por la estrategia de muestreo empleada (Balasse et al., 2001).

El colágeno-dentina por sí sólo sí podría permitir diferenciar el período de equilibrio (2 meses) de cambios de alimentación muy graduales (>2 meses), pues se representaría con mayor extensión de lo que equivale a 2 meses de crecimiento de la corona. Sin embargo, al menos a partir de los resultados obtenidos con el experimental SUMA, las secuencias de DSA no permiten diferenciar entre proceso de equilibrio metabólico y efecto del muestreo en las variaciones isotópicas obtenidas. No obstante, a partir de los datos disponibles, no podemos evaluar este aspecto en detalle, pues no era uno de los objetivos planteados en el experimental.

Por otro lado, sí puede observarse en los resultados que el proceso de equilibrio está mejor representado en partes superiores de la corona que en las partes inferiores (con *drill method*). Las partes superiores de la corona, que presenta altas tasas de crecimiento, son susceptibles de ofrecer resoluciones temporales más altas que las partes inferiores de la corona. Según los ratios de crecimiento de la dentina reportados para los molares mandibulares en ovejas Soay (Kahle et al., 2018), mediante la aplicación del muestreo *drill*, y asumiendo entorno a ~500 μm de profundidad del muestreo, las muestras pueden incluir períodos de tiempo que varían de 24 días (en partes superiores de la corona desarrollada durante los primeros meses de desarrollo dental) a ≥ 8 meses (en la dentina de partes inferiores e internas de la corona formada en los períodos más tardíos de desarrollo dental). El período de equilibrio metabólico podría quedar por tanto más reflejado a lo largo de la parte superior de la corona donde las muestras tienen menos de 2 meses de resolución temporal. Por el contrario, cuanto menor sea la tasa de crecimiento en partes inferiores de la corona, la variación isotópica estará progresivamente más afectada por la estrategia de muestreo y el proceso de equilibrio quedará menos representado. Los datos no permiten determinar con precisión éstos aspectos.

2.3. Limitaciones en DSA: variabilidad intra-específica en el tamaño del diente y en los tiempos de desarrollo dental

2.3.1. Tamaño del diente

Aun cuando los tiempos de desarrollo sean los mismos (i.e. mismo inicio de formación y finalización de la corona), puede haber diferencias en el tamaño del diente entre diferentes individuos. La variabilidad en el tamaño del diente puede estar presente entre razas, o incluso entre individuos de una misma población, por ejemplo, entre machos y hembras, o menor medida, individuos castrados. Esto afectará directamente a la posición del cambio isotópico en la corona respecto al punto de referencia empleado. Se trata de la principal limitación intrínseca al método de DSA, puesto que los resultados se procesan en relación a la distancia (en mm) de un punto de referencia del diente (ERJ o cúspide), y esta distancia depende directamente del tamaño del molar (concretamente la longitud de la corona). Por ello, en el momento de atribuir una temporalidad a la posición de los cambios isotópicos en las coronas, y principalmente al realizar comparaciones inter-individuales en esta línea, se han de evaluar las diferencias de tamaño esquelético que pueden presentar los individuos analizados. Esta limitación ya fue señalada por Balasse & Tresset (2002) al interpretar temporalmente la posición del destete en los molares mandibulares de vacas domésticas a partir de DSA, y afrontar una comparación entre los especímenes arqueológicos y los referenciales modernos empleados, que presentaban una mayor altura en cruz.

Esta limitación también se ha afrontado en previos estudios implementando análisis secuenciales de esmalte para identificar la estacionalidad de nacimiento en especies hipsodontas a partir de los valores de $\delta^{18}\text{O}$ y su posición en la corona (e.g. Balasse et al., 2003, 2012b; Balasse & Tresset, 2007; Blaise & Balasse, 2011; Henton, 2012; Henton et al., 2010; Tornero, 2011; Tornero et al., 2013). Sin embargo, los modelos que han sido desarrollados para normalizar los resultados isotópicos en esmalte (Balasse et al., 2012b; Chazin et al., 2019; Tornero et al., 2013) corrigen la potencial variabilidad en el tamaño del diente a partir de la posición de los máximos y mínimos del $\delta^{18}\text{O}$: se basa en la asunción de que el período de tiempo entre ambos puntos es siempre estable, pues depende de la oscilación climática estacional de los valores de $\delta^{18}\text{O}$ del agua de precipitación (vinculados a la temperatura). En el caso de señales isotópicas que representan la alimentación ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$), y que no ofrecen tales puntos de referencia invariables, la diferencia de tamaño ha de corregirse con criterios externos a la posición de los valores isotópicos.

En los análisis secuenciales, la diferencia de tamaño del diente se hace evidente en la diferente longitud de la corona, que es la que genera una distribución asimétrica de los valores isotópicos respecto a la ERJ entre individuos con distinto tamaño dental. Comparar la posición de las muestras (y de los cambios isotópicos) entre coronas de distinta longitud es un aspecto de fácil corrección siempre y cuando se conozca la altura promedio de las coronas en una misma población. Utilizar la altura media de los dientes como referencia sobre la que procesar y ajustar los datos, ya se ha propuesto previamente para asignar estacionalidad a la posición de las hipoplasias a lo largo de las coronas (Upex & Dobney, 2012). Estos autores utilizan como puntos de referencia la ERJ y la altura máxima de la corona estimada a partir de dientes con el mínimo desgaste posible. Blaise & Balasse (2011) y Frémondeau et al. (2012) también consideran un promedio de la altura máxima de la corona para normalizar la distancia de las muestras de la ERJ y minimizar el efecto de la potencial variabilidad en el tamaño del diente. Cuando el desgaste no permite estimar la altura máxima de la corona, otra opción plausible sería considerar la altura promedio de la corona entre elementos con una misma fase de desgaste (o una misma edad de muerte cuando sea conocida).

Al comparar ovejas Ripollesa con ovejas Soay, donde hay grandes diferencias de talla, puede observarse cómo los tiempos de desarrollo encajan bien con los resultados isotópicos una vez que la diferente altura de la corona es ajustada entre dientes con distinta longitud de la corona, pero misma edad en el momento de muerte (Figura 4).

Dentro de la población de Ripollesa aquí analizada las diferencias observadas en el tamaño de los elementos analizados son muy pequeñas (máximo 2.6 mm en la longitud de la corona de los M₂), como muestra también la similitud en los patrones isotópicos entre individuos, por lo que no ha sido necesario normalizar la distancia de las muestras en este sentido. Es importante señalar que el conjunto de Ripollesa analizado se conformaba únicamente de hembras, todas procedentes de un mismo rebaño y nacidas en el mismo año. La mayor variabilidad inter-individual la presentaba la posición del proceso de destete en los M₁ (concretamente en OV-03-M1). Sin embargo, cuando se corrigen las ligeras diferencias de tamaño existentes entre otros elementos con un desgaste similar (M₁ de OV-02 y OV-04), no se obtenían grandes diferencias en la posición de los cambios isotópicos (datos no presentados). La variabilidad intra-individual presente parece más relacionada con el inicio de formación del M₁. Trabajos previos muestran una variabilidad de hasta 22 días en el inicio de desarrollo del M₁ en una misma población de ovejas Soay (Kahle et al., 2018), que si bien es una diferencia muy reducida, puede llevar a ligeras diferencias en la posición de las señales isotópicas en la primera parte de la corona de los M₁, donde la dentina presenta altos ratios de crecimiento y mayor resolución.

La diferencia de tamaño del diente no parece condicionar los resultados isotópicos de forma notable en una misma población (al menos entre individuos de un mismo sexo), pero sí será fundamental considerar al comparar distintas poblaciones (e.g. referencial moderno y arqueológico), o cuando se reconozcan diferencias sustanciales en el tamaño de los molares en el conjunto analizado. Esto aplica principalmente a cuando el objetivo del análisis sea situar un cambio isotópico dentro del período de formación dental (por ejemplo, el momento de destete). Se trata de un factor a tener en cuenta a la hora de generar los conjuntos de referencia: ofrecer los datos de referencia a partir de individuos con distinto estadio de desarrollo dental (e.g. grado de desgaste) permitirá disponer de elementos comparables con los restos objeto de estudio, de cara a posibilitar la corrección de la longitud de la corona.

2.3.2. Tiempos de desarrollo dental

La atribución de temporalidad a los resultados isotópicos depende de la suposición de que los tiempos y ritmos de crecimiento dental (período de vida involucrado en el desarrollo de las coronas y ritmo de crecimiento dentro de ese período) son similares entre poblaciones de una misma especie, y concretamente en lo que refiere a su aplicación arqueológica, entre poblaciones pasadas y actuales. Sin embargo, se ha observado que entre razas de ovejas domésticas puede existir cierta variabilidad intra-específica en los tiempos de desarrollo dental (e.g. en los tiempos de erupción dental o de formación de la corona), principalmente entre algunas razas modernas “mejoradas” (*improved breeds*) con ratios de crecimiento rápido y una maduración temprana, y razas *unimproved* con unas ratios de crecimiento más lentos (Geiger et al., 2020; Upex & Dobney, 2012; Witzel et al., 2018). Esto supone *a priori* una limitación a la hora de elaborar datos de referencia a partir de poblaciones modernas que permitan atribuir temporalidad a los cambios isotópicos, aunque se trata de una limitación común a muchos análisis arqueozoológicos (Balasse & Tresset, 2002).

Las fases de desarrollo de los molares mandibulares observada en los especímenes de Ripollesa aquí estudiados, sugiere que esta raza presenta un período prolongado de crecimiento de los molares mandibulares en relación con otras razas ovejas actuales, de forma similar a lo reportado para otras razas *unimproved*. Los estudios de referencia normalmente citados en la literatura para el desarrollo dental en ovejas determinan un período de desarrollo de los M₂ que abarca desde el segundo /tercer mes de vida hasta la finalización de la corona a los 12 /13 meses de vida (raza Préalps du sud, en Milhaud & Nezit, 1991; raza Awassi en Weinreb & Sharav, 1964; raza Suffolk en Zazzo et al., 2010). En función tanto de observaciones macroscópicas como en base a los resultados isotópicos, sabemos que en los especímenes de Ripollesa el desarrollo de la corona del M₂ se extiende varios meses después del primer año vida. Los 6 especímenes sacrificados a los 20-21 meses de edad presentaban los M₂ con las coronas completas, pero con las raíces prácticamente sin desarrollar (en las facetas bucales apenas sobrepasan la ERJ). Esto sugiere que el desarrollo de la corona de los M₂ fue prolongado prácticamente hasta el momento de muerte (20-21 meses), de forma similar a otras razas *unimproved* donde la corona no se completa hasta los 16 meses (raza Shetland, Upbex & Dobney, 2012) o hasta los 19 meses (raza Soay, Witzel et al., 2018). Este desarrollo prolongado se observa también en los M₃ de las Ripollesa: inicia su desarrollo entre el 10 y el 13 mes de vida, pero a los 20/21 meses aún muestra las coronas a medio completar, y el infundíbulo en proceso de formación, de forma similar a las ovejas Soay (20 meses). En cambio, en otras razas la corona M₃ ya está completada a esa edad (e.g. Préalps du Sud, Milhaud & Nezit, 1991).

De acuerdo a las observaciones hechas por Witzel et al. (2018), las diferencias reportadas para los períodos de formación de las coronas entre diferentes razas de ovejas modernas podrían estar en parte relacionadas con aspectos técnicos. Los estudios clásicos que establecen los períodos de formación a través de exámenes radiográficos podrían estar sesgados por este enfoque técnico, menos adecuado para determinar la finalización de las coronas dentales que los empleados a partir de marcadores de fluorescencias. De manera similar, Upbex y Dobney (2012) también señalan una falta de claridad en algunos estudios que se refieren a los criterios histológicos utilizados para definir la finalización del crecimiento dental y omiten la formación de la ERJ (es decir, la finalización del esmalte y el desarrollo inicial de las raíces), o no aclaran la cúspide utilizada – la lingual y bucal pueden formarse con varios meses de diferencia.

Sin embargo, tanto entre distintas especies de rumiantes como entre distintas razas ovinas, generalmente se atribuye el crecimiento dental más lento y prolongado a una maduración tardía, y a unas tasas de crecimiento corporal, tanto de masa corporal como crecimiento esquelético, más bajas (Geiger et al., 2020; Jordana et al., 2014; Upex & Dobney, 2012; Witzel et al., 2018). La semejanza en los tiempos de desarrollo dental entre la raza Ripollesa y unas razas insulares como la Soay o la Shetland es sorprendente teniendo en cuenta las diferencias en el tamaño y peso entre ambas razas (los ejemplares maduros de Ripollesa suelen duplicar el peso de las ovejas Soay), y respalda la idea de que esa menor tasa de crecimiento (más lenta y prolongada) no está necesariamente relacionada con el tamaño del animal, sino con un rasgo filogenético (Geiger et al., 2020).

El uso de razas no mejoradas para el desarrollo de datos referenciales es preferible cuando se persigue una aplicación arqueológica. Estas razas como la Soay o la Shetland, son comúnmente utilizadas para la creación de datos de referencia por presentar unos tiempos de desarrollo que serían presumiblemente más próximos a los de razas de ovejas preindustriales, en oposición a

otras razas modernas donde se habrían dado procesos de selección recientes a favor de tasas de crecimiento mayores (e.g. Geiger et al., 2020; Kierdorf et al., 2013; Popkin et al., 2012; Upex & Dobney, 2012; Witzel et al., 2018; Worley et al., 2016). Las similitudes que muestra la Ripollesa en sus tiempos de formación dental con estas razas, sugieren que también podría presentarse como una raza apropiada para la creación de datos referenciales, y que la variabilidad intra-específica en los tiempos de desarrollo es menor cuando se limita a razas no mejoradas. Ampliar los datos de referencia relativos a los tiempos de desarrollo dental con otras razas ayudará a acotar la limitación que supone la variabilidad intra-específica, y a determinar de forma precisa la resolución temporal de los DSA. Por su parte, las tasas de crecimiento dental en poblaciones pasadas pueden definirse a también a partir de estudios histológicos (Jordana & Köhler, 2011).

3

Posibilidades del DSA en el estudio de la gestión de caprinos domésticos en arqueozoología

3.1. La aplicación del DSA en el estudio del proceso de destete

El destete artificial de corderos (i.e. cese forzado de la lactancia antes de la edad de destete natural) es una práctica ampliamente implementada hoy en día en industrias lácteas (Freitas-de-Melo et al., 2022) pero también está bien documentada etnográficamente en sistemas pastorales donde se persigue ampliar la producción láctea para consumo humano (Hadjikoumis, 2017; Halstead, 1998; Makarewicz, 2011; Vigne & Helmer, 2007). En ovejas y cabras domésticas, la presencia de las crías junto a las madres no es igual de esencial que en el caso de las vacas para garantizar un adecuado ordeño artificial (Balase, 2003a), y numerosos ejemplos etnográficos donde las crías son sacrificadas en edad lechal para intensificar la producción láctea demuestran que, al menos en razas domésticas actuales, la presencia de los corderos o cabritos no es necesaria para mantener todo el período de lactancia (e.g. en Hadjikoumis, 2017; Halstead, 1998; Sherrat, 1981). Sin embargo, el proceso de destete en caprinos domésticos, y su vinculación con la producción láctea, es un aspecto que apenas ha sido explorado en arqueología.

El potencial de los análisis secuenciales de dentina (DSA) ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) para identificar el momento de destete en molares de coronas altas ya se ha demostrado previamente en vacas domésticas, tanto de forma experimental (Balasse et al 2001), como a partir de ejemplares arqueológicos (Balasse & Tresset, 2002; Gillis, 2012; Gillis et al., 2013; Stojanovski et al., 2020). Estos estudios muestran que las prácticas de destete artificial están en mayor o menor grado presentes desde contextos prehistóricos, aunque los datos disponibles son aún escasos, y responderían a distinta casuística: los destetes artificiales de terneros responderían a la necesidad de mantener con vida a los terneros hasta el final del período de lactancia de las vacas para favorecer la correcta bajada de la leche (Balasse, 2003a).

Estos estudios que realizan DSA en molares de vacas implementan el *slice method*, lo que complica la interpretación de los resultados. Las interpretaciones están limitadas a identificar la presencia o ausencia de la señal isotópica de lactancia y de post-lactancia en M_1 y en M_2 (respectivamente) (e.g. Balasse & Tresset, 2002) o a identificar si los terneros fueron sacrificados antes o después del proceso de destete (*post-lactation culling*) (e.g. Stojanovski et al., 2020). Sin embargo, los efectos del muestreo no permiten definir en mayor detalle la temporalidad del momento de destete, pues complican identificar la posición del destete en la corona a partir de las secuencias intra-dentales. Especialmente, como se muestrea todo el grosor de la dentina, los resultados isotópicos

(y la representación del destete en las secuencias) pueden variar con la adición de dentina durante el desarrollo del diente, lo que supone una limitación cuando se comparan individuos con distinta edad de muerte.

Estudiar el momento del destete en ovejas y cabras domésticas afrontaba aún mayores dificultades técnicas: los dientes presentan menor tamaño, lo que genera una mayor atenuación isotópica durante el muestreo secuencial, y se aspira a una mayor resolución temporal, puesto que los periodos de lactancia de cabras y ovejas pueden ser varios meses más cortos que en vacas lecheras. El *método drill*, supone una novedad en este sentido, puesto que ofrece una mayor resolución para explorar el destete en estas especies a partir de DSA.

Al aplicarlo a los individuos del programa experimental SUMA, con un historial de destete conocido, observamos que el *drill method* tiene la resolución necesaria para estudiar el proceso de destete en animales de mediano tamaño, y para identificar un destete temprano en ovejas a partir de los M₁. Todos los individuos analizados (N= 6) muestran unos patrones de variación isotópica similares, y los principales cambios isotópicos observables se sitúan en posiciones similares de la corona, independientemente de la edad de los especímenes (y de su grado de desarrollo dental).

Dos cambios isotópicos principales vinculados al proceso de destete son identificables en las secuencias a partir de los valores isotópicos de carbono y nitrógeno. En primer lugar, el cambio entre lactancia exclusiva e incorporación de alimento sólido a la dieta después del primer mes de vida, observable a partir de una disminución en los valores isotópicos del nitrógeno ($2.3 \pm 0.6\text{‰}$). En segundo lugar, el cese de lactancia (destete) en el segundo mes de vida, i.e., el cambio a una dieta post-destete basada en una mezcla de gránulos y alfalfa, y observable a partir de los valores máximos de $\delta^{13}\text{C}$ como resultado de la presencia de especies C₄ en la composición de los gránulos.

Puesto que el colágeno refleja principalmente la parte proteica de la dieta, cuando las crías se destetan mediante alimentos poco proteicos, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ reflejan principalmente el cese de la lactancia en vez de la incorporación de sólido a la dieta a lo largo del proceso de destete (Balasse et al., 2001; Fuller et al., 2006). Sin embargo, los resultados de nuestro experimental muestran cómo en el caso involucrar alimentos sólidos muy proteicos durante la lactancia, el $\delta^{15}\text{N}$ puede reflejar también la ingesta de sólido mientras aún están mamando, y por tanto antes de producirse el destete. Un uso combinado de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ es por tanto recomendable a la hora de interpretar el momento de destete a partir de secuencias de colágeno, de cara a discernir entre ingesta de sólido y cese de lactancia (Fuller et al., 2006). El uso de elementos traza ha sido también sugerido esta línea (Balasse et al., 2001; Tornero, 2011), y el uso combinado de otros análisis de isótopos estables como el calcio (Wright, 2014) o el zinc (Jaouen et al., 2016) pueden contribuir también a la lectura del período de lactancia y del proceso de destete a partir de análisis secuenciales.

En los individuos analizados, el destete a los 2 meses de edad se representa en los M₁ hacia la mitad de la corona. Esta representación tan avanzada en la corona, sugiere un uso combinado de los M₁ y M₂ para estudiar el proceso de destete en ovejas, puesto que éste puede retrasarse hasta los 5-6 meses de edad (Wright, 2014). Partiendo de los tiempos de desarrollo dental esperados para M₁ y M₂, es esperable que un destete natural o tardío se represente en partes cervicales de la corona de los M₁ y a lo largo de la parte superior del M₂. Las partes cervicales del M₁ pueden representar ratios de crecimiento muy bajos, por lo que el momento de destete podrá quedar algo difuminado en esta parte del diente. En contraste, la primera parte del M₂ tendrá mayor resolución isotópica y temporal para representar destetes posteriores al 2 mes de vida (asumiendo un *drill method*).

En el estudio realizado en esta tesis, se aportan datos de referencia procedentes de una raza de oveja no mejorada, donde el destete se produjo a los 2 meses de edad, el más temprano posible para garantizar la supervivencia de los corderos sin necesidad de proveer de lactancia artificial o leche en fórmula (Freitas-de-Melo et al., 2022). Sin embargo, sería necesario replicar el estudio para el caso de destete natural a los 5-6 meses, con el objetivo de obtener un referencial de proceso no-manipulado. Las posibles diferencias presentes en los tiempos de desarrollo dental entre razas modernas y arqueológicas siempre habrá de valorarse al interpretar el momento de destete a partir de referenciales modernos. El tamaño del diente puede corregirse estimando un promedio de la altura máxima de la corona (Blaise & Balasse, 2011; Frémondeau et al., 2012; Upex & Dobney, 2012), o entre individuos con un mismo grado de desgaste, por lo que conviene considerar este aspecto a la hora de generar los datos referenciales.

Identificar el momento de destete en conjuntos arqueofaunísticos podría aportar al estudio de la producción láctea en arqueología y en prehistoria, ya sea empleado como evidencia de producción láctea, para definir la escala de producción (ya que implica cierta maximización) o para explorar el rol de los taxones involucrados en la misma. La producción de lácteos está hoy en día documentada desde contextos neolíticos (Debono Spiteri et al., 2016; Evershed et al., 2008; Greenfield, 2010, 2014; Halstead, 2023; Roffet-Salque et al., 2018; Vigne & Helmer, 2007), pero la mayoría de proxies utilizados como evidencia directa del procesado de lácteos (e.g. análisis de residuos cerámicos, o de cálculo dental, ya sea a partir de lípidos o proteínas), no permiten definir la escala de la producción, ni los principales mecanismos de gestión animal implicados. Por su parte, el estudio de los patrones de mortalidad vinculados a la producción láctea en ovejas y cabras, se basan en modelos de especialización de la producción, que pueden pasar por alto en muchos contextos arqueológicos una producción a menor escala donde no se realizara el sacrificio de individuos infantiles (Greenfield, 2010; Halstead, 1998). El destete artificial es una estrategia plausible para economías diversificadas donde se busca aumentar la producción láctea para consumo humano a la par que se mantiene la supervivencia de la cría, que puede responder a diversos objetivos, e.g., la estabilidad del rebaño, el acceso al óptimo cárnico u otros productos secundarios, o la mantenimiento de hembras reproductoras. Las dos especies domésticas de caprinos (oveja y cabra), por ser las primeras especies animales domesticadas, y por su presencia predominante en muchos conjuntos faunísticos de contextos prehistóricos, son un buen candidato para explorar la gestión del destete con finalidades vinculadas a la producción láctea.

3.2. Otras posibilidades del DSA

La reproducción, movilidad y alimentación de los animales domésticos están a menudo condicionadas a ciclos anuales, y su control y gestión humanas es un factor clave para la supervivencia, crecimiento y reproducción adecuadas de los animales. Parte del potencial del DSA, compartido con el resto de análisis intra-dentales, es que permite inferir la temporalidad de las condiciones de vida representadas por las señales isotópicas. Los DSA permiten por tanto abordar aspectos vinculados a las condiciones básicas de alimentación, movilidad, y reproducción en base a una variable fundamental: la edad del individuo cuando se daban tales condiciones.

Estudiar la gestión de los animales en base a la edad del individuo permite discernir entre la gestión del animal sub-adulto (e.g., nacimiento, lactancia, alimentación durante el crecimiento, supervivencia o mortalidad) y la gestión del animal adulto (e.g., alimentación estacional, estrategias de forrajeo, estrategias de movilidad, gestación, lactancia). Considerando los tiempos de desarrollo dental observados en ovejas domésticas, y considerando la resolución temporal del método, el

DSA permite estudiar en esta especie, a partir de los molares mandibulares, ventanas concretas del período de vida vinculadas principalmente a los primeros dos años y medio de vida. Los primeros molares mandibulares (M_1), sobre todo combinados con los M_2 , son los más apropiados para estudiar los primeros meses de vida. Los M_2 permiten una aproximación al primer período de alimentación adulta y todo el primer año y medio de vida, mientras que el M_3 será el más apropiado para estudiar el segundo año de vida (por ejemplo, momentos de primera gestación). Es importante subrayar que el DSA, si bien puede representar largos períodos de tiempo (todo el período de formación del diente), ofrece una resolución temporal muy variable a lo largo de la corona. La primera parte de la corona ofrecerá resoluciones temporales mucho mayores (incluso mensuales) que las partes más cervicales, donde largos períodos de tiempo pueden estar comprimidos en escasos milímetros.

La principal ventaja que ofrecen los análisis de DSA es su capacidad para acceder al análisis isotópico del colágeno, y por tanto a los ratios de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ procedentes de la fracción proteica de la dieta, una señal inaccesible a partir de los análisis de esmalte. Además del estudio del nivel trófico a partir de individuos lactantes, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ analizados secuencialmente a partir del colágeno-dentina ofrecen amplias posibilidades para explorar en la reconstrucción de las condiciones medioambientales o de alimentación de las poblaciones animales del pasado: e.g. variaciones en las condiciones de aridez o humedad (Heaton, 1999; Heaton et al., 1986; Hopper et al., 2018; Sealy et al., 1987), altitud (Hobson et al., 2003; Mariotti et al., 1980), tipo de suelo y movilidad (Lazzerini et al., 2021), cambios de dieta estacionales (Drucker et al., 2001, Drucker et al., 2010), tipo de cobertura vegetal (Balasse et al., 2014; Drucker et al., 2003; Tieszen, 1991), forrajeo estacional (Makarewicz & Tuross 2006; 2012), consumo de algas (Blanz et al., 2020; Schulting et al., 2017), abono de los pastos y estrategias de pastoreo intensivo (Aguilera et al., 2018; Bogaard et al., 2007; Makarewicz, 2014; Trentacoste et al., 2020, 2023), consumo de subproductos y deshechos humanos (Balasse et al., 2016), etc. La dentina, no obstante, ofrece también otras posibilidades biogeoquímicas, tanto a partir del análisis de su fracción orgánica (e.g. valores de $\delta^2\text{H}$ y $\delta^{34}\text{S}$), como de su fracción inorgánica (e.g. $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{44}\text{Ca}$, $\delta^{66}\text{Zn}$, $\text{Sr}^{87}/^{86}\text{Sr}$ o relación de elementos alcalinotérreos Sr/Ca y Ba/Ca).

En función del objetivo del estudio, las combinaciones analíticas posibles son múltiples. Por ejemplo, el deuterio ($\delta^2\text{H}$) analizado en colágeno óseo se ha visto que representa variaciones climáticas paralelas a los valores de $\delta^{18}\text{O}$, por lo que puede permitir identificar la variación climática estacional también a partir de la fracción orgánica de la dentina (Kirsanow et al., 2008; Lehn et al., 2020; Reynard et al., 2020; Reynard & Hedges, 2008). A partir del análisis de deuterio y $\delta^{18}\text{O}$ en dentina, donde no está presente la limitación de la segunda mineralización del esmalte, puede explorarse el estudio de la estación de muerte a partir de secuencias isotópicas (como e.g. se ha intentado a partir del esmalte: Lazzerini et al., 2021). Por su parte, los isótopos de azufre ($\delta^{34}\text{S}$) son comúnmente estudiados en arqueología para identificar el aporte de productos marinos a la dieta (Privat et al., 2007; Walker & Macko, 1999), pero también como indicador de movilidad puesto que reflejan el sulfato geológico del suelo (Richards et al., 2001). El potencial del análisis secuencial de $\delta^{34}\text{S}$ en dentina para inferir patrones de movilidad ya ha sido demostrado en restos humanos (Goude et al., 2020). En añadidura, los análisis de *single aminoacids* a partir de colágeno óseo permiten discernir la señal isotópica de componentes determinados de la dieta, e.g. recursos acuáticos de terrestres (Honch et al., 2012), y su análisis secuencial a partir de secuencias intra-dentales abriría también múltiples posibilidades.

Por último, los análisis secuenciales de dentina-colágeno y esmalte ofrecen distintas resoluciones temporales e isotópicas, y un uso combinado de ambas puede permitir también superar las

limitaciones de cada tejido y afrontar nuevas posibilidades de estudio. A lo largo de esta tesis, hemos visto que cuando se aplican análisis secuenciales de $\delta^{13}\text{C}$ en esmalte y de $\delta^{13}\text{C}$ en colágeno-dentina a partir de un mismo diente (Capítulo IV-sección 2.4.2) se producen resultados comparables. La aplicación de un muestreo *drill* permite por tanto la implementación de análisis *multi-isotope* en un mismo elemento dental (e.g. Lehn et al., 2012), siempre y cuando se conozcan y consideren las diferentes resoluciones temporales de ambos tejidos.

Por su parte, es esperable que la fracción mineral de la dentina tenga una resolución temporal similar a la obtenida a partir del colágeno, puesto que la dentina se mineraliza seguidamente a la deposición del manto de pre-dentina (Dean, 2000; Engel & Hilding, 1984; Frank & Nalbandian, 1989). La fracción inorgánica de la dentina permite por tanto acceder a composiciones isotópicas mesurables en el esmalte, pero a partir de diferente resolución temporal, lo que puede complementar las posibilidades del esmalte, por ej., cuando el período de mineralización del esmalte no cubra el período objeto de estudio. Los análisis de la fracción inorgánica de la dentina hacen posible además, analizar elementos traza tanto en su concentración elemental (e.g. Sr/Ca y Ba/Ca), como analizando sus ratios isotópicas ($\delta^{44}\text{Ca}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$), aunque la mayor susceptibilidad de la dentina a la alteración diagenética de su composición química podría suponer una limitación en determinados contextos post-deposicionales (Lee-Thorp & van der Merwe, 1991). Los isótopos de Calcio ($\delta^{42}\text{Ca}$ y $\delta^{44}\text{Ca}$), utilizados como un marcador directo de la ingesta de leche en la dieta (Reynard et al., 2011), ofrece también grandes posibilidades en el estudio de los procesos de lactancia y de destete en animales domésticos (Wright, 2014).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

Conclusiones y perspectivas de futuro

Conclusiones

En arqueozoología, es fundamental trazar las relaciones entre humanos y animales a partir de escalas temporales precisas, que permitan representar a una escala operativa los procesos sociales objeto de estudio de la arqueología. A lo largo de esta tesis, nos centramos en el desarrollo metodológico de una vía de análisis que permitirá explorar nuevos escenarios en esta línea, la del estudio de las relaciones entre humanos y animales en el pasado. La integración de análisis secuenciales de dentina, particularmente a partir de nuestra nueva propuesta, permite estudiar la variación isotópica del colágeno a lo largo de períodos concretos de la vida de los animales, y ofrece numerosas posibilidades para representar las condiciones relacionadas con la alimentación, la movilidad, o la reproducción de los individuos, o el medioambiente en el que habitaron, mediadas o no, por la actividad humana.

A lo largo del primer bloque metodológico desarrollado en esta tesis, hemos replicado el método convencional de DSA desarrollado por Balasse et al. (2001), y originalmente aplicado sobre vacas domésticas. La aplicación que hemos realizado sobre nuestro conjunto ovino experimental demuestra que este método es también aplicable en el caso de ovejas domésticas, donde ofrece una resolución similar a su aplicación en bóvidos de mayor tamaño. El método permite representar a partir de la señal de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ del colágeno hasta tres escenarios de dieta diferentes, estudiar patrones de variación isotópica dentro de una población, y asignar información temporal a los datos isotópicos obtenidos a lo largo de la secuencia intra-dental, aunque se han de considerar las importantes limitaciones que presenta el método y los efectos que el muestreo tiene sobre los resultados.

De forma concreta, la principal limitación de esta aproximación es la baja resolución temporal que ofrece, consecuencia de los largos intervalos temporales que integran cada una de las muestras que se obtienen. Como consecuencia, esto produce que en determinadas situaciones las señales isotópicas de un período concreto, o los cambios isotópicos que registra la dentina, puedan no reconocerse en los resultados que se obtienen. Además, el muestreo de todo el grosor de la dentina dificulta la comparación entre individuos que presentan distinto grado de desarrollo de la dentina (i.e. diferente edad de muerte), puesto que los mismos patrones de alimentación pueden representarse de forma desigual. Por el contrario, y a pesar del hándicap que supone la mezcla de dentina, ha de subrayarse que la principal fortaleza de este protocolo de muestreo es obtener muestras de dentina de mayor tamaño: permiten tratamientos de purificación de colágeno más agresivos, especialmente en el caso que éstos sean esenciales para garantizar valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ fiables por los contextos diagenéticos de los que proceden; y permiten ser analizadas más de una vez (i.e. realizar repeticiones de las medidas isotópicas o realizar análisis multi-isotópicos).

En segundo lugar, y con el objetivo de superar las limitaciones inherentes del método de DSA convencional hasta ahora disponible, hemos desarrollado un nuevo protocolo de muestreo

alternativo con el que implementar análisis secuenciales de colágeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$). El nuevo método, permite ahora obtener una mayor resolución temporal e isotópica en las secuencias, a la vez que se adapta a la dirección de crecimiento de los molares de coronas altas. La estrategia de muestreo permite analizar sólo la dentina más superficial, evitando el muestreo de dentina interna. Esto supone una reducción directa sobre el efecto de atenuación de los resultados isotópicos, a la par que las muestras representan períodos de tiempo más cortos. Por ello, el protocolo es especialmente útil a la hora de comparar datos entre dientes en distinto estadio de desarrollo (i.e. entre individuos con distinta edad en el momento de muerte), puesto que no depende de la continua adición de dentina a lo largo del desarrollo de la corona y de las raíces. Por último, otra ventaja del protocolo es que el patrón de variación isotópica se representa en las secuencias más acorde con los tiempos de crecimiento dental del diente en su eje longitudinal, por lo que permite atribuir temporalidad a los resultados de forma más fácil que el método de DSA hasta ahora disponible.

La mayor resolución del nuevo método de muestreo *drill* facilita la interpretación de los resultados, lo que lo hace más adecuado para la aplicación de DSA sobre conjuntos arqueológicos. De hecho, la comparación de valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{bioapatita}}$ y $\delta^{13}\text{C}_{\text{colágeno}}$ obtenidos a partir de un mismo molar, muestran que el protocolo es capaz de representar cambios isotópicos a lo largo de la corona con una resolución similar a la que se obtiene a partir del protocolo estándar de análisis secuencial de esmalte, al menos en términos de rango de variación intra-dental.

El desarrollo del método de DSA por muestreo *drill*, se ha hecho a partir de molares mandibulares de ovejas domésticas, pero la estrategia de muestreo es aplicable a otras especies que presenten denticiones similares. La estrategia permite adaptar el muestreo a molares donde la cavidad pulpar es alargada y por tanto la dentina presente ángulos de deposición muy oblicuos, a la vez que permite adaptar el muestreo a la morfología curva de las facetas bucales de los lóbulos, que presentan la mayor tasa de aposición de dentina (Kahle et al., 2018; Wtitzel et al., 2018), y por tanto facilitan obtener mayor resolución temporal. La estrategia es por tanto aplicable a otras especies que presenten esta morfología de los molares, y donde se busque evitar la inclusión de dentina interna y priorizar la dirección longitudinal del crecimiento de los molares. No obstante, la resolución temporal (i.e. intervalo de tiempo que representa la muestra y la secuencia) será en cada caso diferente y tendrá que definirse de forma específica para cada taxón.

La resolución temporal del muestreo dependerá directamente del ángulo y la tasa diaria de secreción de la dentina, la cual es variable entre especies con coronas altas según la talla, el índice de hipsodoncia y la tasa de crecimiento y maduración de cada especie (Jordana et al., 2014). La resolución temporal que se obtiene en ovejas ha de ser similar en otras especies de caprinos que presenten similar tamaño, grado de hipsodoncia y tiempo de desarrollo de los molares mandibulares, como ocurre en el caso de las cabras domésticas (Deniz & Payne, 1982; Silver, 1969). No obstante, en otras especies de bóvidos, sobre todo de diferente talla, la resolución temporal será variable. Por su parte, la aplicación de este protocolo de muestreo en denticiones con diferente morfología, como e.g. molares de équidos, necesitará de nuevos estudios metodológicos que evalúen la aplicabilidad de este protocolo a estas denticiones.

La aplicación del nuevo protocolo de muestreo al estudio de un proceso de alimentación concreto –lactancia y destete– y acontecido durante los primeros meses de vida, muestra las posibilidades del nuevo método. Se trata del primer estudio donde se evalúa la utilidad del análisis secuencial de dentina ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ colágeno) para explorar el proceso de destete en caprinos domésticos, concretamente en ovejas. Los resultados isotópicos que se obtienen permiten identificar el cambio

de dieta entre lactancia y dieta post-destete a partir de los primeros molares mandibulares, con una resolución temporal nunca antes obtenida en este tipo de denticiones.

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ que se obtienen con este método de DSA permiten representar el empobrecimiento en ^{15}N que –generalmente– conlleva el destete y la ingesta de proteínas mayoritariamente procedentes de los alimentos sólidos. Sin embargo, se tienen que tener en cuenta factores de la alimentación y metabólicos involucrados en la composición isotópica del colágeno que pueden complicar la interpretación de los resultados en relación al proceso de destete. La composición de $\delta^{15}\text{N}$ del colágeno puede representar la ingesta de sólido (aún durante la lactancia) cuando la dieta sólida tenga un alto contenido proteico, en vez de representar el cese de la lactancia. En nuestro estudio se han utilizado dietas formuladas muy proteicas para destetar los corderos, pero parece que esto no supone un problema cuando la alimentación sólida son pastos (Balasse et al., 2001; Makarewicz, 2011), donde el principal aporte de proteína procede de la leche y los valores de $\delta^{15}\text{N}$ sí representan el cese de la lactancia. No obstante, éste aspecto tendrá que considerarse en el futuro al integrar el análisis de $\delta^{15}\text{N}$ en la reconstrucción del destete en herbívoros. El uso combinado de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ es también recomendable para ayudar a discernir entre ingesta de sólido y cese de lactancia (Fuller et al., 2006).

La aplicación del nuevo método a los primeros molares mandibulares presenta además una “secuencia-tipo” (posición y representación en las secuencias) para un destete temprano en ovejas domésticas, situado a una altura intermedia de la corona. Este es un primer trabajo experimental con ovejas actuales donde se controlan los tiempos de destete, pero futuros trabajos serán necesarios ofreciendo referencias sobre un proceso de lactancia y destete no manipulado. La capacidad del DSA para representar esta resolución temporal en caprinos domésticos abre grandes posibilidades para estudiar la explotación láctea en estos taxones (extensión de período de lactancia, y destete artificial). La aplicación también puede trasladarse a bovinos, aunque nuevos trabajos serán necesarios para definir la resolución temporal que se obtiene en estos taxones con el método *drill*. El DSA tiene un amplio campo por recorrer en este sentido, pero también se han de tener en cuenta las limitaciones que todavía presenta y que necesitan futuros esfuerzos, como la variabilidad intra-específica en los tiempos de crecimiento dental, y las diferencias en el tamaño del diente que pueden existir entre poblaciones.

Será fundamental considerar la potencial diferencia de tamaño del diente al comparar distintas poblaciones (e.g. referencial moderno y arqueológico), o cuando se reconozcan diferencias sustanciales en el tamaño de los molares en el conjunto analizado, siempre que el objetivo sea situar un cambio isotópico dentro del período de formación dental (e.g. momento de destete). Las diferencias de tamaño del diente entre poblaciones pueden abordarse a partir de normalizar los datos en base a una altura media de la corona (e.g. altura máxima o altura media a determinado desgaste) (Blaise & Balasse, 2011; Frémondeau et al., 2012b; Upex & Dobney, 2012). Se habrá de evaluar el margen de error temporal que introducen estas correcciones del tamaño de la corona. Por su parte, ampliar los datos de referencia relativos a los tiempos de desarrollo dental con otras razas ayudará a acotar la variabilidad intra-específica y a definir de forma más precisa la resolución del DSA. La variabilidad en los tiempos de crecimiento dental entre razas se puede resolver también con futuros trabajos donde se explore la variabilidad entre razas *non-improved*, donde podría ser menor que la existente entre razas actuales. Es imperativo explorar este aspecto para abordar el estudio del momento del destete.

La práctica de destetes artificiales puede suponer una estrategia ganadera muy útil en economías diversificadas y en sistemas ganaderos donde se busca obtener múltiples y diversos productos

finales animales, puesto que permite aumentar la producción de leche para consumo humano a la vez que se mantiene la supervivencia de los corderos. Ésta puede responder a diversos objetivos, como la estabilidad y reproducción del rebaño, o el acceso al óptimo cárnico u otros productos secundarios. Las ovejas (al igual que las cabras) muestran una amplia distribución actual como especies domésticas lecheras, y son abundantes los datos arqueozoológicos (e.g., Helmer et al., 2007; Sierra et al., 2021; Vigne & Helmer, 2007), o moleculares (Hendy et al., 2018), que apuntan a la explotación láctea de estas especies desde el Neolítico. Ovejas y cabras domésticas, por ser las primeras especies en ser domesticadas (Peters et al., 2005; Zeder, 2008), y por su mayor propensión fisiológica a facilitar un ordeño artificial (Balasse, 2003a), son además un buen candidato para explorar su gestión con una finalidad orientada a la producción láctea desde las primeras sociedades agrícola-ganaderas. El procesado de lácteos está hoy en día documentado desde el VII milenio BC (Debono Spiteri et al., 2016; Evershed et al., 2008), pero los proxies biomoleculares empleados como evidencia directa a partir del análisis de residuos orgánicos, dependen de la presencia en el registro de recipientes cerámicos, y no permiten definir la *escala* de la producción, ni los principales mecanismos de gestión animal implicados en ella. El estudio de prácticas de destete y manipulación de la lactancia en caprinos domésticos, puede contribuir al estudio de sistemas lecheros, tanto en su origen y su difusión, como en la escala de producción.

La gestión animal es un aspecto esencial en arqueozoología en lo que concierne al estudio de la organización socio-económica, la escala de la producción, y la complejidad de los sistemas ganaderos en comunidades prehistóricas. Las condiciones de alimentación y nutricionales están a menudo restringidas a los ciclos estacionales, y a la edad de los individuos, y su control y gestión por las comunidades humanas es un factor esencial para la supervivencia, crecimiento óptimo, y reproducción de los animales domésticos. Los análisis secuenciales de $\delta^{13}\text{C}_{\text{colágeno}}$ y $\delta^{15}\text{N}_{\text{colágeno}}$ ofrecen múltiples posibilidades para estudiar las fluctuaciones de la parte proteica de la dieta, especialmente aquellas vinculadas al nivel trófico y al consumo de proteínas (animales o vegetales), inaccesibles a partir del análisis de componentes inorgánicos. El nuevo método de muestreo que se desarrolla a lo largo de la tesis, permite además alcanzar una resolución temporal mucho mayor, y ofrece mayores posibilidades de aplicación. Explorar el amplio abanico de posibilidades que ofrecen los DSA, en particular los análisis de colágeno ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{34}\text{S}$) pero también de su fracción inorgánica o partir de análisis *multi-isotope*, puede abrir nuevas vías de investigación en arqueozoología.

Perspectivas de futuro

Son múltiples las líneas de trabajo que pueden seguirse para integrar los DSA en arqueozoología, tanto a nivel metodológico, como para su integración a las problemáticas históricas en curso de estudio. A un nivel técnico, y metodológico, y en base a los estudios y los resultados que se han obtenido a lo largo de esta tesis, podemos destacar las siguientes:

- Evaluar la aplicación del nuevo protocolo *drill* sobre restos óseos arqueológicos, y definir los límites que puede presentar según el grado de preservación del colágeno y en función del contexto diagenético.
- Adaptación de la estrategia de muestreo por *drill* previo a la desmineralización, que minimice el impacto destructivo del método, de cara a fomentar su aplicación sobre restos arqueológicos. Para ello, sería necesario adaptar el protocolo de desmineralización a muestras en polvo y de pequeño tamaño, y evaluar la capacidad de la estrategia para muestrear por debajo (i.e. a través) del esmalte a la vez que se mantiene una profundidad de muestreo homogénea.
- Evaluación de la posibilidad de aplicar otros análisis isotópicos sobre el colágeno a partir del *drill-method*, como análisis isotópicos de azufre, hidrógeno, u oxígeno. Concretamente, explorar el análisis de $\delta^{18}\text{O}$ y $\delta^2\text{H}$ a partir de DSA (*drill-method*) como marcadores de estacionalidad, y la posibilidad de combinar estas mediciones con las de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ a partir de análisis *multi-isotope*.
- Aplicación del *drill method* a otras especies animales de potencial interés en estudios arqueozoológicos, especialmente vacas domésticas, por la posibilidad que ofrece el colágeno para representar el salto trófico (lactancia), pero también a otras especies comunes en el registro arqueológico como, e.g. pertenecientes al género *equus*, donde por su morfología dental, queda por explorar la aplicabilidad de este protocolo.
- Cuantificación del intervalo temporal que incluyen las muestras (según el taxón analizado) y de la atenuación isotópica que se produce a lo largo de la corona, de cara a desarrollar un modelo de predicción de la señal isotópica original (no atenuada). El desarrollo de estudios histológicos a partir de marcadores con fluorescencia, que permiten registrar las tasas de desarrollo dental a partir de animales actuales, posibilitaría dicha cuantificación.
- Desarrollo de nuevos conjuntos referenciales con poblaciones actuales que contribuyan al estudio del proceso de destete en conjuntos arqueológicos: referenciales que permitan representar secuencias-tipo de variación del $\delta^{15}\text{N}$ en destetes no artificiales; que representen la variabilidad en la longitud del período de lactancia entre razas lecheras y no lecheras; que representen estos procesos en el caso de las cabras domésticas, etc. La generación de datos referenciales puede contribuir también al desarrollo de modelos de predicción del momento de destete en función de la posición de los cambios isotópicos en la corona.

- Evaluación del margen de error que se introduce al normalizar los resultados isotópicos entre individuos con un distinto tamaño del diente a partir de la estimación de la altura media (o máxima) de la corona, cuando el objetivo es atribuir temporalidad a la posición del cambio isotópico en el diente (e.g. momento de destete). De forma paralela, desarrollo de modelos matemáticos que permitan corregir o limitar el potencial error inducido en la comparativa.

- Estudio de la variabilidad intra-específica de los tiempos de desarrollo dental para el caso de las ovejas domésticas, de cara a definir la temporalidad que se puede inferir con DSA en función de la posición de los cambios isotópicos en el diente. Ampliar los datos de referencia con otras razas *non-improved* ayudará a acotar esta limitación, y a determinar de forma precisa la resolución temporal de los DSA.

Por su parte, las líneas de trabajo que pueden seguir a esta tesis en relación a su aplicación en conjuntos arqueológicos son también múltiples. Las posibilidades aplicativas del DSA dependerán de las problemáticas específicas y a las preguntas que se busque responder en cada caso. Destacamos las posibilidades que puede ofrecer el DSA para realizar reconstrucciones paleoambientales y paleoecológicas a partir de especies de fauna salvaje, pero también las que ofrece en animales domésticos para el estudio de procesos de domesticación o estrategias de gestión ganadera.

De forma más concreta, por las posibilidades que ofrece para rastrear el salto trófico, destacamos como una línea a explorar en los próximos años la integración de DSA en el estudio de la gestión y manipulación humana del proceso de destete y del período de lactancia en razas domésticas del pasado, tanto en vacas como en ovejas y cabras. La aplicación de DSA que se ha hecho en esta tesis para estudiar el momento de destete, puede replicarse ahora sobre restos arqueológicos de caprinos domésticos, y ofrece un primer referencial sobre el que se pueden contraponer los nuevos resultados.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

Referencias bibliográficas

- Aguilera, M., Zech-Matterne, V., Lepetz, S., & Balasse, M. (2018). Crop Fertility Conditions in North-Eastern Gaul During the La Tène and Roman Periods: A Combined Stable Isotope Analysis of Archaeobotanical and Archaeozoological Remains. *Environmental Archaeology*, 23(4), 323–337. <https://doi.org/10.1080/14614103.2017.1291563>
- Ambrose, S. H. (1990). Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. *Journal of Archaeological Science*, 17(4), 431–451. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(90\)90007-R](https://doi.org/10.1016/0305-4403(90)90007-R)
- Ambrose, S. H., & Norr, L. (1993). Experimental Evidence for the Relationship of the Carbon Isotope Ratios of Whole Diet and Dietary Protein to Those of Bone Collagen and Carbonate. In *Prehistoric Human Bone* (pp. 1–37). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02894-0_1
- Amundson, R., Austin, A. T., Schuur, E. A. G., Yoo, K., Matzek, V., Kendall, C., Uebersax, A., Brenner, D., & Baisden, W. T. (2003). Global patterns of the isotopic composition of soil and plant nitrogen. *Global Biogeochemical Cycles*, 17(1). <https://doi.org/10.1029/2002GB001903>
- Arnold, G. W., Wallace, S. R., & Maller, R. A. (1979). Some factors involved in natural weaning processes in sheep. *Applied Animal Ethology*, 5(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/0304-3762\(79\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0304-3762(79)90006-3)
- Ayliffe, L. ., Chivas, A. ., & Leakey, M. . (1994). The retention of primary oxygen isotope compositions of fossil elephant skeletal phosphate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(23), 5291–5298. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(94\)90312-3](https://doi.org/10.1016/0016-7037(94)90312-3)
- Bada, J. L., Peterson, R. O., Schimmelmann, A., & Hedges, R. E. M. (1990). Moose teeth as monitors of environmental isotopic parameters. *Oecologia*, 82(1), 102–106.

<https://doi.org/10.1007/BF00318540>

- Balasse, M. (1999). *De l'exploitation du lait au Néolithique moyen en Europe tempérée : examen des modalités de sevrage des bovins, par l'analyse isotopique des ossements archéologiques*. Université Paris VI.
- Balasse, M. (2002). Reconstructing dietary and environmental history from enamel isotopic analysis: Time resolution of intra-tooth sequential sampling. *International Journal of Osteoarchaeology*, 12(3), 155–165. <https://doi.org/10.1002/oa.601>
- Balasse, M. (2003a). Keeping the young alive to stimulate milk production? Differences between cattle and small stock. *Anthropozoologica*, 37, 3–10.
- Balasse, M. (2003b). Potential biases in sampling design and interpretation of intra-tooth isotope analysis. *International Journal of Osteoarchaeology*, 13(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1002/oa.656>
- Balasse, M. (2014). Isotopic Studies of Husbandry Practices. In C. Smith (Ed.), *Encyclopedia of Global Archaeology* (pp. 4120–4128). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0465-2>
- Balasse, M., Ambrose, S. H., Smith, A. B., & Price, T. D. (2002). The seasonal mobility model for prehistoric herders in the south-western Cape of South Africa assessed by isotopic analysis of sheep tooth enamel. *Journal of Archaeological Science*, 29(9), 917–932. <https://doi.org/10.1006/jasc.2001.0787>
- Balasse, M., Bălăşescu, A., Tornero, C., Fremondeau, D., Hovsepyan, R., Gillis, R., & Popovici, D. (2017). Investigating the scale of herding in Chalcolithic pastoral communities settled along the Danube River in the 5th millennium BC: A case study at Borduşani-Popină and Hârşovă-tell (Romania). *Quaternary International*, 436, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2015.07.030>
- Balasse, M., Bocherens, H., & Mariotti, A. (1999). Intra-bone Variability of Collagen and Apatite Isotopic Composition Used as Evidence of a Change of Diet. *Journal of Archaeological Science*, 26(6), 593–598. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0376>
- Balasse, M., Bocherens, H., Mariotti, A., & Ambrose, S. H. (2001). Detection of dietary changes by intra-tooth carbon and nitrogen isotopic analysis: An experimental study of dentine collagen of cattle (*Bos taurus*). *Journal of Archaeological Science*, 28(3), 235–245. <https://doi.org/10.1006/jasc.1999.0535>
- Balasse, M., Bocherens, H., Tresset, A., Mariotti, A., & Vigne, J.-D. (1997). Émergence de la production laitière au Néolithique ? Contribution de l'analyse isotopique d'ossements de bovins archéologiques. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science*, 325(12), 1005–1010. [https://doi.org/10.1016/S1251-8050\(97\)82382-8](https://doi.org/10.1016/S1251-8050(97)82382-8)
- Balasse, M., Boury, L., Ughetto-Monfrin, J., & Tresset, A. (2012a). Stable isotope insights ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$) into cattle and sheep husbandry at Bercy (Paris, France, 4th millennium BC): birth seasonality and winter leaf foddering. *Environmental Archaeology*, 17(1), 29–44. <https://doi.org/10.1179/1461410312Z.0000000003>

- Balasse, M., Chemineau, P., Parisot, S., Fiorillo, D., & Keller, M. (2024). Experimental Data from Lacaune and Merino Sheep Provide New Methodological and Theoretical Grounds to Investigate Autumn Lambing in Past Husbandries. *Journal of Archaeological Method and Theory*, 31(1), 75–92. <https://doi.org/10.1007/s10816-022-09600-7>
- Balasse, M., Evin, A., Tornero, C., Radu, V., Fiorillo, D., Popovici, D., Andreescu, R., Dobney, K., Cucchi, T., & Bălăşescu, A. (2016). Wild, domestic and feral? Investigating the status of suids in the Romanian Gumelnița (5th mil. cal BC) with biogeochemistry and geometric morphometrics. *Journal of Anthropological Archaeology*, 42, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jaa.2016.02.002>
- Balasse, M., Mainland, I., & Richards, M. P. (2009). Stable isotope evidence for seasonal consumption of marine seaweed by modern and archaeological sheep in the Orkney archipelago (Scotland). *Environmental Archaeology*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1179/174963109X400637>
- Balasse, M., Obein, G., Ughetto-Monfrin, J., & Mainland, I. (2012b). Investigating seasonality and season of birth in past herds: A reference set of sheep enamel stable oxygen isotope ratios. *Archaeometry*, 54(2), 349–368. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2011.00624.x>
- Balasse, M., Renault-Fabregon, L., Gandois, H., Fiorillo, D., Gorczyk, J., Bacvarov, K., & Ivanova, M. (2020). Neolithic sheep birth distribution: Results from Nova Nadezhda (sixth millennium BC, Bulgaria) and a reassessment of European data with a new modern reference set including upper and lower molars. *Journal of Archaeological Science*, 118, 105139. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2020.105139>
- Balasse, M., Smith, A. B., Ambrose, S. H., & Leigh, S. R. (2003). Determining Sheep Birth Seasonality by Analysis of Tooth Enamel Oxygen Isotope Ratios: The Late Stone Age Site of Kasteelberg (South Africa). *Journal of Archaeological Science*, 30(2), 205–215. <https://doi.org/10.1006/jasc.2002.0833>
- Balasse, M., Tornero, C., Bréhard, S., Ughetto-Monfrin, J., Voinea, V., Bălăşescu, A., Balasse, M., Tornero, C., Bréhard, S., Ughetto-Monfrin, J., Voinea, V., & Bălăşescu, A. (2014). Cattle and Sheep Herding at Cheia, Romania, at the Turn of the Fifth Millennium cal BC. *Early Farmers, November*. <https://doi.org/10.5871/bacad/9780197265758.003.0007>
- Balasse, M., & Tresset, A. (2002). Early weaning of Neolithic domestic cattle (Bercy, France) revealed by intra-tooth variation in nitrogen isotope ratios. *Journal of Archaeological Science*, 29(8), 853–859. <https://doi.org/10.1006/jasc.2001.0725>
- Balasse, M., & Tresset, A. (2007). Environmental constraints on the reproductive activity of domestic sheep and cattle: what latitude for the herder? *Anthropozoologica*, 42(2), 71–88.
- Balasse, M., Tresset, A., & Ambrose, S. H. (2006). Stable isotope evidence ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) for winter feeding on seaweed by Neolithic sheep of Scotland. *Journal of Zoology*, 270(1), 170–176. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00104.x>
- Balasse, M., Tresset, A., Bocherens, H., Mariotti, A., & Vigne, J.-D. (2000). Un abattage “post-lactation” sur des bovins domestiques néolithiques. Étude isotopique des restes osseux du site

de Bercy (Paris, France). *Anthropozoologica*, 31, 39–48.
<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:164057135>

- Beaumont, J., Gledhill, A., Lee-Thorp, J., & Montgomery, J. (2013). Childhood diet: A closer examination of the evidence from dental tissues using stable isotope analysis of incremental human dentine*. *Archaeometry*, 55(2), 277–295. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2012.00682.x>
- Beaumont, J., Gledhill, A., & Montgomery, J. (2014). Isotope analysis of incremental human dentine: Towards higher temporal resolution. *Bulletin of the International Association for Paleodontology*, 8(2), 212–223.
- Beaumont, J., & Montgomery, J. (2016). The great irish famine: Identifying starvation in the tissues of victims using stable isotope analysis of bone and incremental dentine collagen. *PLoS ONE*, 11(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160065>
- Bendrey, R., Vella, D., Zazzo, A., Balasse, M., & Lepetz, S. (2015). Exponentially decreasing tooth growth rate in horse teeth: implications for isotopic analyses. *Archaeometry*, 57(6), 1104–1124. <https://doi.org/10.1111/arcm.12151>
- Bentley, R. A. (2006). Strontium isotopes from the earth to the archaeological skeleton: A review. *Journal of Archaeological Method and Theory*, 13(3), 135–187. <https://doi.org/10.1007/s10816-006-9009-x>
- Blaise, E., & Balasse, M. (2011). Seasonality and season of birth of modern and late Neolithic sheep from south-eastern France using tooth enamel $\delta^{18}\text{O}$ analysis. *Journal of Archaeological Science*, 38(11), 3085–3093. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.07.007>
- Blanz, M., Mainland, I., Richards, M., Balasse, M., Ascough, P., Wolfhagen, J., Taggart, M. A., & Feldmann, J. (2020). Identifying seaweed consumption by sheep using isotope analysis of their bones and teeth: Modern reference $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and their archaeological implications. *Journal of Archaeological Science*, 118, 105140. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2020.105140>
- Bocherens, H., Billiou, D., Patou-Mathis, M., Bonjean, D., Otte, M., & Mariotti, A. (1997). Paleobiological Implications of the Isotopic Signatures (^{13}C , ^{15}N) of Fossil Mammal Collagen in Scladina Cave (Sclayn, Belgium). *Quaternary Research*, 48(3), 370–380. <https://doi.org/10.1006/qres.1997.1927>
- Bocherens, H., & Drucker, D. (2003). Trophic level isotopic enrichment of carbon and nitrogen in bone collagen: Case studies from recent and ancient terrestrial ecosystems. *International Journal of Osteoarchaeology*, 13(1–2), 46–53. <https://doi.org/10.1002/oa.662>
- Bocherens, H., Drucker, D. G., & Madelaine, S. (2014). Evidence for a ^{15}N positive excursion in terrestrial foodwebs at the Middle to Upper Palaeolithic transition in south-western France: Implications for early modern human palaeodiet and palaeoenvironment. *Journal of Human Evolution*, 69, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2013.12.015>
- Bocherens, H., Fizet, M., Cuif, J. P., Jaeger, J. J., Michard, J., & Mariotti, A. (1988). First measurements of ^{13}C and ^{15}N natural isotopic abundance of fossil dinosaurian organic matter. Application to determining the diet of Anatosaurus (Ornithischia, Hadrosauridae). *Comptes*

Rendus - Academie Des Sciences, Serie II, 306(20), 1521–1525.

- Bocherens, H., Fizet, M., & Mariotti, A. (1994). Diet, physiology and ecology of fossil mammals as inferred from stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry: implications for Pleistocene bears. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 107(3–4), 213–225.* [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(94\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0031-0182(94)90095-7)
- Bocherens, H., Fizet, M., Mariotti, A., Lange-Badré, B., Vandermeersch, B., Borel, J. P., & Bellon, G. (1991). Isotopic Biogeochemistry ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) of fossil vertebrate collagen: implications for the study of fossil food web including Neandertal Man. *Journal of Human Evolution, 20, 481–492.*
- Bocherens, H., Fogel, M. L., Tuross, N., & Zeder, M. (1995). Trophic Structure and Climatic Information From Isotopic Signatures in Pleistocene Cave Fauna of Southern England. *Journal of Archaeological Science, 22(2), 327–340.* <https://doi.org/10.1006/jasc.1995.0035>
- Bocherens, H., & Mariotti, A. (2002). Paléoenvironnements et paléoalimentations: biogéochimie isotopique des vertébrés. In J. C. Miskovsky (Ed.), *Géologie de la Préhistoire* (pp. 1323–1344). Presses Universitaires de Perpignan.
- Bocherens, H., Pacaud, G., Lazarev, P. A., & Mariotti, A. (1996). Stable isotope abundances (^{13}C , ^{15}N) in collagen and soft tissues from Pleistocene mammals from Yakutia: Implications for the palaeobiology of the Mammoth Steppe. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 126(1–2), 31–44.* [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(96\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(96)00068-5)
- Bogaard, A., Heaton, T. H. E., Poulton, P., & Merbach, I. (2007). The impact of manuring on nitrogen isotope ratios in cereals: archaeological implications for reconstruction of diet and crop management practices. *Journal of Archaeological Science, 34(3), 335–343.* <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.04.009>
- Bourgon, N., Jaouen, K., Bacon, A. M., Dufour, E., McCormack, J., Tran, N. H., Trost, M., Fiorillo, D., Dunn, T. E., Zanolli, C., Zachwieja, A., Düringer, P., Ponche, J. L., Boesch, Q., Antoine, P. O., Westaway, K. E., Joannes-Boyau, R., Suzzoni, E., Frangeul, S., ... Tütken, T. (2021). Trophic ecology of a Late Pleistocene early modern human from tropical Southeast Asia inferred from zinc isotopes. *Journal of Human Evolution, 161.* <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2021.103075>
- Brault, E. K., Koch, P. L., Gier, E., Ruiz-Cooley, R. I., Zupcic, J., Gilbert, K. N., & McCarthy, M. D. (2014). Effects of decalcification on bulk and compound-specific nitrogen and carbon isotope analyses of dentin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry, 28(24), 2744–2752.* <https://doi.org/10.1002/rcm.7073>
- Britton, K., Gaudzinski-Windheuser, S., Roebroeks, W., Kindler, L., & Richards, M. P. (2012). Stable isotope analysis of well-preserved 120,000-year-old herbivore bone collagen from the Middle Palaeolithic site of Neumark-Nord 2, Germany reveals niche separation between bovids and equids. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 333–334, 168–177.* <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2012.03.028>
- Britton, K., Grimes, V., Dau, J., & Richards, M. P. (2009). Reconstructing faunal migrations using

intra-tooth sampling and strontium and oxygen isotope analyses: a case study of modern caribou (*Rangifer tarandus granti*). *Journal of Archaeological Science*, 36(5), 1163–1172. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2009.01.003>

Britton, K., Grimes, V., Niven, L., Steele, T. E., McPherron, S., Soressi, M., Kelly, T. E., Jaubert, J., Hublin, J. J., & Richards, M. P. (2011). Strontium isotope evidence for migration in late Pleistocene *Rangifer*: Implications for Neanderthal hunting strategies at the Middle Palaeolithic site of Jonzac, France. *Journal of Human Evolution*, 61(2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2011.03.004>

Britton, K., Jimenez, E.-L., Le Corre, M., Pederzani, S., Daujeard, C., Jaouen, K., Vettese, D., Tütken, T., Hublin, J.-J., & Moncel, M.-H. (2023). Multi-isotope zooarchaeological investigations at Abri du Maras: The paleoecological and paleoenvironmental context of Neanderthal subsistence strategies in the Rhône Valley during MIS 3. *Journal of Human Evolution*, 174, 103292. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2022.103292>

Britton, K., Pederzani, S., Kindler, L., Roebroeks, W., Gaudzinski-Windheuser, S., Richards, M. P., & Tütken, T. (2019). Oxygen isotope analysis of *Equus* teeth evidences early Eemian and early Weichselian palaeotemperatures at the Middle Palaeolithic site of Neumark-Nord 2, Saxony-Anhalt, Germany. *Quaternary Science Reviews*, 226, 106029. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2019.106029>

Brown, T. A., Nelson, D. E., Vogel, J. S., & Southon, J. R. (1988). Improved Collagen Extraction by Modified Longin Method. *Radiocarbon*, 30(2), 171–177. <https://doi.org/10.1017/s0033822200044118>

Brown, W. A., Christofferson, P. V, Massler, M., & Weiss, M. B. (1960). Postnatal tooth development in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 21, 7–34.

Bryant, J. D., Froelich, P. N., Showers, W. J., & Genna, B. J. (1996). Biologic and climatic signals in the oxygen isotopic composition of Eocene-Oligocene equid enamel phosphate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 126(1–2), 75–89. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(96\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(96)00071-5)

Bryant, J. D., Koch, P. L., Froelich, P. N., Showers, W. J., & Genna, B. J. (1996). Oxygen isotope partitioning between phosphate and carbonate in mammalian apatite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(24), 5145–5148. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(96\)00308-0](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(96)00308-0)

Burleigh, R., & Brothwell, D. (1978). Studies on amerindian dogs, 1: Carbon isotopes in relation to maize in the diet of domestic dogs from early Peru and Ecuador. *Journal of Archaeological Science*, 5(4), 355–362. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(78\)90054-7](https://doi.org/10.1016/0305-4403(78)90054-7)

Cantalapiedra-Hijar, G., Ortigues-Marty, I., Sepchat, B., Agabriel, J., Huneau, J. F., & Fouillet, H. (2015). Diet-animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *British Journal of Nutrition*, 113(7), 1158–1169. <https://doi.org/10.1017/S0007114514004449>

Carlson, S. J. (1991). Vertebrate Dental Structures. In J. G. Carter (Ed.), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends* (Vol. 5, pp. 235–260). Springer US.

https://doi.org/10.1007/978-1-4899-5740-5_21

- Chazin, H., Deb, S., Falk, J., & Srinivasan, A. (2019). New Statistical Approaches to Intra-individual Isotopic Analysis and Modelling of Birth Seasonality in Studies of Herd Animals. *Archaeometry*, *61*(2), 478–493. <https://doi.org/10.1111/arcm.12432>
- Cherney, M. D., Fisher, D. C., & Rountrey, A. N. (2017). Tusk pairs in the Ziegler Reservoir mastodon (*Mammut americanum*) assemblage: Implications for site taphonomy and stratigraphy. *Quaternary International*, *443*, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2016.10.041>
- Cheung, C., Fernández-Crespo, T., Mion, L., Di Giusto, M., Goude, G., Macdonald, R. A., Richards, M. P., & Herrscher, E. (2022). Micro-punches versus micro-slices for serial sampling of human dentine: Striking a balance between improved temporal resolution and measuring additional isotope systems. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *36*(21), 1–15. <https://doi.org/10.1002/rcm.9380>
- Chisholm, B. S., Nelson, D. E., Hobson, K. A., Schwarcz, H. P., & Knyf, M. (1983). Carbon isotope measurement techniques for bone collagen: Notes for the archaeologist. *Journal of Archaeological Science*, *10*(4), 355–360. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(83\)90073-0](https://doi.org/10.1016/0305-4403(83)90073-0)
- Chu, N. C., Henderson, G. M., Belshaw, N. S., & Hedges, R. E. M. (2006). Establishing the potential of Ca isotopes as proxy for consumption of dairy products. *Applied Geochemistry*, *21*(10), 1656–1667. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.07.003>
- Cleland, T. P., Sarancha, J. J., & France, C. A. M. (2021). Proteomic profile of bone “collagen” extracted for stable isotopes: Implications for bulk and single amino acid analyses. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *35*(6). <https://doi.org/10.1002/rcm.9025>
- Codron, D., Clauss, M., Codron, J., & Tütken, T. (2018). Within trophic level shifts in collagen–carbonate stable carbon isotope spacing are propagated by diet and digestive physiology in large mammal herbivores. *Ecology and Evolution*, *8*(8), 3983–3995. <https://doi.org/10.1002/ece3.3786>
- Codron, J., Codron, D., Lee-Thorp, J. A., Sponheimer, M., Bond, W. J., de Ruiter, D., & Grant, R. (2005). Taxonomic, anatomical, and spatio-temporal variations in the stable carbon and nitrogen isotopic compositions of plants from an African savanna. *Journal of Archaeological Science*, *32*(12), 1757–1772. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.06.006>
- Collins, M. J., & Galley, P. (1998). Towards an optimal method of archaeological collagen extraction. *Ancient Biomolecules*, *2*(2–3), 209–222.
- Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P., Prigodich, R. V., Wess, T. J., Csapò, J., Millard, A. R., & Turner-Walker, G. (2002). The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, *44*(3), 383–394. <https://doi.org/10.1111/1475-4754.t01-1-00071>
- Conklin-Brittain, N. L., Dierenfeld, E. S., Wrangham, R. W., Norconk, M., & Silver, S. C. (1999). Chemical protein analysis: A comparison of Kjeldahl crude protein and total ninhydrin protein from wild, tropical vegetation. *Journal of Chemical Ecology*, *25*(12), 2601–2622.

<https://doi.org/10.1023/A:1020835120701>

- Cormie, A. ., Schwarcz, H. ., & Gray, J. (1994). Relation between hydrogen isotopic ratios of bone collagen and rain. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(1), 377–391. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(94\)90471-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(94)90471-5)
- Corr, L. T., Sealy, J. C., Horton, M. C., & Evershed, R. P. (2005). A novel marine dietary indicator utilising compound-specific bone collagen amino acid $\delta^{13}\text{C}$ values of ancient humans. *Journal of Archaeological Science*, 32(3), 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2004.10.002>
- Craig, H. (1961). Isotopic Variations in Meteoric Waters. *Science*, 133(3465), 1702–1703. <https://doi.org/10.1126/science.133.3465.1702>
- Curtis, M. J., Beaumont, J., Elamin, F., Wilson, A. S., & Koon, H. E. C. (2022). Method of micro-sampling human dentine collagen for stable isotope analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 36(13). <https://doi.org/10.1002/rcm.9305>
- Czermak, A., Fernández-Crespo, T., Ditchfield, P. W., & Lee-Thorp, J. A. (2020). A guide for an anatomically sensitive dentine microsampling and age-alignment approach for human teeth isotopic sequences. *American Journal of Physical Anthropology*, 173(4), 776–783. <https://doi.org/10.1002/ajpa.24126>
- Czermak, A., Schermelleh, L., & Lee-Thorp, J. (2018). Imaging-assisted time-resolved dentine sampling to track weaning histories. *International Journal of Osteoarchaeology*, 28(5), 535–541. <https://doi.org/10.1002/oa.2697>
- Daniel Bryant, J., Luz, B., & Froelich, P. N. (1994). Oxygen isotopic composition of fossil horse tooth phosphate as a record of continental paleoclimate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 107(3–4), 303–316. [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(94\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0031-0182(94)90102-3)
- Dean, C. (2017). How the microstructure of dentine can contribute to reconstructing developing dentitions and the lives of hominoids and hominins. *Comptes Rendus Palevol*, 16(5–6), 557–571. <https://doi.org/10.1016/j.crpv.2016.10.006>
- Dean, C., Leakey, M. G., Reid, D., Schrenk, F., Schwartz, G. T., Stringer, C., & Walker, A. (2001). Growth processes in teeth distinguish modern humans from *Homo erectus* and earlier hominins. *Nature*, 414(6864), 628–631. <https://doi.org/10.1038/414628a>
- Dean, M. C. (2000). Incremental markings in enamel and dentine: what they can tell us about the way teeth grow. In M. Teaford (Ed.), *Development, Function and Evolution of Teeth* (pp. 119–130). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542626.009>
- Dean, M. C., & Scandrett, A. E. (1995). Rates of dentine mineralization in permanent human teeth. *International Journal of Osteoarchaeology*, 5(4), 349–358. <https://doi.org/10.1002/oa.1390050405>
- Debono Spiteri, C., Gillis, R. E., Roffet-Salque, M., Castells Navarro, L., Guilaine, J., Manen, C., Muntoni, I. M., Saña Seguí, M., Urem-Kotsou, D., Whelton, H. L., Craig, O. E., Vigne, J.-D., & Evershed, R. P. (2016). Regional asynchronicity in dairy production and processing in early farming communities of the northern Mediterranean. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences, 113(48), 13594–13599. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607810113>

- DeNiro, M. J., & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(5), 495–506. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(78\)90199-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(78)90199-0)
- DeNiro, M. J., & Epstein, S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45(3), 341–351. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(81\)90244-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90244-1)
- Deniro, M. J., & Weiner, S. (1988). Organic matter within crystalline aggregates of hydroxyapatite: A new substrate for stable isotopic and possibly other biogeochemical analyses of bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52(10), 2415–2423. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90298-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90298-0)
- Deniz, E., & Payne, S. (1982). Eruption and Wear in the Mandibular Dentition as a Guide to Mandibular Dentition to Ageing Turkish Angora Goats. In B. Wilson, C. Grigson, & S. Payne (Eds.), *Ageing and sexing animal bones from archaeological sites* (pp. 155–206). Archaeopress. <https://doi.org/LK> - <https://worldcat.org/title/605732791>
- Díez-Canseco, C., Aguilera, M., & Tornero, C. (2022). Intra-tooth isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth: A new experimental study with modern sheep specimens. *International Journal of Osteoarchaeology*, 32(5), 962–975. <https://doi.org/10.1002/oa.3138>
- Díez-Canseco, C., & Tornero, C. (2024). New methods for old challenges: A sampling protocol for sequential stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth. *Journal of Archaeological Science*, 162, 105923. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2023.105923>
- Doherty, S. P., Collins, M. J., Harris, A. J. T., Sistiaga, A., Newton, J., & Alexander, M. M. (2022). A modern baseline for the paired isotopic analysis of skin and bone in terrestrial mammals. *Royal Society Open Science*, 9(1). <https://doi.org/10.1098/rsos.211587>
- Drucker, D., Bocherens, H., Pike-Tay, A., & Mariotti, A. (2001). Isotopic tracking of seasonal dietary change in dentine collagen: preliminary data from modern caribou. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science*, 333(5), 303–309. [https://doi.org/10.1016/s1251-8050\(01\)01640-8](https://doi.org/10.1016/s1251-8050(01)01640-8)
- Drucker, D. G., Bocherens, H., & Billiou, D. (2003). Evidence for shifting environmental conditions in Southwestern France from 33 000 to 15 000 years ago derived from carbon-13 and nitrogen-15 natural abundances in collagen of large herbivores. *Earth and Planetary Science Letters*, 216(1–2), 163–173. [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(03\)00514-4](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(03)00514-4)
- Drucker, D. G., Hobson, K. A., Münzel, S. C., & Pike-Tay, A. (2012). Intra-individual variation in stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes in mandibles of modern caribou of Qamanirjuaq (*Rangifer tarandus groenlandicus*) and Banks Island (*Rangifer tarandus pearyi*): Implications for tracing seasonal and temporal c. *International Journal of Osteoarchaeology*, 22(4), 494–504. <https://doi.org/10.1002/oa.1220>
- Eerkens, J. W., Bartelink, E. J., Bartel, J., & Johnson, P. R. (2019). Isotopic Insights into Dietary Life

History, Social Status, and Food Sharing in American Samoa. *American Antiquity*, 84(2), 336–352. <https://doi.org/10.1017/aaq.2018.84>

Eerkens, J. W., Berget, A. G., & Bartelink, E. J. (2011). Estimating weaning and early childhood diet from serial micro-samples of dentin collagen. *Journal of Archaeological Science*, 38(11), 3101–3111. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.07.010>

Eerkens, J. W., de Voogt, A., Dupras, T. L., Francigny, V., & Greenwald, A. M. (2018). Early childhood diets on the Nile: $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in serial samples of permanent first molars in an elite Meroitic population from Sai Island, Sudan. *International Journal of Osteoarchaeology*, 28(5), 552–562. <https://doi.org/10.1002/oa.2679>

EFSA. (2014). Scientific Opinion on the welfare risks related to the farming of sheep for wool, meat and milk production. European Food Safety Authority. *EFSA Journal*, 12(12), 3933.

Engel, M. B., & Hilding, O. H. (1984). Mineralization of developing teeth. *Scanning Electron Microscopy, Pt 4*, 1833–1845.

Epstein, S., Thompson, P., & Yapp, C. J. (1977). Oxygen and Hydrogen Isotopic Ratios in Plant Cellulose. *Science*, 198(4323), 1209–1215. <http://www.jstor.org/stable/1745828>

Esquivelzeta, C., Fina, M., Bach, R., Madruga, C., Caja, G., Casellas, J., & Piedrafita, J. (2011). Morphological analysis and subpopulation characterization of Ripollesa sheep breed. *Animal Genetic Resources/Ressources Génétiques Animales/Recursos Genéticos Animales*, 49, 9–17. <https://doi.org/10.1017/s2078633611000063>

Evans, J. A., Tatham, S., Chenery, S. R., & Chenery, C. A. (2007). Anglo-Saxon animal husbandry techniques revealed through isotope and chemical variations in cattle teeth. *Applied Geochemistry*, 22(9), 1994–2005. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.03.059>

Evershed, R. P., Payne, S., Sherratt, A. G., Copley, M. S., Coolidge, J., Urem-Kotsu, D., Kotsakis, K., Özdoğan, M., Özdoğan, A. E., Nieuwenhuys, O., Akkermans, P. M. M. G., Bailey, D., Andeescu, R. R., Campbell, S., Farid, S., Hodder, I., Yalman, N., Özbaşaran, M., Biçakci, E., ... Burton, M. M. (2008). Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature*, 455(7212), 528–531. <https://doi.org/10.1038/nature07180>

Fagre, T., Tieszen, L. L., & Rodriguez, S. (1991). Variations in stable carbon isotope values of dietary biochemicals: extraction procedures and results. *Proc. SD Acad. Sci*, 70, 83–98.

Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R., & Hubick, K. T. (1989). Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1), 503–537. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002443>

Fernández-Crespo, T., Czermak, A., Lee-Thorp, J. A., & Schulting, R. J. (2018). Infant and childhood diet at the passage tomb of Alto de la Huesera (north-central Iberia) from bone collagen and sequential dentine isotope composition. *International Journal of Osteoarchaeology*, 28(5), 542–551. <https://doi.org/10.1002/oa.2659>

Fernández-Crespo, T., Snoeck, C., Ordoño, J., de Winter, N. J., Czermak, A., Mattielli, N., Lee-Thorp, J. A., & Schulting, R. J. (2020). Multi-isotope evidence for the emergence of cultural

alterity in Late Neolithic Europe. *Science Advances*, 6(4).
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aay2169>

Fisher, D. C. (1987). Mastodont Procurement by Paleoindians of the Great Lakes Region: Hunting or Scavenging? In *The Evolution of Human Hunting* (pp. 309–421). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8833-3_9

Fisher, D. C., & Fox, D. L. (1998). Oxygen isotopes in mammoth teeth: sample design, mineralization patterns, and enamel-dentine comparisons. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 18(3), 41.

Fisher, D. C., Fox, D. L., & Agenbroad, L. D. (2003). Tusk growth rate and season of death of *Mammuthus columbi* from Hot Springs, South Dakota, USA. *Deinsea*, 9, 117–133.

Fogel, M. L., Tuross, N., & Owsley, D. . (1989). Nitrogen isotope tracers of human lactation in modern and archeological populations. In *Annual Report of the Director of the Geophysical Laboratory of the Carnegie Institution* (Vols. 1988–1989).

Fox, D. L., & Fisher, D. C. (2004). Dietary reconstruction of Miocene Gomphotherium (Mammalia, Proboscidea) from the Great Plains region, USA, based on the carbon isotope composition of tusk and molar enamel. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 206(3–4), 311–335. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.01.010>

Fox, D. L., Fisher, D. C., Vartanyan, S., Tikhonov, A. N., Mol, D., & Buigues, B. (2007). Paleoclimatic implications of oxygen isotopic variation in late Pleistocene and Holocene tusks of *Mammuthus primigenius* from northern Eurasia. *Quaternary International*, 169–170, 154–165.
<https://doi.org/10.1016/j.quaint.2006.09.001>

Frank, R. M., & Nalbandian, J. (1989). Development of Dentine and Pulp. In B. K. B. Berkovitz, A. Boyde, R. M. Frank, H. J. Höhling, B. J. Moxham, J. Nalbandian, C. H. Tonge, R. M. Frank, & J. Nalbandian (Eds.), *Teeth* (Issue 1805, pp. 73–171). https://doi.org/10.1007/978-3-642-83496-7_3

Freitas-de-Melo, A., Orihuela, A., Hötzel, M. J., & Ungerfeld, R. (2022). What Do We Know and Need to Know About Weaning in Sheep? An Overview of Weaning Practises, Stress and Welfare. *Frontiers in Animal Science*, 3(February), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fanim.2022.823188>

Frémondeau, D., Cucchi, T., Casabianca, F., Ughetto-Monfrin, J., Horard-Herbin, M.-P., & Balasse, M. (2012). Seasonality of birth and diet of pigs from stable isotope analyses of tooth enamel ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$): a modern reference data set from Corsica, France. *Journal of Archaeological Science*, 39(7), 2023–2035. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.04.004>

Fricke, H. C., Clyde, W. C., & O'Neil, J. R. (1998). Intra-tooth variations in $\delta^{18}\text{O}$ (PO_4) of mammalian tooth enamel as a record of seasonal variations in continental climate variables. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62(11), 1839–1850. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(98\)00114-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(98)00114-8)

Fricke, H. C., & O'Neil, J. R. (1996). Inter- and intra-tooth variation in the oxygen isotope composition of mammalian tooth enamel phosphate: Implications for palaeoclimatological and

palaeobiological research. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 126(1–2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(96\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(96)00072-7)

- Fricke, H. C., & O'Neil, J. R. (1999). The correlation between $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of meteoric water and surface temperature: its use in investigating terrestrial climate change over geologic time. *Earth and Planetary Science Letters*, 170(3), 181–196. [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(99\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(99)00105-3)
- Fricke, H. C., O'Neil, J. R., & Lynnerup, N. (1995). SPECIAL REPORT: Oxygen isotope composition of human tooth enamel from medieval Greenland: Linking climate and society. *Geology*, 23(10), 869. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1995\)023<0869:SROICO>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1995)023<0869:SROICO>2.3.CO;2)
- Froehle, A. W., Kellner, C. M., & Schoeninger, M. J. (2010). FOCUS: Effect of diet and protein source on carbon stable isotope ratios in collagen: Follow up to Warinner and Tuross (2009). *Journal of Archaeological Science*, 37(10), 2662–2670. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.06.003>
- Fuller, B. T., Fuller, J. L., Harris, D. A., & Hedges, R. E. M. (2006). Detection of breastfeeding and weaning in modern human infants with carbon and nitrogen stable isotope ratios. *American Journal of Physical Anthropology*, 129(2), 279–293. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20249>
- Fuller, B. T., Richards, M. P., & Mays, S. A. (2003). Stable carbon and nitrogen isotope variations in tooth dentine serial sections from Wharram Percy. *Journal of Archaeological Science*, 30(12), 1673–1684. [https://doi.org/10.1016/S0305-4403\(03\)00073-6](https://doi.org/10.1016/S0305-4403(03)00073-6)
- Gadbury, C., Todd, L., Jahren, A. H., & Amundson, R. (2000). Spatial and temporal variations in the isotopic composition of bison tooth enamel from the Early Holocene Hudson–Meng Bone Bed, Nebraska. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 157(1–2), 79–93. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(99\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(99)00151-0)
- Gallego-Valle, A., Colominas, L., Burguet-Coca, A., Aguilera, M., Palet, J. M., & Tornero, C. (2020). What is on the menu today? Creating a microwear reference collection through a controlled-food trial to study feeding management systems of ancient agropastoral societies. *Quaternary International*, 557(February), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2020.02.020>
- Geiger, M., Marron, S., West, A. R., & Asher, R. J. (2020). Influences of Domestication and Island Evolution on Dental Growth in Sheep. *Journal of Mammalian Evolution*, 27(2), 273–288. <https://doi.org/10.1007/s10914-018-9452-y>
- Geyh, M. A. (2001). Bomb Radiocarbon Dating of Animal Tissues and Hair. *Radiocarbon*, 43(2B), 723–730. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0033822200041382>
- Gigleux, C., Grimes, V., Tütken, T., Knecht, R., & Britton, K. (2019). Reconstructing caribou seasonal biogeography in Little Ice Age (late Holocene) Western Alaska using intra-tooth strontium and oxygen isotope analysis. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 23, 1043–1054. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.10.043>
- Gillis, R. (2012). *Osteological and isotopic contributions to the study of dairy husbandry during the European Neolithic*. Muséum national d'histoire naturelle.

- Gillis, R., Bréhard, S., Bălăşescu, A., Ughetto-Monfrin, J., Popovici, D., Vigne, J.-D., & Balasse, M. (2013). Sophisticated cattle dairy husbandry at Borduşani-Popină (Romania, fifth millennium BC): the evidence from complementary analysis of mortality profiles and stable isotopes. *World Archaeology*, *45*(3), 447–472. <https://doi.org/10.1080/00438243.2013.820652>
- Gillis, R. E., Bulatović, J., Penezić, K., Spasić, M., Tasić, N. N., & Makarewicz, C. A. (2021). Of herds and societies—Seasonal aspects of Vinča culture herding and land use practices revealed using sequential stable isotope analysis of animal teeth. *PLOS ONE*, *16*(10), e0258230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258230>
- Gillis, R. E., Gaastra, J. S., Linden, M. Vander, & Vigne, J. D. (2022). A Species Specific Investigation Into Sheep and Goat Husbandry During the Early European Neolithic. *Environmental Archaeology*, *27*(1), 8–19. <https://doi.org/10.1080/14614103.2019.1615214>
- Goude, G., Dori, I., Sparacello, V. S., Starnini, E., & Varalli, A. (2020). Multi-proxy stable isotope analyses of dentine microsections reveal diachronic changes in life history adaptations, mobility, and tuberculosis-induced wasting in prehistoric Liguria (Finale Ligure, Italy, northwestern Mediterranean). *International Journal of Paleopathology*, *28*, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2019.12.007>
- Greenfield, H. J. (2010). The secondary products revolution: The past, the present and the future. *World Archaeology*, *42*(1), 29–54. <https://doi.org/10.1080/00438240903429722>
- Greenfield, H. J. (2014). Some reflections on the origins and intensification of dairying in the archaeological record. *Animal Secondary Products*, April 2014, 20–39. <https://doi.org/10.2307/j.ctvh1dr4j.6>
- Griffith, J., & Mulville, J. (2020). A Sequential Multi-Isotopic Analysis of Norse Cattle Teeth. In *The Economy of a Norse Settlement in the Outer Hebrides: Excavations at Mounds 2 and 2A, Bornais, South Uist* (pp. 367–381). Oxbow Books. <http://orca.cf.ac.uk/id/eprint/135418>
- Guiry, E. J., Hepburn, J. C., & Richards, M. P. (2016). High-resolution serial sampling for nitrogen stable isotope analysis of archaeological mammal teeth. *Journal of Archaeological Science*, *69*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2016.03.005>
- Guiry, E. J., Jones, B. M., DeFrance, S., Bruseth, J. E., Durst, J., & Richards, M. P. (2018). Animal Husbandry and Colonial Adaptive Behavior: Isotopic Insights from the La Belle Shipwreck Fauna. *Historical Archaeology*, *52*(4), 684–699. <https://doi.org/10.1007/s41636-018-0142-7>
- Guiry, E. J., & Szpak, P. (2020). Quality control for modern bone collagen stable carbon and nitrogen isotope measurements. *Methods in Ecology and Evolution*, *11*(9), 1049–1060. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13433>
- Hadjikoumis, A. (2017). Age-at-death in traditional Cypriot sheep and goat husbandry: implications for zooarchaeology. In P. ROWLEY-CONWY, D. SERJEANTSON, & P. HALSTEAD (Eds.), *Economic Zooarchaeology: Studies in Hunting, Herding and Early Agriculture (1st ed.)*. Oxbow Books. <https://doi.org/10.2307/j.ctt1s4751q.20>
- Halstead, P. (1998). Mortality models and milking: problems of uniformitarianism, optimality and equifinality reconsidered. *Anthropozoologica*, *27*, 3–20.

- Halstead, P. (2023). Zooarchaeological evidence for livestock management in (earlier) Neolithic Europe: Outstanding questions and some limitations of current approaches. *Quaternary International*, October 2022. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2023.09.013>
- Handley, L. L., Austin, A. T., Robinson, D., Scrimgeour, C. M., Raven, J. A., Heaton, T. H. E., Schmidt, S., & Stewart, G. R. (1999). The $\delta^{15}\text{N}$ natural abundance ($\delta^{15}\text{N}$) of ecosystem samples reflects measures of water availability. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(2), 185–199. <https://doi.org/10.1071/PP98146>
- Handley, L. L., & Scrimgeour, C. M. (1997). Terrestrial Plant Ecology and ^{15}N Natural Abundance: The Present Limits to Interpretation for Uncultivated Systems with Original Data from a Scottish Old Field. In *Plant Physiology* (Vol. 66, Issue 1, pp. 133–212). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60008-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60008-2)
- Hare, P. E., Fogel, M. L., Stafford, T. W., Mitchell, A. D., & Hoering, T. C. (1991). The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. *Journal of Archaeological Science*, 18(3), 277–292. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(91\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0305-4403(91)90066-X)
- Hatté, C., Morvan, J., Noury, C., & Paterne, M. (2001). Is Classical Acid-Alkali-Acid Treatment Responsible for Contamination? An Alternative Proposition. *Radiocarbon*, 43(2A), 177–182. <https://doi.org/10.1017/S003382220003798X>
- Heaton, T. H. E. (1999). Spatial, Species, and Temporal Variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios of C_3 Plants: Implications for Palaeodiet Studies. *Journal of Archaeological Science*, 26(6), 637–649. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0381>
- Heaton, T. H. E., Vogel, J. C., von la Chevallerie, G., & Collett, G. (1986). Climatic influence on the isotopic composition of bone nitrogen. *Nature*, 322(6082), 822–823. <https://doi.org/10.1038/322822a0>
- Hedges, R. E. M., Clement, J. G., Thomas, C. D. L., & O'Connell, T. C. (2007). Collagen turnover in the adult femoral mid-shaft: Modeled from anthropogenic radiocarbon tracer measurements. *American Journal of Physical Anthropology*, 133(2), 808–816. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20598>
- Helmer, D., Gourichon, L., & Vila, E. (2007). The development of the exploitation of products from *Capra* and *Ovis* (meat, milk and fleece) from the PPNB to the Early Bronze in the northern Near East (8700 to 2000 BC cal.). *Anthropozoologica*, 42(2), 41–69.
- Henderson, R. C., Lee-Thorp, J., & Loe, L. (2014). Early life histories of the London poor using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ stable isotope incremental dentine sampling. *American Journal of Physical Anthropology*, 154(4), 585–593. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22554>
- Hendy, J., Colonese, A. C., Franz, I., Fernandes, R., Fischer, R., Orton, D., Lucquin, A., Spindler, L., Anvari, J., Stroud, E., Biehl, P. F., Speller, C., Boivin, N., Mackie, M., Jersie-Christensen, R. R., Olsen, J. V., Collins, M. J., Craig, O. E., & Rosenstock, E. (2018). Ancient proteins from ceramic vessels at Çatalhöyük West reveal the hidden cuisine of early farmers. *Nature Communications*, 9(1), 4064. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06335-6>

- Henton, E. (2012). The combined use of oxygen isotopes and microwear in sheep teeth to elucidate seasonal management of domestic herds: The case study of çatalhöyük, central Anatolia. *Journal of Archaeological Science*, 39(10), 3264–3276. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.05.020>
- Henton, E., Meier-Augenstein, W., & Kemp, H. F. (2010). The use of oxygen isotopes in sheep molars to investigate past herding practices at the neolithic settlement of Çatalhöyük, central Anatolia. *Archaeometry*, 52(3), 429–449. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2009.00492.x>
- Hillson, S. (2005). Teeth, second edition. In *Teeth, Second Edition*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511614477>
- Hobson, K. A., Atwell, L., & Wassenaar, L. I. (1999). Influence of drinking water and diet on the stable-hydrogen isotope ratios of animal tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8003–8006. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8003>
- Hobson, K. A., & Sease, J. L. (1998). Stable isotope analyses of tooth annuli reveal temporal dietary records: An example using steller sea lions. *Marine Mammal Science*, 14(1), 116–129. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1998.tb00694.x>
- Hobson, K. A., Wassenaar, L. I., Mil, B., Lovette, I., Dingle, C., & Smith, T. B. (2003). Stable isotopes as indicators of altitudinal distributions and movements in an Ecuadorean hummingbird community. *Oecologia*, 136(2), 302–308. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1271-y>
- Honch, N. V., McCullagh, J. S. O., & Hedges, R. E. M. (2012). Variation of bone collagen amino acid $\delta^{13}\text{C}$ values in archaeological humans and fauna with different dietary regimes: Developing frameworks of dietary discrimination. *American Journal of Physical Anthropology*, 148(4), 495–511. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22065>
- Hopper, C., Sealy, J. C., & Dewar, G. (2018). Little Ice Age drought event reconstructed from isotopic analysis of archaeological springbok (*Antidorcas marsupialis*) teeth. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 495(April), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.09.019>
- Hummel, J., Findeisen, E., Südekum, K.-H., Ruf, I., Kaiser, T. M., Bucher, M., Clauss, M., & Codron, D. (2011). Another one bites the dust: faecal silica levels in large herbivores correlate with high-crowned teeth. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1712), 1742–1747. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1939>
- Humphrey, L. T. (2016). Chemical and isotopic analyses of dental tissues. In J. Irish & G. R. Scott (Eds.), *A companion to dental anthropology* (pp. 499–513). Wiley-Blackwell.
- Janis, C. M. (1988). An estimation of tooth volume and hypsodonty indices in ungulate mammals, and the correlation of these factors with dietary preferences. In *Teeth revisited: Proceedings of the VIIIth International Symposium on Dental Morphology* (pp. 367–387).
- Janis, C. M., & Fortelius, M. . (1988). On the means whereby mammals achieve increased functional durability of their dentitions, with special reference to limiting factors. *Biological Reviews*, 63(2), 197–230. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1988.tb00630.x>

- Jaouen, K., Beasley, M., Schoeninger, M., Hublin, J. J., & Richards, M. P. (2016). Zinc isotope ratios of bones and teeth as new dietary indicators: Results from a modern food web (Koobi Fora, Kenya). *Scientific Reports*, 6(April), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep26281>
- Jenkins, S. G., Partridge, S. T., Stephenson, T. R., Farley, S. D., & Robbins, C. T. (2001). Nitrogen and carbon isotope fractionation between mothers, neonates, and nursing offspring. *Oecologia*, 129(3), 336–341. <https://doi.org/10.1007/s004420100755>
- Jim, S., Ambrose, S. H., & Evershed, R. P. (2004). Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: Implications for their use in palaeodietary reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(1), 61–72. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(03\)00216-3](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(03)00216-3)
- Jones, J. R., Marín-Arroyo, A. B., Corchón Rodríguez, M. S., & Richards, M. P. (2021). After the Last Glacial Maximum in the refugium of northern Iberia: Environmental shifts, demographic pressure and changing economic strategies at Las Caldas Cave (Asturias, Spain). *Quaternary Science Reviews*, 262, 106931. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2021.106931>
- Jones, J. R., Marín-Arroyo, A. B., Straus, L. G., & Richards, M. P. (2020). Adaptability, resilience and environmental buffering in European Refugia during the Late Pleistocene: Insights from La Riera Cave (Asturias, Cantabria, Spain). *Scientific Reports*, 10(1), 1217. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57715-2>
- Jones, J. R., Richards, M. P., Reade, H., Bernaldo de Quirós, F., & Marín-Arroyo, A. B. (2019). Multi-Isotope investigations of ungulate bones and teeth from El Castillo and Covalejos caves (Cantabria, Spain): Implications for paleoenvironment reconstructions across the Middle-Upper Palaeolithic transition. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 23, 1029–1042. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2018.04.014>
- Jones, R. J., Ludlow, M. M., Troughton, J. H., & Blunt, C. G. (1981). Changes in natural carbon isotope ratio of the hair from steers fed diets of C₄, C₃ and C₄ species in sequence. *Search*, 12, 85–87.
- Jordana, X., & Köhler, M. (2011). Enamel microstructure in the fossil bovid *Myotragus balearicus* (Majorca, Spain): Implications for life-history evolution of dwarf mammals in insular ecosystems. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 300(1–4), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.12.008>
- Jordana, X., Marín-Moratalla, N., Moncunill-Solé, B., & Köhler, M. (2014). Ecological and life-history correlates of enamel growth in ruminants (Artiodactyla). *Biological Journal of the Linnean Society*, 112(4), 657–667. <https://doi.org/10.1111/bij.12264>
- Jørkov, M. L. S., Heinemeier, J., & Lynnerup, N. (2007). Evaluating bone collagen extraction methods for stable isotope analysis in dietary studies. *Journal of Archaeological Science*, 34(11), 1824–1829. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.12.020>
- Julien, M.-A., Rivals, F., Serangeli, J., Bocherens, H., & Conard, N. J. (2015). A new approach for deciphering between single and multiple accumulation events using intra-tooth isotopic variations: Application to the Middle Pleistocene bone bed of Schöningen 13 II-4. *Journal of*

Human Evolution, 89, 114–128. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2015.02.012>

- Kahle, P., Witzel, C., Kierdorf, U., Frölich, K., & Kierdorf, H. (2018). Mineral Apposition Rates in Coronal Dentine of Mandibular First Molars in Soay Sheep: Results of a Fluorochrome Labeling Study. *Anatomical Record*, 301(5), 902–912. <https://doi.org/10.1002/ar.23753>
- Katzenberg, M. A. (2008). Stable Isotope Analysis: A Tool for Studying Past Diet, Demography, and Life History. In *Biological Anthropology of the Human Skeleton* (pp. 411–441). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470245842.ch13>
- Katzenberg, M. A., & Pfeiffer, S. (1995). Nitrogen isotope evidence for weaning age in a nineteenth century Canadian skeletal sample. In A. L. Grauer (Ed.), *Bodies of evidence: reconstructing history through skeletal analysis*. (pp. 221–235). Wiley-Liss.
- Kendall, C., Eriksen, A. M. H., Kontopoulos, I., Collins, M. J., & Turner-Walker, G. (2018). Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 491, 21–37. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.11.041>
- Kierdorf, H., Kierdorf, U., Frölich, K., & Witzel, C. (2013). Lines of Evidence-Incremental Markings in Molar Enamel of Soay Sheep as Revealed by a Fluorochrome Labeling and Backscattered Electron Imaging Study. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074597>
- Kinaston, R. L. (2023). Isotopes, Domestication, and Past Animal Husbandry Practices: A Review of the Formative Studies. In M. M. Beasley & A. D. Somerville (Eds.), *Exploring Human Behavior Through Isotope Analysis: Applications in Archaeological Research* (pp. 155–180). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-32268-6_7
- Kirsanow, K., Makarewicz, C., & Tuross, N. (2008). Stable oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) and hydrogen (δD) isotopes in ovicaprid dentinal collagen record seasonal variation. *Journal of Archaeological Science*, 35(12), 3159–3167. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.06.025>
- Kirsanow, K., & Tuross, N. (2011). Oxygen and hydrogen isotopes in rodent tissues: Impact of diet, water and ontogeny. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 310(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2011.03.022>
- Knockaert, J., Balasse, M., Rendu, C., Burens, A., Campmajo, P., Carozza, L., Bousquet, D., Fiorillo, D., & Vigne, J. D. (2018). Mountain adaptation of caprine herding in the eastern Pyrenees during the Bronze Age: A stable oxygen and carbon isotope analysis of teeth. *Quaternary International*, 484, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2017.05.029>
- Knox, T. C., Stuart-Williams, H., Warneke, R. M., Hoskins, A. J., & Arnould, J. P. Y. (2014). Analysis of growth and stable isotopes in teeth of male Australian fur seals reveals interannual variability in prey resources. *Marine Mammal Science*, 30(2), 763–781. <https://doi.org/10.1111/mms.12078>
- Koch, P. L., Fisher, D. C., & Dettman, D. (1989). Oxygen isotope variation in the tusks of extinct proboscideans: a measure of season of death and seasonality. *Geology*, 17(6), 515–519. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1989\)017<0515:OIVITT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1989)017<0515:OIVITT>2.3.CO;2)
- Koch, P. L., Heisinger, J., Moss, C., Carlson, R. W., Fogel, M. L., & Behrensmeyer, A. K. (1995).

- Isotopic tracking of change in diet and habitat use in African elephants. *Science*, 267(5202), 1340–1343. <https://doi.org/10.1126/science.267.5202.1340>
- Kohl, D. H., & Shearer, G. (1980). Isotopic Fractionation Associated With Symbiotic N₂ Fixation and Uptake of NO₃⁻ by Plants. *Plant Physiology*, 66(1), 51–56. <https://doi.org/10.1104/pp.66.1.51>
- Kohn, M. J. (2010). Carbon isotope compositions of terrestrial C₃ plants as indicators of (paleo)ecology and (paleo)climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46), 19691–19695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004933107>
- Kohn, M. J., Morris, J., & Olin, P. (2013). Trace element concentrations in teeth – a modern Idaho baseline with implications for archeometry, forensics, and palaeontology. *Journal of Archaeological Science*, 40(4), 1689–1699. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.11.012>
- Kohn, M. J., Schoeninger, M. J., & Valley, J. W. (1998). Variability in oxygen isotope compositions of herbivore teeth: reflections of seasonality or developmental physiology? *Chemical Geology*, 152(1–2), 97–112. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(98\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(98)00099-0)
- Lazzerini, N., Coulon, A., Simon, L., Marchina, C., Fiorillo, D., Turbat, T., Bayarkhuu, N., Noûs, C., Lepetz, S., & Zazzo, A. (2021). The isotope record ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) of vertical mobility in incremental tissues (tooth enamel, hair) of modern livestock: A reference set from the Mongolian Altai. *Quaternary International*, 595(April), 128–144. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2021.04.008>
- Lee-Thorp, J. A., Sealy, J. C., & van der Merwe, N. J. (1989). Stable carbon isotope ratio differences between bone collagen and bone apatite, and their relationship to diet. *Journal of Archaeological Science*, 16(6), 585–599. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(89\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0305-4403(89)90024-1)
- Lee-Thorp, J. A., & van der Merwe, N. J. (1991). Aspects of the chemistry of modern and fossil biological apatites. *Journal of Archaeological Science*, 18(3), 343–354. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(91\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0305-4403(91)90070-6)
- Lee-Thorp, J. A. (2008). On Isotopes And Old Bones. *Archaeometry*, 50(6), 925–950. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2008.00441.x>
- LeGeros, R. Z. (1981). Apatites in Biological Systems. *Progress in Crystal Growth and Characterization*, 4(1–2), 1–45.
- Lehn, C., Rossmann, A., & Mayr, C. (2020). Stable isotope relationships between apatite phosphate ($\delta^{18}\text{O}$), structural carbonate ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$), and collagen ($\delta^2\text{H}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$) in modern human dentine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34(8), 1–14. <https://doi.org/10.1002/rcm.8674>
- Leyden, J. J., Wassenaar, L. I., Hobson, K. A., & Walker, E. G. (2006). Stable hydrogen isotopes of bison bone collagen as a proxy for Holocene climate on the Northern Great Plains. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 239(1–2), 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2006.01.009>
- Liden, K., Takahashi, C., & Nelson, D. E. (1995). The Effects of Lipids in Stable Carbon Isotope

Analysis and the Effects of NaOH Treatment on the Composition of Extracted Bone Collagen. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 321–326. <https://doi.org/10.1006/jasc.1995.0034>

Lightfoot, E., Przelomska, N., Craven, M., O Connell, T. C., He, L., Hunt, H. V., & Jones, M. K. (2016). Intraspecific carbon and nitrogen isotopic variability in foxtail millet (*Setaria italica*). *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 30(13), 1475–1487. <https://doi.org/10.1002/rcm.7583>

Longin, R. (1971). New Method of Collagen Extraction for Radiocarbon Dating. *Nature*, 230(5291), 241–242. <https://doi.org/10.1038/230241a0>

Losey, R. J., Guiry, E., Nomokonova, T., Gusev, A. V., & Szpak, P. (2020). Storing fish?: a dog's isotopic biography provides insight into Iron Age food preservation strategies in the Russian Arctic. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 12(8). <https://doi.org/10.1007/s12520-020-01166-3>

Lyford, S. J. (1988). Growth and development of the ruminant digestive system. *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 44–63.

Lynch, J. J., Hinch, G. N., Adams, D. B., International, C. A. B., & (Australia), C. (1992). The behaviour of sheep : biological principles and implications for production. In *TA - TT -*. C.A.B. International; CSIRO Australia Wallingford, UK, East Melbourne, Vic. <https://doi.org/LK> - <https://worldcat.org/title/26278307>

Macko, S. A., Fogel, M. L., Hare, P. E., & Hoering, T. C. (1987). Isotopic fractionation of nitrogen and carbon in the synthesis of amino acids by microorganisms. *Chemical Geology: Isotope Geoscience Section*, 65(1), 79–92. [https://doi.org/10.1016/0168-9622\(87\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0168-9622(87)90064-9)

Makarewicz, C. A. (2011). Xiongnu pastoral systems: Integrating economies of subsistence and scale. In U. Brosseder & B. Miller (Eds.), *XIONGNU ARCHAEOLOGY: Multidisciplinary Perspectives of the First Steppe Empire in Inner Asia* (pp. 27–38). Vor- und Frühgeschichtliche Archäologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Makarewicz, C. A. (2014). Winter pasturing practices and variable fodder provisioning detected in nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) isotopes in sheep dentinal collagen. *Journal of Archaeological Science*, 41, 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.09.016>

Makarewicz, C. A. (2017). Winter is coming: seasonality of ancient pastoral nomadic practices revealed in the carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopic record of Xiongnu caprines. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 9(3), 405–418. <https://doi.org/10.1007/s12520-015-0289-5>

Makarewicz, C. A., Arbuckle, B. S., & Öztan, A. (2017a). Carbon and nitrogen isotopic evidence for sheep and goat pastoral management practices at Chalcolithic Köşk Höyük, Central Turkey. In A. Ventresca Miller & C. Makarewicz (Eds.), *Isotopic investigations of pastoralism in prehistory* (pp. 113–122). Routledge.

Makarewicz, C. A., Arbuckle, B. S., & Öztan, A. (2017b). Vertical transhumance of sheep and goats identified by intra-tooth sequential carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) isotopic analyses: Evidence from Chalcolithic Köşk Höyük, central Turkey. *Journal of Archaeological Science*, 86,

68–80. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2017.01.003>

- Makarewicz, C. A., & Sealy, J. (2015). Dietary reconstruction, mobility, and the analysis of ancient skeletal tissues: Expanding the prospects of stable isotope research in archaeology. *Journal of Archaeological Science*, *56*, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2015.02.035>
- Makarewicz, C., & Tuross, N. (2006). Foddering by Mongolian pastoralists is recorded in the stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes of caprine dentinal collagen. *Journal of Archaeological Science*, *33*(6), 862–870. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.10.016>
- Makarewicz, C., & Tuross, N. (2012). Finding fodder and tracking transhumance: Isotopic detection of goat domestication processes in the near east. *Current Anthropology*, *53*(4), 495–505. <https://doi.org/10.1086/665829>
- Mariotti, A., Pierre, D., Vedy, J. C., Bruckert, S., & Guillemot, J. (1980). The abundance of natural nitrogen 15 in the organic matter of soils along an altitudinal gradient (chablais, haute savoie, France). *CATENA*, *7*(4), 293–300. [https://doi.org/10.1016/0341-8162\(80\)90014-4](https://doi.org/10.1016/0341-8162(80)90014-4)
- Martín, P., Tornero, C., García, D. C. S., & Vergès, J. M. (2021). Early sheep herd management in the inland of the Iberian Peninsula: results of the incremental isotopic analyses of dental remains from El Mirador cave (Sierra de Atapuerca, Spain). *Archaeological and Anthropological Sciences*, *13*(6), 99. <https://doi.org/10.1007/s12520-021-01355-8>
- Masters, P. M. (1987). Preferential preservation of noncollagenous protein during bone diagenesis: Implications for chronometric and stable isotopic measurements. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *51*(12), 3209–3214. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(87\)90129-3](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90129-3)
- Matsubayashi, J., & Tayasu, I. (2019). Collagen turnover and isotopic records in cortical bone. *Journal of Archaeological Science*, *106*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2019.03.010>
- Mendes, S., Newton, J., Reid, R. J., Frantzis, A., & Pierce, G. J. (2007). Stable isotope profiles in sperm whale teeth: Variations between areas and sexes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *87*(2), 621–627. <https://doi.org/10.1017/S0025315407056019>
- Messana, C., Tornero, C., Madgwick, R., Lamb, A. L., Evans, J., & Colominas, L. (2023). Between valleys, plateaus, and mountains: unveiling livestock altitudinal mobility in the Iron Age Iberian Peninsula (3rd c. BC) through a multi-isotope approach. *Frontiers in Environmental Archaeology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fearc.2023.1245725>
- Metcalf, J. Z., Longstaffe, F. J., & Zazula, G. D. (2010). Nursing, weaning, and tooth development in woolly mammoths from Old Crow, Yukon, Canada: Implications for Pleistocene extinctions. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *298*(3–4), 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.09.032>
- Milán, M. J., Arnalte, E., & Caja, G. (2003). Economic profitability and typology of Ripollesa breed sheep farms in Spain. *Small Ruminant Research*, *49*(1), 97–105. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00058-0)
- Milhaud, G., & Nezeit, J. (1991). Molar development in sheep: morphology, radiography,

microhardness. *Recueil de Medecine Veterinaire*, 167(2), 121–127.
http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:45092771

- Minagawa, M., & Wada, E. (1984). Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(5), 1135–1140. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90204-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90204-7)
- Molnar, S., Przybeck, T. R., Gantt, D. G., Elizondo, R. S., & Wilkerson, J. E. (1981). Dentin apposition rates as markers of primate growth. *American Journal of Physical Anthropology*, 55(4), 443–453. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330550405>
- Morandi, L. F., Frémondeau, D., Müldner, G., & Maggi, R. (2021). Sequential analyses of bovid tooth enamel and dentine collagen ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$): new insights into animal husbandry between the Late Neolithic and the Early Bronze Age at Tana del Barletta (Ligurian Prealps). *Archaeological and Anthropological Sciences*, 13(9), 147. <https://doi.org/10.1007/s12520-021-01418-w>
- Nanci, A. (2013). Dentin-Pulp Complex. In A. B. T.-T. C. O. H. (Eighth E. Nanci (Ed.), *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function* (8th ed., pp. 165–204). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07846-7.00008-2>
- National Research Council. (1985). Nutrient Requirements of Sheep. In *Nutrient Requirements of Sheep, Sixth Revised Edition*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/20671>
- Navarrete, V., Colonese, A. C., Tornero, C., Antolín, F., Von Tersch, M., Eulàlia Subirà, M., Comes, P., Rosell-Melé, A., & Saña, M. (2017). Feeding Management Strategies among the Early Neolithic Pigs in the NE of the Iberian Peninsula. *International Journal of Osteoarchaeology*, 27(5), 839–852. <https://doi.org/10.1002/oa.2598>
- Navarrete, V., Tornero, C., Balasse, M., & Saña, M. (2019). Food management of early introduced caprine and bovine herds in the early Neolithic site of La Draga (Banyoles): An isotopic approach. *International Journal of Osteoarchaeology*, 29(6), 986–998. <https://doi.org/10.1002/oa.2812>
- Nitsch, E. K., Humphrey, L. T., & Hedges, R. E. M. (2011). Using stable isotope analysis to examine the effect of economic change on breastfeeding practices in Spitalfields, London, UK. *American Journal of Physical Anthropology*, 146(4), 619–628. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21623>
- O'Leary, M. H. (1981). Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 20(4), 553–567. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85134-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85134-5)
- Passey, B. H., & Cerling, T. E. (2002). Tooth enamel mineralization in ungulates: Implications for recovering a primary isotopic time-series. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(18), 3225–3234.
- Passey, B. H., Cerling, T. E., Schuster, G. T., Robinson, T. F., Roeder, B. L., & Krueger, S. K. (2005). Inverse methods for estimating primary input signals from time-averaged isotope profiles. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(16), 4101–4116.

<https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.12.002>

- Payne, S. (1973). Kill-off Patterns in Sheep and Goats: the Mandibles from Aşvan Kale. *Anatolian Studies*, 23, 281–303. <https://doi.org/10.2307/3642547>
- Pearson, J. A., Buitenhuis, H., Hedges, R. E. M., Martin, L., Russell, N., & Twiss, K. C. (2007). New light on early caprine herding strategies from isotope analysis: a case study from Neolithic Anatolia. *Journal of Archaeological Science*, 34(12), 2170–2179. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2007.09.001>
- Pederzani, S., Aldeias, V., Dibble, H. L., Goldberg, P., Hublin, J. J., Madelaine, S., McPherron, S. P., Sandgathe, D., Steele, T. E., Turq, A., & Britton, K. (2021). Reconstructing Late Pleistocene paleoclimate at the scale of human behavior: an example from the Neandertal occupation of La Ferrassie (France). *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80777-1>
- Peske, L. (1994). Contribution to the beginning of milking in Prehistory. *Archeologické Rozhledy*, 46, 97–104.
- Peters, J., von den Driesch, A., & Helmer, D. (2005). The Upper Euphrates-Tigris Basin: cradle of agro-pastoralism? In J.-D. Vigne, J. Peters, & D. Helmer (Eds.), *The First Steps of Animal Domestication. New Archaeological Approaches* (pp. 96–124). Oxbow Books.
- Popkin, P. R. W., Baker, P., Worley, F., Payne, S., & Hammon, A. (2012). The Sheep Project (1): determining skeletal growth, timing of epiphyseal fusion and morphometric variation in unimproved Shetland sheep of known age, sex, castration status and nutrition. *Journal of Archaeological Science*, 39(6), 1775–1792. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.01.018>
- Price, T. D., Meiggs, D., Weber, M.-J., & Pike-Tay, A. (2017). The migration of Late Pleistocene reindeer: isotopic evidence from northern Europe. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 9(3), 371–394. <https://doi.org/10.1007/s12520-015-0290-z>
- Privat, K. L., O'Connell, T. C., & Hedges, R. E. M. (2007). The distinction between freshwater- and terrestrial-based diets: methodological concerns and archaeological applications of sulphur stable isotope analysis. *Journal of Archaeological Science*, 34(8), 1197–1204. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.10.008>
- Reynard, L. M., & Hedges, R. E. M. (2008). Stable hydrogen isotopes of bone collagen in palaeodietary and palaeoenvironmental reconstruction. *Journal of Archaeological Science*, 35(7), 1934–1942. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2007.12.004>
- Reynard, L. M., Henderson, G. M., & Hedges, R. E. M. (2011). Calcium isotopes in archaeological bones and their relationship to dairy consumption. *Journal of Archaeological Science*, 38(3), 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.10.017>
- Reynard, L. M., Ryan, S. E., Guirguis, M., Contreras-Martínez, M., Pompianu, E., Ramis, D., van Dommelen, P., & Tuross, N. (2020). Mediterranean precipitation isoscape preserved in bone collagen $\delta^2\text{H}$. *Scientific Reports*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65407-0>
- Reynard, L. M., & Tuross, N. (2015). The known, the unknown and the unknowable: Weaning times

from archaeological bones using nitrogen isotope ratios. *Journal of Archaeological Science*, 53, 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.11.018>

Richards, M. P. (2019). Isotope Analysis for Diet Studies. In *Archaeological Science* (pp. 125–144). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781139013826.006>

Richards, M. P., Fuller, B. T., & Hedges, R. E. M. (2001). Sulphur isotopic variation in ancient bone collagen from Europe: Implications for human palaeodiet, residence mobility, and modern pollutant studies. *Earth and Planetary Science Letters*, 191(3–4), 185–190. [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(01\)00427-7](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(01)00427-7)

Richards, M. P., Mays, S., & Fuller, B. T. (2002). Stable carbon and nitrogen isotope values of bone and teeth reflect weaning age at the Medieval Wharram Percy site, Yorkshire, UK. *American Journal of Physical Anthropology*, 119(3), 205–210. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10124>

Roffet-Salque, M., Gillis, R., Evershed, R., & Vigne, J.-D. (2018). Milk as a pivotal medium in the domestication of cattle, sheep and goats. In C. Stepanoff & J.-D. Vigne (Eds.), *Hybrid Communities: Biosocial Approaches to Domestication and Other Trans-species Relationships* (pp. 127–143). Routledge Studies in Anthropology. CRC Press.

Rogers, B., Gron, K. J., Montgomery, J., Rowley-Conwy, P., Nowell, G., Peterkin, J., & Jacques, D. (2019). Isotopic analysis of the Blick Mead dog: A proxy for the dietary reconstruction and mobility of Mesolithic British hunter-gatherers. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 24(March 2018), 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2019.02.022>

Rountrey, A. N., Fisher, D. C., Vartanyan, S., & Fox, D. L. (2007). Carbon and nitrogen isotope analyses of a juvenile woolly mammoth tusk: Evidence of weaning. *Quaternary International*, 169–170, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2006.08.002>

Saña, M., Antolín, F., Alcántara, R., Sierra, A., & Tornero, C. (2020). Integrating domesticates: earliest farming experiences in the Iberian Peninsula. In K. J. Gron, L. Sørensen, & P. Rowley-Conwy (Eds.), *Farmers at the Frontier: A Pan-European Perspective on Neolithisation* (pp. 161–176). Oxbow Books. <https://doi.org/10.2307/j.ctv13gvh1g.11>

Saña, M., & Tornero, C. (2008). Consumption of animal resources at the sites of Akarçay Tepe and Tell Halula (Middle Euphrates Valley, 8th–6th Millenia cal. BC). In E. Vila, L. Gourichon, H. Buitenhuis, & A. Choyke (Eds.), *Archaeozoology of Southwest Asia and Adjacent Areas VIII* (Travaux de, pp. 153–167).

Saña, M., & Tornero, C. (2012). Use of Animal Fibres during the Neolithisation in the Middle Euphrates Valley: An Archaeozoological Approach. *Paléorient*, 38(1/2), 79–91. <http://www.jstor.org/stable/43264564>

Sanson, G. D. (2023). Reassessing assumptions about the evolution of herbivore teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.2219060120>

Scharlotta, I., Goude, G., Herrscher, E., Bazaliiskii, V. I., & Weber, A. W. (2018). Shifting weaning practices in Early Neolithic Cis-Baikal, Siberia: New insights from stable isotope analysis of molar micro-samples. *International Journal of Osteoarchaeology*, 28(5), 579–598.

<https://doi.org/10.1002/oa.2708>

- Schoeninger, M. J., & DeNiro, M. J. (1984). Nitrogen and carbon isotopic composition of bone collagen from marine and terrestrial animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(4), 625–639. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90091-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90091-7)
- Schulting, R. J., Vaiglova, P., Crozier, R., & Reimer, P. J. (2017). Further isotopic evidence for seaweed-eating sheep from Neolithic Orkney. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 11, 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.12.017>
- Schulze, E.-D., Williams, R. J., Farquhar, G. D., Schulze, W., Langridge, J., Miller, J. M., & Walker, B. H. (1998). Carbon and nitrogen isotope discrimination and nitrogen nutrition of trees along a rainfall gradient in northern Australia. *Functional Plant Biology*, 25(4), 413. <https://doi.org/10.1071/PP97113>
- Schurr, M. R. (1997). Stable Nitrogen Isotopes as Evidence for the Age of Weaning at the Angel Site: A Comparison of Isotopic and Demographic Measures of Weaning Age. *Journal of Archaeological Science*, 24(10), 919–927. <https://doi.org/10.1006/jasc.1996.0171>
- Schwertl, M., Auerswald, K., Schäufele, R., & Schnyder, H. (2005). Carbon and nitrogen stable isotope composition of cattle hair: ecological fingerprints of production systems? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 109(1–2), 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.01.015>
- Sealy, J. C., van der Merwe, N. J., Thorp, J. A. L., & Lanham, J. L. (1987). Nitrogen isotopic ecology in southern Africa: Implications for environmental and dietary tracing. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51(10), 2707–2717. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(87\)90151-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90151-7)
- Semal, P., & Orban, R. (1995). Collagen Extraction from Recent and Fossil Bones: Quantitative and Qualitative Aspects. *Journal of Archaeological Science*, 22(4), 463–467. <https://doi.org/10.1006/jasc.1995.0045>
- Sharp, Z. D., & Cerling, T. E. (1998). Fossil isotope records of seasonal climate and ecology: Straight from the horse's mouth. *Geology*, 26(3), 219. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1998\)026<0219:FIROSC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1998)026<0219:FIROSC>2.3.CO;2)
- Sherrat, A. (1981). Plough and Pastoralism: Aspects of the Secondary Products Revolution. In I. Hodder, G. Isaac, & N. Hammond (Eds.), *Pattern of the Past: Studies in the Honour of David Clarke* (pp. 261–306). Cambridge Unive.
- Sierra, A., Balasse, M., Rivals, F., Fiorillo, D., Utrilla, P., & Saña, M. (2021). Sheep husbandry in the early Neolithic of the Pyrenees: New data on feeding and reproduction in the cave of Chaves. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 37, 102935. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2021.102935>
- Sierra, A., Bréhard, S., Montes, L., Utrilla, P., & Saña, M. (2019). Sheep exploitation and husbandry in first farming societies: from production to consumption in Central Pyrenees in the Early Neolithic. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 11(10), 5813–5829. <https://doi.org/10.1007/s12520-019-00907-3>
- Silver, I. A. (1969). The ageing of domestic animals. In D. R. Brothwell & E. S. Higgs (Eds.), *Science*

in archaeology: a survey of progress and research (pp. 284–302). Thames. <https://doi.org/LK>
- <https://worldcat.org/title/893941410>

- Skinner, H. C. W. (2005). Biominerals. *Mineralogical Magazine*, 69(5), 621–641. <https://doi.org/10.1180/0026461056950275>
- Soana, S., Bertoni, G., Gnudi, G., & Botti, P. (1997). Anatomico-Radiographic Study of Prenatal Development of Bovine Fetal Teeth. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 26(2), 107–113. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1997.tb00108.x>
- Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Passey, B., Roeder, B., Shipley, L., Lopez, E., Cerling, T., Dearing, D., & Ehleringer, J. (2003a). An experimental study of carbon-isotope fractionation between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. *Canadian Journal of Zoology*, 81(5), 871–876. <https://doi.org/10.1139/z03-066>
- Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Roeder, B., Hammer, J., Passey, B., West, A., Cerling, T., Dearing, D., & Ehleringer, J. (2003b). Nitrogen isotopes in mammalian herbivores: Hair $\delta^{15}\text{N}$ values from a controlled feeding study. *International Journal of Osteoarchaeology*, 13(1–2), 80–87. <https://doi.org/10.1002/oa.655>
- Stantis, C., Buckley, H. R., Commendador, A., & Dudgeon, J. V. (2021). Expanding on incremental dentin methodology to investigate childhood and infant feeding practices on Taumako (southeast Solomon Islands). *Journal of Archaeological Science*, 126, 105294. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2020.105294>
- Stevens, R. E., Balasse, M., & O'Connell, T. C. (2011). Intra-tooth oxygen isotope variation in a known population of red deer: Implications for past climate and seasonality reconstructions. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 301(1–4), 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.12.021>
- Stevens, R. E., & Hedges, R. E. (2004). Carbon and nitrogen stable isotope analysis of northwest European horse bone and tooth collagen, 40,000BP–present: Palaeoclimatic interpretations. *Quaternary Science Reviews*, 23(7–8), 977–991. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2003.06.024>
- Stevens, R. E., Lister, A. M., & Hedges, R. E. M. (2006). Predicting diet, trophic level and palaeoecology from bone stable isotope analysis: a comparative study of five red deer populations. *Oecologia*, 149(1), 12–21. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0416-1>
- Stojanovski, D., Živaljević, I., Dimitrijević, V., Dunne, J., Evershed, R. P., Balasse, M., Dowle, A., Hendy, J., McGrath, K., Fischer, R., Speller, C., Jovanović, J., Casanova, E., Knowles, T., Balj, L., Naumov, G., Putica, A., Starović, A., & Stefanović, S. (2020). Living off the land: Terrestrial-based diet and dairying in the farming communities of the Neolithic Balkans. *PLoS ONE*, 15(8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237608>
- Szpak, P., Krippner, K., & Richards, M. P. (2017). Effects of Sodium Hydroxide Treatment and Ultrafiltration on the Removal of Humic Contaminants from Archaeological Bone. *International Journal of Osteoarchaeology*, 27(6), 1070–1077. <https://doi.org/10.1002/oa.2630>
- Tejedor-Rodríguez, C., Moreno-García, M., Tornero, C., Hoffmann, A., de Lagrán, Í. G. M., Arcusa-

- Magallón, H., Garrido-Pena, R., Royo-Guillén, J. I., Díaz-Navarro, S., Peña-Chocarro, L., Alt, K. W., & Rojo-Guerra, M. (2021). Investigating Neolithic caprine husbandry in the Central Pyrenees: Insights from a multi-proxy study at Els Trocs cave (Bisaurri, Spain). In *PLoS ONE* (Vol. 16, Issue 1 January). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244139>
- Terra, J. A., Scaglia, G., & García Préchac, F. (2000). *MOHA: Características del Cultivo y Comportamiento en Rotaciones Forrajeras con Siembra Directa* (Issue 111). Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA.
- Tieszen, L. L. (1991). Natural variations in the carbon isotope values of plants: Implications for archaeology, ecology, and paleoecology. *Journal of Archaeological Science*, *18*(3), 227–248. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(91\)90063-U](https://doi.org/10.1016/0305-4403(91)90063-U)
- Tieszen, L. L., & Fagre, T. (1993). Effect of Diet Quality and Composition on the Isotopic Composition of Respiratory CO₂, Bone Collagen, Bioapatite, and Soft Tissues. In *Prehistoric Human Bone* (pp. 121–155). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02894-0_5
- Tornero, C. (2011). *Estrategias de explotación, gestión y apropiación del ganado en las primeras sociedades campesinas del valle medio del Eufrates (República Árabe de Siria). Integración de los análisis biogeoquímicos al estudio arqueofaunístico de tell Halula (Valle Medio d. Autonomous University of Barcelona.*
- Tornero, C., Aguilera, M., Ferrio, J. P., Arcusa, H., Moreno-García, M., Garcia-Reig, S., & Rojo-Guerra, M. (2018). Vertical sheep mobility along the altitudinal gradient through stable isotope analyses in tooth molar bioapatite, meteoric water and pastures: A reference from the Ebro valley to the Central Pyrenees. *Quaternary International*, *484*, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2016.11.042>
- Tornero, C., Bălăşescu, A., Ughetto-Monfrin, J., Voinea, V., & Balasse, M. (2013). Seasonality and season of birth in early Eneolithic sheep from Cheia (Romania): Methodological advances and implications for animal economy. *Journal of Archaeological Science*, *40*(11), 4039–4055. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.05.013>
- Tornero, C., Balasse, M., Bălăşescu, A., Chataigner, C., Gasparyan, B., & Montoya, C. (2016a). The altitudinal mobility of wild sheep at the Epigravettian site of Kalavan 1 (Lesser Caucasus, Armenia): Evidence from a sequential isotopic analysis in tooth enamel. *Journal of Human Evolution*, *97*, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2016.05.001>
- Tornero, C., Balasse, M., Bréhard, S., Carrère, I., Fiorillo, D., Guilaine, J., Vigne, J. D., & Manen, C. (2020). Early evidence of sheep lambing de-seasoning in the Western Mediterranean in the sixth millennium BCE. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69576-w>
- Tornero, C., Balasse, M., Molist, M., & Saña, M. (2016b). Seasonal reproductive patterns of early domestic sheep at Tell Halula (PPNB, Middle Euphrates Valley): Evidence from sequential oxygen isotope analyses of tooth enamel. *Journal of Archaeological Science: Reports*, *6*, 810–818. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2015.10.038>

- Tornero, C., Balasse, M., Ughetto-Monfrin, J., Molist, M., & Saña, M. (2017). Evaluating seasonality of birth in gazelles in the Middle Euphrates Valley: confirming ethological assumptions in the Abu Hureyra model. In *Economic Zooarchaeology. Studies in Hunting, Herding and Early Agriculture (Essays in Memory of Tony Legge- Hunter, Fisherman, Fowler and Zooarchaeologist)* (pp. 173–182). Oxbow.
- Towers, J., Gledhill, A., Bond, J., & Montgomery, J. (2014). An Investigation of Cattle Birth Seasonality using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ Profiles within First Molar Enamel. *Archaeometry*, 56(S1), 208–236. <https://doi.org/10.1111/arc.12055>
- Towers, J., Mainland, I., Montgomery, J., & Bond, J. (2017). Calving seasonality at Pool, Orkney during the first millennium AD: an investigation using intra-tooth isotope ratio analysis of cattle molar enamel. *Environmental Archaeology*, 22(1), 40–55. <https://doi.org/10.1080/14614103.2015.1116214>
- Treasure, E. R., Church, M. J., & Gröcke, D. R. (2016). The influence of manuring on stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in Celtic bean (*Vicia faba* L.): archaeobotanical and palaeodietary implications. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 8(3), 555–562. <https://doi.org/10.1007/s12520-015-0243-6>
- Trentacoste, A., Lightfoot, E., Le Roux, P., Buckley, M., Kansa, S. W., Esposito, C., & Gleba, M. (2020). Heading for the hills? A multi-isotope study of sheep management in first-millennium BC Italy. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 29(October 2019), 102036. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2019.102036>
- Trentacoste, A., MacKinnon, M., Day, C., Le Roux, P., Buckley, M., McCallum, M., & Carroll, M. (2023). Isotopic Insights into Livestock Production in Roman Italy: Diet, Seasonality, and Mobility on an Imperial Estate. *Environmental Archaeology*, 1–23. <https://doi.org/10.1080/14614103.2023.2282866>
- Tresset, A. (1996). *Le rôle des relations homme/animal dans l'évolution économique et culturelle des sociétés des V-IVe millénaires en Bassin Parisien*. Université Paris 1.
- Tuross, N. (2012). Comparative decalcification methods, radiocarbon dates, and stable isotopes of the VIRI bones. *Radiocarbon*, 54(3–4), 837–844. <https://doi.org/10.1017/S0033822200047482>
- Tuross, N., Fogel, M. L., & Hare, P. E. (1988). Variability in the preservation of the isotopic composition of collagen from fossil bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52(4), 929–935. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90364-X](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90364-X)
- Uno, K. T., Fisher, D. C., Schuster, G., Wittemyer, G., Douglas-Hamilton, I., Omondi, P., Litoroh, M., & Cerling, T. E. (2020). High-resolution stable isotope profiles of modern elephant (*Loxodonta africana*) tusk dentin and tail hair from Kenya: Implications for identifying seasonal variability in climate, ecology, and diet in ancient proboscideans. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 559(May). <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2020.109962>
- Upex, B., & Dobney, K. (2012). Dental enamel hypoplasia as indicators of seasonal environmental and physiological impacts in modern sheep populations: A model for interpreting the

zoarchaeological record. *Journal of Zoology*, 287(4), 259–268.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2012.00912.x>

Van der Merwe, N. J., & Vogel, J. C. (1978). ^{13}C Content of human collagen as a measure of prehistoric diet in woodland North America. *Nature*, 276(5690), 815–816.
<https://doi.org/10.1038/276815a0>

Van Klinken, G. J. (1999). Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science*, 26(6), 687–695.
<https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0385>

Van Valen, L. (1960). A FUNCTIONAL INDEX OF HYPSONDONTY. *Evolution*, 14(4), 531–532.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1960.tb03121.x>

Vigne, J.-D., & Helmer, D. (2007). Was milk a “secondary product” in the Old World Neolithisation process? Its role in the domestication of cattle, sheep and goats. *Anthropozoologica*, 42(2), 9–40.

Viner, S., Evans, J., Albarella, U., & Parker Pearson, M. (2010). Cattle mobility in prehistoric Britain: strontium isotope analysis of cattle teeth from Durrington Walls (Wiltshire, Britain). *Journal of Archaeological Science*, 37(11), 2812–2820. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.06.017>

Virginia, R. A., & Delwiche, C. C. (1982). Natural ^{15}N abundance of presumed N_2 -fixing and non- N_2 -fixing plants from selected ecosystems. *Oecologia*, 54(3), 317–325.
<https://doi.org/10.1007/BF00380000>

Vogel, J. C., & Van Der Merwe, N. J. (1977). Isotopic Evidence for Early Maize Cultivation in New York State. *American Antiquity*, 42(2), 238–242. <https://doi.org/10.2307/278984>

Von Holstein, I. C. C., Hamilton, J., Craig, O. E., Newton, J., & Collins, M. J. (2013). Comparison of isotopic variability in proteinaceous tissues of a domesticated herbivore: A baseline for zooarchaeological investigation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(23), 2601–2615. <https://doi.org/10.1002/rcm.6725>

Walker, J. L., & Macko, S. A. (1999). Dietary studies of marine mammals using stable carbon and nitrogen isotopic ratios of teeth. *Marine Mammal Science*, 15(2), 314–334.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00804.x>

Warinner, C., & Tuross, N. (2010). Brief communication: Tissue isotopic enrichment associated with growth depression in a pig: Implications for archaeology and ecology. *American Journal of Physical Anthropology*, 141(3), 486–493. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21222>

Webb, E. C., Stewart, A., Miller, B., Tarlton, J., & Evershed, R. P. (2016). Age effects and the influence of varying proportions of terrestrial and marine dietary protein on the stable nitrogen-isotope compositions of pig bone collagen and soft tissues from a controlled feeding experiment. *Science and Technology of Archaeological Research*, 2(1), 54–66.
<https://doi.org/10.1080/20548923.2015.1133121>

Weinreb, M. M., & Sharav, Y. (1964). Tooth Development in Sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 25, 891–908.

- Wiedemann, F. B., Bocherens, H., Mariotti, A., Driesch, A. von den, & Grupe, G. (1999). Methodological and Archaeological Implications of Intra-tooth Isotopic Variations ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) in Herbivores from Ain Ghazal (Jordan, Neolithic). *Journal of Archaeological Science*, 26(6), 697–704. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0392>
- Witzel, C., Kierdorf, U., Frölich, K., & Kierdorf, H. (2018). The pay-off of hypsodonty - Timing and dynamics of crown growth and wear in molars of Soay sheep. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1332-9>
- Worley, F., Baker, P., Popkin, P., Hammon, A., & Payne, S. (2016). The Sheep Project (2): The effects of plane of nutrition, castration and the timing of first breeding in ewes on dental eruption and wear in unimproved Shetland sheep. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 6, 862–874. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2015.10.029>
- Wright, C. C. (2014). *Calcium isotopes in sheep dental enamel: a new approach to studying weaning and dairying in the archaeological record*. PhD thesis. University of Oxford.
- Zazzo, A., Balasse, M., Passey, B. H., Moloney, A. P., Monahan, F. J., & Schmidt, O. (2010). The isotope record of short- and long-term dietary changes in sheep tooth enamel: Implications for quantitative reconstruction of paleodiets. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(12), 3571–3586. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.03.017>
- Zazzo, A., Balasse, M., & Patterson, W. P. (2005). High-resolution $\delta^{13}\text{C}$ intratooth profiles in bovine enamel: Implications for mineralization pattern and isotopic attenuation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(14), 3631–3642. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2005.02.031>
- Zazzo, A., Balasse, M., & Patterson, W. P. (2006). The reconstruction of mammal individual history: refining high-resolution isotope record in bovine tooth dentine. *Journal of Archaeological Science*, 33(8), 1177–1187. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.12.006>
- Zazzo, A., Mariotti, A., Lécuyer, C., & Heintz, E. (2002). Intra-tooth isotope variations in late Miocene bovid enamel from Afghanistan: paleobiological, taphonomic, and climatic implications. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 186(1–2), 145–161. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(02\)00449-2](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(02)00449-2)
- Zeder, M. A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), 11597–11604. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801317105>

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

ANEXOS

Anexo I

Composició isotòpica de les mostres de forrajes de SUMAIL.

Tabla 1, Resultados de los análisis isotópicos y elementales de las muestras de forraje: valores $\delta^{13}\text{C}$, contenido de carbono (%C), valores de $\delta^{15}\text{N}$, y contenido de nitrógeno (%N).

	Muestra - ID	Peso (mg)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	%C	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%N
Alfalfa	A-1	1,1	-29,4	43,2	-0,5	2,3
	A-2	0,9	-29,3	42,3	+1,4	2,1
	A-3	0,9	-29,4	47,8	+1,8	2,4
	A-4	0,9	-29,4	48,4	+1,5	2,4
	A-5	1,0	-29,1	47,4	+3,0	2,1
	A-6	1,0	-29,1	46,1	+3,1	2,1
	A-7	0,9	-29,1	44,9	+3,3	1,3
	A-8	1,0	-29,2	45,3	+3,4	1,4
	A-9	1,0	-29,0	45,3	+2,9	1,4
	A-10	1,0	-29,8	44,5	+2,4	3,9
	A-11	1,0	-29,9	44,4	+2,5	3,9
	A-12	1,1	-30,0	44,3	+2,4	3,7
	A-13	0,9	-29,3	44,7	+3,6	1,6
	A-14	1,0	-29,3	44,4	+4,9	1,5
	A-15	1,0	-29,3	44,1	+4,2	1,5
promedio			-29,4	45,1	+2,7	2,2
SD			0,3	1,7	1,3	0,9
Mijo	P-1	0,9	-13,5	41,1	+12,1	2,0
	P-2	0,9	-12,8	38,9	+10,7	1,3
	P-3	1,1	-13,1	40,1	+12,0	0,9
	P-4	1,0	-13,0	38,9	+12,5	1,4
	P-5	1,1	-13,0	41,3	+10,6	1,4
	P-6	0,9	-12,8	39,9	+12,8	1,1
	P-7	1,1	-13,3	39,7	+12,1	1,2
	P-8	1,0	-12,6	39,5	+12,1	1,5
	P-9	0,9	-13,4	41,6	+11,6	0,6
promedio			-13,1	40,1	+11,8	1,3
SD			0,3	1,0	0,7	0,4
Cebada-paja	C-1	1,0	-28,4	42,7	+3,7	0,5
	C-2	1,0	-27,6	44,0	+2,0	0,6
	C-3	1,1	-27,9	44,1	+5,8	0,4

	C-4	1,0	-27,5	43,6	+3,7	0,5
	C-5	1,1	-28,5	41,9	+1,5	0,6
	C-6	0,9	-28,0	41,8	+2,0	0,6
	C-7	1,0	-27,8	43,4	+2,6	0,3
	C-8	1,0	-28,5	44,2	+2,3	0,3
	C-9	1,0	-28,5	44,1	+7,0	0,3
	C-10	1,1	-28,3	45,0	+2,2	0,2
	C-11	1,1	-28,7	42,7	+5,8	0,2
	C-12	1,1	-28,6	42,0	+4,0	0,2
	promedio		-28,2	43,3	+3,6	0,4
	SD		0,4	1,1	1,8	0,2
Cebada-grano	CG-1	1,0	-25,5	42,3	+7,4	2,0
	CG-2	1,1	-25,4	40,0	+7,1	1,7
	CG-3	1,0	-25,7	41,8	+7,3	2,0
	CG-4	0,9	-25,5	41,8	+7,7	2,1
	CG-5	1,1	-25,5	42,3	+7,3	2,1
	CG-6	1,1	-25,5	41,7	+7,5	1,8
	CG-7	0,9	-25,4	41,4	+7,5	1,7
	CG-8	1,0	-25,5	42,0	+7,2	2,0
	CG-9	1,0	-25,5	41,4	+7,2	1,8
	CG-10	0,9	-25,6	41,9	+8,1	2,1
	CG-11	1,0	-25,5	41,7	+7,7	2,0
	CG-12	1,1	-25,8	42,5	+7,6	2,2
	CG-13	1,2	-25,6	42,5	+7,4	2,0
	CG-14	1,1	-25,6	42,0	+7,3	1,8
	CG-15	1,2	-25,7	41,9	+8,2	2,1
	CG-16	1,0	-25,7	42,0	+7,1	2,2
	promedio		-25,6	41,8	+7,5	2,0
	SD		0,1	0,6	0,3	0,2

Anexo II

Desarrollo dental de los molares mandibulares en los individuos seleccionados.

Figura 1. Desarrollo dental de los molares mandibulares en los individuos seleccionados del grupo 1 (mandíbulas izquierdas).

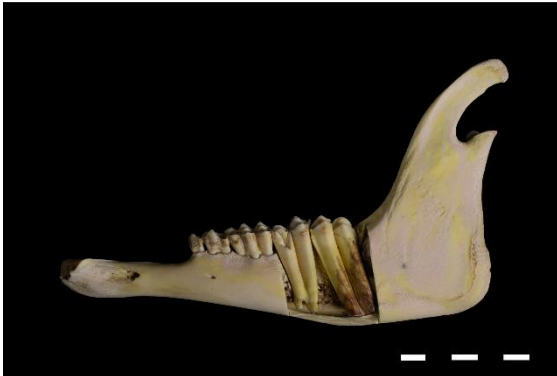
OV-02



OV-03



OV-04



OV-05



OV-06

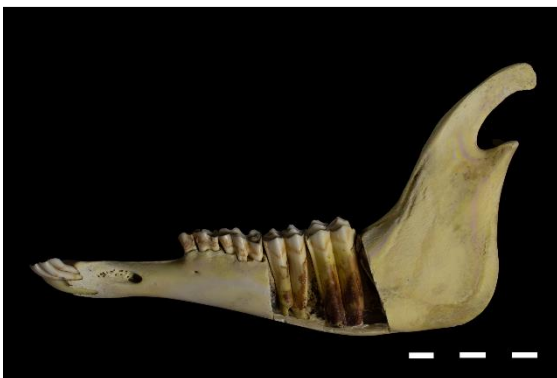


Figura 2. Desarrollo dental de los molares mandibulares en los individuos seleccionados del grupo 2 (mandíbulas derechas).

OV-07



OV-08



OV-09



OV-10



OV-11



Anexo III

Resultados isotópicos de los valores de los estándares para todas las sesiones analíticas.

Tabla 1. Resultados isotópicos de los valores $\delta^{13}\text{C}$ de NBS-19, con indicación del promedio y la desviación estándar (SD) (1 sigma).

Session	Identifier 1	SD $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	
1	NBS-19//	0,02	1,97	
	NBS-19//	0,02	1,99	
	NBS-19//	0,04	1,93	
	NBS-19//	0,01	1,90	
	NBS-19//	0,01	1,97	
			1,95	Mean
			0,03	SD
2	NBS-19//	0,18	2,01	
	NBS-19//	0,02	1,96	
	NBS-19//	0,03	1,88	
			1,95	Mean
			0,07	SD
3	NBS-19//	0,02	1,87	
	NBS-19//	0,02	1,96	
			1,92	Mean
			0,06	SD
4	NBS-19//	0,03	1,93	
	NBS-19//	0,01	1,92	
	NBS-19//	0,02	1,99	
	NBS-19//	0,04	1,96	
	NBS-19//	0,01	1,92	
	NBS-19//	0,01	1,96	
			1,95	Mean
			0,03	SD
5	NBS-19//	0,01	2,02	
	NBS-19//	0,01	1,91	
	NBS-19//	0,00	1,95	
	NBS-19//	0,01	1,92	
	NBS-19//	0,01	1,95	
			1,95	Mean
			0,04	SD
6	NBS-19//	0,03	1,98	
	NBS-19//	0,03	1,99	
	NBS-19//	0,01	1,99	
	NBS-19//	0,03	1,90	

	NBS-19//	0,04	1,92	
			1,95	Mean
			0,04	SD
7	NBS-19//	0,04	2,04	
	NBS-19//	0,01	1,93	
	NBS-19//	0,04	1,96	
	NBS-19//	0,02	1,92	
	NBS-19//	0,03	1,95	
	NBS-19//	0,02	1,89	
			1,95	Mean
			0,05	SD

Tabla 2. Resultados isotópicos de los valores $\delta^{13}\text{C}$ de IAEA 600, con indicación del promedio y la desviación estándar (SD) (1 sigma)

Session	Row	Analysis	Identifier 1	Identifier 2	Area All	Amount	$\delta^{13}\text{C}$	
1	2	7343	IAEA 600	376 ug	75,27	0,38	-27,67	
	3	7344	IAEA 600	287 ug	57,24	0,29	-27,72	
	4	7345	IAEA 600	401 ug	80,98	0,40	-27,69	
	15	7356	IAEA 600	348 ug	69,59	0,35	-27,77	
	16	7357	IAEA 600	339 ug	67,90	0,34	-27,69	
	27	7368	IAEA 600	345 ug	69,45	0,35	-27,86	
	28	7369	IAEA 600	308 ug	61,89	0,31	-27,69	
	38	7379	IAEA 600	375 ug	76,21	0,38	-27,67	
	39	7380	IAEA 600	378 ug	76,27	0,38	-27,73	
								-27,72
							0,06	SD
2	2	7395	IAEA 600	325 ug	64,19	0,33	-27,70	
	3	7396	IAEA 600	367 ug	72,02	0,37	-27,94	
	4	7397	IAEA 600	317 ug	62,14	0,32	-27,74	
	15	7408	IAEA 600	334 ug	65,83	0,33	-27,80	
	16	7409	IAEA 600	313 ug	61,31	0,31	-27,79	
	27	7420	IAEA 600	339 ug	65,93	0,34	-27,93	
	28	7421	IAEA 600	309 ug	60,30	0,31	-28,02	
	38	7431	IAEA 600	359 ug	71,16	0,36	-27,97	
	39	7432	IAEA 600	302 ug	59,84	0,30	-27,81	
								-27,86
							0,11	SD
3	6	8307	IAEA 600	221 ug	45,62	0,22	-27,43	
	7	8308	IAEA 600	199 ug	40,73	0,20	-27,60	
	18	8319	IAEA 600	249 ug	52,20	0,25	-27,65	
	19	8320	IAEA 600	187 ug	38,17	0,19	-27,58	
	30	8331	IAEA 600	186 ug	38,71	0,19	-27,68	
	31	8332	IAEA 600	245 ug	50,84	0,25	-27,70	
	41	8342	IAEA 600	197 ug	40,30	0,20	-27,73	

	42	8343	IAEA 600	205 ug	42,69	0,21	-27,64	
							-27,63	Mean
							0,09	SD
4	6	8360	IAEA 600	199 ug	41,31	0,20	-27,39	
	7	8361	IAEA 600	199 ug	40,82	0,20	-27,59	
	17	8371	IAEA 600	201 ug	43,17	0,20	-27,66	
	18	8372	IAEA 600	207 ug	43,34	0,21	-27,67	
	28	8382	IAEA 600	199 ug	39,72	0,20	-27,64	
	29	8383	IAEA 600	207 ug	43,50	0,21	-27,65	
							-27,60	Mean
							0,11	SD
5	14	10440	IAEA 600	278 ug	40,20	0,28	-27,61	
	15	10441	IAEA 600	149 ug	20,96	0,15	-27,53	
	25	10451	IAEA 600	250 ug	35,92	0,25	-27,53	
	26	10452	IAEA 600	359 ug	52,63	0,36	-27,52	
	37	10463	IAEA 600	263 ug	38,14	0,26	-27,52	
	48	10474	IAEA 600	333 ug	48,74	0,33	-27,51	
							-27,54	Mean
							0,04	SD
6	3	12979	IAEA 600	283 ug	29,34	0,28	-27,39	
	15	12991	IAEA 600	219 ug	23,08	0,22	-27,37	
	27	13003	IAEA 600	263 ug	28,38	0,26	-27,39	
	39	13015	IAEA 600	257 ug	27,45	0,26	-27,42	
	51	13027	IAEA 600	245 ug	26,26	0,25	-27,39	
	63	13039	IAEA 600	272 ug	30,20	0,27	-27,48	
	75	13051	IAEA 600	262 ug	30,46	0,26	-27,46	
	87	13063	IAEA 600	291 ug	33,25	0,29	-27,30	
	94	13070	IAEA 600	264 ug	30,23	0,26	-27,34	
							-27,40	Mean
							0,06	SD
7	3	13096	IAEA 600	245 ug	30,11	0,25	-27,40	
	15	13108	IAEA 600	246 ug	34,02	0,25	-27,42	
	27	13120	IAEA 600	224 ug	30,36	0,22	-27,44	
	39	13132	IAEA 600	312 ug	43,26	0,31	-27,48	
	51	13144	IAEA 600	229 ug	31,39	0,23	-27,38	
	63	13156	IAEA 600	301 ug	42,13	0,30	-27,49	
	74	13167	IAEA 600	254 ug	35,40	0,25	-27,45	
							-27,44	Mean
							0,04	SD
8	3	13575	IAEA 600	193 ug	50,99	0,19	-27,50	
	5	13577	IAEA 600	215 ug	30,61	0,22	-27,23	
	13	13585	IAEA 600	281 ug	40,45	0,28	-27,26	
							-27,33	Mean
							0,15	SD

Tabla 3. Resultados isotópicos de los valores $\delta^{15}\text{N}$ de IAEA 600, con indicación del promedio y la desviación estándar (SD) (1 sigma).

Session	Row	Analysis	Identifier 1	Identifier 2	Area All	Amount	$\delta^{15}\text{N}$	
1	2	7343	IAEA 600	376 ug	60,04	0,38	0,86	
	3	7344	IAEA 600	287 ug	44,74	0,29	0,91	
	4	7345	IAEA 600	401 ug	64,14	0,40	0,88	
	15	7356	IAEA 600	348 ug	54,52	0,35	0,90	
	16	7357	IAEA 600	339 ug	52,95	0,34	0,93	
	27	7368	IAEA 600	345 ug	55,02	0,35	0,81	
	28	7369	IAEA 600	308 ug	48,61	0,31	0,86	
	38	7379	IAEA 600	375 ug	59,56	0,38	0,90	
	39	7380	IAEA 600	378 ug	59,22	0,38	0,92	
								0,88
							0,04	SD
2	2	7395	IAEA 600	325 ug	48,24	0,33	0,78	
	3	7396	IAEA 600	367 ug	54,53	0,37	0,89	
	4	7397	IAEA 600	317 ug	46,25	0,32	0,86	
	15	7408	IAEA 600	334 ug	48,92	0,33	0,76	
	16	7409	IAEA 600	313 ug	45,58	0,31	0,77	
	27	7420	IAEA 600	339 ug	49,72	0,34	0,73	
	28	7421	IAEA 600	309 ug	44,71	0,31	0,67	
	38	7431	IAEA 600	359 ug	54,01	0,36	0,84	
	39	7432	IAEA 600	302 ug	44,70	0,30	0,84	
								0,79
							0,07	SD
3	6	8307	IAEA 600	221 ug	29,65	0,22	1,10	
	7	8308	IAEA 600	199 ug	26,93	0,20	1,05	
	18	8319	IAEA 600	249 ug	34,60	0,25	0,98	
	19	8320	IAEA 600	187 ug	24,53	0,19	0,93	
	30	8331	IAEA 600	186 ug	25,34	0,19	0,89	
	31	8332	IAEA 600	245 ug	32,88	0,25	0,80	
	41	8342	IAEA 600	197 ug	26,29	0,20	0,98	
	42	8343	IAEA 600	205 ug	28,84	0,21	0,93	
							0,96	Mean
							0,09	SD
4	6	8360	IAEA 600	199 ug	24,43	0,20	0,81	
	7	8361	IAEA 600	199 ug	25,02	0,20	0,65	
	17	8371	IAEA 600	201 ug	27,14	0,20	0,99	
	18	8372	IAEA 600	207 ug	28,19	0,21	0,96	
	28	8382	IAEA 600	199 ug	26,24	0,20	0,96	
	29	8383	IAEA 600	207 ug	28,65	0,21	1,03	
							0,90	Mean
							0,14	SD
5	14	10440	IAEA 600	278 ug	38,55	0,28	1,57	
	15	10441	IAEA 600	149 ug	18,86	0,15	1,96	

	25	10451	IAEA 600	250 ug	34,51	0,25	1,53	
	26	10452	IAEA 600	359 ug	50,25	0,36	1,52	
	37	10463	IAEA 600	263 ug	35,47	0,26	1,45	
	48	10474	IAEA 600	333 ug	46,37	0,33	1,45	
							1,58	Mean
							0,19	SD
6	3	12979	IAEA 600	283 ug	40,54	0,28	1,16	
	15	12991	IAEA 600	219 ug	31,66	0,22	1,32	
	27	13003	IAEA 600	263 ug	38,10	0,26	1,20	
	39	13015	IAEA 600	257 ug	36,73	0,26	1,25	
	51	13027	IAEA 600	245 ug	35,43	0,25	1,37	
	63	13039	IAEA 600	272 ug	39,63	0,27	1,10	
	75	13051	IAEA 600	262 ug	37,92	0,26	1,07	
	87	13063	IAEA 600	291 ug	41,81	0,29	1,16	
	94	13070	IAEA 600	264 ug	37,78	0,26	1,17	
							1,20	Mean
							0,10	SD
7	3	13096	IAEA 600	245 ug	34,82	0,25	1,01	
	15	13108	IAEA 600	246 ug	37,17	0,25	1,53	
	27	13120	IAEA 600	224 ug	31,80	0,22	1,20	
	39	13132	IAEA 600	312 ug	46,11	0,31	1,26	
	51	13144	IAEA 600	229 ug	32,70	0,23	1,17	
	63	13156	IAEA 600	301 ug	44,78	0,30	1,31	
	74	13167	IAEA 600	254 ug	37,65	0,25	1,35	
							1,26	Mean
							0,16	SD
8	3	13575	IAEA 600	193 ug	58,53	0,19	0,87	
	5	13577	IAEA 600	215 ug	34,58	0,22	1,02	
	13	13585	IAEA 600	281 ug	45,80	0,28	0,99	
							0,96	Mean
							0,08	SD

Anexo IV

Resultados de los análisis isotópicos de las muestras de dentina obtenidas por el método de muestreo por secciones (*slice*) en los M₂ y M₃ izquierdos (Capítulo IV –1).

Tabla 1. Composición isotópica de carbono y nitrógeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$), contenido de carbono y nitrógeno (%C and %N), y ratio C:N de las muestras de colágeno. Los valores mínimos y máximos de cada molar están marcados en negrita. La distancia (Dist.) de ERJ en los M₂ y la distancia de la cúspide en los M₃, representan el punto intermedio entre secciones.

	M ₂ (left)						M ₃ (left)					
	Dist. from ERJ (mm)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	%C	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%N	C:N	Dist. from cuspid (mm)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	%C	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%N	C:N
OV-07	38,0	-20,2	38,3	+7,0	14,0	3,2	1,5	-15,8	38,6	+11,7	14,0	3,2
	34,0	-20,5	40,2	+7,8	14,6	3,2	4,3	-15,4	32,7	+13,3	11,9	3,2
	30,3	-20,7	39,1	+8,0	14,3	3,2	6,5	-14,6	36,3	+13,9	13,3	3,2
	26,5	-20,9	38,9	+8,3	14,2	3,2	8,3	-14,5	39,8	+14,3	14,6	3,2
	23,0	-20,5	39,9	+9,1	14,5	3,2	10,3	-15,0	30,2	+14,5	11,2	3,1
	19,3	-19,6	44,8	+9,8	16,2	3,2	12,5	-15,2	40,4	+14,6	14,7	3,2
	17,0	-19,1	40,0	+10,4	14,5	3,2	14,8	-15,5	37,2	+14,5	13,8	3,1
	15,0	-18,4	41,1	+11,1	14,9	3,2	17,0	-16,0	26,7	+14,6	9,7	3,2
	13,0	-18,1	42,1	+11,8	15,1	3,3	20,8	-17,8	37,6	+14,1	13,7	3,2
	11,0	-18,0	39,5	+11,9	14,3	3,2	25,0	-20,4	28,3	+13,0	10,5	3,1
	8,8	-17,4	40,2	+12,3	14,4	3,2	29,8	-20,9	24,9	+13,4	9,3	3,1
	6,3	-16,2	37,9	+13,7	13,8	3,2						
	4,0	-15,0	37,8	+14,7	13,7	3,2						
1,5	-17,9	41,9	+14,2	15,2	3,2							
OV-08	35,1	-20,4	36,7	+8,0	13,6	3,1	1,3	-15,6	33,6	+11,3	12,4	3,2
	31,6	-20,6	39,0	+8,5	14,3	3,2	3,2	-14,7	36,4	+13,0	13,5	3,2
	28,4	-20,7	39,9	+8,6	14,5	3,2	4,4	-14,4	38,3	+13,6	14,2	3,1
	24,3	-20,7	35,7	+8,6	13,2	3,2	6,0	-14,0	36,8	+14,2	13,7	3,1
	20,8	-20,4	36,9	+8,9	13,6	3,2	8,5	-14,0	38,0	+14,7	14,0	3,2
	17,8	-19,8	38,4	+9,2	14,1	3,2	10,6	-14,7	41,0	+14,9	15,1	3,2
	15,8	-19,4	36,9	+9,4	13,7	3,1	12,3	-14,9	35,7	+14,9	13,3	3,1
	14,0	-18,7	34,3	+10,2	12,8	3,1	13,7	-15,7	37,8	+15,1	14,0	3,2
	12,3	-18,2	30,6	+10,6	11,3	3,1	17,0	-16,7	35,2	+14,9	13,1	3,1
	11,1	-17,6	34,9	+11,3	13,0	3,1	21,4	-18,9	39,2	+14,2	14,4	3,2
	9,7	-16,7	34,5	+12,3	12,7	3,2	27,0	-20,4	31,3	+14,1	11,7	3,1
	7,6	-15,6	37,0	+13,4	13,7	3,2						
	5,5	-14,4	34,6	+14,5	12,8	3,2						
3,5	-15,6	32,4	+14,9	12,0	3,1							

	1,3	-19,1	34,7	+14,0	12,8	3,2							
OV-11	36,0	-21,4	37,2	+6,9	13,6	3,2	1,5	-12,7	40,8	+13,4	15,0	3,2	
	33,3	-21,4	35,6	+7,3	13,0	3,2	4,0	-14,2	39,5	+14,0	14,5	3,2	
	31,5	-21,5	36,7	+7,5	13,4	3,2	6,0	-14,9	38,1	+13,9	14,2	3,1	
	29,6	-21,3	37,8	+7,5	13,8	3,2	7,7	-15,2	38,0	+14,2	14,1	3,1	
	27,4	-21,5	36,7	+7,6	13,4	3,2	9,7	-15,7	37,0	+14,2	13,6	3,2	
	25,4	-21,4	35,9	+7,9	13,2	3,2	12,0	-16,0	38,6	+14,2	14,3	3,1	
	22,9	-21,1	37,3	+8,1	13,7	3,2	13,5	-16,3	39,9	+14,4	14,7	3,2	
	20,3	-20,8	38,1	+8,4	14,1	3,2	15,0	-17,4	41,6	+13,9	15,1	3,2	
	18,3	-20,7	36,2	+8,5	13,4	3,2	19,5	-20,1	38,0	+12,7	14,1	3,1	
	16,2	-20,2	36,6	+8,9	13,5	3,2	24,0	-20,7	35,6	+12,5	13,2	3,1	
	14,1	-19,2	37,5	+9,6	13,9	3,1	28,5	-22,2	30,1	+12,4	10,4	3,4	
	11,9	-18,2	36,2	+10,6	13,3	3,2							
	9,8	-17,6	35,4	+11,7	13,1	3,2							
	8,3	-16,4	36,9	+12,6	13,7	3,1							
	6,1	-15,1	37,3	+14,0	13,7	3,2							
	3,5	-16,4	35,6	+14,1	13,1	3,2							
	1,2	-20,3	31,4	+12,0	11,9	3,1							

Anexo V

Resultados de los análisis isotópicos de las muestras de esmalte y de dentina-colágeno (método *drill*) en los M₂ derechos (Capítulo IV – 2).

Tabla 1. Composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) de las muestras de esmalte-bioapatita. Los valores mínimos y máximos de cada molar están marcados en negrita.

ID specimen, tooth, laterality	ID sample	Distance from ERJ (mm)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$
OV-07-M2-R	1	38,7	-11,9
	2	37,1	-12,4
	3	35,7	-12,9
	4	35,1	-13,3
	5	32,1	-13,2
	6	30,7	-14,0
	7	29,2	-13,5
	8	27,4	-14,0
	9	26,5	-13,7
	10	24,5	-13,1
	11	23,3	-12,8
	12	21,5	-11,8
	13	20,2	-10,7
	14	18,8	-9,0
	15	17,4	-8,1
	16	15,5	-5,7
	17	14,1	-5,8
	18	12,5	-4,5
	19	11,1	-3,5
	20	9,5	-3,7
	21	8,0	-4,8
	22	6,2	-7,0
	23	5,0	-8,9
	24	3,4	-11,1
	25	1,7	-11,8
OV-08-M2-R	1	37,2	-12,5
	2	35,6	-12,9
	3	34,6	-13,1
	4	33,3	-13,2
	5	31,7	-13,0
	6	30,2	-13,3
	7	28,5	-12,8

	8	27,3	-12,6
	9	26,0	-11,7
	10	24,4	-11,3
	11	22,8	-10,1
	12	21,3	-8,4
	13	19,6	-7,5
	14	16,5	-5,5
	15	14,9	-4,3
	16	13,4	-3,4
	17	11,8	-2,5
	18	10,2	-2,9
	19	8,5	-4,2
	20	6,8	-5,9
	21	5,3	-8,4
	22	4,0	-11,0
	23	2,6	-11,1

	1	37,4	-11,3
	2	36,0	-11,5
	3	34,4	-12,8
	4	33,4	-13,2
	5	31,4	-13,5
	6	29,9	-13,6
	7	28,5	-13,8
	8	27,1	-13,7
	9	25,4	-13,8
	10	23,9	-12,8
	11	22,6	-12,6
	12	20,9	-11,3
	13	19,3	-9,7
OV-09-M2-R	14	17,8	-9,0
	15	16,2	-7,7
	16	14,7	-6,3
	17	13,4	-5,4
	18	12,2	-4,3
	19	10,6	-3,6
	20	9,2	-3,3
	21	7,6	-4,4
	22	6,6	-5,7
	23	4,8	-7,6
	24	3,6	-10,4
	25	2,3	-11,8
	26	1,3	-11,4

OV10-M2-R	1	39,5	-12,4
-----------	---	------	-------

	17	12,6	-3,1
	18	11,3	-3,4
	19	9,7	-4,7
	20	8,4	-6,4
	21	7,1	-8,0
	22	5,5	-10,3
	23	4,1	-11,9
	24	2,4	-11,6

Tabla 2. Composición isotópica de carbono y nitrógeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$), contenido de carbono y nitrógeno (%C and %N), y ratio C:N de las muestras de colágeno. Los valores mínimos y máximos de cada molar están marcados en negrita.

ID specimen, tooth, laterality	ID sample	Distance from ERJ (mm)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	% C	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$	%N	C:N
OV-07-M2-R	1	38,4	-18,3	43,7	+7,5	15,6	3,3
	2	36,7	-19,2	43,5	+7,6	15,7	3,2
	3	35,1	-20,0	43,3	+7,2	15,1	3,3
	4	33,8	-20,5	42,9	+7,2	15,6	3,2
	5	31,9	-20,3	43,1	+7,4	15,5	3,3
	6	30,2	-20,8	43,6	+7,6	15,6	3,3
	7	28,6	-20,6	43,1	+7,4	15,5	3,2
	8	27,2	-21,5	42,8	+7,3	15,7	3,2
	9	25,7	-21,9	42,5	+7,4	15,4	3,2
	10	24,5	-22,1	43,2	+7,7	15,7	3,2
	11	23,1	-22,1	44,0	+7,7	16,0	3,2
	12	21,5	-22,4	44,1	+7,3	16,2	3,2
	13	20,4	-22,6	43,6	+7,0	15,5	3,3
	14	18,6	-22,8	43,4	+7,2	15,8	3,2
	15	17,4	-22,9	43,1	+7,1	15,7	3,2
	16	15,7	-22,8	43,2	+7,2	15,2	3,3
	17	13,9	-22,4	42,9	+7,8	15,9	3,2
	18	12,6	-22,3	43,1	+7,8	15,6	3,2
	19	11,2	-21,7	43,2	+8,3	15,8	3,2
	20	9,8	-21,3	42,9	+8,3	15,0	3,3
	21	8,6	-19,4	42,9	+10,0	15,3	3,3
	22	6,7	-14,7	42,7	+13,4	15,8	3,2
	23	5,1	-12,1	43,5	+15,2	16,2	3,1
	24	3,6	-12,4	43,9	+16,3	16,0	3,2
	25	2,1	-15,2	43,3	+15,1	15,5	3,3
	26	0,9	-19,3	43,2	+13,8	15,6	3,2

OV-08-M2-R	1	36,0	-19,2	41,8	+8,5	15,0	3,3
	2	34,5	-19,5	42,9	+8,2	15,8	3,2
	3	33,3	-20,0	42,9	+8,3	15,7	3,2
	4	31,8	-20,1	43,3	+8,2	15,8	3,2
	5	30,5	-21,2	42,7	+8,2	15,6	3,2
	6	29,0	-21,4	42,8	+8,2	15,4	3,3
	7	26,3	-21,9	43,1	+7,8	15,9	3,2
	8	24,8	-22,3	42,7	+8,1	15,6	3,2
	9	23,0	-22,3	43,7	+7,8	16,0	3,2
	10	21,8	-22,2	44,7	+7,5	16,5	3,2
	11	20,3	-22,4	43,2	+7,4	15,7	3,2
	12	18,7	-22,3	44,6	+7,5	16,5	3,2
	13	17,4	-22,3	42,9	+7,9	15,3	3,3
	14	16,0	-21,5	43,4	+8,1	15,9	3,2
	15	13,3	-21,4	43,8	+8,1	16,1	3,2
	16	11,6	-20,7	43,6	+8,7	16,0	3,2
	17	10,1	-19,0	44,0	+10,1	15,7	3,3
	18	8,8	-18,7	43,4	+10,1	15,9	3,2
	19	7,5	-14,9	43,6	+12,5	16,0	3,2
	20	6,2	-12,0	44,6	+14,7	16,2	3,2
	21	4,3	-11,9	43,2	+15,7	15,5	3,3
	22	3,0	-14,0	43,1	+15,4	16,0	3,1
	23	1,6	-18,0	43,5	+14,0	16,0	3,2
OV-09-M2-R	1	36,3	-15,0	44,5	+8,1	16,4	3,2
	2	34,5	-16,5	44,6	+7,6	15,4	3,4
	3	31,1	-18,0	44,4	+8,3	16,3	3,2
	4	29,7	-18,6	45,1	+8,3	16,8	3,1
	5	27,9	-19,5	40,8	+8,2	15,0	3,2
	6	26,3	-20,7	43,6	+7,8	15,0	3,4
	7	24,8	-21,3	44,1	+7,6	16,0	3,2
	8	23,1	-21,7	43,9	+7,6	15,3	3,3
	9	21,8	-22,1	43,1	+7,7	15,4	3,3
	10	20,2	-22,0	44,0	+7,7	15,8	3,3
	11	18,5	-22,4	43,4	+7,7	16,3	3,1
	12	17,1	-22,7	42,7	+7,4	15,8	3,2
	13	15,8	-22,8	43,9	+7,5	16,2	3,2
	14	14,3	-22,8	41,8	+7,2	15,2	3,2
	15	12,7	-22,8	44,6	+7,4	16,3	3,2
	16	11,2	-22,3	43,6	+7,8	15,9	3,2
	17	9,8	-22,2	43,6	+7,9	15,8	3,2
	18	8,2	-20,3	42,2	+9,5	14,9	3,3
	19	6,4	-14,0	43,5	+13,3	16,1	3,2
	20	5,2	-11,9	43,9	+14,9	15,6	3,3
	21	4,2	-11,4	44,0	+16,4	16,5	3,1

	22	3,4	-12,1	45,1	+15,9	16,0	3,3
	23	2,5	-16,4	43,4	+14,5	16,0	3,2
	24	1,5	-20,4	44,5	+13,3	15,8	3,3

OV-10-M2-R	1	38,7	-17,9	44,2	+7,8	15,9	3,2
	2	36,9	-18,6	44,2	+7,6	16,3	3,2
	3	35,4	-19,3	44,1	+7,2	16,0	3,2
	4	33,9	-20,6	42,2	+7,1	14,7	3,3
	5	32,1	-20,9	43,5	+7,1	14,9	3,4
	6	30,7	-21,1	43,7	+7,5	15,8	3,2
	7	28,7	-21,6	43,6	+7,4	16,1	3,2
	8	27,3	-21,8	43,3	+7,1	16,0	3,2
	9	25,7	-22,3	42,6	+7,3	14,9	3,3
	10	24,3	-22,6	43,1	+7,0	15,2	3,3
	11	22,6	-22,5	41,6	+7,4	15,0	3,2
	12	20,7	-22,5	43,7	+7,4	15,8	3,2
	13	19,3	-22,9	43,5	+7,1	15,8	3,2
	14	18,0	-23,0	43,7	+7,1	15,7	3,2
	15	16,6	-23,0	43,6	+7,0	15,4	3,3
	16	15,1	-22,7	43,7	+7,6	16,0	3,2
	17	13,8	-22,9	43,6	+7,1	15,9	3,2
	18	12,3	-22,5	43,4	+7,5	15,5	3,3
	19	11,1	-21,9	43,3	+8,2	14,7	3,4
	20	9,5	-21,5	43,8	+8,8	16,0	3,2
	21	8,4	-19,7	43,6	+10,3	15,3	3,3
	22	7,0	-18,7	43,2	+11,0	16,1	3,1
	23	5,5	-14,2	43,8	+13,7	16,1	3,2
	24	4,1	-11,7	44,6	+16,2	16,2	3,2
	25	2,7	-13,9	43,8	+15,9	16,3	3,1
	26	1,1	-18,9	44,3	+13,8	16,0	3,2

OV-11-M2-R	1	35,4	-20,4	43,9	+7,2	15,7	3,3
	2	33,8	-20,9	43,7	+6,8	16,0	3,2
	3	32,0	-21,1	43,6	+6,8	15,7	3,2
	4	30,4	-21,5	43,2	+6,6	15,8	3,2
	5	28,8	-21,7	43,5	+7,1	16,0	3,2
	6	27,5	-22,1	43,4	+6,9	15,8	3,2
	7	25,7	-22,4	44,0	+7,2	15,2	3,4
	8	23,9	-22,6	44,0	+6,9	15,6	3,3
	9	22,5	-22,7	44,2	+7,0	16,1	3,2
	10	21,0	-22,8	42,9	+7,0	15,1	3,3
	11	19,2	-22,9	44,6	+6,9	16,0	3,2
	12	18,1	-23,2	44,5	+6,5	15,5	3,3
	13	16,8	-23,0	44,7	+7,0	15,9	3,3
	14	15,6	-22,8	44,7	+6,9	15,9	3,3

15	14,5	-22,2	44,5	+7,4	16,0	3,2
16	13,3	-22,0	44,2	+7,8	15,7	3,3
17	12,1	-20,8	44,4	+8,9	15,6	3,3
18	11,0	-21,0	44,6	+8,7	15,6	3,3
19	9,9	-19,2	44,4	+10,2	15,4	3,3
20	8,4	-17,9	44,8	+10,9	16,0	3,3
21	7,4	-15,2	44,8	+12,5	15,8	3,3
22	6,1	-12,8	45,1	+14,7	15,9	3,3
23	5,1	-11,6	44,8	+15,6	16,0	3,2
24	3,6	-12,6	44,4	+15,8	16,0	3,2
25	2,3	-16,3	44,4	+14,5	15,5	3,3
26	1,2	-20,0	44,9	+12,9	15,5	3,4

Anexo VI

Resultados de los análisis isotópicos de las muestras de dentina de los M₁ (método drill) (Capítulo IV – 3).

Tabla 1. Composición isotópica de carbono y nitrógeno ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$), contenido de carbono y nitrógeno (%C and %N), y ratio C:N de las muestras de colágeno. Los valores mínimos y máximos de cada molar están marcados en negra.

ID specimen, tooth, laterality	ID sample	Distance from ERJ (mm)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	% C	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$	%N	C:N
OV-02-M1-L	1	26,7	-21,4	45,7	+9,5	16,0	3,3
	2	25,1	-20,6	45,3	+9,4	16,5	3,2
	3	23,7	-20,6	46,4	+9,6	16,2	3,3
	4	22,1	-20,1	45,4	+9,7	15,8	3,4
	5	20,3	-19,6	45,8	+9,3	15,7	3,4
	6	18,8	-19,4	44,8	+8,8	16,3	3,2
	7	17,2	-18,9	44,6	+8,9	15,7	3,3
	8	16,2	-18,7	44,2	+8,7	15,5	3,3
	9	14,1	-18,7	44,4	+7,8	15,9	3,3
	10	12,9	-17,4	45,2	+7,8	16,2	3,3
	11	11,2	-16,6	45,6	+7,8	16,4	3,3
	12	9,8	-16,4	46,0	+8,0	17,0	3,2
	13	8,3	-16,2	45,6	+8,3	16,5	3,2
	14	6,7	-16,2	45,7	+8,3	16,4	3,3
	15	5,3	-17,0	47,6	+8,0	16,3	3,4
	16	4,3	-18,0	48,6	+7,3	16,6	3,4
	17	2,5	-19,7	49,2	+7,6	16,5	3,5
	18	0,7	-21,1	49,6	+7,6	16,4	3,5
OV-03-M1-L	1	29,7	-21,8	44,7	+9,0	15,7	3,3
	2	27,8	-21,4	44,4	+9,2	16,3	3,2
	3	26,2	-21,0	44,4	+9,0	16,3	3,2
	4	24,4	-20,6	44,6	+8,9	16,3	3,2
	5	22,7	-20,1	44,9	+8,7	15,7	3,3
	6	21,1	-20,3	44,5	+8,3	16,2	3,2
	7	19,6	-19,5	44,2	+7,8	16,1	3,2
	8	17,9	-18,7	45,0	+7,1	16,1	3,2
	9	16,1	-17,2	45,3	+7,1	16,2	3,3
	10	14,6	-15,9	45,6	+7,6	16,7	3,2
	11	12,8	-15,1	44,5	+7,9	16,0	3,2
	12	10,9	-15,6	44,9	+7,8	16,4	3,2
	13	9,3	-16,8	44,9	+7,5	15,8	3,3

	14	7,9	-17,6	44,5	+7,1	15,6	3,3
	15	6,2	-19,5	45,3	+6,9	16,4	3,2
	16	4,8	-20,4	44,6	+7,1	16,5	3,1
	17	3,3	-21,3	45,0	+7,2	16,4	3,2
	18	1,9	-22,2	45,2	+7,1	16,2	3,3
	19	0,5	-23,0	45,0	+7,0	16,1	3,3
	20	-1,2	-23,4	45,1	+6,3	15,7	3,3
	1,0	27,9	-21,6	46,7	+9,2	16,7	3,3
	2,0	26,4	-21,2	45,5	+9,0	16,3	3,3
	3,0	24,9	-20,9	46,6	+9,3	16,8	3,2
	4,0	23,5	-20,8	45,3	+8,8	16,1	3,3
	5,0	21,8	-20,6	46,0	+9,0	16,7	3,2
	6,0	20,4	-20,1	45,6	+8,6	16,4	3,2
	7,0	18,9	-19,3	45,6	+7,8	16,3	3,3
	8,0	17,3	-18,9	46,5	+7,4	16,6	3,3
	9,0	15,6	-18,5	45,3	+7,3	16,7	3,2
	10,0	14,0	-17,6	44,7	+7,3	16,8	3,1
OV-04-M1-L	11,0	12,3	-17,4	43,5	+7,4	16,1	3,2
	12,0	11,1	-16,1	44,5	+7,7	16,2	3,2
	13,0	9,7	-15,4	44,7	+8,4	16,5	3,2
	14,0	8,5	-15,8	43,9	+8,3	16,3	3,1
	15,0	6,7	-15,4	45,2	+7,8	16,5	3,2
	16,0	5,2	-16,2	46,4	+7,4	17,6	3,1
	17,0	4,1	-18,1	45,3	+7,7	17,0	3,1
	18,0	2,5	-20,4	45,9	+8,0	17,0	3,1
	19,0	1,2	-21,6	45,4	+7,8	16,8	3,1
	20,0	-0,2	-22,3	45,4	+7,6	16,8	3,2
	21,0	-2,1	-22,8	46,2	+6,9	16,6	3,2
	1,0	27,8	-20,6	45,9	+9,1	17,0	3,2
	2,0	25,6	-20,5	45,8	+9,1	16,9	3,2
	3,0	23,9	-20,2	45,1	+9,0	16,6	3,2
	4,0	22,3	-20,3	45,3	+8,7	16,7	3,2
	5,0	20,9	-19,6	45,8	+8,5	16,9	3,2
	6,0	19,4	-19,6	46,6	+8,4	17,2	3,2
	7,0	17,9	-19,3	45,4	+8,0	16,6	3,2
OV-05-M1-L	8,0	16,4	-18,7	45,6	+7,6	17,1	3,1
	9,0	15,0	-17,7	45,7	+7,2	17,7	3,0
	10,0	13,7	-17,5	45,2	+7,3	16,6	3,2
	11,0	12,3	-16,4	46,2	+7,7	17,1	3,2
	12,0	10,9	-15,6	46,6	+8,2	17,1	3,2
	13,0	9,7	-14,6	45,8	+8,9	16,8	3,2
	14,0	8,5	-15,5	45,6	+9,0	17,0	3,1
	15,0	7,3	-15,8	45,6	+9,0	16,8	3,2

Anexo VII

Publicaciones.

RESEARCH ARTICLE

Intra-tooth isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth: A new experimental study with modern sheep specimens

Celia Díez-Canseco^{1,2}  | Mònica Aguilera³  | Carlos Tornero^{2,4} 

¹Departament d'Història i Història de l'Art, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

²Institut Català de Paleoecologia Humana i Evolució Social (IPHES-CERCA), Tarragona, Spain

³Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal | AGROTECNIO Center, Universitat de Lleida, Lleida, Spain

⁴Department of Prehistory, Autonomous University of Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain

Correspondence

Celia Díez-Canseco, Departament d'Història i Història de l'Art, Universitat Rovira i Virgili, Avinguda de Catalunya 35, Tarragona 43002, Spain.
Email: cdiezcanseco@iphes.cat

Funding information

Department of Culture, Generalitat de Catalunya, Grant/Award Numbers: 2017 SGR 836, CLT009/18/00048; Spanish Ministry of Science and Innovation, Grant/Award Numbers: RYC2020-029404-I, CEX2019-000945-M; Ministry of Science, Innovation, and Universities, Grant/Award Number: PGC2018-093925-B-C32; Fundació Atapuerca, Grant/Award Number: 2021-2022

Abstract

Hypsodont teeth molars develop in a short lapse of time. Both dentine and enamel dental tissues do not regenerate once formed. This fact allows the reconstruction of isotopic sequences covering short moments of the individual's life span, a useful approach in current zooarchaeological and paleontological studies. Sampling design usually follows a serial or sequential extraction of dental bands perpendicular to the tooth growth axis, from the apex to the root. However, dentine develops following a secretion of layers oblique to the tooth vertical axis, and this pattern makes hard to isolate isotopic signals. A new experimental study with modern sheep breeds was conducted, covering a whole year and where carbon and nitrogen isotopic signatures of consumed plants were known. Three diet periods with different isotopic compositions were alternated during sheep's life. In this contribution, we test the resolution of a dentine sampling procedure to obtain intra-tooth isotopic variability of $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$ values tied to diet shifts in sheep. Dentine was sequentially sampled in previously demineralized second and third mandibular molars. Samples were treated with standard protocols of collagen purification and then subjected to stable carbon and nitrogen isotope analysis. In M2 and M3 isotopic sequences obtained, diet shifts are recorded along two progressive trends of increasing–decreasing values, but some affections of the sampling procedure are also present. We conclude that the dentine sequential sampling here implemented allows for obtaining reliable intra-tooth isotopic data tied to dietary conditions in high-crowned teeth, although dentine growth patterns should be considered in detail in final interpretations. The integration of this high-resolution analysis in archaeological studies offers a new scope of possibilities for studying dietary patterns, seasonal dietary changes, and animal husbandry practices in past populations.

KEYWORDS

carbon and nitrogen isotopes, modern reference data set, sequential analysis, serial sampling, tooth dentine

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *International Journal of Osteoarchaeology* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION AND RESEARCH OBJECTIVES

During the last decades, biogeochemical analyses have shown a huge capability to investigate certain life conditions of past animal populations from archaeological faunal remains that were unreachable through traditional approaches. In zooarchaeological research, intra-tooth stable isotope analyses have become quite popular in hypsodont species because they allow for obtaining isotopic data with a high temporal resolution, in some cases with a seasonal extent, taking advantage from the growth dynamics of high-crowned teeth and the non-remodeling of the mineralized dental tissues. The possibility of obtaining biochemical data with an intra-annual resolution has turned these analyses into a powerful tool to investigate domestication processes and husbandry practices through the study of essential aspects of animal management, such as reproduction (Balasse et al., 2012, 2020, 2021; Blaise & Balasse, 2011; Tornero et al., 2013, 2020), feeding habits (Balasse, 2002; Balasse et al., 2009; Gillis et al., 2021; Makarewicz & Tuross, 2006; Navarrete et al., 2019), and mobility practices of domestic herds (Knockaert et al., 2018; Makarewicz et al., 2017; Tejedor-Rodríguez et al., 2021; Tornero et al., 2018), all three strongly tied to animal's seasonal cycles.

Nowadays, most intra-tooth or sequential stable isotope analyses performed on hypsodont species focus on inorganic compounds of teeth, commonly $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, or $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ measurements in bioapatite enamel. However, dentine also offers possibilities for intra-tooth analysis. Neither enamel nor dentine undergoes remodeling once mineralized except for diseases (Bada et al., 1990; Nanci & Causa, 2013; Witzel et al., 2018), so they both record the isotopic signal from ingested sources during the whole time period of teeth development. In contrast with enamel where inorganic fraction forms $\sim 97\%$, organic fraction forms up to $\sim 20\%$ of dentine composition by weight, closer to bone composition (LeGeros, 1981; Skinner, 2005). This feature favors obtaining $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values from dentine collagen through standard analytical techniques while obtaining high-temporal resolution data, an unfeasible goal in bone isotopic analysis considering bone remodeling rates. In addition, it is known that collagen isotopic composition reflects the protein part of diet (Ambrose & Norr, 1993; Tieszen & Fagre, 1993), so dentine may constitute a key tissue to complete the isotopic data spectrum in paleodietary studies developed through sequential analysis.

Despite the potential of implementing sequential analyses in dentine collagen, they have been scarcely performed in faunal remains regarding zooarchaeological research. Previous studies have been focused on defining weaning time in domestic cattle (Balasse et al., 2001; Balasse & Tresset, 2002; Gillis et al., 2013), feeding strategies on caprine herds (Makarewicz, 2014, 2017), or paleoenvironmental conditions in wild or free-range domestic specimens (Hopper et al., 2018; Kirsanow et al., 2008). The development of this analytical technique in high-crowned teeth has been limited by the shortage of methodological and experimental studies to support its archaeological implementation and to guarantee a reliable interpretation of the isotopic data. Sequential analysis on dentine is nowadays barely

understood because the technique needs to face an isotopic average resulting from mixing different dentine layers during sampling. In high-crowned teeth, dentine growth front is oblique to the vertical axis of molars, growing in width while the tooth is growing in length (Balasse et al., 2001; Kahle et al., 2018; Zazzo et al., 2006). This growth geometry complicates sampling following the natural deposition of dentine while obtaining samples with enough size to implement the standard collagen purification methods (Guiry et al., 2016).

Dentine's growth geometry makes difficult an alternative sampling: dentine thickness in one semi-lobule reaches around 1–1.5 mm wide (depending on the growth stage) and discriminating certain layers of dentine appositions becomes a complex challenge (e.g., Zazzo et al., 2006). Recent approaches implementing sequential dentine analysis in human molars develop the sampling by slicing sections of approximately 0.5–1 mm thickness following incremental layers of dentine (Czermak et al., 2018). However, this methodology is hardly suitable for hypsodont molars, where it is not possible to isolate incremental layers by hand (accumulated in less than 2 mm of dentine) and where it would become impossible to replicate a homogeneous sampling between different individuals, even using high-resolution transmission microscopy image (obtained prior to demineralization) as a reference. In addition, sample size obtained through these approaches implies omitting gelatinization, filtration, or NaOH steps during sample treatment (Czermak et al., 2018; Fernández-Crespo et al., 2018, 2020); all of them standardized steps accepted as beneficial and necessary to obtain reliable isotopic measurements. Drilling samples from teeth in a longitudinal axis would be more suitable for species with hypsodont teeth, but some problems turn up when implementing the demineralization of powder micro-samples by standard protocols in order to obtain reliable $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values from dentine (Guiry et al., 2016).

These histological complications require some methodological efforts focused on untangling isotopic data resulting from the sampling protocols implemented in dentine. This study aims to develop a referential set of data for implementing sequential analysis of dentine collagen in hypsodont species, caprines in particular, to support its later archeological implementation. Our specific objective is to refine a main aspect related to the methodology: the relation between the isotopic input and the isotopic composition of the collagen serial samples obtained through the standard sampling and treatment protocol first developed by Balasse et al. (2001).

To achieve this proposal, we developed a new study with modern sheep specimens performing sequential stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) on tooth dentine collagen. This is the first study implementing intra-tooth analysis of dentine in experimental sheep raised under controlled life conditions and where the diet isotopic composition is known. This study focuses on post-weaning diet and covers a feeding schedule of 12 months where three fodder types with different isotopic compositions are alternated, introducing abrupt changes on sheep's diet in a 1-year time span. High-resolution isotopic data related to these diet changes are expected in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of dentine collagen.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | The SUMA modern reference herd

Between 2017 and 2019, an experimental animal science program with a modern reference set of *Ovis aries* (Linnaeus, 1758) specimens with known life conditions was developed at the Farm Services and Experimental Fields facilities of the Autonomous University of Barcelona (UAB), settled in Barcelona, Spain. This program was named SUMA and was designed by Dr. Carlos Tornero to implement several methodological studies dealing with sheep dietary reconstruction in zooarchaeological studies (e.g., Gallego-Valle et al., 2020). The different studies carried on were approved by the Animal Care and Use Committee from UAB. All investigated specimens belong to *ripollesa* sheep breed, a local breed from NE Spain traditionally oriented to lamb production and meat exploitation (Caja et al., 2010; Esquivelzeta et al., 2011). The specimens used in this study come from a flock of 12 female sheep raised in a stall where diet conditions were controlled from October 2017 to November 2018.

The weaning age of the lambs was 2 months. Post-weaning diet consisted of three different monospecific diet periods, which alternate C₃ and C₄ plants. The sheep fed on alfalfa (*Medicago sativa*) (DIET1) during the first 10.5 months of life following weaning; C₄ diet period based on foxtail millet (*Setaria italica*) (DIET2) followed during the next 4 months; the last 4.5-month period the sheep fed on barley (*Hordeum vulgare*) (DIET3). The detailed diet schedule is shown in Figure 1. Fodder was provided by local agri-food companies using verified and numbered fodder bales. Fodder was daily supplied in general troughs where sheep ate ad libitum. During DIET1 and DIET2, fodder consisted of hay, thus including the whole plant. DIET3 was based on straw (mostly leaves and stems) but daily complemented with 1 kg of grain per specimen. Grain supplement was recommended to counteract the low nutritional contribution of barley straw to sheep's diet. Fodder origin was relatively stable during each diet period: each fodder type derived from the same supplier and same batch. Three specimens of this flock were selected to perform isotopic analyses: OV-08 (ID 711-170110), OV-07 (ID 704-170048), and OV-11 (ID 706-170080). They were born between March 1 and March 10, 2017, and they were slaughtered between November 7 and

November 21, 2018, at 20.3 (OV-08), 20.5 (OV-07), and 20.9 (OV-11) months of age.

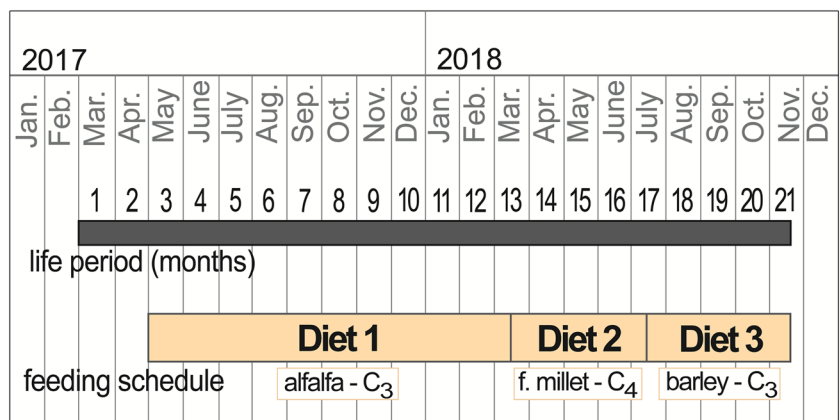
2.2 | Fodder sampling and isotopic measurements

Fodder supplied to sheep during the three diet periods was sampled for δ¹³C and δ¹⁵N analyses. Fodder samples were collected from troughs from November 2017 until sheep's slaughtering. A total number of 40 fodder samples were analyzed, belonging to the four diet components: alfalfa, foxtail millet, barley straw, and barley grains. Each sample plot included at least five individuals and the representation of the whole plant in the case of alfalfa and foxtail millet, leaves and stems in barley-straw, and the whole grain in barley-grains. Samples were oven-dried, milled, weighted, and placed in tin capsules for subsequent analysis. δ¹³C and δ¹⁵N signatures in fodder samples were measured using a Thermo Flash 1112 elemental analyzer (EA) coupled to a Thermo Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer (IRMS) with a ConFlo III interface at the Institute of Environmental Science and Technology (ICTA-UAB) (Barcelona, Spain). The international standard laboratory IAEA 600 (caffeine) was used as control. The average analytical error was <0.15‰ (1σ) calculated for each isotopic measurement, δ¹³C and δ¹⁵N separately. δ¹³C values are expressed relative to Vienna PeeDee Belemnite (V-PDB) standard and δ¹⁵N values relative to air N₂ (AIR): $\delta \chi^{1/4} (R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1) \times 1000\%$, where χ stands for ¹³C or ¹⁵N and R stands for ¹³C/¹²C or ¹⁵N/¹⁴N.

M. sativa is a C₃ leguminous plant (N₂-fixing-plant), *H. vulgare* is a C₃ plant, and *S. italica* is a C₄ plant, the last two from *Poaceae* family. Our study foresaw important differences in δ¹³C values between the three species according to their photosynthetic pathway (Farquhar et al., 1989; O'Leary, 1981). Further, low values in δ¹⁵N values were expected in alfalfa according to N₂-fixing-plant condition (Kohl & Shearer, 1980; Virginia & Delwiche, 1982).

Some differences in δ¹³C and δ¹⁵N values are also expected between both components of DIET3, barley grains and straw, according to the different isotopic composition reported between the different organs of plants (Codron et al., 2005; Heaton, 1999; Lightfoot et al., 2016). Taking into account that collagen isotopic

FIGURE 1 Life span period for the three sheep specimens analyzed in this study and duration of the three diet periods settled during the experimental program: DIET1, alfalfa; DIET2, foxtail millet; DIET3, barley [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



composition mainly reflects protein fraction of diet (Ambrose & Norr, 1993; Codron et al., 2018; Jim et al., 2004; Tieszen & Fagre, 1993), the estimation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of the whole DIET3 was made considering the different protein contribution of straw and grain to the diet based on (1) their different protein content and (2) the different weight (g) contribution of both components. Protein contribution was estimated from the %N values (Balasse et al., 2001; Conklin-Brittain et al., 1999) and from dry matter (DM) content of barley forages (data extracted from National Research Council, 1985). Sheep daily ate the whole supplement of grain, that is, 1 kg (DM = 880 g). Because straw is supplied ad libitum, we estimated the daily DM voluntary intake of sheep following method from Minson (1990): $\text{DMI} = 60 \text{ g/kg W}^{0.75}$ (DMI, dry matter intake; W, bodyweight = ~60 kg).

2.3 | Dentine sampling and collagen isotopic analyses

Sheep mandibles were separated from the skull, partially defleshed, and boiled in distilled water for several hours. Second (M2) and third (M3) left mandibular molars were selected for analysis. At the time of death, M2s were partially worn, and enamel-root junction (ERJ) was recently formed. Roots were in an early stage of development at the time of death, barely exceeding the ERJ. M3 presents an early stage of eruption, the cuspids are slightly or not worn, and around 2/3 parts of the crown are formed (Figure 2).

The posterior lobe of M2 and anterior lobe of M3 were cut and separated from the tooth using a diamond disc. Teeth sampling and samples treatment were performed at the Biomolecular Laboratory of the Catalan Institute of Human Palaeoecology and Social Evolution (Tarragona, Spain). Dentine was sampled following Balasse et al. (2001). The selected lobes were demineralized in EDTA (0.5 M, pH 8) at room temperature (Tuross et al., 1988). The solution was renewed

every 2–5 days. Complete demineralization took about 2 months for the M2 lobe and about 1 month for the M3 lobe. Once demineralized, the lobes were intensely rinsed with distilled water, including a soak in distilled water for a week, in order to remove EDTA completely. Sampling was then performed with a scalpel by cutting the buccal part of each lobe in 2-mm sections, following the vertical axis (i.e., from the top to the bottom of the tooth). A total of 18 to 20 samples were obtained in M2 molars and 14 samples in M3. In M2 lobes, the distance of the root base from ERJ was measured before demineralization. During sampling, the base of the sampled buccal lobe was considered as reference. Sample position was then expressed as distance from ERJ to allow for comparison between molars. Cuspid was used as reference for M3 sampling, because M3 molars were not worn or presented slight wear without compromising the tooth length. Each sample was soaked in 0.125M NaOH for 20 h at room temperature in order to remove some lipids (Ambrose, 1990; Ambrose & Norr, 1993) and then rinsed again with distilled water several times. Samples were homogenized by solubilization in a HCl 10^{-2} M solution (pH 2), at 100°C for 17 h (Bocherens et al., 1991), then filter and freeze-dried. A total of 80 samples were taken for isotopic analyses. Around 300 μg of collagen was weighed into 6×4 -mm tin capsules. Stable isotope measurements, notation, and standards used for δ calculation are described in previous Section 2.2. The average analytical error was also $<0.15\%$ (1σ) for each isotopic measurement, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ separately. The reliability of the isotopic signatures of the collagen extracts was addressed using carbon and nitrogen content values and the atomic C/N ratio, settled $3.1 < \text{C/N} > 3.5$. It was not possible to calculate the % of collagen yield because sampling was carried out once the whole tooth was demineralized.

3 | RESULTS

3.1 | Fodder $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values

The isotopic results from fodder samples are shown in Table 1. Alfalfa, foxtail millet and barley-straw samples provide $\delta^{13}\text{C}$ mean values of $-28.9 \pm 0.83\%$, $-13.1 \pm 0.30\%$, and $-28.2 \pm 0.41\%$, respectively, and $\delta^{15}\text{N}$ mean values of $+1.2 \pm 1.48\%$, $+11.7 \pm 0.74\%$, and $+3.6 \pm 1.78\%$, respectively. Barley-grain samples provide higher mean values than barley-straw samples, both in $\delta^{13}\text{C}$ ($-25.6 \pm 0.11\%$) and $\delta^{15}\text{N}$ ($+7.5 \pm 0.33\%$).

The two sampled C_3 plants species, alfalfa and barley, show large differences with C_4 foxtail millet, both in their $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values. The ^{13}C content is in accordance with their different photosynthetic pathways of C_3 – C_4 plants (Farquhar et al., 1989; Kohn, 2010). Both C_3 plants, alfalfa and barley, present similar $\delta^{13}\text{C}$ values around -28% (-25% in the case of grain). As for nitrogen isotope composition, DIET1-alfalfa shows the lowest $\delta^{15}\text{N}$ values, in accordance with N_2 -fixing-plants isotopic composition (Kohl & Shearer, 1980; Virginia & Delwiche, 1982). Differences in $\delta^{15}\text{N}$ values between DIET2-foxtail millet and DIET3-barley, both cereals and non- N_2 -fixing



FIGURE 2 Stage of tooth development of one of the individuals analyzed (OV-08). All three individuals showed similar development of M2 and M3 molars [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://www.wileyonlinelibrary.com)]

TABLE 1 Carbon and nitrogen isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of sampled components supplied during DIET1, DIET2, and DIET3: Mean values and standard deviation (\pm), min. and max. values, and ranges of variation

		n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			
			Mean \pm SD	Min.	Max.	Range	Mean \pm SD	Min.	Max.	Range
DIET 1	Alfalfa	3	-28.9 ± 0.8	-29.4	-27.9	1.5	$+1.2 \pm 1.5$	-0.5	+2.5	2.9
DIET 2	Foxtail millet	9	-13.1 ± 0.3	-13.5	-12.6	0.9	$+11.7 \pm 0.7$	+10.6	+12.8	2.2
DIET 3	Barley-straw	12	-28.2 ± 0.4	-28.7	-27.5	1.2	$+3.6 \pm 1.8$	+1.5	+7.0	5.4
	Barley-grain	16	-25.6 ± 0.1	-25.8	-25.4	0.4	$+7.5 \pm 0.3$	+7.1	+8.2	1.1

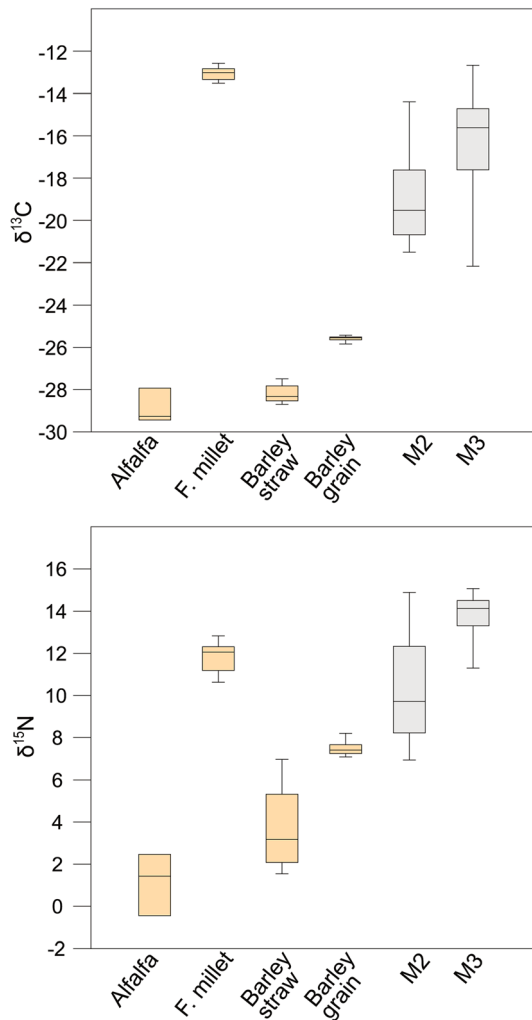


FIGURE 3 Box plot showing $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for the four fodder types analyzed and for the collagen samples of the three sheep specimens plotted by sampled molar [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

plants, probably refer to different field origin and soil conditions of both crops types (manure intensity or natural abundance of ^{15}N in soil) (Bogaard et al., 2007; Handley et al., 1999; Handley & Scrimgeour, 1997; Treasure et al., 2016), more than referring differences in the plant physiology (Terra et al., 2000). The same explanation regarding differences in soil conditions applies to the

intra-specific variability existing in $\delta^{15}\text{N}$ values (Figure 3), because several bales of hay and straw were employed for fodder supplies during each period.

The two barley components—grain and straw—involved in DIET3 present large differences in their $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values. In this sense, it is important to underline that most protein contribution to sheep's diet will come from grain, considering two main aspects. (1) Based on the different nitrogen content (%N) of the two components, we can assume a larger crude protein content present in grain (CP of 12.3%) than in straw (CP of 2.5%) (following Kjeldahl method, Conklin-Brittain et al., 1999). (2) Considering a daily voluntary intake of 1.3 kg of DM for each sheep specimen (Minson, 1990), a larger daily intake of grain in relation to straw should be expected. The isotopic composition estimated for the whole DIET3 according to the different protein contribution of the two components is shown in Table 2. We are aware that some differences could exist between $\delta^{13}\text{C}_{\text{whole-plant}}$ (bulk sample) and $\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}$ (Fagre et al., 1991), so plant carbon isotopic results are not fully representative of the real isotopic contribution coming from protein.

3.2 | Dentine collagen $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values

Carbon and nitrogen isotopic composition, carbon and nitrogen content values, and C:N ratios from dentine collagen samples are presented in Table 3. All samples present carbon content values, nitrogen content values, and C:N ratios according to modern collagen data (Ambrose, 1990; Van Klinken, 1999). All samples yield C:N ratios between 3.1 and 3.4. Carbon content (in wt% C) ranges from 44.8% to 24.9% (mean $36.8 \pm 3.45\%$), and nitrogen content (in wt% N) ranges from 16.2% to 9.3% (mean $13.5 \pm 1.21\%$).

Collagen samples from M2 molars present mean values of $-19.0 \pm 2.04\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $+10.3 \pm 2.46\%$ in $\delta^{15}\text{N}$ (Table 4). Collagen samples from M3 are slightly enriched in ^{13}C , showing mean values of $-16.4 \pm 2.42\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $+13.8 \pm 0.92\%$ in $\delta^{15}\text{N}$. Serial samples yield high intra-tooth isotopic variation in both second and third molars (Figure 3) as a consequence of the different feeding periods involved in sheep's diet: in M2 samples, $\delta^{13}\text{C}$ values range from -21.5% to -14.4% and $\delta^{15}\text{N}$ values range from $+6.9\%$ to $+14.9\%$; in M3 samples, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values range from -22.2% to -12.7% and from $+11.3\%$ to $+15.1\%$, respectively.

TABLE 2 Mean isotopic composition of whole DIET3 based on the different protein contribution of the two components supplied to sheep (straw, grain)

		Weight (g)	Dry matter ^a intake (g)	%N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Protein contribution
Barley	Straw	Ad lib.	420	0.4	-28.2	+3.6	8%
	Grain	1000	880	2.0	-25.6	+7.5	92%
Isotopic composition from protein part of DIET3					$\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{protein}}$	
					-25.8‰	+7.2‰	

Note: Dry matter intake of straw (supplied ad libitum) has been estimated considering a daily voluntary intake of 1.3 kg for each sheep specimen (following Minson, 1990). Mean carbon isotopic composition for the protein part of DIET3 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{protein}}$) is an estimation (see text).

^aDry matter content of barley forages from NRC (1985).

TABLE 3 Carbon and nitrogen isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$), carbon and nitrogen content values (%C and %N), and C:N ratio of collagen samples

	M2						M3					
	Dist. from ERJ (mm)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%C	%N	C:N	Dist. from cuspid (mm)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%C	%N	C:N
OV-07	38.0	-20.2	+7.0	38.3	14.0	3.2	1.5	-15.8	+11.7	38.6	14.0	3.2
	34.0	-20.5	+7.8	40.2	14.6	3.2	4.3	-15.4	+13.3	32.7	11.9	3.2
	30.3	-20.7	+8.0	39.1	14.3	3.2	6.5	-14.6	+13.9	36.3	13.3	3.2
	26.5	-20.9	+8.3	38.9	14.2	3.2	8.3	-14.5	+14.3	39.8	14.6	3.2
	23.0	-20.5	+9.1	39.9	14.5	3.2	10.3	-15.0	+14.5	30.2	11.2	3.1
	19.3	-19.6	+9.8	44.8	16.2	3.2	12.5	-15.2	+14.6	40.4	14.7	3.2
	17.0	-19.1	+10.4	40.0	14.5	3.2	14.8	-15.5	+14.5	37.2	13.8	3.1
	15.0	-18.4	+11.1	41.1	14.9	3.2	17.0	-16.0	+14.6	26.7	9.7	3.2
	13.0	-18.1	+11.8	42.1	15.1	3.3	20.8	-17.8	+14.1	37.6	13.7	3.2
	11.0	-18.0	+11.9	39.5	14.3	3.2	25.0	-20.4	+13.0	28.3	10.5	3.1
	8.8	-17.4	+12.3	40.2	14.4	3.2	29.8	-20.9	+13.4	24.9	9.3	3.1
	6.3	-16.2	+13.7	37.9	13.8	3.2						
	4.0	-15.0	+14.7	37.8	13.7	3.2						
1.5	-17.9	+14.2	41.9	15.2	3.2							
OV-08	35.1	-20.4	+8.0	36.7	13.6	3.1	1.3	-15.6	+11.3	33.6	12.4	3.2
	31.6	-20.6	+8.5	39.0	14.3	3.2	3.2	-14.7	+13.0	36.4	13.5	3.2
	28.4	-20.7	+8.6	39.9	14.5	3.2	4.4	-14.4	+13.6	38.3	14.2	3.1
	24.3	-20.7	+8.6	35.7	13.2	3.2	6.0	-14.0	+14.2	36.8	13.7	3.1
	20.8	-20.4	+8.9	36.9	13.6	3.2	8.5	-14.0	+14.7	38.0	14.0	3.2
	17.8	-19.8	+9.2	38.4	14.1	3.2	10.6	-14.7	+14.9	41.0	15.1	3.2
	15.8	-19.4	+9.4	36.9	13.7	3.1	12.3	-14.9	+14.9	35.7	13.3	3.1
	14.0	-18.7	+10.2	34.3	12.8	3.1	13.7	-15.7	+15.1	37.8	14.0	3.2
	12.3	-18.2	+10.6	30.6	11.3	3.1	17.0	-16.7	+14.9	35.2	13.1	3.1
	11.1	-17.6	+11.3	34.9	13.0	3.1	21.4	-18.9	+14.2	39.2	14.4	3.2
	9.7	-16.7	+12.3	34.5	12.7	3.2	27.0	-20.4	+14.1	31.3	11.7	3.1
	7.6	-15.6	+13.4	37.0	13.7	3.2						
5.5	-14.4	+14.5	34.6	12.8	3.2							
3.5	-15.6	+14.9	32.4	12.0	3.1							
1.3	-19.1	+14.0	34.7	12.8	3.2							
OV-11	36.0	-21.4	+6.9	37.2	13.6	3.2	1.5	-12.7	+13.4	40.8	15.0	3.2
	33.3	-21.4	+7.3	35.6	13.0	3.2	4.0	-14.2	+14.0	39.5	14.5	3.2
	31.5	-21.5	+7.5	36.7	13.4	3.2	6.0	-14.9	+13.9	38.1	14.2	3.1

TABLE 3 (Continued)

M2						M3					
Dist. from ERJ (mm)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%C	%N	C: N	Dist. from cuspid (mm)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%C	%N	C: N
29.6	-21.3	+7.5	37.8	13.8	3.2	7.7	-15.2	+14.2	38.0	14.1	
27.4	-21.5	+7.6	36.7	13.4	3.2	9.7	-15.7	+14.2	37.0	13.6	3.2
25.4	-21.4	+7.9	35.9	13.2	3.2	12.0	-16.0	+14.2	38.6	14.3	3.1
22.9	-21.1	+8.1	37.3	13.7	3.2	13.5	-16.3	+14.4	39.9	14.7	3.2
20.3	-20.8	+8.4	38.1	14.1	3.2	15.0	-17.4	+13.9	41.6	15.1	3.2
18.3	-20.7	+8.5	36.2	13.4	3.2	19.5	-20.1	+12.7	38.0	14.1	3.1
16.2	-20.2	+8.9	36.6	13.5	3.2	24.0	-20.7	+12.5	35.6	13.2	3.1
14.1	-19.2	+9.6	37.5	13.9	3.1	28.5	-22.2	+12.4	30.1	10.4	3.4
11.9	-18.2	+10.6	36.2	13.3	3.2						
9.8	-17.6	+11.7	35.4	13.1	3.2						
8.3	-16.4	+12.6	36.9	13.7	3.1						
6.1	-15.1	+14.0	37.3	13.7	3.2						
3.5	-16.4	+14.1	35.6	13.1	3.2						
1.2	-20.3	+12.0	31.4	11.9	3.1						

Note: Minimum and maximum isotopic values are shown in bold. Distance (dist.) from ERJ in M2 and from cuspid in M3 represents the intermediate point between sections.

TABLE 4 Summary table showing mean collagen isotopic values, standard deviation, and range for the three individuals and teeth analyzed

		n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		
			Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
OV-07	M2	14	-18.7	1.8	5.9	+10.7	2.5	7.6
	M3	11	-16.5	2.3	6.4	+13.8	0.9	2.9
OV-08	M2	15	-18.5	2.1	6.3	+10.8	2.4	6.9
	M3	11	-15.8	2.1	6.4	+14.1	1.1	3.8
OV-11	M2	17	-19.7	2.1	6.4	+9.6	2.4	7.1
	M3	11	-16.9	3.0	9.5	+13.6	0.7	1.9

The three sheep individuals show similar intra-tooth isotopic variation as expected from animals raised and fixing isotopic signatures under identical conditions: (1) the range of variation for the three individuals present mean values of 6.2 ± 0.26 and 7.4 ± 1.77 in $\delta^{13}\text{C}$ and 7.2 ± 0.38 and 2.9 ± 0.93 in $\delta^{15}\text{N}$, M2 and M3, respectively; (2) according to maximum values, inter-individual variability is $\leq 0.7\%$ and $\leq 1.8\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $\leq 0.8\%$ and $\leq 0.7\%$ in $\delta^{15}\text{N}$, M2 and M3, respectively; according to minimum values, inter-individual variability is $\leq 0.8\%$ and $\leq 1.8\%$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $\leq 1.0\%$ and $\leq 1.1\%$ in $\delta^{15}\text{N}$, M2 and M3, respectively.

Intra-tooth isotopic sequences for each individual are presented in Figure 4. In all sampled specimens, isotopic variation along the M2 molars follows a progressive increase in the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values along most part of the crown, followed by an abrupt decrease represented in the last 2–4 mm. In the M3 crowns, sequences show a short ascendant trend in $\delta^{13}\text{C}$ values during the first 8 mm (except for OV-11) then interrupted by a sudden deviation into a trend of

decreasing values. In $\delta^{15}\text{N}$ values, the M3 sequences show a short increase until forming a “plateau” in the middle of the crown, followed by a less accentuated decrease –both in amplitude and extension– than in $\delta^{13}\text{C}$ values.

Minimum $\delta^{13}\text{C}$ values recorded in sheep dentine samples from the first part of the M2 sequences show a mean of $-21.0 \pm 0.43\%$, consistent with a C_3 diet. Mean maximum $\delta^{13}\text{C}$ values in M2s ($-14.8 \pm 0.38\%$) and M3s ($-13.7 \pm 0.93\%$) are consistent with an important intake of C_4 plants in sheep's diet. Last samples of M2 and M3 crowns show again low $\delta^{13}\text{C}$ values closer to a consumption of C_3 plants ($-19.1 \pm 1.19\%$ and $-21.1 \pm 0.92\%$, respectively). As for $\delta^{15}\text{N}$, minimum values are recorded in the first part of M2 crowns and show a mean of $+7.3 \pm 0.58\%$, while the maximum values recorded in the last mm of M2s show a mean of $+14.5 \pm 0.43\%$. In M3 crowns, maximum values of $\delta^{15}\text{N}$ provide a mean of $+14.7 \pm 0.36\%$, whereas last samples yield $\delta^{15}\text{N}$ mean values of $+13.3 \pm 0.84\%$.

Celia Díez-Canseco Esteban

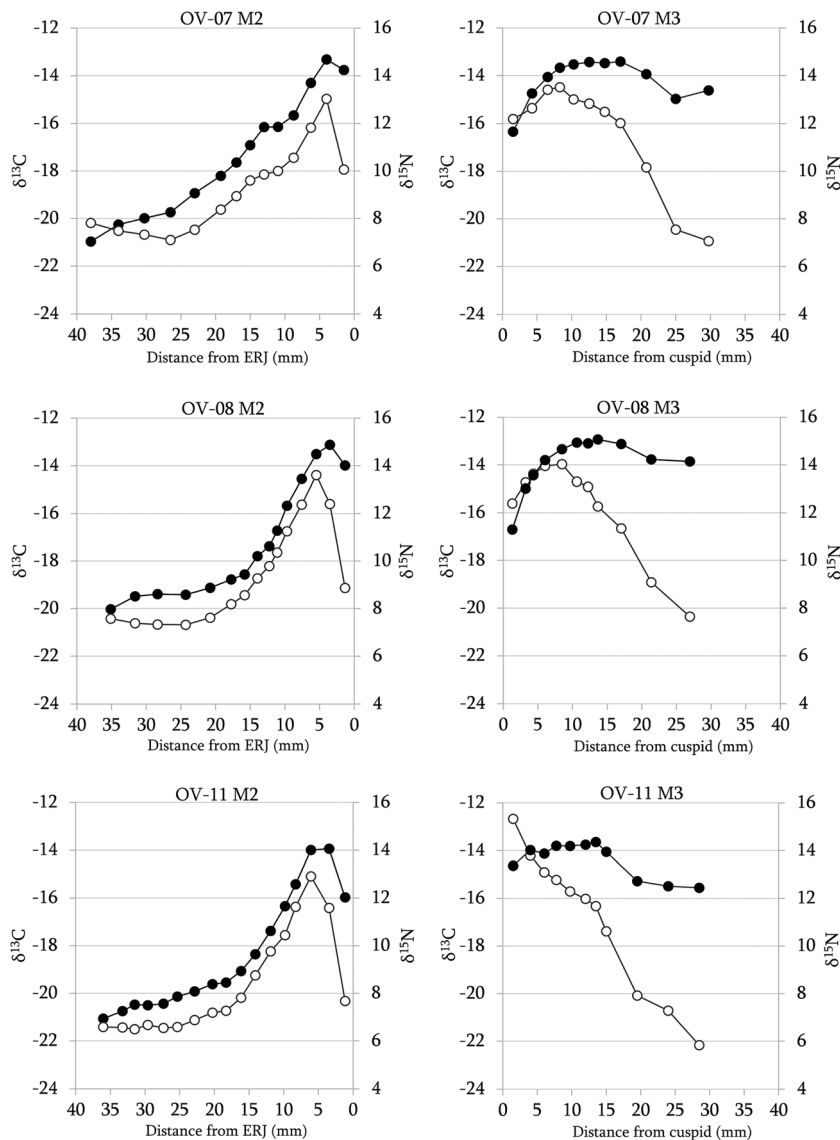


FIGURE 4 Sequential $\delta^{13}\text{C}$ (white) and $\delta^{15}\text{N}$ (black) values measured in collagen along the crown of the second (M2) and third (M3) molars of the three sheep specimens analyzed (OV-07, OV-08, OV-11)

4 | DISCUSSION

4.1 | Intra-tooth isotopic variation related to diet shifts

The pattern of intra-tooth variation of $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$ obtained through dentine sequential sampling fits well with the differences observed between fodder types in their carbon and nitrogen isotopic composition. Diet shifts—succession of DIET1, DIET2, and DIET3—are recorded in the M2 and M3 isotopic sequences along two progressive trends of increasing-decreasing values in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Collagen highest isotopic values recorded in both molars necessarily correspond to the DIET2 signature entirely based on a C_4 plant enriched in ^{15}N (foxtail millet). DIET1 period based on alfalfa is mainly recorded in the first half of M2 crown by low values, whereas DIET2 and DIET3 (barley) are mainly recorded through the last part of the M2 and along the whole crown of the M3. In third molars samples, the smaller range of variation of nitrogen isotopic values compared

with carbon values is also consistent with plant data, where the isotopic variation between DIET2-millet and DIET3-barley is much larger in $\delta^{13}\text{C}$ values than in $\delta^{15}\text{N}$ values.

The oscillation pattern of carbon and nitrogen values found along the M2 and M3 sequences is highly uniform for all three sampled individuals. In addition to the identical dietary conditions existing for all sheep, this aspect suggests that sampled animals followed similar patterns of crown formation. Inter-individual variability in maximum and minimum values is $\leq 1.0\text{‰}$ for M2s and $\leq 1.8\text{‰}$ for M3s, in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$; however, it is worth noting that excluding OV-11, inter-individual variability in M3s is reduced to $\leq 0.6\text{‰}$ in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Similar small inter-individual isotopic differences between same species specimens raised under the same dietary conditions have already been noticed in collagen composition (for small mammals with monoisotopic diets: Ambrose & Norr, 1993; Tieszen & Fagre, 1993; for medium-large mammals with non-monoisotopic diet: Balasse et al., 2001; Doherty et al., 2022; Von Holstein et al., 2013; Webb et al., 2016) or other proteinaceous tissues (Sponheimer, Robinson,

Ayliffe, Passey, et al., 2003; Sponheimer, Robinson, Ayliffe, Roeder, et al., 2003), as a result of individual metabolic and physiological factors affecting the final tissue isotopic composition. Moreover, the dissimilarities seen in the M3 of OV-11 against the others M3s of OV-07 and OV-08—both in the oscillation pattern and in the max. and min. isotopic values—are probably related to a slightly-later development of this third molar in OV-11, a scenario where the first diet isotopic signature previous to the 13th month would be absent. Previous studies have shown a larger variability in the M3 growth timing than in M2 within sheep populations (Milhaud & Nezeit, 1991; Weinreb & Sharav, 1964; Zazzo et al., 2010), a feature also observed through isotopic approaches (Blaise & Balasse, 2011; Tornero et al., 2013).

DIET2 and DIET3 periods are represented in the isotopic sequences over a different length (in mm) between second and third molars, despite representing the same time span in both molars (4 months span each period). This fact is well consistent with the variable tooth growth rates existing along the crown, where the deposition rate of dentine is higher during the first months of tooth development than towards the latest growth stages when the growth rate decreases (Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018). This histological feature (i.e., attenuation of the crown growth rate) results in a more prolonged representation of a certain isotopic signature in the upper part of the crown, while the same time span would be cramped in the last part of the tooth. This trend has also been highlighted in previous works implementing enamel sequential analysis in hypsodont species, due to similar differential growth rates of this tissue along the tooth crown (Balasse, 2003; Bendrey et al., 2015; Zazzo et al., 2010). Our study found that, as for enamel, when implementing dentine sequential analysis in sheep, the dental growth stage when diet variations occur determines the representation of the isotopic signatures in the sequences, not only in their position in the crown but also in their length. Hence, dentine growth rates must be considered in final interpretations.

4.2 | Effects of the sampling approach on intra-tooth isotopic variation

In both M2 and M3, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values obtained from collagen samples show a quite reduced range of variation in contrast with the large isotopic differences existing between each diet period. Results from fodder analysis show that diet changes entailed drastic shifts in the sheep's isotopic input. For the first and second diet change, respectively, an input variation of around $\sim 15.8\text{‰}$ and $\sim 12.7\text{‰}$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $\sim 10.5\text{‰}$ and $\sim 4.5\text{‰}$ in $\delta^{15}\text{N}$ could be expected. However, dentine samples obtained through sequential sampling hardly reach such ranges of variation in their isotopic values. Collagen shows, in M2 and M3, respectively, a maximum range of 7.1‰ and 9.5‰ in $\delta^{13}\text{C}$ values and a maximum range of 7.9‰ and 3.8‰ in $\delta^{15}\text{N}$ values.

This observation is mainly related to the effect that the sampling procedure here implemented is having on the isotopic intra-tooth variation. Dentine is deposited by apposition of layers oblique to pulp cavity and therefore oblique to the tooth vertical axis, a growth model

previously demonstrated through histological observations (Kahle et al., 2018; Weinreb & Sharav, 1964; Witzel et al., 2018) and through dentine isotopic data (Balasse et al., 2001; Balasse & Tresset, 2002; Zazzo et al., 2006). As a result, when a longitudinally sampling procedure cross-cuts the whole dentine thickness, it causes the admixture of dentine increments synthesized in different moments of life. Therefore, it is expectable that in our study—performed during 1 year—dentine samples from M2 and M3 may yield isotopic values from more than one feeding period, depending on the position of the samples in the tooth crown. When this dentine admixture affects samples yielding maximum and minimum isotopic values, it results in shorter ranges of intra-tooth variation than expected based on diet input.

This fact is most evident in the highest $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ values, too depleted to represent the C₄ diet period exclusively (DIET2), both in M2s samples (mean observed diet-collagen enrichment: $\Delta^{13}\text{C}_{\text{diet2-collagen}} = -1.7 \pm 0.38\text{‰}$) and M3s samples (mean observed diet-collagen enrichment: $\Delta^{13}\text{C}_{\text{diet2-collagen}} = -0.6 \pm 0.93\text{‰}$). These values seem quite depleted taking into account that a diet-collagen enrichment of 3–5‰ should be expected in $\delta^{13}\text{C}$ in primary consumers (Ambrose & Norr, 1993; Bocherens & Mariotti, 2002; Froehle et al., 2010; Lee-Thorp et al., 1989; Tieszen & Fagre, 1993). Considering dentine growth geometry, in these samples, the DIET2 isotopic signature is probably attenuated because of some incorporation of later increments representing DIET3, more depleted in ^{13}C . As a sampling-related issue, similar attenuation may exist in maximum values of $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$, although in this case, the diet-collagen differences are larger (attending max. Values: $\Delta^{15}\text{N}_{\text{diet2-collagen}} = 1.4 \pm 0.43\text{‰}$ in M2s and $\Delta^{15}\text{N}_{\text{diet2-collagen}} = 1.6 \pm 0.36\text{‰}$ in M3s) and somewhat more coherent with usual $\delta^{15}\text{N}$ enrichment values. The interference of DIET3 signature in maximum values of $\delta^{15}\text{N}$ is here less evident, probably because DIET2 and DIET3 present more similar isotopic values in $\delta^{15}\text{N}$ than in $\delta^{13}\text{C}$.

A similar sampling effect could also be expected in both minimum $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of M2s, according to the dentine growth pattern and the position of these samples in the first part of M2 crowns. Here, they may include some dentine increments developed during the following diet periods, therefore yielding higher isotopic values than expected from DIET1 when isolated. For the same histological reason, samples from the last part of the crown should, in contrast, include less dentine admixture, because dentine is here thinner and represents only the final growth development (for illustrating dentine growth geometry, cf. Kahle et al., 2018, and Witzel et al., 2018).

Finally, it is worth noting that in the 20-month-old sheep specimens analyzed here, dentine does not exceed ERJ either in second or third molars at death time. However, dentine continues developing along the whole life of the individuals, conforming the roots and narrowing the pulp chambers and the root canal (Hillson, 2005; Milhaud & Nezeit, 1991). Therefore, when applying this sampling procedure, isotopic variations obtained from dentine will be progressively attenuated as the tooth continues developing and growing in thickness with the apposition of new dentine. Our study suggests that tooth development stages should be considered in order to implement

dentine isotopic sequential analysis in sheep, and younger specimens should be preferably selected when possible.

4.3 | Temporal resolution

The diet changes induced on sheep were abrupt, produced in 1 day. However, diet changes are apparently represented in intra-tooth isotopic sequences along two progressive trends of increasing-decreasing values. Around 1.5 and 2 months of diet-tissue isotopic equilibration is expected (Jones et al., 1981; Sponheimer, Robinson, Ayliffe, Roeder, et al., 2003), but effects of the longitudinal sampling procedure should also be considered to explain this observation. Considering the dentine growth geometry of hypsodont molars, it is reasonable to assess that the isotopic variation observed in the intra-tooth sequences starts with the incorporation of inner and later-formed dentine to the sample, thus representing the progressive admixture of subsequent increments instead of the actual collagen variation through time (i.e., equilibration period). Although the equilibration process is indeed recorded in dentine collagen, the admixture of dentine derived from the longitudinal sampling necessarily overstates this 2-month process, resulting in an earlier and longer representation of the isotopic variation. This aspect had been previously noticed in cattle molars by M. Balasse et al., where diet shifts were represented in dentine intra-tooth sequences earlier than expected

according to crown development timings known for cattle (Balasse et al., 2001).

In the sheep specimens analyzed in this study, these effects are well evident in the representation of the first change of diet—occurring at the 13th month of life—along the M2 crown. The ascending trend in isotopic values starts around 25 mm from ERJ, while it would be expectable that this moment of life would be represented much onwards in the crown, in the last 1/5 part according to crown growth rates reported in sheep in previous studies (Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018). When considering these dentine growth timings reported for M2 and M3 crowns, in contrast, the moments on sheep's life when diet shifts occurred seem to fix better with the final position of ascending/descending trends instead of the starting point of variation (Figure 5). This fact is coherent with the dentine growth geometry and the sampling implemented: final points of the variation trends should correspond to the crown's position where the previous diet signature is no longer sampled, that is, the part of the crown first developing—in length—under the new isotopic background.

Taking this into account, we suggest that final points of the ascending/descending trends reached in intra-tooth sequences obtained through this sampling may coincide with the part of the crown growing in length when collagen is being synthesized under the new period isotopic composition, thus representing that particular period of life after the equilibration period. This is an important aspect because it entails that through sequential dentine analysis, it could be possible to situate at a temporal level different diet periods existing in

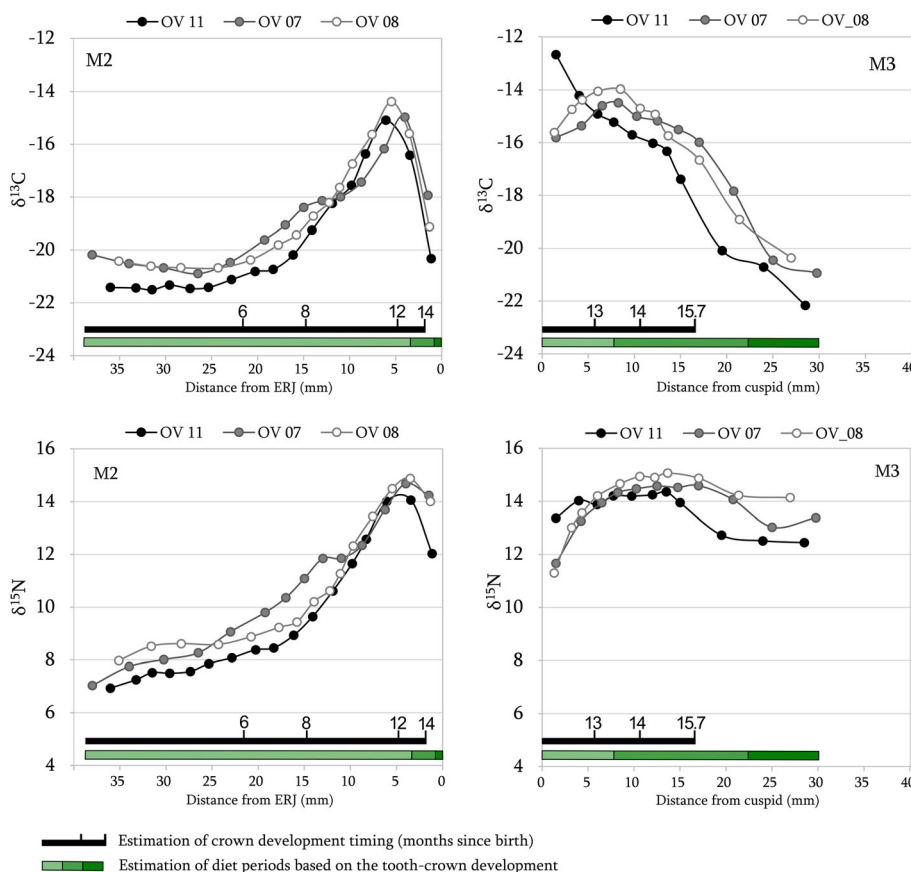


FIGURE 5 Sequential $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values measured in dentine-collagen of second (M2) and third (M3) molars. The horizontal black bars represent an estimation of the crown development timing in the tooth vertical axis (months since birth), according to dentine growth rates reported by Witzel et al. (2018) for sheep's M2 and M3 molars. The horizontal green bars indicate an estimation of the three diet periods. Note that isotopic variations are represented earlier than expected [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

the animal's life, provided that dental growth timings are known in detail. Moreover, it is worth noting that because dentine collagen is synthesized during the first phase of pre-dentine deposition (Carlson, 1991; Nanci & Causa, 2013), it is expectable that the later mineralization process does not distort the isotopic signature of the organic fraction. More specific knowledge of dentine development would allow for determining in a precise way the temporal resolution of the sampling (i.e., when diet changes occurred in the animal's life period).

5 | CONCLUSIONS

The sampling procedure implemented in this study enables obtaining isotopic data based on the longitudinal growth dynamics of high-crowned molars, a key feature in performing high-resolution analysis on tissues developing progressively during annual time spans. Results from this study show that this procedure is suitable for representing a minimum of three different scenarios of dietary conditions in sheep's life along second and third molars, even when they present different tooth growth stages. Furthermore, it allows identifying intra-tooth isotopic variation patterns within populations, because inter-individual differences are not related to sampling and rely on uncontrollable factors like metabolism or growth timing differences. Although the admixture of dentine increments is also represented in the isotopic sequences, it is possible to assign temporal information to the intra-tooth isotopic data obtained. Methodological efforts are needed in this direction.

Regardless of the growth-geometry handicap, the main strength of implementing a longitudinal post-demineralization sampling is obtaining dentine samples susceptible to be treated with the standard protocols of collagen purification, supporting its applicability to the archaeological record where some collagen preservation problems may exist and where it becomes essential to guarantee reliable $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$ values.

Animal management is an essential aspect in archaeological research concerning the socioeconomic organization and complexity of prehistoric communities. Animal's dietary and nutritional conditions are often constraint to seasonal cycles, and their control by human communities is a key factor for the survival, optimal growth, and reproduction of domestic animals. The development of intra-tooth analysis of $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$ offers new possibilities for studying fluctuations of the protein part of diet during the animal's cycle, unapproachable through the serial analysis of inorganic components that reflect the whole part of diet. Exploring the wide scope of possibilities for sequential stable isotope analysis of dentine-collagen, in particular $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$ analysis, may become a new pathway for zooarchaeological research.

ACKNOWLEDGMENTS

C. Díez-Canseco's research is part of a PhD project funded by Fundación Atapuerca's research grant program. C. Tornero was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through

the "Ramón y Cajal" program (RYC2020-029404-I). This research had the financial support of the Ministry of Science, Innovation, and Universities (MICINN-FEDER) of the Spanish Government, project no. PGC2018-093925-B-C32, and the support of the Department of Culture (AGAUR-DGPC) of Generalitat de Catalunya Government, project n° CLT009/18/00048 and project n° 2017 SGR 836. IPHES research is framed in CERCA Program/Generalitat de Catalunya and is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the "María de Maeztu" excellence accreditation (CEX2019-000945-M). The authors thank Dr. J.L. de la Torre and Dr. R. Costa (*Servei de Granges* UAB) who supervise the herd and ensure animals' welfare during the development of the whole sheep experimental program. Finally, the authors also thank the two anonymous reviewers who helped to greatly improve the manuscript. A preliminary version of this study was presented as a poster at the UK Archaeological Sciences Conference 2022, April 20–22, 2022, hosted at the University of Aberdeen, UK.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Celia Díez-Canseco  <https://orcid.org/0000-0003-0221-745X>

Mònica Aguilera  <https://orcid.org/0000-0002-4502-735X>

Carlos Tornero  <https://orcid.org/0000-0002-2870-8989>

REFERENCES

- Ambrose, S. H. (1990). Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. *Journal of Archaeological Science*, 17, 431–451. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(90\)90007-R](https://doi.org/10.1016/0305-4403(90)90007-R)
- Ambrose, S. H., & Norr, L. (1993). Experimental evidence for the relationship of the carbon isotope ratios of whole diet and dietary protein to those of bone collagen and carbonate. In *Prehistoric Human Bone* (pp. 1–37). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02894-0_1
- Bada, J. L., Peterson, R. O., Schimmelmann, A., & Hedges, R. E. M. (1990). Moose teeth as monitors of environmental isotopic parameters. *Oecologia*, 82, 102–106. <https://doi.org/10.1007/BF00318540>
- Balasse, M. (2002). Reconstructing dietary and environmental history from enamel isotopic analysis: Time resolution of intra-tooth sequential sampling. *International Journal of Osteoarchaeology*, 12, 155–165. <https://doi.org/10.1002/oa.601>
- Balasse, M. (2003). Potential biases in sampling design and interpretation of intra-tooth isotope analysis. *International Journal of Osteoarchaeology*, 13, 3–10. <https://doi.org/10.1002/oa.656>
- Balasse, M., Bocherens, H., Mariotti, A., & Ambrose, S. H. (2001). Detection of dietary changes by intra-tooth carbon and nitrogen isotopic analysis: An experimental study of dentine collagen of cattle (*Bos taurus*). *Journal of Archaeological Science*, 28, 235–245. <https://doi.org/10.1006/jasc.1999.0535>
- Balasse, M., Mainland, I., & Richards, M. P. (2009). Stable isotope evidence for seasonal consumption of marine seaweed by modern and archaeological sheep in the Orkney archipelago (Scotland). *Environmental Archaeology*, 14, 1–14. <https://doi.org/10.1179/174963109X400637>

- Balasse, M., Obein, G., Ughetto-Monfrin, J., & Mainland, I. (2012). Investigating seasonality and season of birth in past herds: A reference set of sheep enamel stable oxygen isotope ratios. *Archaeometry*, 54, 349–368. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2011.00624.x>
- Balasse, M., Renault-Fabregon, L., Gandois, H., Fiorillo, D., Gorczyk, J., Bacvarov, K., & Ivanova, M. (2020). Neolithic sheep birth distribution: Results from Nova Nadezhda (sixth millennium BC, Bulgaria) and a reassessment of European data with a new modern reference set including upper and lower molars. *Journal of Archaeological Science*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2020.105139>
- Balasse, M., & Tresset, A. (2002). Early weaning of neolithic domestic cattle (Bercy, France) revealed by intra-tooth variation in nitrogen isotope ratios. *Journal of Archaeological Science*, 29, 853–859. <https://doi.org/10.1006/jasc.2001.0725>
- Balasse, M., Gillis, R., Živaljević, I., Berthon, R., Kovačiková, L., Fiorillo, D., Arbogast, R.-M., Bălăşescu, A., Bréhard, S., Nyerges, É. Á., Dimitrijević, V., Bánffy, E., Domboróczki, L., Marciniak, A., Oross, K., Vostrovská, I., Roffet-Salque, M., Stefanović, S., & Ivanova, M. (2021). Seasonal calving in European prehistoric cattle and its impacts on milk availability and cheese-making. *Scientific Reports*, 11, 8185. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87674-1>
- Bendrey, R., Vella, D., Zazzo, A., Balasse, M., & Lepetz, S. (2015). Exponentially decreasing tooth growth rate in horse teeth: Implications for isotopic analyses. *Archaeometry*, 57, 1104–1124. <https://doi.org/10.1111/arcm.12151>
- Blaise, E., & Balasse, M. (2011). Seasonality and season of birth of modern and late neolithic sheep from South-Eastern France using tooth enamel $\delta^{18}\text{O}$ analysis. *Journal of Archaeological Science*, 38, 3085–3093. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.07.007>
- Bocherens, H., Fizet, M., Mariotti, A., Lange-Badré, B., Vandermeersch, B., Borel, J. P., & Bellon, G. (1991). Isotopic biogeochemistry ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) of fossil vertebrate collagen: Implications for the study of fossil food web including neandertal man. *Journal of Human Evolution*, 20, 481–492.
- Bocherens, H., & Mariotti, A. (2002). Paléoenvironnements et paléoalimentations: biogéochimie isotopique des vertébrés. In *Géologie de la Préhistoire*, Miskovsky JC (pp. 1323–1344). Presses Universitaires de Perpignan.
- Bogaard, A., Heaton, T. H. E., Poulton, P., & Merbach, I. (2007). The impact of manuring on nitrogen isotope ratios in cereals: Archaeological implications for reconstruction of diet and crop management practices. *Journal of Archaeological Science*, 34, 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.04.009>
- Caja, G., Basch, R., Piedrafita, J., Milán, M. J., & Casellas, J. (2010). Ovella Ripollesa. *Dossier Tècnic*, 43, 36.
- Carlson, S. J. (1991). Vertebrate Dental Structures. In J. G. Carter (Ed.), *Skeletal Biomineralization: Patterns, processes and evolutionary trends* (pp. 235–260). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-5740-5_21
- Codron, D., Clauss, M., Codron, J., & Tütken, T. (2018). Within trophic level shifts in collagen-carbonate stable carbon isotope spacing are propagated by diet and digestive physiology in large mammal herbivores. *Ecology and Evolution*, 8, 3983–3995. <https://doi.org/10.1002/ece3.3786>
- Codron, J., Codron, D., Lee-Thorp, J. A., Sponheimer, M., Bond, W. J., de Ruiter, D., & Grant, R. (2005). Taxonomic, anatomical, and spatio-temporal variations in the stable carbon and nitrogen isotopic compositions of plants from an African savanna. *Journal of Archaeological Science*, 32, 1757–1772. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.06.006>
- Conklin-Brittain, N. L., Dierenfeld, E. S., Wrangham, R. W., Norconk, M., & Silver, S. C. (1999). Chemical protein analysis: A comparison of Kjeldahl crude protein and total ninhydrin protein from wild, tropical vegetation. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 2601–2622. <https://doi.org/10.1023/A:1020835120701>
- Czermak, A., Schermelleh, L., & Lee-Thorp, J. (2018). Imaging-assisted time-resolved dentine sampling to track weaning histories. *International Journal of Osteoarchaeology*, 28, 535–541. <https://doi.org/10.1002/oa.2697>
- Doherty, S. P., Collins, M. J., Harris, A. J. T., Sistiaga, A., Newton, J., & Alexander, M. M. (2022). A modern baseline for the paired isotopic analysis of skin and bone in terrestrial mammals. *Royal Society Open Science*, 9. <https://doi.org/10.1098/rsos.211587>
- Esquivelzeta, C., Fina, M., Bach, R., Madruga, C., Caja, G., Casellas, J., & Piedrafita, J. (2011). Morphological analysis and subpopulation characterization of Ripollesa sheep breed. *Animal Genetic Resources/Ressources génétiques Animales/Recursos genéticos Animales*, 49, 9–17. <https://doi.org/10.1017/s2078633611000063>
- Fagre, T., Tieszen, L. L., & Rodriguez, S. (1991). Variations in stable carbon isotope values of dietary biochemicals: extraction procedures and results (pp. 83–98).
- Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R., & Hubick, K. T. (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 503–537. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002443>
- Fernández-Crespo, T., Czermak, A., Lee-Thorp, J. A., & Schulting, R. J. (2018). Infant and childhood diet at the passage tomb of Alto de la Huesera (north-central Iberia) from bone collagen and sequential dentine isotope composition. *International Journal of Osteoarchaeology*, 28, 542–551. <https://doi.org/10.1002/oa.2659>
- Fernández-Crespo, T., Snoeck, C., Ordoño, J., de Winter, N. J., Czermak, A., Mattielli, N., Lee-Thorp, J. A., & Schulting, R. J. (2020). Multi-isotope evidence for the emergence of cultural alterity in late neolithic Europe. *Science Advances*, 6. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay2169>
- Froehle, A. W., Kellner, C. M., & Schoeninger, M. J. (2010). FOCUS: Effect of diet and protein source on carbon stable isotope ratios in collagen: Follow up to Warinner and Tuross (2009). *Journal of Archaeological Science*, 37, 2662–2670. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.06.003>
- Gallego-Valle, A., Colominas, L., Burguet-Coca, A., Aguilera, M., Palet, J. M., & Tornero, C. (2020). What is on the menu today? Creating a microwear reference collection through a controlled-food trial to study feeding management systems of ancient agropastoral societies. *Quaternary International*, 557, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2020.02.020>
- Gillis, R., Bréhard, S., Bălăşescu, A., Ughetto-Monfrin, J., Popovici, D., Vigne, J.-D., & Balasse, M. (2013). Sophisticated cattle dairy husbandry at Borduşani-Popină (Romania, fifth millennium BC): The evidence from complementary analysis of mortality profiles and stable isotopes. *World Archaeology*, 45, 447–472. <https://doi.org/10.1080/00438243.2013.820652>
- Gillis, R., Bulatović, J., Penezić, K., Spasić, M., Tasić, N. N., & Makarewicz, C. A. (2021). Of herds and societies—Seasonal aspects of Vinča culture herding and land use practices revealed using sequential stable isotope analysis of animal teeth. *PLoS ONE*, 16, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258230>
- Guiry, E. J., Hepburn, J. C., & Richards, M. P. (2016). High-resolution serial sampling for nitrogen stable isotope analysis of archaeological mammal teeth. *Journal of Archaeological Science*, 69, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2016.03.005>
- Handley, L. L., Austin, A. T., Robinson, D., Scrimgeour, C. M., Raven, J. A., Heaton, T. H. E., Schmidt, S., & Stewart, G. R. (1999). The ^{15}N natural abundance ($\delta^{15}\text{N}$) of ecosystem samples reflects measures of water availability. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 185–199. <https://doi.org/10.1071/PP98146>
- Handley, L. L., & Scrimgeour, C. M. (1997). Terrestrial plant ecology and ^{15}N natural abundance: The present limits to interpretation for uncultivated systems with original data from a Scottish old field. In *Plant Physiology* (pp. 133–212). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60008-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60008-2)

- Heaton, T. H. E. (1999). Spatial, species, and temporal variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of C_3 plants: Implications for Palaeodiet studies. *Journal of Archaeological Science*, 26, 637–649. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0381>
- Hillson, S. (2005). *Teeth* (second ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511614477>
- Hopper, C., Sealy, J. C., & Dewar, G. (2018). Little ice age drought event reconstructed from isotopic analysis of archaeological springbok (*Antidorcas marsupialis*) teeth. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 495, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.09.019>
- Jim, S., Ambrose, S. H., & Evershed, R. P. (2004). Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: Implications for their use in palaeodietary reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68, 61–72. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(03\)00216-3](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(03)00216-3)
- Jones, R. J., Ludlow, M. M., Troughton, J. H., & Blunt, C. G. (1981). Changes in natural carbon isotope ratio of the hair from steers fed diets of C_4 , C_3 and C_4 species in sequence. *Search*, 12, 85–87.
- Kahle, P., Witzel, C., Kierdorf, U., Frölich, K., & Kierdorf, H. (2018). Mineral apposition rates in coronal dentine of mandibular first molars in Soay sheep: Results of a fluorochrome labeling study. *Anatomical Record*, 301, 902–912. <https://doi.org/10.1002/ar.23753>
- Kirsanow, K., Makarewicz, C., & Tuross, N. (2008). Stable oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) and hydrogen (δD) isotopes in ovicaprid dentinal collagen record seasonal variation. *Journal of Archaeological Science*, 35, 3159–3167. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.06.025>
- Knockaert, J., Balasse, M., Rendu, C., Burens, A., Campmajo, P., Carozza, L., Bousquet, D., Fiorillo, D., & Vigne, J. D. (2018). Mountain adaptation of caprine herding in the eastern Pyrenees during the bronze age: A stable oxygen and carbon isotope analysis of teeth. *Quaternary International*, 484, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2017.05.029>
- Kohl, D. H., & Shearer, G. (1980). Isotopic fractionation associated with symbiotic N_2 fixation and uptake of NO_3^- by plants. *Plant Physiology*, 66, 51–56. <https://doi.org/10.1104/pp.66.1.51>
- Kohn, M. J. (2010). Carbon isotope compositions of terrestrial C_3 plants as indicators of (paleo)ecology and (paleo)climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 19691–19695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004933107>
- Lee-Thorp, J. A., Sealy, J. C., & van der Merwe, N. J. (1989). Stable isotope ratio differences between bone collagen and bone apatite, and their relationship to diet. *Journal of Archaeological Science*, 16, 585–599.
- LeGeros, R. Z. (1981). Apatites in biological systems. *Progress in Crystal Growth and Characterization*, 4, 1–45.
- Lightfoot, E., Przelomska, N., Craven, M., O'Connell, T. C., He, L., Hunt, H. V., & Jones, M. K. (2016). Intraspecific carbon and nitrogen isotopic variability in foxtail millet (*Setaria italica*). *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 30, 1475–1487. <https://doi.org/10.1002/rcm.7583>
- Makarewicz, C. (2014). Winter pasturing practices and variable fodder provisioning detected in nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) isotopes in sheep dentinal collagen. *Journal of Archaeological Science*, 41, 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.09.016>
- Makarewicz, C. (2017). Winter is coming: Seasonality of ancient pastoral nomadic practices revealed in the carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopic record of Xiongnu caprines. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 9, 405–418. <https://doi.org/10.1007/s12520-015-0289-5>
- Makarewicz, C., Arbuckle, B. S., & Öztan, A. (2017). Vertical transhumance of sheep and goats identified by intra-tooth sequential carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) isotopic analyses: Evidence from chalcolithic Köşk Höyük, Central Turkey. *Journal of Archaeological Science*, 86, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2017.01.003>
- Makarewicz, C., & Tuross, N. (2006). Foddering by Mongolian pastoralists is recorded in the stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes of caprine dentinal collagen. *Journal of Archaeological Science*, 33, 862–870. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.10.016>
- Milhaud, G., & Nezit, J. (1991). Molar development in sheep: Morphology, radiography, microhardness. *Recueil de Medecine Veterinaire*, 167, 121–127.
- Minson, D. J. (1990). Intake of forage by housed ruminants. *Forage in Ruminant Nutrition*, 9–59. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-498310-6.50008-0>
- Nanci, A., & Causa, H. (2013). Structure of the Oral tissues. In *Ten Cate's Oral Histology* (pp. 1–13). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07846-7.00001-X>
- National Research Council. (1985). *Nutrient Requirements of Sheep*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/20671>
- Navarrete, V., Tornero, C., Balasse, M., & Saña, M. (2019). Food management of early introduced caprine and bovine herds in the early Neolithic site of La Draga (Banyoles): An isotopic approach. *International Journal of Osteoarchaeology*, 29, 986–998. <https://doi.org/10.1002/oa.2812>
- O'Leary, M. H. (1981). Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 20, 553–567. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85134-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85134-5)
- Skinner, H. C. W. (2005). Biominerals. *Mineralogical Magazine*, 69, 621–641. <https://doi.org/10.1180/0026461056950275>
- Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Passey, B., Roeder, B., Shipley, L., Lopez, E., Cerling, T., Dearing, D., & Ehleringer, J. (2003). An experimental study of carbon-isotope fractionation between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. *Canadian Journal of Zoology*, 81, 871–876. <https://doi.org/10.1139/z03-066>
- Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Roeder, B., Hammer, J., Passey, B., West, A., Cerling, T., Dearing, D., & Ehleringer, J. (2003). Nitrogen isotopes in mammalian herbivores: Hair $\delta^{15}\text{N}$ values from a controlled feeding study. *International Journal of Osteoarchaeology*, 13, 80–87. <https://doi.org/10.1002/oa.655>
- Tejedor-Rodríguez, C., Moreno-García, M., Tornero, C., Hoffmann, A., García-Martínez de Lagrán, Í., Arcusa-Magallón, H., Garrido-Pena, R., Ignacio Royo-Guillén, J., Díaz-Navarro, S., Peña-Chocarro, L., Alt, K. W., & Rojo-Guerra, M. (2021). Investigating neolithic caprine husbandry in the Central Pyrenees: Insights from a multi-proxy study at Els Trocs cave. Bisaurri. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244139>
- Terra, J. A., Scaglia, G., & García, P. F. (2000). *MOHA: Características del Cultivo y Comportamiento en Rotaciones Forrajeras con Siembra Directa*. Montevideo.
- Tieszen, L. L., & Fagre, T. (1993). Effect of Diet Quality and Composition on the Isotopic Composition of Respiratory CO_2 , Bone Collagen, Bioapatite, and Soft Tissues. In *Prehistoric Human Bone* (pp. 121–155). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02894-0_5
- Tornero, C., Aguilera, M., Ferrio, J. P., Arcusa, H., Moreno-García, M., Garcia-Reig, S., & Rojo-Guerra, M. (2018). Vertical sheep mobility along the altitudinal gradient through stable isotope analyses in tooth molar bioapatite, meteoric water and pastures: A reference from the Ebro valley to the Central Pyrenees. *Quaternary International*, 484, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2016.11.042>
- Tornero, C., Bălăşescu, A., Ughetto-Monfrin, J., Voinea, V., & Balasse, M. (2013). Seasonality and season of birth in early Eneolithic sheep from Cheia (Romania): Methodological advances and implications for animal economy. *Journal of Archaeological Science*, 40, 4039–4055. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.05.013>
- Tornero, C., Balasse, M., Bréhard, S., Carrère, I., Fiorillo, D., Guilaine, J., Vigne, J. D., & Manen, C. (2020). Early evidence of sheep lambing de-seasoning in the Western Mediterranean in the sixth millennium BCE. *Scientific Reports*, 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69576-w>
- Treasure, E. R., Church, M. J., & Gröcke, D. R. (2016). The influence of manuring on stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in Celtic bean (*Vicia faba*

- L.): Archaeobotanical and palaeodietary implications. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 8, 555–562. <https://doi.org/10.1007/s12520-015-0243-6>
- Tuross, N., Fogel, M. L., & Hare, P. E. (1988). Variability in the preservation of the isotopic composition of collagen from fossil bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52, 929–935. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90364-X](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90364-X)
- van Klinken, G. J. (1999). Bone collagen quality indicators for palaeodietary and radiocarbon measurements. *Journal of Archaeological Science*, 26, 687–695. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0385>
- Virginia, R. A., & Delwiche, C. C. (1982). Natural ^{15}N abundance of presumed N_2 -fixing and non- N_2 -fixing plants from selected ecosystems. *Oecologia*, 54, 317–325. <https://doi.org/10.1007/BF00380000>
- von Holstein, I. C. C., Hamilton, J., Craig, O. E., Newton, J., & Collins, M. J. (2013). Comparison of isotopic variability in proteinaceous tissues of a domesticated herbivore: A baseline for zooarchaeological investigation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, 2601–2615. <https://doi.org/10.1002/rcm.6725>
- Webb, E. C., Stewart, A., Miller, B., Tarlton, J., & Evershed, R. P. (2016). Age effects and the influence of varying proportions of terrestrial and marine dietary protein on the stable nitrogen-isotope compositions of pig bone collagen and soft tissues from a controlled feeding experiment. *Science and Technology of Archaeological Research*, 2, 54–66. <https://doi.org/10.1080/20548923.2015.1133121>
- Weinreb, M. M., & Sharav, Y. (1964). Tooth development in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 25, 891–908.
- Witzel, C., Kierdorf, U., Frölich, K., & Kierdorf, H. (2018). The pay-off of hypsodonty—Timing and dynamics of crown growth and wear in molars of Soay sheep. *BMC Evolutionary Biology*, 18, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1332-9>
- Zazzo, A., Balasse, M., Passey, B. H., Moloney, A. P., Monahan, F. J., & Schmidt, O. (2010). The isotope record of short- and long-term dietary changes in sheep tooth enamel: Implications for quantitative reconstruction of paleodiets. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74, 3571–3586. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.03.017>
- Zazzo, A., Balasse, M., & Patterson, W. P. (2006). The reconstruction of mammal individual history: Refining high-resolution isotope record in bovine tooth dentine. *Journal of Archaeological Science*, 33, 1177–1187. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.12.006>

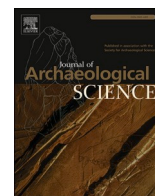
How to cite this article: Díez-Canseco, C., Aguilera, M., & Tornero, C. (2022). Intra-tooth isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth: A new experimental study with modern sheep specimens. *International Journal of Osteoarchaeology*, 1–14. <https://doi.org/10.1002/oa.3138>



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Archaeological Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jas



New methods for old challenges: A sampling protocol for sequential stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth

Celia Díez-Canseco^{a,c,*}, Carlos Tornero^{b,c}

^a Universitat Rovira i Virgili, Departament d'Història i Història de l'Art, Avinguda de Catalunya 35, 43002 Tarragona, Spain

^b Department of Prehistory, Autonomous University of Barcelona (UAB), Edifici B Facultat de Filosofia i Lletres, 08193 Bellaterra, Spain

^c Institut Català de Paleoecologia Humana i Evolució Social (IPHES-CERCA), Zona Educacional 4, Campus Sescelades URV (Edifici W3), 43007 Tarragona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Intra-tooth analysis
Stable carbon isotopes
Stable nitrogen isotopes
Experimental sheep program

ABSTRACT

Intra-tooth or sequential stable isotope analyses are nowadays widely implemented in zooarchaeological research. Sequential isotopic analyses have been mainly restricted to the mineral fraction of the enamel, while a wider implementation in dentine collagen has been generally eluded, despite conforming an essential organic compound for paleodietary studies. In high-crowned teeth, dentine grows oblique to the vertical axis of growth and some challenges arise when trying to isolate dentine increments during a sequential sampling. Previous sampling strategies slice the whole dentine thickness and provide sequences where isotopic variation is largely attenuated. In this study, we show a new proposal for performing carbon and nitrogen isotope analyses of dentine collagen which better fits dentine's growth. We implemented it in mandibular second molars of an experimental modern sheep flock. Our sampling largely reduces the isotopic "damping" of previous approaches and provides short time-span samples. Sequential $\delta^{13}\text{C}$ values obtained in dentine tissue yielded similar resolution to those obtained in enamel tissue of the same individuals. This proposal, especially suitable for caprine and other bovid species, broadens the implementation of dentine collagen signatures in the field of stable isotope analyses in zooarchaeology.

1. Introduction

Hypsodonty is a common morphological characteristic in dentitions of herbivorous-grazing mammals. It defines those dentitions with prolonged periods of tooth crown formation, still growing after eruption, and with elongated tooth crowns (i.e. high-crowned teeth) (Janis 1988). These teeth are susceptible to provide a long record of the isotopic variation occurring during dental development by sampling their main growth direction in height (i.e. longitudinally), and this feature has been widely exploited in paleoecological and zooarchaeological studies since the 90s (e.g. Fricke and O'Neil, 1996; Sharp and Cerling 1998; Wiedemann et al., 1999). These approaches have been mainly focused on the analysis of phosphates and carbonates compounds of tooth enamel-hydroxyapatites, especially since enamel shows high resistance to diagenetic alteration in fossil remains (Lee-Thorp and van der Merwe 1991; Schoeninger and DeNiro 1982). Conversely, in zooarchaeological studies, intra-tooth isotopic analyses of dentine have not undergone such popularity during the last decades, despite the potential of this tissue to track the isotopic fluctuations of collagen recorded along

several months of tooth formation: the organic fraction (mainly collagen type I) forms up to ~20% of total dentine by weight (Carlson 1991; LeGeros 1981) and dentine do not undergo regeneration once mineralized, except for pathological factors (Bada et al., 1990; Carlson 1991; Frank and Nalbandian 1989).

Dentine develops incrementally, in a two-step process where the collagenous organic matrix (predentine) is first deposited and then mineralized, at a constant rate of organic-matrix apposition and mineralization (Kahle et al., 2018; Nanci 2013). However, isolating different dentine increments during sampling may entail certain complexities. Despite the elongated crown, dentine in high-crowned teeth grows oblique to the vertical axis (Hillson 2005; Kahle et al., 2018) and this pattern makes it difficult to sample following growth direction while obtaining enough sample size to implement standard protocols of collagen isolation (Zazzo et al., 2006).

The possibility of obtaining an intra-tooth isotopic record of collagen through a sequential sampling of high-crowned teeth was first explored by M. Balasse and colleagues (Balasse et al., 2001; Balasse and Tresset 2002). These studies showed that $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$ values obtained from

* Corresponding author. Universitat Rovira i Virgili, Departament d'Història i Història de l'Art, Avinguda de Catalunya 35, 43002 Tarragona, Spain.
E-mail addresses: cdiezcanseco@iphes.cat (C. Díez-Canseco), ctornero@iphes.cat (C. Tornero).

<https://doi.org/10.1016/j.jas.2023.105923>

Received 19 August 2023; Received in revised form 22 November 2023; Accepted 18 December 2023

Available online 27 December 2023

0305-4403/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

sequentially sampled M_1 cattle molars may represent the shift between the suckling period and the later herbivorous diet, allowing to study weaning management in past animal populations. Since then, sequential isotopic analyses in dentine collagen have been implemented in several archaeological studies, not only linked to define weaning age in domestic calves (Gillis et al., 2013; Griffith and Mulville 2020; Stojanovski et al., 2020), but also to track other strictly herbivorous conditions such as seasonal feeding strategies of domestic herds (Makarewicz 2014, 2017; Makarewicz et al., 2018), or to reconstruct paleoenvironmental conditions from wild or free-range specimens (Hopper et al., 2018; Kirsanow et al., 2008).

The implementation of this sampling approach needs to deal with some dampening of the isotopic sequences, resulting from the admixture of different dentine increments during sampling (Díez-Canseco et al., 2022). The sampling strategy developed by M. Balasse and nowadays implemented, slices the lobe selected from the apex to the base, obtaining a series of samples along the vertical axis of the tooth which are susceptible to further treatments of collagen isolation, but which represent an isotopic pool of the whole dentine thickness. As a consequence, samples represent large time spans and sequences show an attenuation of the diet isotope signatures which complicates the interpretation of the final data. In order to obtain smaller and more time-accurate samples of dentine, some authors have proposed the possibility of performing a serial sampling by drilling, without any further treatment of the final powder sample, analysing thus "raw dentine" (Guiry et al., 2016, implemented in pig's tusks). However, this protocol entails discarding $\delta^{13}\text{C}$ values (which mainly come from the inorganic fraction), and the reliability of $\delta^{15}\text{N}$ values could be compromised by the presence of exogenous nitrogen-rich compounds in the samples. A modified version of this protocol where drilled, powdered dentine samples are demineralized with hydrochloric acid (Guiry et al., 2018), allows for obtaining $\delta^{13}\text{C}$ values coming mainly from collagen, but sample size does not allow additional treatments for the removal of base-soluble contaminants (Losey et al., 2020), potentially present after burial conditions. No further methodological proposals have been made relating to the implementation of sequential carbon and nitrogen isotope analyses of dentine collagen in faunal remains.

Likewise, sampling strategies developed in recent years for human dentine, although may be suitable for other animal species (e.g. Rogers et al., 2019), do not appear to be suitable to yield major improvements for high-crowned teeth, considering the differences existing between the growth geometries of both dentitions. Sampling after generating a thin section of the teeth, whether by slicing sections with a scalpel (Beaumont et al., 2013; Czermak et al., 2018) or by sampling with a biopsy punch tool (i.e. ~1 mm of diameter) (Czermak et al., 2020; Fernández-Crespo et al., 2018), does not guarantee to isolate dentine increments in high-crowned molars, where (1) increments are laid down in more oblique angles than in bunodont molars, (2) the whole dentine thickness may be cramped in less than 2 mm width, and (3) lobe-curved morphologies complicate generating a section thick enough for the micro-punches method. In addition, the time resolution targeted in humans with these methods is highly lower (i.e. several years) than the one that would be feasible for hypsodont teeth (i.e. several months).

In this study, we present a new sequential sampling strategy of dentine that allows for performing stable carbon and nitrogen isotope analysis and which better suits molar growth in hypsodont species. Since the inner dentine is not sampled through this strategy, it allows to take advantage of the longitudinal development in high-crowned teeth, while obtaining better resolution than previous sampling protocols. This method is tested in modern sheep specimens coming from an experimental program where diet conditions and isotopic inputs are known. Results are compared with standard methods of dentine and enamel sequential analyses performed in the same specimens. We evaluate the sampling resolution and its potential biases in the implementation in the archaeological record.

2. Materials

An experimental program with several flocks of modern sheep (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758) was developed between 2017 and 2019 in the Farm Services and Experimental Fields facilities of the Autonomous University of Barcelona (UAB), located in Bellaterra (Spain). The aim of the program was to provide referential data sets for several paleodietary-related research studies (e.g. Díez-Canseco et al., 2022; Gallego-Valle et al., 2020). The experiment was approved by the ethics committee of animal experimentation of UAB, and it was carried out under the supervision of the Animal Welfare advisor in charge, together with the rest of the farm's veterinary staff. The sheep specimens selected for the present study come from a 12-female flock of Ripollesa breed. Ripollesa is an autochthonous sheep breed from north-eastern regions of Catalonia (NE Spain), traditionally oriented to lamb production and meat exploitation (Caja et al., 2010; Esquivelzeta et al., 2011).

The sheep flock was raised in a stall under controlled life and feeding conditions. All lambs were born in February–March 2017. Lambs were weaned at eight weeks of age, and weanlings were fed with a mixture of alfalfa hay and supplement pellet (based on maize, barley, soy and wheat) for the next two/three months. The flock was then fed following a schedule based on three monospecific diets alternated as follows: DIET1, based on alfalfa hay (*Medicago sativa*); DIET2, based on foxtail millet hay (*Setaria italica*); DIET3, based on barley (*Hordeum vulgare*) supplied in the form of straw and grain (Fig. 1). These three diets were scheduled in a C_3 -leguminous- C_4 - C_3 plant scheme, thus expecting major differences in the isotopic signature between these periods. Diet changes were abruptly performed on March 22nd and July 10th, when sheep were 12 and 16 months old, respectively. Fodder samples from the three monospecific diets (alfalfa, foxtail millet, barley-straw and barley-grains) were periodically collected from troughs from November 2017 until sheep's slaughtering –thus covering the last year of sheep's life– and were subjected to stable carbon and nitrogen isotope analysis. The isotopic data of fodder samples was previously published in Díez-Canseco et al. (2022); the main isotopic results from fodder analyses are shown in Table 1.

A total of five sheep specimens from this flock were selected for the present study (OV-07, OV-08, OV-09, OV-10, OV-11), all of them slaughtered at 20.5–21 months old (detailed information for each specimen is given in Supplementary Material 1). It was expected that Ripollesa sheep showed completed crowns of mandibular second molars (M_2) at the time of death. Mandibular second molars formation starts during the second month of life, and crown formation may complete at 12 months in improved breeds (Milhaud and Nezit 1991; Zazzo et al., 2010) or extend until 18 or 19 months of life in breeds with lower growth rates (Upex and Dobney 2012; Witzel et al., 2018). A delay of 4–6 months in the enamel mineralization has been observed in sheep (Balasse et al., 2012; Zazzo et al., 2010), so diet changes were expected to be recorded in the enamel of M_2 molars. A previous study showed that the three diet periods are also recorded in dentine (Díez-Canseco et al., 2022).

3. Methods

Mandibles from the five selected sheep specimens were separated from the skull, partially defleshed, and boiled in water (100 °C) for 2 h; the remaining soft tissues were then removed manually. M_2 molars were extracted from the right hemi-mandibles. At the time of death, M_2 showed a wear stage D following criteria in Payne (1973), and the crown was recently completed; roots were in an early stage of development, barely exceeding the enamel-root junction (ERJ). The posterior lobes of the right M_2 ($N = 5$) were selected for sequential stable isotope analysis of enamel and dentine tissues.

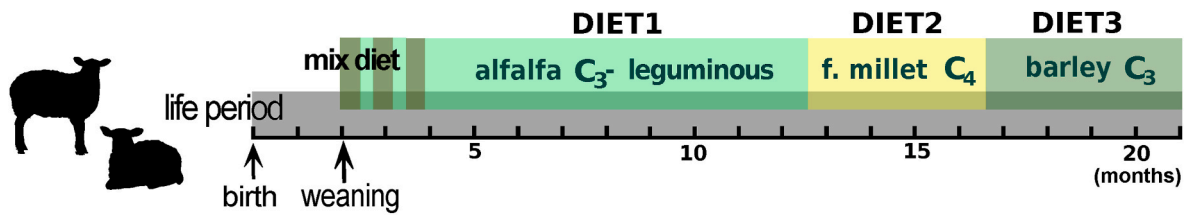


Fig. 1. Life period of the sheep selected for this study and diet periods scheduled during the experimental program.

Table 1

Mean and standard deviation of carbon and nitrogen isotopic results of sampled fodder supplied to sheep during the three monospecific diets. Data from Díez-Canseco et al. (2022).

	DIET1	DIET2	DIET3	
	Alfalfa (n = 3)	Foxtail millet (n = 9)	Barley-straw (n = 12)	Barley-grain (n = 16)
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-28.9 ± 0.8	-13.1 ± 0.3	-28.2 ± 0.4	-25.6 ± 0.1
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$+1.2 \pm 1.5$	$+11.7 \pm 0.7$	$+3.6 \pm 1.8$	$+7.5 \pm 0.3$

3.1. Enamel sequential sampling

Enamel sampling was performed on the buccal side of the posterior lobes of right M_2 , using a Dremel tool coupled to a diamond bit. Between 23 and 29 samples were obtained mechanically in each sequence. Samples weighing 5.3 ± 1.2 mg were obtained each 1.5–2 mm along the crown's longitudinal axis. The position of samples was noted as the distance (in mm) from the ERJ. Powder samples were then chemically treated following protocols published by Balasse et al. (2002) and Tornero et al. (2013). Briefly, samples were treated for 4 h in 0.1 M acetic acid [CH_3COOH] (0.1 ml solution/1 mg of sample), rinsed five times with Milli-Q water, and dried in an oven for 48 h at 70 °C. During chemical treatment, samples ($N = 127$) lost an average of $45.9 \pm 9.2\%$ of their weight.

3.2. Dentine sequential sampling

Posterior lobes were separated from the tooth mechanically. Lobes were demineralized in EDTA (0.5 M, pH = 8) for several weeks at room temperature following criteria from Tuross et al. (1988) and Balasse et al. (2001). Demineralized lobes were then intensively rinsed with Milli-Q water, including a one-week soak, and then placed in a 0.125 M NaOH solution at room temperature for 20 h, rinsed again several times and lyophilized. The buccal part was then sampled using a cylindrical diamond point of 1 mm of diameter, sampling each 1.5 mm along the tooth's vertical axis and obtaining powder samples weighing 1.0 ± 0.3 mg. Depth sampling was homogenized using the point diameter as reference, resulting in grooves of about 0.3–0.5 mm deep. Between 23 and 26 samples were obtained in each sequence.

The position of samples was noted as distance (in mm) from the base of the sampled lobe (i.e. root base). Since demineralized lobes slightly shrink during freeze-drying (3.3 ± 0.5 mm), the distances are corrected considering the total length of each lobe before and after freeze-drying as follows: $d_0 = (d_1 \cdot l_0) / l_1$, where 'd₀' is distance from root-base before lyophilization, 'd₁' is distance from root-base after lyophilization, 'l₀' is length of the lobe before lyophilization, and 'l₁' is length of the lobe after lyophilization. The distance of the root base from ERJ was measured before demineralization, so the dentine samples position may be also expressed as distance from ERJ to allow comparisons between molars, and between enamel and dentine series.

Powder samples were treated with a 0.5 M HCL solution for 30 min following criteria in Czermak et al. (2020) to avoid potential

contamination of precipitated atmospheric CO_2 (Hatté et al., 2001). Samples were then rinsed in Milli-Q water, and freeze-dried. Here, we refer as collagen to the EDTA insoluble residue obtained after this treatment protocol, although other minor non-collagenous tooth proteins may be present in the sample after the demineralization steps (Ambrose 1990; Cleland et al., 2021; Guiry and Szpak 2020; Masters 1987; Tuross et al., 1988).

To test the resolution of this sampling strategy, this method (hereinafter "drill-sampling" or DS) is compared with the standard dentine sampling previously implemented in zooarchaeological studies for sequential isotopic analysis, which obtains "chunk" samples by slicing the lobe into 2 mm sections once demineralized (Balasse et al., 2001). This standard method (hereinafter "slice-sampling" or SS) was previously tested in the same sheep individuals used in this study, but using the posterior lobes of left M_2 teeth (Díez-Canseco et al., 2022) instead of right M_2 teeth (this study).

3.3. Isotopic measurements

A total number of 127 enamel bioapatite samples and 125 dentine collagen samples were subjected to isotopic analysis. Each sample was measured once. Carbon isotope ratios of treated enamel bioapatite samples were measured using an automated Kiel-III Carbonate Device coupled to a Finnigan MAT 252 isotope ratio mass spectrometer (IRMS) at the Environmental Isotope Laboratory (Department of Geosciences) of the University of Arizona (USA). Samples weighting ~ 600 μg were reacted with dehydrated phosphoric acid under vacuum at 70 °C. Measurements' accuracy and precision were checked and calibrated using NBS-19 (theoretical $\delta^{13}\text{C}$ values = $+1.95\%$) international standard. All measured values of the standard are shown in Supplementary Material 2. The mean analytical precision varies by $\pm 0.05\%$ (1σ) for $\delta^{13}\text{C}$, determined within each run and from replicate measurements of standards.

For dentine samples, ~ 350 μg of collagen were weighted into tin samples. Carbon and nitrogen content (%), and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures were measured using a Thermo Flash 1112 elemental analyzer (EA) coupled to a Thermo Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer (IRMS) with a ConFlo III interface at the Institute of Environmental Science and Technology (ICTA-UAB) (Barcelona, Spain). The international standard IAEA 600 (caffeine) (theoretical values: $\delta^{13}\text{C} = -27.77 \pm 0.04\%$, $\delta^{15}\text{N} = +1.0 \pm 0.2\%$) was used for data calibration. All measured values of the standard are shown in Supplementary Material 2. The mean analytical precision was $\pm 0.08\%$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\pm 0.11\%$ $\delta^{15}\text{N}$, determined within each run and from repeated measurements of standards. Isotope ratio is reported in δ notation: $\delta^{13}\text{C}$ values are expressed relative to Vienna PeeDee Belemnite (V-PDB) standard and $\delta^{15}\text{N}$ values relative to air N_2 (AIR).

4. Results

4.1. Results from sequential $\delta^{13}\text{C}$ analysis of enamel

Results from stable carbon isotope analysis of the enamel bioapatite samples are shown in Supplementary Material 3. Table 2 shows a summary with the minimum (Min.) and maximum (Max.) $\delta^{13}\text{C}$ values,

Table 2

Summary table with isotopic results from sequential analysis of enamel ($\delta^{13}\text{C}_{\text{bioapatite}}$) and dentine ($\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$). Minimum values (Min.), maximum values (Max.), and maximum range of variation (Range) are shown per specimen, with mean values and standard deviation for all specimens.

Specimen	$\delta^{13}\text{C}_{\text{bioapatite}}$ (‰)			$\delta^{13}\text{C}_{\text{collagen}}$ (‰)			$\delta^{15}\text{N}_{\text{collagen}}$ (‰)		
	Min.	Max.	Range	Min.	Max.	Range	Min.	Max.	Range
OV-07	-14,0	-3,5	10,4	-22,9	-12,1	10,8	+7,0	+16,3	9,3
OV-08	-13,3	-2,5	10,7	-22,4	-11,9	10,5	+7,4	+15,7	8,3
OV-09	-13,8	-3,3	10,5	-22,8	-11,4	11,5	+7,2	+16,4	9,2
OV-10	-14,2	-2,8	11,4	-23,0	-11,7	11,3	+7,0	+16,2	9,2
OV-11	-14,4	-3,1	11,3	-23,2	-11,6	11,5	+6,5	+15,8	9,3
Mean	-13,9	-3,1	10,9	-22,9	-11,7	11,1	+7,0	+16,1	9,1
SD	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4

and the maximum range of variation per each sheep specimen. Enamel samples yielded $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from -14.4‰ to -2.5‰ . All teeth yield similar absolute carbon values, where Min. values range from -14.4‰ to -13.3‰ , and Max. values range from -3.5‰ to -2.5‰ . All specimens show a high intra-tooth variation in their $\delta^{13}\text{C}$ values: the mean amplitude is $10.9 \pm 0.4\text{‰}$. Inter-individual variation (considering Min. and Max. values) is less than 1.1‰ .

The distribution of $\delta^{13}\text{C}$ values along the M_2 crowns is shown in Fig. 2. Every tooth shows a similar variation of the carbon isotopic values, where the highest and lowest values are located in similar positions of the tooth crown. The carbon values in all teeth vary in accordance with the dietary conditions induced in sheep during the last year of life, when three monospecific-forage periods were alternated in a $C_3-C_4-C_3$ plant scheme. The lowest $\delta^{13}\text{C}$ values of the first part of the sequence represent DIET1, while the increase of values at the middle of the sequence and the following decrease represent the changes into DIET2 and DIET3, respectively.

4.2. Results from sequential $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis of dentine

Stable carbon and nitrogen isotope ratios, carbon and nitrogen content, and C:N ratios of dentine collagen samples are presented in Supplementary Material 2. All samples yield carbon content values (in wt %C) ranging from 40.8% to 45.1% (average $43.6 \pm 0.8\%$) and nitrogen content values (in wt %N) ranging from 14.7 % to 16.8% (average $15.7 \pm 0.4\%$). C:N ratios range from 3.10 to 3.44 (average 3.23 ± 0.07). Dentine collagen samples yield $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from -23.2‰ to -11.4‰ , and $\delta^{15}\text{N}$ values ranging from $+6.5\text{‰}$ to $+16.4\text{‰}$. All five M_2 dentine series present high intra-tooth variation, with a mean amplitude result of $11.1 \pm 0.4\text{‰}$ in $\delta^{13}\text{C}$ values, and $9.1 \pm 0.4\text{‰}$ in $\delta^{15}\text{N}$ values (Table 2).

The variation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values along the tooth is shown in Fig. 2. Overall, all dentine sequences present small inter-individual variation, showing a similar fluctuation of isotopic values along the crown. When considering Min. and Max. isotopic values, all sequences differ inter-individually $\leq 0.8\text{‰}$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $\leq 0.9\text{‰}$ in $\delta^{15}\text{N}$. The major discrepancy is present in OV-09, which slightly deviates in the $\delta^{13}\text{C}$ values along the first part of the crown. A higher resolution is expected in this part of the crown, as it presents faster tooth growth (Jordana and Köhler 2011; Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018), and inter-individual disparities (e.g. dental growth timings, or specific behavioral or metabolic differences affecting the final isotopic composition of collagen) may be here amplified.

Isotopic results from collagen samples are in accordance with the dietary conditions induced in sheep during the experimental program. In all teeth, two main diet changes ($C_3-C_4-C_3$ alternation) are represented in the second half of the tooth, in accordance with the timings of the three monospecific diets. Clear maximum peaks are present in the final part of the crown, in accordance with the DIET2 period (based on a C_4 plant highly enriched in ^{15}N), while the lowest isotopic values are located previous to the C_4 maximum peak, which fit with the previous DIET1 (alfalfa-based) period.

5. Discussion

5.1. Evaluation of the drill-sampling strategy for dentine sequential analyses

The incremental growth of dentine in high-crowned teeth is oblique to the vertical axis, so dentine continues developing in thickness while the teeth develop in height. The main advantage of sampling dentine by drilling is to obtain small-size samples where the inclusion of inner

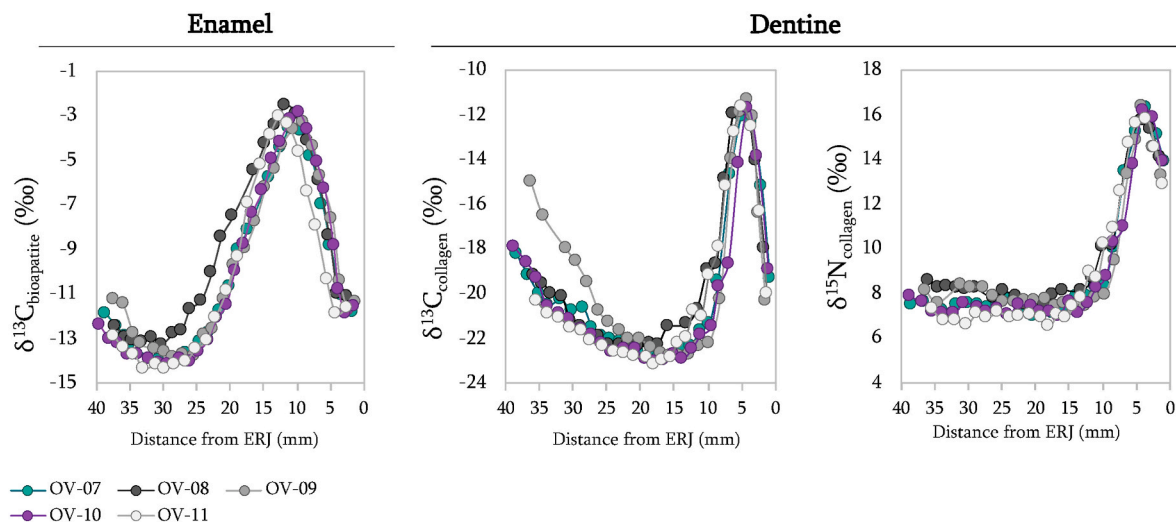


Fig. 2. Distribution of isotopic values obtained by sequential sampling of enamel ($\delta^{13}\text{C}$) and dentine ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) along the M_2 crown of all specimens analyzed.

dentine increments, formed in later stages of dental development, is highly reduced. In Fig. 3 we compare the intra-tooth series of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values obtained in dentine by drill-sampling or slice-sampling in the M_2 of the same sheep specimens (right or left M_2 , respectively). The main effects of the slice-sampling previously observed (Balasse et al., 2001; Díez-Canseco et al., 2022) are now largely reduced as follows.

- (i) Drilled series show less attenuation of diet isotopic signatures. In both carbon and nitrogen signatures DS yields a higher range of variation than the SS series ($11.1 \pm 0.4\text{‰}$ in front of $6.2 \pm 0.3\text{‰}$ in $\delta^{13}\text{C}$ values, and $9.1 \pm 0.4\text{‰}$ in front of $7.2 \pm 0.4\text{‰}$ in $\delta^{15}\text{N}$ values), therefore closer to the original isotopic amplitude existing between diets (DIET1-DIET2: $\sim 15.8\text{‰}$ in $\delta^{13}\text{C}$ and $\sim 10.5\text{‰}$ in $\delta^{15}\text{N}$). Also, DS yields a fluctuation of $\delta^{13}\text{C}$ values along the first part of the crown which is not recorded in the sliced series.
- (ii) Abrupt diet changes are represented in shorter spans in the crown, reducing the over-representation of dietary changes along the sequences. In the DS series, the increasing trends of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values – i.e. isotopic change into DIET2 signatures– start in lower positions of the crown (14.0 ± 2.1 mm and 13.9 ± 2.4 mm from ERJ, respectively), while in sliced series they start in upper parts of the crown (22.2 ± 1.3 mm and 24.2 ± 3.0 mm from ERJ, respectively) or directly after the first samples (e.g. $\delta^{15}\text{N}$ in OV-11).

On the DS series, samples incorporate a small proportion of the total dentine thickness commonly sampled by the SS strategy. It entails obtaining a more faithful picture of the original isotopic variation recorded along a vertical axis of the tooth crown, since the sampling of large time-spans, which may involve different isotopic scenarios, is avoided. The more time-accurate samples of drilled series also engender

that changes in diet –i.e. the shifts into new isotopic signatures– are not represented in such advanced positions of the sequences, but more accordingly to the real growth timings of the tooth crown (i.e. in height) (Fig. 4).

In both incremental dentine strategies, part of the isotopic variation observed in the sequences is the result of the sampling procedure rather than the actual collagen isotopic variation over time (i.e. the equilibration period between isotopic input and tissue synthesis) (Díez-Canseco et al., 2022). Considering the growth pattern of dentine in high-crowned teeth, it is expectable that the observed changes into new isotopic values mostly reflect the gradual admixture of subsequent dentine increments. Increments synthesized in earlier periods are progressively sampled in less proportion in favour of later increments, until the first period is no longer sampled. This is an important aspect to consider when interpreting the isotopic results, since the position of diet changes in the crown corresponds, if visible, to the final point of the variation observed in the sequences (commonly Max. or Min. values), instead of the starting point. However, high rates of dentine admixture may alter the position of diet changes in the sequences, as can be observed in slice-series where the minimum $\delta^{13}\text{C}$ values of DIET1 are completely blurred.

In general, our drill-sampling allows a better representation of the original isotopic signature recorded in dentine, especially in the case of existing several dietary scenarios with different isotopic signatures. Besides, it may provide a huge advantage when sampling molars in a population where different development stages are present in teeth: the drill method provides sequences that are independent of the addition of new inner increments during growth, and thus comparable between individuals of different ages. In contrast, the slice-sampling obtains bigger size samples, presumably easier to apply to archaeological assemblages where some preservation issues may occur, but the

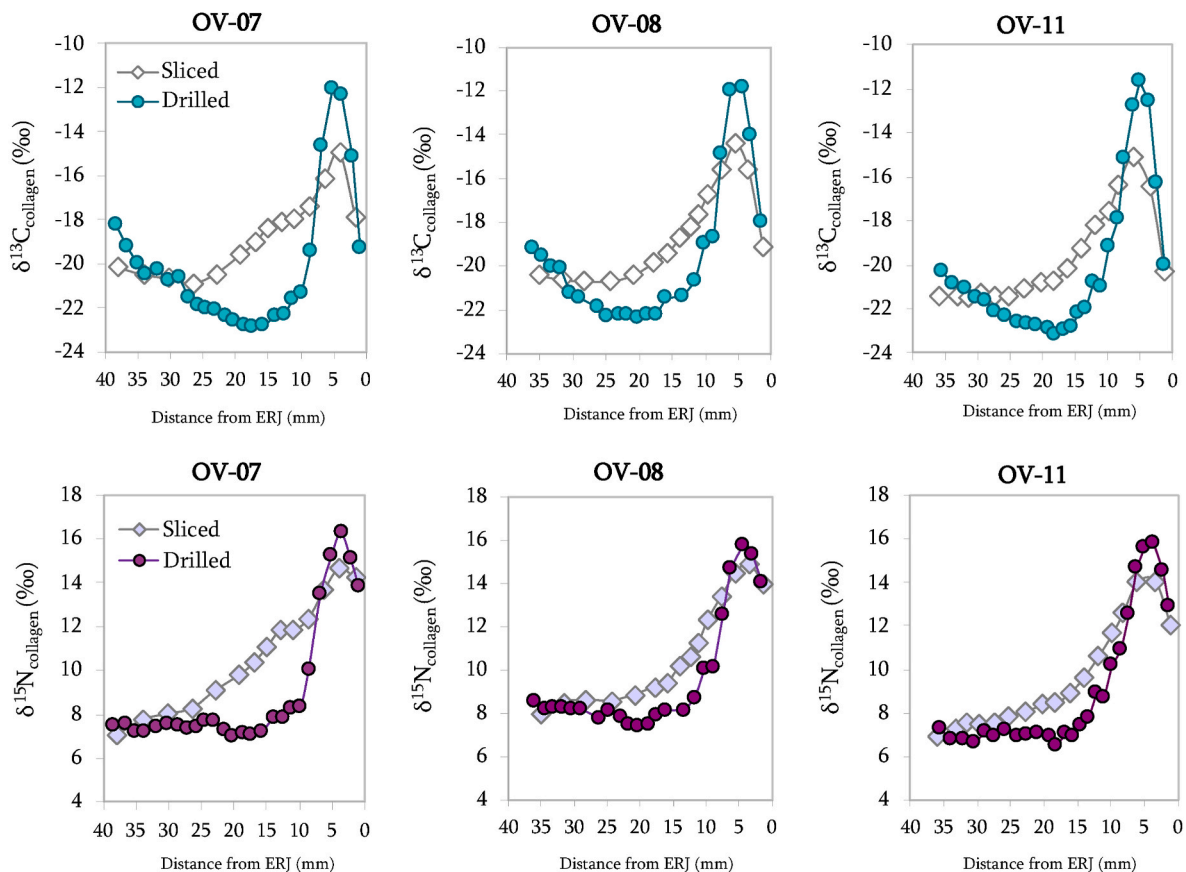


Fig. 3. Sequential $\delta^{13}\text{C}$ values (upper row) and $\delta^{15}\text{N}$ values (lower row) of dentine collagen obtained by slice-sampling (rhomboid symbol; data from Díez-Canseco et al., 2022) and drill-sampling (circle symbols; this study) in M_2 molars of same specimens.

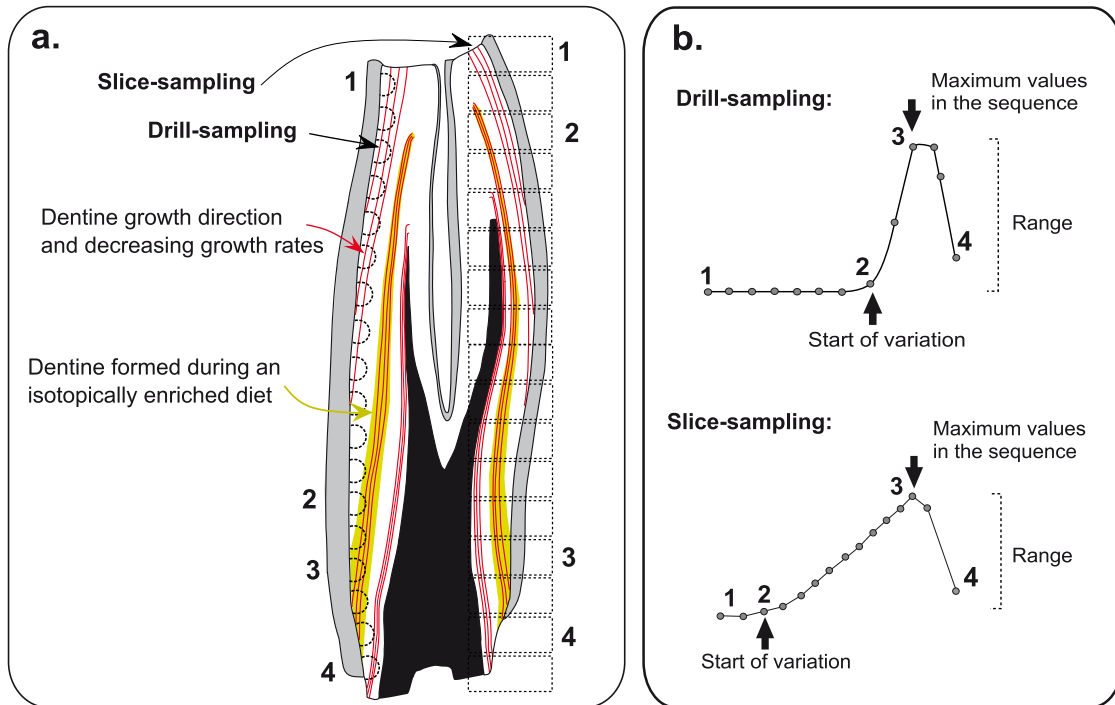


Fig. 4. Representation of diet changes in the isotopic results depending on the sampling strategy implemented in dentine. a) Scheme of a bucco-lingual section of a mandibular molar. Dentine growth direction and decreasing growth rates are shown: red lines represent different groups of increments laid down in equal time spans but in different parts of the crown (edited and modified from Kahle et al., 2018). The yellow band represents a hypothetical scenario of an isotopically enriched diet during the final months of tooth crown development. b) Intra-tooth isotopic variation obtained after slice-sampling (SS) or drill-sampling (DS) approaches: changes in diet are located more accordingly to growth timing in DS series, while Max. values fit with the moment of the new diet in both SS and DS approaches. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

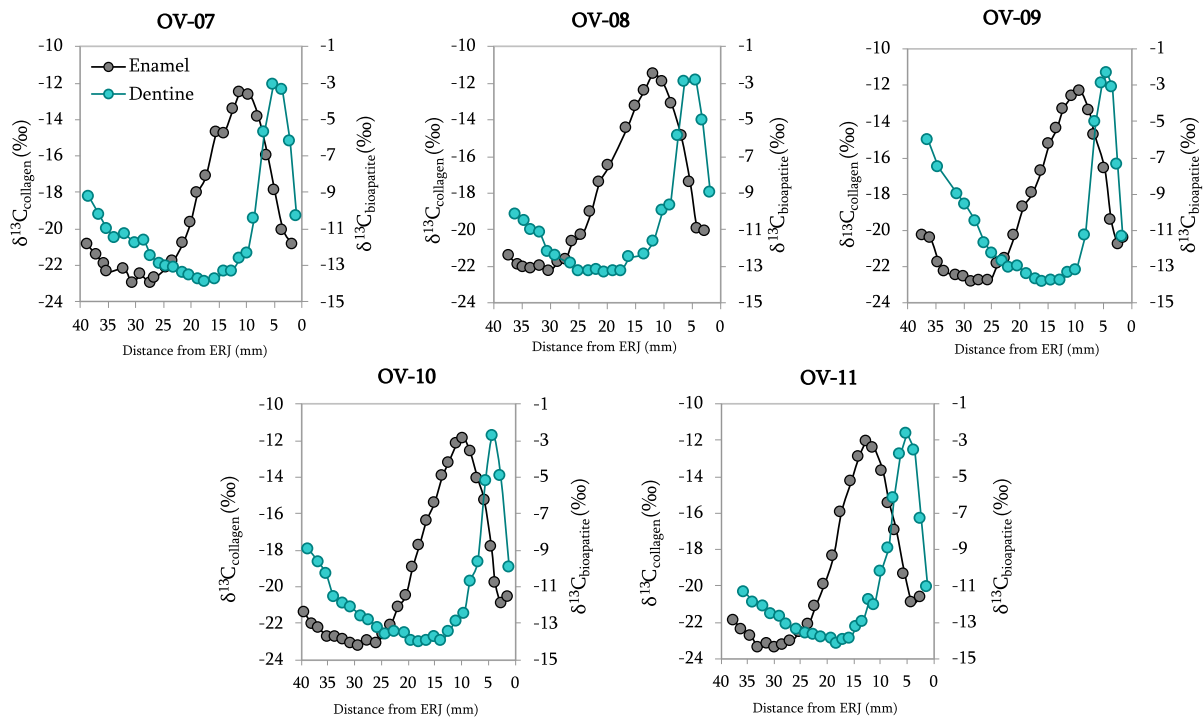


Fig. 5. Carbon isotope values of dentine (blue symbol, left axis) and enamel (grey symbol, right axis) obtained by drilling in the same specimen and same tooth (all sampled sheep individuals, right M₂). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

attenuation of the input isotopic signal should be highly considered when the slice method is applied: some isotopic variations could be highly blurred or could result indistinguishable, especially along the first part of the crown or in those teeth where dentine is well developed (older specimens). Different stages of development should be avoided when implementing the slice method in inter-individual comparisons.

5.2. A comparison with enamel sequential analysis: histological implications, time resolution, and comparability of isotopic results

In Fig. 5 we compare the carbon isotope results from the sequential sampling of enamel (bioapatite $\delta^{13}\text{C}$) and dentine drill-sampling (collagen $\delta^{13}\text{C}$) performed in the same tooth. Both approaches, dentine and enamel sequential sampling, show clear similarities in their pattern of distribution of $\delta^{13}\text{C}$ values, in accordance with the alternation of $\text{C}_3\text{-C}_4\text{-C}_3$ diets induced in sheep during the experimental program. However, it is quite surprising that dentine-drilled series, despite the admixture of dentine increments, have provided a similar range of intra-tooth variation in $\delta^{13}\text{C}$ values than the one obtained in enamel through the standard protocol of sequential analysis. All dentine collagen sequences present a mean $\delta^{13}\text{C}$ amplitude of $11.1 \pm 0.4\%$, in front of the $10.9 \pm 0.4\%$ represented in enamel (actual DIET1-DIET2 $\delta^{13}\text{C}$ spacing = 15.8%), showing a similar attenuation of the original amplitude in both approaches. This data suggests that by drilling, dentine sequential sampling is capable to represent changes in isotope ratios along the tooth crown with similar resolution as enamel standard protocols, at least in terms of the range of intra-tooth variation.

Although both approaches seem to converge in similar damping of the isotopic sequences, different histological factors relating to dentine and enamel development are involved, and the time span represented in samples is not the same in both tissues. The complexities of the enamel mineralization process, proceeding in two phases—matrix formation and secondary mineralization or maturation— engender that the final and fully-mineralized enamel accumulates carbonate from several months, which results in a subsequent time-averaged isotope ratio (Balasse 2002, 2003; Passey and Cerling 2002; Zazzo et al. 2005, 2010). In sheep, this whole enamel developmental process covers about 5–6 months (Balasse et al., 2012). In the case of dentine, conversely, the attenuation of diet isotopic signatures strictly derives from the sampling performance, from mixing collagen from different increments and therefore synthesized in different moments.

Dental growth rates decrease progressively during the later stages of tooth formation (Witzel et al., 2018), so the time span represented in dentine samples is not constant along the crown. Previous studies focusing on dental growth rates in Soay sheep show that the mineral apposition rates of dentine vary from $21 \mu\text{m}$ to $<2 \mu\text{m}$ per day in a first mandibular molar, decreasing along the vertical axis of growth, i.e. from cuspal to cervical, and from the enamel-dentine junction towards the pulp chamber, i.e. from outer to inner parts of the crown (Kahle et al., 2018). Considering these data, by performing a drill-sampling of $\sim 500 \mu\text{m}$ depth, samples may involve time spans that vary from 24 days (in upper parts of the crown developed during first months of dental growth) to ≥ 8 months (later formed dentine of lower and inner parts of the crown). These decreasing trends in growth ratios entail that the time span involved in each dentine sample is *gradually* enlarged in a serial sampling, increasing while approaching cervical parts of the crown. Lower growth rates are also present in enamel in the final part of the crown (Witzel et al., 2018; Zazzo et al., 2010), but due to the extended length of the maturation front, a more constant isotope-mixing and time-average along the crown should be expected in enamel samples than in dentine. This feature should be considered when interpreting isotopic data from dentine sequential analyses.

The time frame involved in dentinogenesis and enamel mineralization processes also affects directly the position of the different diet scenarios along the isotopic sequences, i.e. along the crown. In dentine sequences the position of the Min. and Max. $\delta^{13}\text{C}$ values is uniformly

located in lower positions of the crown than in enamel sequences: respectively, $13.7 \pm 1.7 \text{ mm}$ and $6.7 \pm 0.8 \text{ mm}$ closer to ERJ. As a consequence of the extended period of enamel maturation, the carbon isotopic composition from the mineral fraction of enamel represents mineralization moments occurring later in time than the development of that part of the crown (formed during a previous phase of enamel matrix formation). As a result, diet changes represented in enamel are “displaced”, and we cannot infer the age at which a diet change occurred directly from the position of isotopic changes in the tooth (Balasse 2002, 2003). In contrast, the analyses of dentine collagen will represent the predentine apposition phase (organic-matrix formation), thus representing crown development with no delay. When analysing dentine collagen, isotopic signatures timing may be inferred directly from the position in the tooth. In this line, in agreement with Stojanovski et al. (2020), diet at death time could be also inferred from the last samples in the case of still-growing teeth. However, as discussed above, time resolution decreases in the final parts of the crown, and a larger attenuation of the isotope signatures should be considered here.

The comparison of both approaches suggests that dentine sequential analyses performed by a drill-sampling may be as capable as the standard protocols of enamel sequential analyses to represent the diachronic isotopic variation recorded along the tooth crown. Even when samples do not isolate short amounts of time, these analyses allow for representing life conditions and diet variations of specimens over time.

6. Conclusions

In this paper, we provide a new sampling protocol to implement sequential stable isotope analysis of dentine collagen in high-crowned teeth. This proposal highly reduces the isotopic attenuation caused by dentine admixture in comparison with previous sampling strategies, and yields similar resolution as enamel sequential analyses. A high uniformity between sampled individuals is shown in dentine isotopic results, indicating that the protocol is reproducible in different specimens while yielding comparable isotopic data. We highly recommend performing a dentine drill-sampling when possible, especially when comparing data between individuals of different ages. The method offers better guarantees than the slice-sampling procedure to represent the actual isotopic composition of collagen recorded along the tooth crown. Moreover, the isotopic variation is represented more accordingly to growth timings, providing data more susceptible to be accurately interpreted.

The implementation of this method may encourage future zooarchaeological studies to explore the uses and possibilities of stable isotope analyses of incremental dentine collagen. Tracking the isotopic variation of collagen through animals' life, offers numerous possibilities to study life conditions linked to environment, diet, mobility, or reproduction, especially in the case of nitrogen isotopes which have been barely explored through sequential analyses. The protocol may also be applicable to other bovid species, although more methodological work will be needed in this line. The resolution of the strategy could be higher when implemented in bigger size species than sheep, such as cattle.

Funding

This research is part of the I+D+i project PID2021-122355NB-C32, funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by ERDF A way of making Europe; and was financially supported by projects CLT009/22/000042 and 2021-SGR-01237, funded by Department of Culture of Generalitat de Catalunya Government; and by the READ project, funded by the European Research Council (ERC) under the European Union's HORIZON ERC programme (Grant agreement No. 101088071), and led by CT. The IPHES-CERCA has received financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation through the María de Maeztu program for Units of Excellence (CEX2019-000945-M) CD's work is supported by Fundación Atapuerca. CT's work is supported by

the Spanish Ministry of Science and Innovation (RYC 2020-029404-I).

CRedit authorship contribution statement

Celia Díez-Canseco: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft. **Carlos Tornero:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgements

The authors thank Dr R. Costa and Dr J.L. de la Torre (Servei de Granges, Autonomous University of Barcelona) who supervised the sheep herd and ensured the animals' welfare during the development of the whole sheep experimental program. The authors thank the Associate Editor Dr Cheryl Makarewicz, the Editor-in-Chief Dr Marcos Martín-Torres, and the two anonymous reviewers, for their valuable comments that have contributed to improve the original manuscript. A preliminary version of this project was presented as a poster at the second meeting for the Stable Isotope in Zooarchaeology ICAZ working group (SIZWG 2023), held from March 22nd to 25th in Berlin (DE).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jas.2023.105923>.

References

- Ambrose, S.H., 1990. Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. *J. Archaeol. Sci.* 17 (4), 431–451. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(90\)90007-R](https://doi.org/10.1016/0305-4403(90)90007-R).
- Bada, J.L., Peterson, R.O., Schimmelmann, A., Hedges, R.E.M., 1990. Moose teeth as monitors of environmental isotopic parameters. *Oecologia* 82 (1), 102–106. <https://doi.org/10.1007/BF00318540>.
- Balasse, M., 2002. Reconstructing dietary and environmental history from enamel isotopic analysis: time resolution of intra-tooth sequential sampling. *Int. J. Osteoarchaeol.* 12 (3), 155–165. <https://doi.org/10.1002/oa.601>.
- Balasse, M., 2003. Potential biases in sampling design and interpretation of intra-tooth isotope analysis. *Int. J. Osteoarchaeol.* 13 (1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1002/oa.656>.
- Balasse, M., Ambrose, S.H., Smith, A.B., Price, T.D., 2002. The seasonal mobility model for prehistoric herders in the south-western Cape of South Africa assessed by isotopic analysis of sheep tooth enamel. *J. Archaeol. Sci.* 29 (9), 917–932. <https://doi.org/10.1006/jasc.2001.0787>.
- Balasse, M., Bocherens, H., Mariotti, A., Ambrose, S.H., 2001. Detection of dietary changes by intra-tooth carbon and nitrogen isotopic analysis: an experimental study of dentine collagen of cattle (*Bos taurus*). *J. Archaeol. Sci.* 28 (3), 235–245. <https://doi.org/10.1006/jasc.1999.0535>.
- Balasse, M., Obein, G., Ughetto-Monfrin, J., Mainland, I., 2012. Investigating seasonality and season of birth in past herds: a reference set of sheep enamel stable oxygen isotope ratios. *Archaeometry* 54 (2), 349–368. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2011.00624.x>.
- Balasse, M., Tresset, A., 2002. Early weaning of Neolithic domestic cattle (Bercy, France) revealed by intra-tooth variation in nitrogen isotope ratios. *J. Archaeol. Sci.* 29 (8), 853–859. <https://doi.org/10.1006/jasc.2001.0725>.
- Beaumont, J., Gledhill, A., Lee-Thorp, J., Montgomery, J., 2013. Childhood diet: a closer examination of the evidence from dental tissues using stable isotope analysis of incremental human dentine. *Archaeometry* 55 (2), 277–295. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2012.00682.x>.
- Caja, G., Basch, R., Piedrafita, J., Milán, M.J., Casellas, J., 2010. Ovella ripollesa. *Dossier Tècnic* 43 (I), 36.
- Carlson, S.J., 1991. Vertebrate dental structures. In: Carter, J.G. (Ed.), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*, vol. 5. Springer US, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-5740-5_21, 235–26.
- Cleland, T.P., Saranča, J.J., France, C.A.M., 2021. Proteomic profile of bone “collagen” extracted for stable isotopes: implications for bulk and single amino acid analyses. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 35 (6) <https://doi.org/10.1002/rcm.9025>.
- Czermak, A., Fernández-Crespo, T., Ditchfield, P.W., Lee-Thorp, J.A., 2020. A guide for an anatomically sensitive dentine microsampling and age-alignment approach for human teeth isotopic sequences. *Am. J. Phys. Anthropol.* 173 (4), 776–783. <https://doi.org/10.1002/ajpa.24126>.
- Czermak, A., Schermelleh, L., Lee-Thorp, J., 2018. Imaging-assisted time-resolved dentine sampling to track weaning histories. *Int. J. Osteoarchaeol.* 28 (5), 535–541. <https://doi.org/10.1002/oa.2697>.
- Díez-Canseco, C., Aguilera, M., Tornero, C., 2022. Intra-tooth isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth: a new experimental study with modern sheep specimens. *Int. J. Osteoarchaeol.* 32 (5), 962–975. <https://doi.org/10.1002/oa.3138>.
- Esquivelzeta, C., Fina, M., Bach, R., Madruga, C., Caja, G., Casellas, J., Piedrafita, J., 2011. Morphological analysis and subpopulation characterization of Ripollesa sheep breed. *Animal Genetic Resources/Ressources génétiques animales/Recursos genéticos animales* 49, 9–17. <https://doi.org/10.1017/s2078633611000063>.
- Fernández-Crespo, T., Czermak, A., Lee-Thorp, J.A., Schulting, R.J., 2018. Infant and childhood diet at the passage tomb of Alto de la Huesera (north-central Iberia) from bone collagen and sequential dentine isotope composition. *Int. J. Osteoarchaeol.* 28 (5), 542–551. <https://doi.org/10.1002/oa.2659>.
- Frank, R.M., Nalbandian, J., 1989. The structure and ultrastructure of dentine. In: Berkovitz, B.K.B., Boyde, A., Frank, R.M., Höhling, H.J., Moxham, B.J., Nalbandian, et al. (Eds.), *Teeth*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 173–247.
- Fricke, H.C., O'Neil, J.R., 1996. Inter- and intra-tooth variation in the oxygen isotope composition of mammalian tooth enamel phosphate: implications for palaeoclimatological and palaeobiological research. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 126 (1–2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(96\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(96)00072-7).
- Gallego-Valle, A., Colominas, L., Burguet-Coca, A., Aguilera, M., Palet, J.M., Tornero, C., 2020. What is on the menu today? Creating a microwear reference collection through a controlled-food trial to study feeding management systems of ancient agropastoral societies. *Quat. Int.* 557 (February), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2020.02.020>.
- Gillis, R., Bréhard, S., Bălăşescu, A., Ughetto-Monfrin, J., Popovici, D., Vigne, J.-D., Balasse, M., 2013. Sophisticated cattle dairy husbandry at Borduşani-Popină (Romania, fifth millennium BC): the evidence from complementary analysis of mortality profiles and stable isotopes. *World Archaeol.* 45 (3), 447–472. <https://doi.org/10.1080/00438243.2013.820652>.
- Griffith, J., Mulville, J., 2020. A sequential multi-isotopic analysis of Norse Cattle teeth. In: Sharples, N. (Ed.), *The Economy of a Norse Settlement in the Outer Hebrides: Excavations at Mounds 2 and 2A, Bornais, South Uist*. Oxbow Books, Oxford, pp. 367–381.
- Guiry, E.J., Hepburn, J.C., Richards, M.P., 2016. High-resolution serial sampling for nitrogen stable isotope analysis of archaeological mammal teeth. *J. Archaeol. Sci.* 69, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2016.03.005>.
- Guiry, E.J., Jones, B.M., deFrance, S., Bruseth, J.E., Durst, J., Richards, M.P., 2018. Animal husbandry and colonial adaptive behavior: isotopic insights from the La Belle shipwreck fauna. *Hist. Archaeol.* 52 (4), 684–699. <https://doi.org/10.1007/s41636-018-0142-7>.
- Guiry, E.J., Szpak, P., 2020. Quality control for modern bone collagen stable carbon and nitrogen isotope measurements. *Methods Ecol. Evol.* 11 (9), 1049–1060. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13433>.
- Hatté, C., Morvan, J., Noury, C., Paterne, M., 2001. Is classical acid-alkali-acid treatment responsible for contamination? An alternative proposition. *Radiocarbon* 43 (2A), 177–182. <https://doi.org/10.1017/S003382220003798X>.
- Hillson, S., 2005. *Teeth*, second ed. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511614477>. Teeth, Second Edition.
- Hopper, C., Sealy, J.C., Dewar, G., 2018. Little Ice Age drought event reconstructed from isotopic analysis of archaeological springbok (*Antidorcas marsupialis*) teeth. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 495 (April), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.09.019>.
- Janis, C.M., 1988. An estimation of tooth volume and hypsodonty indices in ungulate mammals, and the correlation of these factors with dietary preferences. In: Russell, D.E., Santoro, J.P., Sigogneau-Russell, D. (Eds.), *Teeth Revisited: Proceedings of the VIIIth International Symposium on Dental Morphology*, vol. 1986. Éditions du Muséum, Paris, pp. 367–387. Paris.
- Jordana, X., Köhler, M., 2011. Enamel microstructure in the fossil bovid *Myotragus balearicus* (Majorca, Spain): implications for life-history evolution of dwarf mammals in insular ecosystems. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 300 (1–4), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.12.008>.
- Kahle, P., Witzel, C., Kierdorf, U., Fröhlich, K., Kierdorf, H., 2018. Mineral apposition rates in coronal dentine of mandibular first molars in Soay sheep: results of a fluorochrome labeling study. *Anat. Rec.* 301 (5), 902–912. <https://doi.org/10.1002/ar.23753>.
- Kirsanow, K., Makarewicz, C., Tuross, N., 2008. Stable oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) and hydrogen (δD) isotopes in ovicaprid dentinal collagen record seasonal variation. *J. Archaeol. Sci.* 35 (12), 3159–3167. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.06.025>.
- Losey, R.J., Guiry, E., Nomokonova, T., Gusev, A.V., Szpak, P., 2020. Storing fish? a dog's isotopic biography provides insight into Iron Age food preservation strategies in the Russian Arctic. *Archaeological and anthropological sciences* 12 (8), 200. <https://doi.org/10.1007/s12520-020-01166-3>.
- Lee-Thorp, J.A., van der Merwe, N.J., 1991. Aspects of the chemistry of modern and fossil biological apatites. *J. Archaeol. Sci.* 18 (3), 343–354. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(91\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0305-4403(91)90070-6).
- LeGeros, R.Z., 1981. Apatites in biological systems. *Prog. Cryst. Growth Char.* 4 (1–2), 1–45. [https://doi.org/10.1016/0146-3535\(81\)90046-0](https://doi.org/10.1016/0146-3535(81)90046-0).
- Makarewicz, C.A., 2014. Winter pasturing practices and variable fodder provisioning detected in nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) isotopes in sheep dentinal collagen. *J. Archaeol. Sci.* 41, 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.09.016>.
- Makarewicz, C.A., 2017. Winter is coming: seasonality of ancient pastoral nomadic practices revealed in the carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopic record of

- Xiongnu caprines. *Archaeological and Anthropological Sciences* 9 (3), 405–418. <https://doi.org/10.1007/s12520-015-0289-5>.
- Makarewicz, C.A., Arbuckle, B.S., Öztan, A., 2018. Carbon and nitrogen isotopic evidence for sheep and goat pastoral management practices at Chalcolithic Köşk Höyük, central Turkey. In: Ventresca Miller, A., Makarewicz, C.A. (Eds.), *Isotopic Investigations of Pastoralism in Prehistory*. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781315143026>.
- Masters, P.M., 1987. Preferential preservation of noncollagenous protein during bone diagenesis: implications for chronometric and stable isotopic measurements. *Geochem. Cosmochim. Acta* 51 (12), 3209–3214. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(87\)90129-3](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90129-3).
- Milhaud, G., Nezit, J., 1991. *Développement des molaires chez le Mouton: Étude morphologique, radiographique et microdurométrique*, vol. 1672. *Recueil de Médecine Veterinaire de l'Ecole d'Alfort*, pp. 121–127.
- Nanci, A., 2013. Dentin-pulp complex. In: Nanci, A. (Ed.), *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Elsevier Mosby, St. Louis, pp. 165–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07846-7.00008-2>.
- Passey, B.H., Cerling, T.E., 2002. Tooth enamel mineralization in ungulates: implications for recovering a primary isotopic time-series. *Geochem. Cosmochim. Acta* 66 (18), 3225–3234. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)00933-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)00933-X).
- Payne, S., 1973. Kill-off patterns in sheep and goats: the mandibles from aşvan kale. *Anatol. Stud.* 23, 281–303. <https://doi.org/10.2307/3642547>.
- Rogers, B., Gron, K.J., Montgomery, J., Rowley-Conwy, P., Nowell, G., Peterkin, J., Jacques, D., 2019. Isotopic analysis of the Blick Mead dog: a proxy for the dietary reconstruction and mobility of Mesolithic British hunter-gatherers. *J. Archaeol. Sci.: Report* 24, 712–720. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2019.02.022>.
- Schoeninger, M.J., DeNiro, M.J., 1982. Carbon isotope ratios of apatite from fossil bone cannot be used to reconstruct diets of animals. *Nature* 297 (5867), 577–578. <https://doi.org/10.1038/297577a0>.
- Sharp, Z.D., Cerling, T.E., 1998. Fossil isotope records of seasonal climate and ecology: straight from the horse's mouth. *Geology* 26 (3), 219. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1998\)026<0219:FIROSC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1998)026<0219:FIROSC>2.3.CO;2).
- Stojanovski, D., Živaljević, I., Dimitrijević, V., Dunne, J., Evershed, R.P., Balasse, M., et al., 2020. Living off the land: terrestrial-based diet and dairying in the farming communities of the Neolithic Balkans. *PLoS One* 15 (8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237608>.
- Tornero, C., Bălăşescu, A., Ughetto-Monfrin, J., Voinea, V., Balasse, M., 2013. Seasonality and season of birth in early Eneolithic sheep from Cheia (Romania): methodological advances and implications for animal economy. *J. Archaeol. Sci.* 40 (11), 4039–4055. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.05.013>.
- Tuross, N., Fogel, M.L., Hare, P.E., 1988. Variability in the preservation of the isotopic composition of collagen from fossil bone. *Geochem. Cosmochim. Acta* 52 (4), 929–935. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90364-X](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90364-X).
- Upex, B., Dobney, K., 2012. Dental enamel hypoplasia. *J. Zool.* 287, 259–268. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2012.00912.x>.
- Wiedemann, F.B., Bocherens, H., Mariotti, A., Driesch, A. von den, Grupe, G., 1999. Methodological and archaeological implications of intra-tooth isotopic variations ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) in herbivores from ain ghazal (Jordan, Neolithic). *J. Archaeol. Sci.* 26 (6), 697–704. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0392>.
- Witzel, C., Kierdorf, U., Frölich, K., Kierdorf, H., 2018. The pay-off of hypsodonty - timing and dynamics of crown growth and wear in molars of Soay sheep. *BMC Evol. Biol.* 18 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1332-9>.
- Zazzo, A., Balasse, M., Passey, B.H., Moloney, A.P., Monahan, F.J., Schmidt, O., 2010. The isotope record of short- and long-term dietary changes in sheep tooth enamel: implications for quantitative reconstruction of paleodiets. *Geochem. Cosmochim. Acta* 74 (12), 3571–3586. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.03.017>.
- Zazzo, A., Balasse, M., Patterson, W.P., 2005. High-resolution $\delta^{13}\text{C}$ intratooth profiles in bovine enamel: implications for mineralization pattern and isotopic attenuation. *Geochem. Cosmochim. Acta* 69 (14), 3631–3642. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2005.02.031>.
- Zazzo, A., Balasse, M., Patterson, W.P., 2006. The reconstruction of mammal individual history: refining high-resolution isotope record in bovine tooth dentine. *J. Archaeol. Sci.* 33 (8), 1177–1187. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.12.006>.

Weaning time in domestic caprines through carbon and nitrogen isotopes: testing dentine sequential analyses in modern sheep specimens¹

Díez-Canseco, Celia*^{1,2} & Tornero, Carlos^{3,2}

1. Universitat Rovira i Virgili, Departament d'Història i Història de l'Art, Avinguda de Catalunya 35, 43002 Tarragona, Spain

2. Institut Català de Paleoeologia Humana i Evolució Social (IPHES-CERCA), Zona Educacional 4, Campus Sescelades URV (Edifici W3), 43007 Tarragona, Spain

3. Department of Prehistory, Autonomous University of Barcelona (UAB), Edifici B Facultat de Filosofia i Lletres, 08193 Bellaterra, Spain

*Corresponding author: cdiezcansco@iphes.cat

Abstract

The age at weaning in domestic dairy animals has been a focus of interest in archaeological research due to its connection to milk production. Artificial weaning (i.e. before natural weaning age) allows to balance physiological and nutritional needs of both mother and offspring while increasing milk supply for human consumption. Past artificial weaning practices have been previously investigated in dairy animals through biochemical analyses. Nitrogen isotopes analyses of bone or dentine collagen have been widely implemented to study weaning stories in humans and other mammals, since they reflect the trophic step present in the dietary shift between mother's milk and sub-adult solid diet. While these approaches have been intended to explore this process on dairy cows, nowadays it is an almost unexplored topic in past domestic caprines. In this study, we implement dentine sequential analyses of nitrogen and carbon isotopes of collagen in early-weaned (at two months old) sheep coming from a modern experimental flock. The sheep specimens selected were progressively slaughtered being 11 to 20 months old, providing a set of specimens where different dentine growth stages are present in teeth. We performed a sampling by drilling in mandibular first molars and we test the suitability of the strategy to identify an artificial weaning in sheep. The sampling method performed yielded a pattern of isotopic distribution where position of diet changes is independent to the age of death. Results show that the method offers enough resolution to track weaning practices in medium-size dairy species as sheep. The implementation of these incremental analyses in zooarchaeological assemblages would allow to explore human technical skills for managing lactation and weaning in past domestic caprines, and the role of these species in past dairying systems.

Keywords: lactation, dentine collagen, intra-tooth, incremental, *Ovis aries*, experimental

1. Introduction

The origin and the scale of milk production is a classic topic of archaeological research. Dairy products may involve an essential part of human subsistence strategies, and milk exploitation may have been present since early farming economies. Although the Sherratt's model of the "Secondary Products Revolution" (Sherratt 1981, 1983) has been long held, an early origin of dairying during Neolithic is nowadays generally assumed as a result of the osteological, genetic, and biomolecular evidences from last decades (Greenfield, 2010, 2014; Halstead, 2023; Roffet-Salque et al., 2018; Vigne & Helmer, 2007).

The majority of research contributions concerning milk production have been made relying on zooarchaeological data and the reconstruction of certain slaughter or culling profiles oriented to a specialized exploitation of dairy products (e.g. Greenfield, 2005; Greenfield et al., 1988; Helmer et al., 2005, 2007; Payne, 1973). However, the study of milking through mortality profiles faces some equifinality problems, since other animal end products or certain processes unrelated to the exploitation of dairy products, as a biased faunal assemblage or natural infant mortality, might generate similar mortality patterns to the theoretical 'milk' profiles (Greenfield, 2014; Halstead, 1998; Martín et al., 2016). More

¹ Manuscrito inédito

recently, the organic residue analyses of dairy lipids and ancient proteins preserved in ceramic sherds, have also greatly contributed to the study of milk production by yielding direct evidences of ruminant dairy products processing in pottery vessels (Copley et al., 2003; Dudd & Evershed, 1998; Hendy et al., 2018). Early dairying evidences are nowadays available from seventh millennium BC in pottery Neolithic sites from the Near East, and from early Neolithic sites all along the Mediterranean area of Europe (Debono Spiteri et al., 2016; Evershed et al., 2008). However, the scale of milk production and the main animal management mechanisms involved, are still unknown aspects.

The role of caprines, especially sheep, in milk exploitation, has been widely claimed through zooarchaeological studies from the beginning of Neolithic onwards (Gillis et al., 2022; Helmer et al., 2007; Saña & Tornero, 2008, 2012; Sierra et al., 2019; Vigne & Helmer, 2007). Caprines show a wide presence in the prehistorical faunal record, they were the first domesticated animal species, and they involve lower risk of failure in maintaining lactation during an artificial milking than cattle (Balasse, 2003). 'Milk' culling profiles for sheep and goats are based on the assumption that the offspring should not be kept alive to maximize human milk consumption. However, these models represent specialization and optimising strategies for a certain goal, and it has been argued that there is no reason to preclude them in prehistory (Greenfield, 2014; Halstead, 1998, 2023). Sheep milking may not be necessary reflected in the slaughter of young animals at lactating age, since other alternatives may be more suitable for herder's targets while keeping the young alive (Halstead, 1998; Payne, 1973). The role of caprines in dairying may be underestimated when attending solely to the mortality profiles.

Artificial weaning of lambs (i.e. forced cessation of suckling before natural weaning age) is well documented ethnographically in pastoral systems where sheep dairy products are targeted (Hadjikoumis, 2017; Halstead, 1998; Makarewicz, 2011; Vigne & Helmer, 2007), but the historical transcendence of this practice is still unknown. In caprines, the presence of the offspring with the mother is not as essential as in cattle to guarantee a proper milking (detailed review in Balasse 2003), and ethnographic examples show that, at least for recent sheep breeds, ewes do not need the presence of the lamb to maintain the whole lactation period (Halstead, 1998). Early weaning, is a win-win strategy for a mixed-model where milk products are supplied in greater quantities for human consumption while lamb's meat optimum or potential reproductive females are not sacrificed. This strategy could be favoured in diversified mixed economies where herd stability and survival are also targeted, as it could be expectable in prehistoric times rather than a systematically young's culling to maximise milking (Greenfield, 2014; Halstead, 1998, 2023).

Artificial weaning of lambs is a practice widely implemented nowadays in milk production systems to increase the amount of milk collected, but also to improve body reserves and reproductive conditions of the ewes (Haenlein & Wendorff, 2006; Vatankhah & Salehi, 2010). In modern sheep breeds, lactation period commonly covers ~5 months in a non-managed weaning process, although it may be extended until 8 months in some dairy sheep breeds (Wright 2014). Weaning age varies between 30 to 120 days when managed, although weaning at least at 60 days greatly improves proper lamb growth and development of digestive system (Freitas-de-Melo et al., 2022; Haenlein & Wendorff, 2006).

Abundances of stable carbon and nitrogen isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in body proteins mainly reflect those of diet plus a discrimination factor, smaller for carbon (+1‰) than for nitrogen (+3–4‰), and usually known as trophic step (DeNiro & Epstein, 1978, 1981; Minagawa & Wada, 1984; Schoeninger & DeNiro, 1984). Nursing offspring are also one trophic level above their mothers, and $\delta^{15}\text{N}$ values in body proteins trace the weaning process with a progressive decline until reaching similar nitrogen values to those of the mother (assuming they both present similar diets) (Fogel et al., 1989; Fuller et al., 2006). The use of $\delta^{15}\text{N}$ values in bone or dentine collagen samples, often in combination with $\delta^{13}\text{C}$ values, has been extensively explored as indicator of breastfeeding and weaning process in archaeological populations, both in humans (Katzenberg & Pfeiffer, 1995; Nitsch et al., 2011; Richards et al., 2002; Schurr, 1997) and faunal remains (Balasse et al., 1997, 1999, 2000; Gillis, 2012). In particular, incremental dentine analyses of nitrogen isotopes have frequently been used to estimate the age at which ancient human infants were weaned (Beaumont et al., 2013; Czermak et al., 2018; Eerkens et al., 2011; Fernández-Crespo et al., 2020; Henderson et al., 2014; Scharlotta et al., 2018).

Dental tissues do not remodel once mineralized, so they isotopically record life-stories occurring during dental development periods (Bada et al., 1990; Frank & Nalbandian, 1989). The potential of intra-tooth isotopic analyses (both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen to track weaning process has also been demonstrated in domestic dairy animal species with high-crowned teeth (Balasse et al., 2001). Weaning moment in domestic cattle has been previously studied in Neolithic contexts and in combination with data from slaughtering patterns, in order to evaluate the role of calves' weaning practices in the exploitation of

milk for human consumption (Balasse & Tresset, 2002; Gillis, 2012; Gillis et al., 2013; Stojanovski et al., 2020). These studies showed that artificial weaning practices are somewhat present in prehistoric contexts, at least for dairy cows where weaned calves may be kept alive until the end of cow's lactation to stimulate milk let down (Balasse, 2003; Balasse et al., 2000).

In caprines, weaning moment has been studied at a lesser extent through dentinal collagen, with few data available at the moment (Makarewicz, 2011; Makarewicz et al., 2017). The study of weaning management in caprines face major technical challenges: teeth present smaller size, which makes the sampling performance more complicated, and shorter temporal span is targeted (shorter lactation periods are present in sheep and goats in relation to cattle). However, preliminary results of Makarewicz (2011) from modern and archaeological samples, suggest that different weaning management strategies could be envisaged also in caprines through dentine sequential analyses of mandibular molars.

In high-crowned teeth, dentine grows oblique to the vertical axis of the tooth, developing in thickness while still developing in height (Kahle et al., 2018; Zazzo et al., 2006). In these previous studies exploring weaning time, the dentine sampling strategy performed slices the whole dentine thickness. As a consequence, samples represent large time spans and sequences show an attenuation of the diet isotope signatures which may complicate the interpretation of the final data (Balasse et al., 2001; Díez-Canseco et al., 2022). Especially, as the entire dentine is sampled, isotopic results may vary with the addition of new dentine during teeth growth, which entails a limitation when individuals with different age at death are compared. In consequence, this method involves some complexities when defining weaning time, especially in caprine teeth where a larger temporal resolution would be desirable.

In this study, we perform dentine sequential analyses of dentine collagen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values) in experimental modern sheep specimens (*Ovis aries*) with known weaning record, to test the ability of the technique to study lactation and weaning management in domestic sheep. We implement the drill method (Díez-Canseco & Tornero, 2024), which avoids the sampling of inner dentine and yields shorter-time span samples. Sheep were early-weaned 2 months after birth, raised in a stall under controlled diet and weaning conditions, and consecutively slaughtered being 11- to 20-month-old. We test the drill method as a useful tool to track weaning through carbon and nitrogen isotopes in dentine-collagen of first mandibular molars of medium-size species, and to represent diet changes independently to the developmental stage of the teeth. The study also aims to provide a reference data set (concerning the position and representation of isotopic changes in intra-tooth dentine sequences) of an early weaning in domestic sheep.

2. Materials

A modern sheep flock of 12 female specimens of Ripollesa breed was raised between February 2017 and November 2018 in the facilities of the Farm Services and Experimental Fields of the Autonomous University of Barcelona (UAB), located in Bellaterra (Spain). The sheep flock was raised in a stall, under controlled life and feeding conditions, as part of an experimental project designed to implement several research studies relating paleodietary reconstruction methodologies (Díez-Canseco et al., 2022; Díez-Canseco & Tornero, 2024; Gallego-Valle et al., 2020). The experiment was conducted under the supervision of the Animal Welfare advisor in charge and the farm's veterinary staff, and was approved by the ethics committee of animal experimentation of UAB.

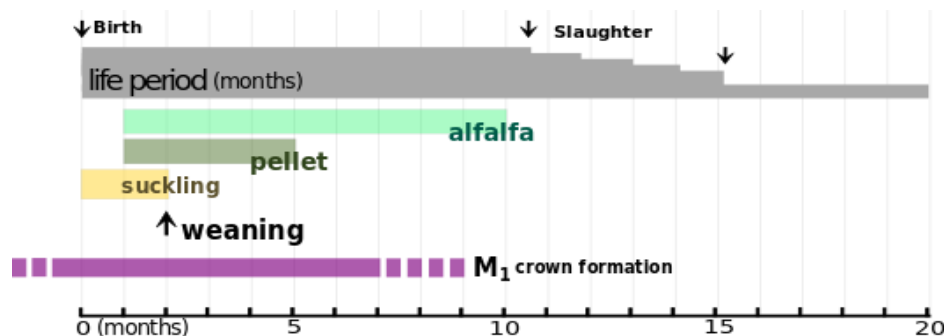
All lambs were born in February-March 2017, and raised in a stall the whole life period. Lambs remained with the mother for their first two months of life, raised mainly on milk (suckling). After the first month of life, while still suckling, lambs were also fed with pellet and alfalfa hay. This was a required feeding condition to stimulate the adaptation of their digestive system and gain familiarity with solid food consumption before an early artificial weaning (Lynch et al., 1992). Lambs were weaned by abrupt separation from the mother at two months of age. Weanlings were then raised within the same flock, and were fed with a mixture of alfalfa hay and pellet provided *ad libitum* until they were four/ five months old, and then changed into alfalfa hay only. The pellet provided to lambs from second to fifth month of life was a formulated pellet commonly provided for the feeding and fattening of growing lambs, it has a crude protein content of 15.6% and it was based on a mixture of C_3 and C_4 plants, including maize, barley, soy flour, wheat, sugarcane molasses and soy oil.

The six sheep specimens selected for this study were gradually slaughtered between January and November of 2018. Sheep were between 11 and 20 months old at death time (Table 1). In domestic sheep, mandibular first molars development starts in utero, about 20 to 49 days before birth (Green et al., 2017;

Kahle et al., 2018), and their crowns complete formation between 7 months (Milhaud & Nezit, 1991; Zazzo et al., 2010) to 9 months of age (Weinreb & Sharav, 1966; Witzel et al., 2018), varying between sheep breeds. It was expected that lactation period and post-weaning diet, were isotopically recorded in the first mandibular molar (M1) (figure 1), and that Ripollesa sheep showed completed crowns of M1 teeth at time of death.

ID this study / ID Farm Services	OV-02 / 702	OV-03 / 712	OV-04 / 707	OV-05 / 708	OV-06 / 701	OV-08 / 711
Birth date	28/02/2017	15/03/2017	08/03/2017	08/03/2017	28/02/2017	09/03/2017
Slaughter date	18/01/2018	01/03/2018	03/04/2018	04/05/2018	31/05/2018	07/11/2018
Age at dead (days)	324	351	391	422	457	608
Age at dead (months)	10.8	11.7	13.0	14.1	15.2	20.3
Wear stage (Payne, 1973)	C	C	C	CD	DEF	DEF

[Table 1]. Sheep specimens selected for this study: birth date, slaughter date, age at death, and wear stage of M1 teeth.



[Figure 1]. Experimental schedule with sheep life periods, dietary periods involved in the weaning process, and schematic indication of growth timing expected in M1 crowns.

3. Methods

The mandibles of the six selected sheep specimens were separated from the skull, partially defleshed and boiled in water for two hours. The M1 molars were extracted from left mandibles using a diamond disc coupled to a Dremel tool. The M1 showed a wear stage varying progressively -with age at death- from C to DEF (following criteria in Payne 1973), and roots showed different stage of development, exceeding enamel root junction (ERJ) in several millimetres, from 1.0 mm (youngest specimen) to 5.7 mm (oldest specimen).

Posterior lobes of M1 were selected for dentine sequential sampling. Dentine sampling was performed following the drill method described in Díez-Canseco and Tornero (2024). Posterior lobes were separated from the tooth, and placed in a EDTA solution (0.5M, pH=8) for several weeks at room temperature. Once demineralized, the lobes were intensively rinsed with Milli-Q water, treated with a NaOH solution (0.125M) at room temperature for 20h, rinsed again and lyophilized. The buccal part of the lobes was sequentially sampled along its vertical axis using a cylindrical diamond point of 1 mm of diameter, performing grooves of 0.3 to 0.5 mm deep, and separated by 1.5 mm. Between 18 and 22 samples were obtained in each tooth. Sample position was noted as distance (in mm) from the base of the sampled lobe. Powder samples were treated with a HCL solution (0.5M) for 30 min, rinsed in Milli-Q water, and freeze-dried. The EDTA insoluble residue obtained after this protocol is thereafter referred as collagen.

During the lyophilization process, lobes shrunk 3.5 ± 0.5 mm, so the sample position -initially noted as distance from base - was corrected considering the total length of each lobe before and after freeze-drying as follows: $d_0 = (d_1 * l_0) / l_1$; where 'd₀' is distance from root-base before lyophilization, 'd₁' is distance from root-base after lyophilization, 'l₀' is length of the lobe before lyophilization, and 'l₁' is length of the lobe after

lyophilization. The corrected distances are then expressed as distance from ERJ to allow comparison between molars (the distance of ERJ from the base of the root was measured before demineralization).

About 350 µg of collagen was weight into tin samples. Carbon and nitrogen content (%), carbon isotope ratio ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) and nitrogen isotope ratio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), were measured using a Thermo Flash 1112 elemental analyser (EA) coupled to a Thermo Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer (IRMS) with a ConFlo III interface at the Institute of Environmental Science and Technology (ICTA-UAB) (Barcelona, Spain). The international standard IAEA 600 (caffeine) (theoretical values: $\delta^{13}\text{C} = -27.77 \pm 0.04\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = +1.0 \pm 0.2\text{‰}$) was used for data calibration. All measured values of the standard are shown in Supplementary Material (S1). The mean analytical precision was $\pm 0.05\text{‰}$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\pm 0.13\text{‰}$ $\delta^{15}\text{N}$, determined within each run and from repeated measurements of the standard. Isotope ratio is reported in δ notation: $\delta^{13}\text{C}$ values are expressed relative to Vienna PeeDee Belemnite (V-PDB) standard and $\delta^{15}\text{N}$ values relative to air N_2 (AIR).

To test the correlation between age at death and isotopic results (attenuation of absolute isotopic values and position of main peaks of minimum or maximum values in the sequences) we calculated the Pearson correlation coefficient (r value) and the significance of the coefficient (p value) with Past (4.03). We used as variable 1 the days at death of the specimens, and as variable 2 the range of intra-tooth isotopic variation, or the position of the main isotopic features observed in the sequences, for both carbon and nitrogen isotope values separately. The significance was set at $p < 0.05$.

4. Results from dentine sequential stable isotope analysis

Carbon and nitrogen content values, C:N ratios, and carbon and nitrogen isotopic composition from all measured collagen samples are shown in Supplementary Material (S2). All collagen samples present C:N ratios ranging from 3.01 to 3.54 (mean 3.21 ± 0.08), mean carbon content values of $45.4 \pm 1.1\%$, and mean nitrogen content values of $16.5 \pm 0.4\%$. Samples yield $\delta^{13}\text{C}$ values ranging from -23.4‰ to -13.7‰ , and $\delta^{15}\text{N}$ values ranging from $+6.3\text{‰}$ to $+11.0\text{‰}$. All teeth yield similar minimum (Min.) and maximum (Max.) values, both for carbon and nitrogen isotopic values (Table 2), and all teeth yield similar intra-tooth isotopic variation, higher in carbon isotope values (mean range of $7.4 \pm 1.3\text{‰}$) than in nitrogen isotope values (mean range of $2.6 \pm 0.6\text{‰}$).

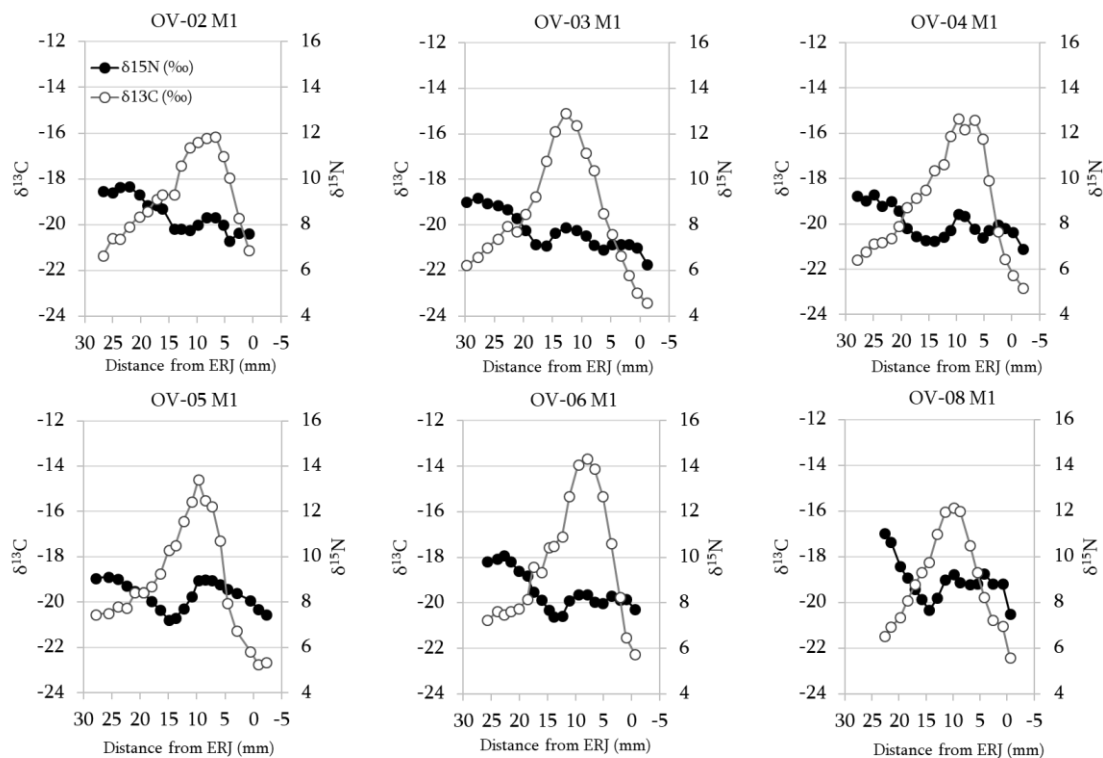
All teeth show similar pattern of distribution of isotopic values along the sequences, in both carbon and isotope values (Figure 2). Carbon isotope values vary from low values in the first samples ($-21.3 \pm 0.5\text{‰}$) towards a peak of maximum values ($-15.1 \pm 0.9\text{‰}$) located at the middle of the sequence which represents the C4/C3 mixed diet. A sudden shift into lower $\delta^{13}\text{C}$ values follows, with last samples yielding $-22.5 \pm 0.8\text{‰}$.

The maximum nitrogen isotope values ($9.7 \pm 0.7\text{‰}$) are located in the upper part of the sequence in all teeth. A decreasing trend in $\delta^{15}\text{N}$ values of $2.3 \pm 0.6\text{‰}$ (1.9 to 3.4‰) follows until a first peak of minimum values ($+7.4 \pm 0.3\text{‰}$) located at 14.1 ± 1.6 mm. $\delta^{15}\text{N}$ values increase again at the middle of the sequence, in parallel to the increasing trend of $\delta^{13}\text{C}$ values. Along the second half of the crown, $\delta^{15}\text{N}$ values vary a mean of 1.4‰ , with a pattern repeated in most specimens, likely relating to intrinsic variation of the diet nitrogen composition, also observed in the first part of M2 crown of sheep from the same flock (Díez-Canseco & Tornero, 2024).

The inter-individual variability in absolute isotope values varies 2.5‰ in Max. $\delta^{13}\text{C}$ values, 1.9‰ in Max. $\delta^{15}\text{N}$ values, and 0.8‰ in the first peak of Min. $\delta^{15}\text{N}$ values. The inter-individual variability in the position of these three values, varies 4.8 mm, 5.7 mm and 4.9 mm, respectively. Overall, the different level of dentine development between teeth (different age at death), does not affect the pattern of distribution of isotopic values along the sequences, although the higher occlusal wear in OV-08 results in a shorter sequence. Age at death (days) show no significant correlation with the position of the main isotopic features represented: max $\delta^{13}\text{C}$ values ($r = -0.14$, $p = 0.80$), or min $\delta^{15}\text{N}$ values located in the first half of the crown ($r = 0.25$, $p = 0.65$). It is not observable any attenuation of the isotopic values in relation to age at death, which shows no significant correlation with the range of intra-tooth variation ($r = 0.04$, $p = 0.95$ for $\delta^{13}\text{C}$; $r = 0.64$, $p = 0.18$ for $\delta^{15}\text{N}$).

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		
	Min.	Max.	Range	Min.	Max.	Range
OV-02	-21.4	-16.2	5.2	+7.3	+9.7	2.4
OV-03	-23.4	-15.1	8.3	+6.3	+9.2	2.9
OV-04	-22.8	-15.4	7.5	+6.9	+9.3	2.4
OV-05	-22.8	-14.6	8.2	+7.2	+9.1	1.9
OV-06	-22.3	-13.7	8.6	+7.4	+10.1	2.7
OV-08	-22.4	-15.9	6.5	+7.5	+11.0	3.5
mean	-22.5	-15.1	7.4	+7.1	+9.7	2.6
SD	0.7	0.9	1.3	0.5	0.7	0.6

[Table 2]. Summary table showing isotopic results (stable carbon and nitrogen isotopes) from dentine sequential analyses in M1 teeth. Minimum values (Min.), maximum values (Max.) and range of intra-tooth variation per specimen, with mean values and standard deviation (SD) for all individuals.



[Figure 2]. Sequential $\delta^{13}\text{C}$ values (white circles) and $\delta^{15}\text{N}$ values (black circles) measured in dentine collagen along the M1 teeth of all specimens analysed, ordered by age at death. The dashed orange line highlights the highest wear of the M1 in OV-08, indicating the position of first samples in the previous specimen.

5. Discussion

1) The representation of weaning process in the sequences (nitrogen and carbon values)

All sampled specimens show similar intra-tooth isotopic sequences, where two main diet shifts linked to the weaning process are traceable through carbon and nitrogen isotope values. Firstly, the shift from exclusive suckling to the incorporation of solid diet after first month of life, and secondly, the cessation of lactation

(weaning) at second month of life, i.e. the shift into a post-weaning diet exclusively based on pellet and alfalfa.

Carbon isotope values of dentine collagen samples show an increasing - decreasing trend, varying from \sim -21‰ to \sim -15‰, and then again to \sim -22‰. Max $\delta^{13}\text{C}$ values are located at the middle of the crown and fit with a C4/C3 mixed diet. One of the main components of pellet was maize, so high $\delta^{13}\text{C}$ values likely represent the presence of pellet in diet. Pellet is provided from the beginning of second month of life, while lambs are still suckling. It is expectable that the intake of solid food becomes progressively more important in sheep's diet along the second month of life as suckling time starts decreasing (Arnold et al., 1979). After weaning, pellet becomes the main protein source of diet, together with alfalfa, so the max values of $\delta^{13}\text{C}$ likely represent this period of diet after cessation of suckling.

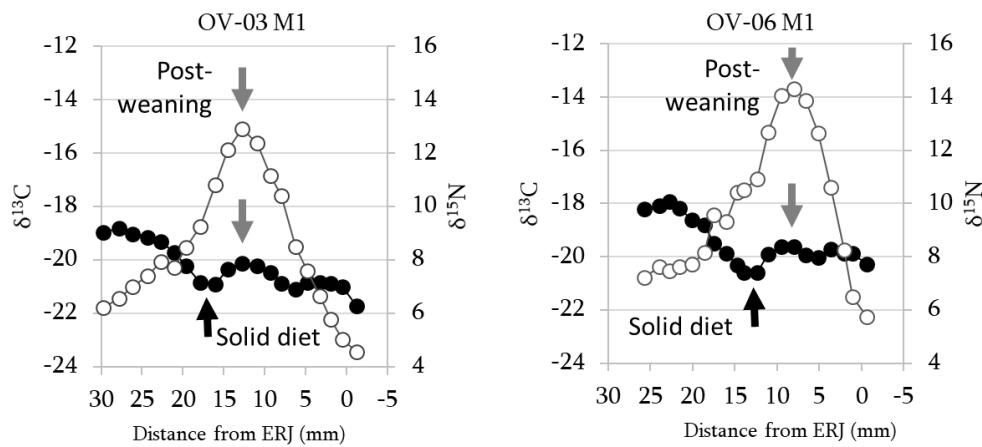
The highest nitrogen values are located at the tip of the crown in all sampled specimens, fitting well with suckling values occurring during first period of tooth formation. The M1 starts developing 20-50 days before birth, so it would be also expectable that dentine records a pre-natal signature in the tip of the crown. M1s show wear at different stages, but a slight increase of 0.2 – 0.3‰ is observed in the first samples of some teeth that could be reflecting the residue of some prenatal signature. In humans it has been observed that new-borns present similar nitrogen values as mother, which is followed by an increase in $\delta^{15}\text{N}$ during breastfeeding (Fuller et al., 2006). The isotopic relation mother-foetus is not known for sheep, although it has been observed that calf and sheep foetus bone collagen could be isotopically enriched 2.6 to 2.7‰ over the mother (Balasse, 1999; Gillis et al., 2013). This would result in a more nuanced shift between pre-natal and suckling nitrogen signatures.

Max. $\delta^{15}\text{N}$ values in the upper part of M1 crowns are followed by a shift into lower values, which are depleted by 1.9 to 3.4‰ ($2.3 \pm 0.6\%$). This step in $\delta^{15}\text{N}$ values is similar to the previously observed between suckling and post-weaning diet in intra-tooth dentine sequences of caprine M1 teeth (1.4‰ to 3.5‰, Makarewicz et al., 2017) and M1 and M2 cattle teeth (2.7‰ in Gillis et al., 2013; 3.1‰ in Stojanovski et al., 2020; 2.5‰ in Balasse et al., 2001; 2.1 ‰ in Balasse & Tresset, 2002). A higher variation of around +3 to +4‰ in $\delta^{15}\text{N}$ values could be expected between suckling and herbivorous diet when considering a theoretical trophic step (DeNiro & Epstein, 1981; Minagawa & Wada, 1984) and some attenuation of the intra-tooth isotopic range of variation may be present as a result of the sampling strategy performed. However, several factors must be also taken into account in this line which are independent to the sampling performance. Firstly, this hypothetical trophic step depends of both mother and lambs having similar diets, but if post-weaning diet is enriched in relation to the mother's diet, the expected trophic step would be attenuated (Balasse et al., 2001; Makarewicz, 2011). The ewes' diet was not monitored during this experimental study, and they could have been fed with grass or fodder depleted in $\delta^{15}\text{N}$ in relation to lambs' post-weaning diet. Secondly, the diet enrichment existing between mother's milk and nursing infant collagen is not strictly a 'trophic step', since milk may have different isotopic composition than mother's collagen and (if depleted) lead to lower trophic level enrichments (Jenkins et al., 2001; Reynard & Tuross, 2015).

It is known that stable carbon and nitrogen isotope values from collagen represent mainly protein fraction of diet (Ambrose & Norr, 1993; Codron et al., 2018; Froehle et al., 2010; Jim et al., 2004; Tieszen & Fagre, 1993). When offspring are weaned into a protein-poor diet, $\delta^{15}\text{N}$ traces the cessation of suckling instead of the ingestion of the solid diet along the weaning process (Balasse et al., 2001; Fuller et al., 2006). In this study, the solid food provided to sheep before weaning has a high protein content (both pellet and alfalfa), so $\delta^{15}\text{N}$ values may also track the intake of solid food while still suckling, independently of the cessation of lactation. Nitrogen values may then represent in dentine sequences the solid diet signature provided along the second month of life even if milk is still the main source of feed, resulting in a decreasing trend in $\delta^{15}\text{N}$ values before actual weaning.

This fact would explain why the "weaning moment" – decreasing $\delta^{15}\text{N}$ values after suckling period – is represented in the sequences before Max. $\delta^{13}\text{C}$ values from pellet, despite that pellet intake occurs before actual weaning and not the other way around (Figure 3). The peak of $\delta^{13}\text{C}$ values represents the cessation of milk intake after second month, since this is the moment when pellet's maize C4 values are better represented: C3 values from milk are no longer diluted in the carbon pool and pellet becomes the solely source of protein together with alfalfa. In contrast, the Min. $\delta^{15}\text{N}$ values represent a previous moment when both milk and solid diet are a source of protein nitrogen in diet, likely a gradual process in favour to solid diet. Probably, pellet C4 values coming from this period (solid intake while suckling) are also represented along the increasing trend of $\delta^{13}\text{C}$ values. In addition, this later representation of C4 values also fits with the

fact that the metabolic pool takes longer to reach Max $\delta^{13}\text{C}$ values since the range between both diets is larger than the present in $\delta^{15}\text{N}$ (Fuller et al., 2006; Zazzo et al., 2010).



[Figure 3]. Main isotopic features linked to weaning process and represented in the intra-tooth sequences: grey arrows, post weaning diet; black arrows, incorporation of solid diet during lactation.

However, what is surprising, is that the minimum $\delta^{15}\text{N}$ values reached during weaning in all sequences, are lower and more depleted than those of post-weaning diet reached later (enriched by 1.1‰.) We cannot explain it as a sampling effect since it is not reflected in $\delta^{13}\text{C}$ values. Besides, higher time resolution is expected in samples from this part of the crown with higher growth rates (Kahle et al., 2018), so dentine admixture shouldn't be too problematic in this line. These Min. $\delta^{15}\text{N}$ values are present in all specimens and in the same position, suggesting that this variation is actually recorded in collagen. A possible explanation is that alfalfa/pellet proportion intake varied between both moments, or that different $\delta^{15}\text{N}$ compositions were present in pellet and alfalfa through the experiment. The isotopic composition of pellet was not monitored during the experimental, and it is possible that some variability in $\delta^{15}\text{N}$ values is present throughout the whole 5 months of pellet diet. The $\delta^{15}\text{N}$ variation is within a possible range of variation within a same diet: a $\delta^{15}\text{N}$ range of variation of 2.9‰ has been observed within monospecific diets based on alfalfa (Díez-Canseco et al., 2022). The abundance of ^{15}N in farming products and plant-based feeds are strictly linked to agricultural conditions (fertilizers) and other N fluxes existing between and within farms (Schwertl et al., 2005). A second hypothesis, is that this effect in nitrogen values may be related with the rumen development, which starts with the increase of solid consumption during second month of life (Lyford, 1988). Differences between ruminant and non-ruminant digestive systems has been previously seen in $\delta^{13}\text{C}$ values from enamel (Towers et al., 2014), and it could also affect $\delta^{15}\text{N}$ values; $\delta^{15}\text{N}$ in body tissues vary with diet conditions but also with metabolic and physiological factors (Fuller et al., 2005; Sponheimer et al., 2003; Warinner & Tuross, 2010). Further work would be needed to asses this idea.

2) Testing dentine sequential as a useful tool to identify weaning moment in sheep

2.1. Addition of inner dentine during tooth growth

In high-crowned teeth, dentine grows by the addition of increments which are laid down oblique to the vertical axis of growth, so dentine continues developing in thickness while the teeth develop in high. Previous sampling strategies performing intra-tooth analyses of dentine collagen in high-crowned teeth slice the whole dentine thickness. As a result, later formed dentine may blur the isotopic signatures from first moments of dentine development (Balasse & Tresset, 2002; Díez-Canseco & Tornero, 2024). In addition, the pattern of isotopic variation may be altered with the continue addition of inner dentine with age. It is a disadvantage when sampling molars in a population where different age at death is present.

In this study, M1 dentine of several specimens with same diet conditions and different age at death were sequentially sampled by drilling. Drill sampling allows to obtain small-size samples where the inclusion of inner dentine increments, formed in later stages of dental development, is highly reduced. Since this

sampling strategy does not cut the entire dentine thickness, it was expectable that the addition of new inner dentine during advanced stages of teeth development does not affect the pattern of isotopic variation. Results show that the position of diet changes is located in the same position of the crown independently to the age of death, and it shows no significant affection by new dentine addition in older specimens in relation to younger ones (Figure 2). Any pattern of attenuation of the absolute isotopic values in relation to the age at death is observed. Inter-individual differences in position of diet changes, specially marked on OV-03, are likely related to different tooth size, or different onset in the M1 formation (previously observed by Kahle et al., 2018). Differences in the absolute isotopic values between individuals may be related with different milk isotopic composition between ewes, and with different preferential feeding habits between lambs, since diets were based in several components (milk, pellet and alfalfa). Small inter-individual differences in collagen isotopic composition (around ‰) are also expected between specimens raised under same diets (e.g. Balasse et al., 2001; Doherty et al., 2022; Von Holstein et al., 2013; Webb et al., 2016), as a result of individual, behavioural, metabolic and physiological factors.

The drill method provides samples where the rate of dentine admixture, and the sample's temporal and in isotopic resolution, is independent to the addition of new inner increments during growth, and thus comparable between individuals of different ages and teeth with different development stages. However, it must be noted that by drilling, all the dentine thickness may be also sampled in developing teeth with thin dentine walls. This stability in isotopic results between development stages are only expectable in dentine thick enough (~0.5 mm) where drilled-samples do not pierce all dentine thickness (e.g. completed crowns).

2.2. Position of the weaning moment in M1 crowns

M1 crown starts developing in utero, 20 to 49 days before birth (Green et al., 2017; Kahle et al., 2018). When sheep reach 2 months of age, M1 molars have been developing for 3 - 3.5 months of a total period of 8 to 10 months. An early weaning occurring at second month of life should be then represented in middle positions of the crown, considering a period of metabolic equilibration in isotopic values of 1.5 – 2 months (Jones et al., 1981; Sponheimer et al., 2003). In this study, the position of the main isotopic features representing weaning process (Min. $\delta^{15}\text{N}$ values and Max. $\delta^{13}\text{C}$ values), fits well with this timing of M1 crowns development.

In light of previous studies performing dentine sequential analyses in sheep molars (Díez-Canseco et al., 2022; Díez-Canseco & Tornero, 2024) we assume that the position of the isotopic changes in the crown corresponds –roughly– to the final points in the trends of isotopic variation represented in the intra-tooth sequences, instead of the starting ones which mainly reflect the incorporation of later formed dentine in the samples). In this study, as previously discussed, the first peak with minimum $\delta^{15}\text{N}$ values represent the solid intake along second month of age, while maximum $\delta^{13}\text{C}$ values represent a maize-based pellet diet without lactation signature after weaning. We estimate that the position of the weaning moment occurring at the end of 2nd month, should fit between these both features (between 14.1 ± 1.6 mm and 9.7 ± 1.7 mm from ERJ). These estimations fit well with previous data obtained by thin sections in Soay sheep, a non-improved sheep breed with prolonged teeth crown formation times, where middle parts of the M1 crowns are formed at around 60 days after birth (formation of the infundibular floor between 56 and 69 days) (Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018).

The advanced position of an early weaning in the crown suggest the use of combined analysis of M1 and M2 crowns to study weaning process in sheep, since it may be delayed until 5 months of age. We hypothesize that position of natural or late weaning should be present in final parts of the M1 crown and along upper parts of the M2 crown. Cervical parts of the M1 crown may yield large-time span samples, as a result of the lower dentine growth rates present in this part of the crown (Kahle et al., 2018), so weaning moment could be blurred, especially in teeth with advanced root development. In contrast, the first part of M2 crown will yield higher time and isotopic resolution. Further work would be needed in this line.

In this study, all sheep are female and they come from a same population, and there are no large differences in tooth size between specimens. However, differences in tooth size between sheep populations or sheep breeds should be always kept in mind when studying weaning position through dentine sequential analyses. The estimation of the mean crown height (e.g. in M1 teeth) within a population could be used to compare isotopic results between teeth with different crown's length. The estimation of maximum crown's height has been already performed in previous studies to normalize isotopic or histological data coming from specimens with different tooth size (Blaise & Balasse, 2011; Frémondeau et al., 2012; Upex & Dobney, 2012). Possible differences in dental growth timings between modern and past sheep breeds should be also considered when inferring weaning time directly from sample position in the

tooth. However, in agreement with Balasse & Tresset (2002), this is not a caveat of the sampling but from every zooarchaeological study based on dental growth timings.

Artificial weaning may be an abrupt or a gradual process (Freitas-de-Melo et al., 2022). In this study, weaning (cessation of suckling) was abrupt, although solid intake was –relatively– gradual. However, differences between progressive/abrupt diet shifts might be difficult to recognise in dentine-collagen sequences. Independently to the gradualness of the process, it will be reflected in the sequences as a progressive variation, as a result of the metabolic equilibration period of the body isotopic pool, but also of the sampling strategy implemented (Balasse et al., 2001). Our experimental data does not allow us to discern metabolic equilibration vs sampling in the isotopic sequences obtained. However, it is expectable that upper parts of the crown, which show fast growth and high rates of dentine apposition (Jordana & Köhler, 2011; Kahle et al., 2018; Witzel et al., 2018) yield higher temporal resolution, probably at a monthly scale (Díez-Canseco et al., 2022, Díez-Canseco & Tornero, 2024). A metabolic equilibration period could be more reflected in these parts of the crown. In contrast, as dentine growth rates decreases into lower parts of the crown, isotopic variation will be progressively more affected by sampling strategy (dentine admixture).

6. Conclusions

The dentine sequential analysis performed in this study shows enough isotopic and temporal resolution to identify an early weaning process in M1 crowns of medium-size species as sheep. The trophic step between suckling moment and fodder based diet is represented in nitrogen isotope values of dentine sequences, and diet changes are located in similar position of the crown independently to the age of death of the specimens. Several dietary (and metabolic) factors are involved in the isotopic composition of collagen samples, which might complicate the interpretation of dentine sequences. Nitrogen isotope values may represent solid intake instead of lactation when forages with high protein content are provided during suckling. A combined use of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values is recommended in order to discern between solid intake and cessation of lactation (Fuller et al., 2006). The use of trace elements has been also suggested in this line (Balasse et al., 2001; Tornero, 2011), and the use of multi-isotopic approaches including calcium isotopes (Wright, 2014) and zinc isotopes (Jaouen et al., 2016) could also contribute to carbon and nitrogen isotopic signatures from collagen.

In this study, we provide a set of data coming from a non-improved sheep breed, where weaning was performed at 2 months' age, the earliest weaning possible to ensure lambs surviving without providing artificial lactation or formulated feeds (Freitas-de-Melo et al., 2022). This is a first experimental study where an early weaning process is controlled in sheep, but further work will be needed providing natural and progressive weaning to use as blank of non-manipulated weaning process. The second mandibular molar could be also used combined with M1 to study weaning process. The performance of new experimental studies with other non-improved sheep breeds is also imperative to explore the potential intra-species variability of teeth development timings.

Early weaning may entail a valuable husbandry strategy in past diversified economies and husbandry systems where several end-products are targeted, since it allows to increase milk production while maintaining lambs' survival. Because of being the earliest domesticated species, and because of their predominant presence in prehistorical faunal assemblages, caprines are a good candidate to explore their management with milking purposes. Sheep (as goats) show a worldwide distribution as dairy domestic species, and the zooarchaeological data pointing to milk exploitation in these species is widely documented in the archaeological record from prehistoric times. The study of weaning practices in sheep may contribute to the study of milk production systems in past human economies, both in the origin, spread and scale of milk production.

References

- Ambrose SH, Norr L. 1993. Experimental Evidence for the Relationship of the Carbon Isotope Ratios of Whole Diet and Dietary Protein to Those of Bone Collagen and Carbonate. In *Prehistoric Human Bone*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; 1–37. DOI: 10.1007/978-3-662-02894-0_1
- Arnold GW, Wallace SR, Maller RA. 1979. Some factors involved in natural weaning processes in sheep.

Applied Animal Ethology **5**: 43–50. DOI: 10.1016/0304-3762(79)90006-3

Bada JL, Peterson RO, Schimmelmann A, Hedges REM. 1990. Moose teeth as monitors of environmental isotopic parameters. *Oecologia* **82**: 102–106. DOI: 10.1007/BF00318540

Balasse M. 1999. *De l'exploitation du lait au Néolithique moyen en Europe tempérée : examen des modalités de sevrage des bovins, par l'analyse isotopique des ossements archéologiques*, Université Paris VI

Balasse M. 2003. Keeping the young alive to stimulate milk production? Differences between cattle and small stock. *Anthropozoologica* **37**: 3–10.

Balasse M, Bocherens H, Mariotti A. 1999. Intra-bone Variability of Collagen and Apatite Isotopic Composition Used as Evidence of a Change of Diet. *Journal of Archaeological Science* **26**: 593–598. DOI: 10.1006/jasc.1998.0376

Balasse M, Bocherens H, Mariotti A, Ambrose SH. 2001. Detection of dietary changes by intra-tooth carbon and nitrogen isotopic analysis: An experimental study of dentine collagen of cattle (*Bos taurus*). *Journal of Archaeological Science* **28**: 235–245. DOI: 10.1006/jasc.1999.0535

Balasse M, Bocherens H, Tresset A, Mariotti A, Vigne J-D. 1997. Émergence de la production laitière au Néolithique ? Contribution de l'analyse isotopique d'ossements de bovins archéologiques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* **325**: 1005–1010. DOI: 10.1016/S1251-8050(97)82382-8

Balasse M, Tresset A. 2002. Early weaning of Neolithic domestic cattle (Bercy, France) revealed by intra-tooth variation in nitrogen isotope ratios. *Journal of Archaeological Science* **29**: 853–859. DOI: 10.1006/jasc.2001.0725

Balasse M, Tresset A, Bocherens H, Mariotti A, Vigne J-D. 2000. Un abattage “post-lactation” sur des bovins domestiques néolithiques. Étude isotopique des restes osseux du site de Bercy (Paris, France). 39–48 pp.

Beaumont J, Gledhill A, Lee-Thorp J, Montgomery J. 2013. Childhood diet: A closer examination of the evidence from dental tissues using stable isotope analysis of incremental human dentine*. *Archaeometry* **55**: 277–295. DOI: 10.1111/j.1475-4754.2012.00682.x

Blaise E, Balasse M. 2011. Seasonality and season of birth of modern and late Neolithic sheep from south-eastern France using tooth enamel $\delta^{18}\text{O}$ analysis. *Journal of Archaeological Science* **38**: 3085–3093. DOI: 10.1016/j.jas.2011.07.007

Codron D, Clauss M, Codron J, Tütken T. 2018. Within trophic level shifts in collagen–carbonate stable carbon isotope spacing are propagated by diet and digestive physiology in large mammal herbivores. *Ecology and Evolution* **8**: 3983–3995. DOI: 10.1002/ece3.3786

Copley MS, Berstan R, Dudd SN, Docherty G, Mukherjee AJ, Straker V, Payne S, Evershed RP. 2003. Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 1524–1529. DOI: 10.1073/pnas.0335955100

Czermak A, Schermelleh L, Lee-Thorp J. 2018. Imaging-assisted time-resolved dentine sampling to track weaning histories. *International Journal of Osteoarchaeology* **28**: 535–541. DOI: 10.1002/oa.2697

Debono Spiteri C et al. 2016. Regional asynchronicity in dairy production and processing in early farming communities of the northern Mediterranean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**: 13594–13599. DOI: 10.1073/pnas.1607810113

DeNiro MJ, Epstein S. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42**: 495–506. DOI: 10.1016/0016-7037(78)90199-0

DeNiro MJ, Epstein S. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **45**: 341–351. DOI: 10.1016/0016-7037(81)90244-1

Díez-Canseco C, Aguilera M, Tornero C. 2022. Intra-tooth isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth: A new experimental study with modern sheep specimens. *International Journal of Osteoarchaeology* **32**: 962–975. DOI: 10.1002/oa.3138

Díez-Canseco C, Tornero C. 2024. New methods for old challenges: A sampling protocol for sequential stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of dentine collagen in high-crowned teeth. *Journal of Archaeological Science* **162**: 105923. DOI: 10.1016/j.jas.2023.105923

Doherty SP, Collins MJ, Harris AJT, Sistiaga A, Newton J, Alexander MM. 2022. A modern baseline for the paired isotopic analysis of skin and bone in terrestrial mammals. *Royal Society Open Science* **9** DOI: 10.1098/rsos.211587

Dudd SN, Evershed RP. 1998. Direct Demonstration of Milk as an Element of Archaeological Economies. *Science* **282**: 1478–1481. DOI: 10.1126/science.282.5393.1478

Eerkens JW, Berget AG, Bartelink EJ. 2011. Estimating weaning and early childhood diet from serial micro-samples of dentin collagen. *Journal of Archaeological Science* **38**: 3101–3111. DOI: 10.1016/j.jas.2011.07.010

Evershed RP et al. 2008. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature* **455**: 528–531. DOI: 10.1038/nature07180

Fernández-Crespo T, Snoeck C, Ordoño J, de Winter NJ, Czermak A, Mattielli N, Lee-Thorp JA, Schulting RJ. 2020. Multi-isotope evidence for the emergence of cultural alterity in Late Neolithic Europe. *Science Advances* **6** DOI: 10.1126/sciadv.aay2169

Fogel ML, Tuross N, Owsley D. 1989. Nitrogen isotope tracers of human lactation in modern and archeological populations. Washington DC.

Frank RM, Nalbandian J. 1989. Structure and Ultrastructure of Dentine. In *Teeth*, Berkovitz BKB, Boyde A, Frank RM, Höhling HJ, Moxham BJ, Nalbandian J, Tonge CH, Frank RM, and Nalbandian J (eds). Berlin; 173–247. DOI: 10.1515/9783110853858-002

Freitas-de-Melo A, Orihuela A, Hötzel MJ, Ungerfeld R. 2022. What Do We Know and Need to Know About Weaning in Sheep? An Overview of Weaning Practises, Stress and Welfare. *Frontiers in Animal Science* **3**: 1–17. DOI: 10.3389/fanim.2022.823188

Frémondeau D, Cucchi T, Casabianca F, Ughetto-Monfrin J, Horard-Herbin M-P, Balasse M. 2012. Seasonality of birth and diet of pigs from stable isotope analyses of tooth enamel ($\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$): a modern reference data set from Corsica, France. *Journal of Archaeological Science* **39**: 2023–2035. DOI: 10.1016/j.jas.2012.04.004

Froehle AW, Kellner CM, Schoeninger MJ. 2010. FOCUS: Effect of diet and protein source on carbon stable isotope ratios in collagen: Follow up to Warinner and Tuross (2009). *Journal of Archaeological Science* **37**: 2662–2670. DOI: 10.1016/j.jas.2010.06.003

Fuller BT, Fuller JL, Harris DA, Hedges REM. 2006. Detection of breastfeeding and weaning in modern human infants with carbon and nitrogen stable isotope ratios. *American Journal of Physical Anthropology* **129**: 279–293. DOI: 10.1002/ajpa.20249

Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, Harris DA, O'Connell TC, Hedges REM. 2005. Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: Why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**: 2497–2506. DOI: 10.1002/rcm.2090

Gallego-Valle A, Colominas L, Burguet-Coca A, Aguilera M, Palet JM, Tornero C. 2020. What is on the menu today? Creating a microwear reference collection through a controlled-food trial to study feeding management systems of ancient agropastoral societies. *Quaternary International* **557**: 3–11. DOI: 10.1016/j.quaint.2020.02.020

Gillis R. 2012. *Osteological and isotopic contributions to the study of dairy husbandry during the European Neolithic*, Muséum national d'histoire naturelle

Gillis R, Bréhard S, Bălăşescu A, Ughetto-Monfrin J, Popovici D, Vigne J-D, Balasse M. 2013. Sophisticated cattle dairy husbandry at Boruşani-Popină (Romania, fifth millennium BC): the evidence from complementary analysis of mortality profiles and stable isotopes. *World Archaeology* **45**: 447–472. DOI: 10.1080/00438243.2013.820652

Gillis RE, Gaastra JS, Linden M Vander, Vigne JD. 2022. A Species Specific Investigation Into Sheep and Goat Husbandry During the Early European Neolithic. *Environmental Archaeology* **27**: 8–19. DOI: 10.1080/14614103.2019.1615214

Green DR, Green GM, Colman AS, Bidlack FB, Tafforeau P, Smith TM. 2017. Synchrotron imaging and Markov Chain Monte Carlo reveal tooth mineralization patterns. *PLoS ONE* **12**: 1–16. DOI: 10.1371/journal.pone.0186391

Greenfield HJ. 2005. A reconsideration of the secondary products revolution: 20 years of research in the

- central Balkans. In *The Zooarchaeology of Milk and Fats (Proceedings of the 9th ICAZ Conference, Durham 2002)*, Mulville J and Outram A (eds). Oxford; 14–31.
- Greenfield HJ. 2010. The secondary products revolution: The past, the present and the future. *World Archaeology* **42**: 29–54. DOI: 10.1080/00438240903429722
- Greenfield HJ. 2014. Some reflections on the origins and intensification of dairying in the archaeological record. *Animal Secondary Products* : 20–39. DOI: 10.2307/j.ctvh1dr4j.6
- Greenfield HJ, Chapman J, Clason AT, Gilbert AS, Hesse B, Milisauskas S. 1988. The Origins of Milk and Wool Production in the Old World: A Zooarchaeological Perspective from the Central Balkans [and Comments]. *Current Anthropology* **29**: 573–593.
- Hadjikoumis A. 2017. Age-at-death in traditional Cypriot sheep and goat husbandry: implications for zooarchaeology. In *Economic Zooarchaeology: Studies in Hunting, Herding and Early Agriculture (1st ed.)*, ROWLEY-CONWAY P, SERJEANTSON D, and HALSTEAD P (eds). Oxbow Books; DOI: 10.2307/j.ctt1s4751q.20
- Haenlein GFW, Wendorff WL. 2006. Sheep Milk. In *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, Park Y and Haenlein GFW (eds). Wiley; 137–194. DOI: 10.1002/9780470999738.ch7
- Halstead P. 1998. Mortality models and milking: problems of uniformitarianism, optimality and equifinality reconsidered. *Anthropozoologica* **27**: 3–20.
- Halstead P. 2023. Zooarchaeological evidence for livestock management in (earlier) Neolithic Europe: Outstanding questions and some limitations of current approaches. *Quaternary International* DOI: 10.1016/j.quaint.2023.09.013
- Helmer D, Gourichon L, Sidi Maamar H, Vigne J. 2005. L'élevage des caprinés néolithiques dans le sud-est de la France : saisonnalité des abattages, relations entre grottes-bergeries et sites de plein air. *Anthropozoologica* **40**: 167–189.
- Helmer D, Gourichon L, Vila E. 2007. The development of the exploitation of products from Capra and Ovis (meat, milk and fleece) from the PPNB to the Early Bronze in the northern Near East (8700 to 2000 BC cal.). *Anthropozoologica* **42**: 41–69.
- Henderson RC, Lee-Thorp J, Loe L. 2014. Early life histories of the London poor using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ stable isotope incremental dentine sampling. *American Journal of Physical Anthropology* **154**: 585–593. DOI: 10.1002/ajpa.22554
- Hendy J et al. 2018. Ancient proteins from ceramic vessels at Çatalhöyük West reveal the hidden cuisine of early farmers. *Nature Communications* **9**: 4064. DOI: 10.1038/s41467-018-06335-6
- Von Holstein ICC, Hamilton J, Craig OE, Newton J, Collins MJ. 2013. Comparison of isotopic variability in proteinaceous tissues of a domesticated herbivore: A baseline for zooarchaeological investigation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **27**: 2601–2615. DOI: 10.1002/rcm.6725
- Jaouen K, Beasley M, Schoeninger M, Hublin JJ, Richards MP. 2016. Zinc isotope ratios of bones and teeth as new dietary indicators: Results from a modern food web (Koobi Fora, Kenya). *Scientific Reports* **6**: 1–8. DOI: 10.1038/srep26281
- Jenkins SG, Partridge ST, Stephenson TR, Farley SD, Robbins CT. 2001. Nitrogen and carbon isotope fractionation between mothers, neonates, and nursing offspring. *Oecologia* **129**: 336–341. DOI: 10.1007/s004420100755
- Jim S, Ambrose SH, Evershed RP. 2004. Stable carbon isotopic evidence for differences in the dietary origin of bone cholesterol, collagen and apatite: Implications for their use in palaeodietary reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68**: 61–72. DOI: 10.1016/S0016-7037(03)00216-3
- Jones RJ, Ludlow MM, Troughton JH, Blunt CG. 1981. Changes in natural carbon isotope ratio of the hair from steers fed diets of C4, C3 and C4 species in sequence. *Search* **12**: 85–87.
- Jordana X, Köhler M. 2011. Enamel microstructure in the fossil bovid *Myotragus balearicus* (Majorca, Spain): Implications for life-history evolution of dwarf mammals in insular ecosystems. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **300**: 59–66. DOI: 10.1016/j.palaeo.2010.12.008
- Kahle P, Witzel C, Kierdorf U, Frölich K, Kierdorf H. 2018. Mineral Apposition Rates in Coronal Dentine of Mandibular First Molars in Soay Sheep: Results of a Fluorochrome Labeling Study. *Anatomical Record* **301**: 902–912. DOI: 10.1002/ar.23753

- Katzenberg MA, Pfeiffer S. 1995. Nitrogen isotope evidence for weaning age in a nineteenth century Canadian skeletal sample. In *Bodies of evidence: reconstructing history through skeletal analysis.*, Grauer AL (ed). Wiley-Liss: New York; 221–235.
- Lyford SJ. 1988. Growth and development of the ruminant digestive system. *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ : 44–63.
- Lynch JJ, Hinch GN, Adams DB, International CAB, (Australia) C. 1992. *The behaviour of sheep : biological principles and implications for production*. C.A.B. International ; CSIRO Australia Wallingford, UK, East Melbourne, Vic.: Wallingford, UK, East Melbourne, Vic. SE - x, 237 pages : illustrations ; 24 cm. DOI: LK - <https://worldcat.org/title/26278307>
- Makarewicz CA. 2011. Xiongnu pastoral systems: Integrating economies of subsistence and scale. In *XIONGNU ARCHAEOLOGY: Multidisciplinary Perspectives of the First Steppe Empire in Inner Asia*, Brosseder U and Miller B (eds). Vor- und Frühgeschichtliche Archäologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn: Bonn; 27–38.
- Makarewicz CA, Arbuckle BS, Öztan A. 2017. Carbon and nitrogen isotopic evidence for sheep and goat pastoral management practices at Chalcolithic Köşk Höyük, Central Turkey. In *Isotopic investigations of pastoralism in prehistory*, Ventresca Miller A and Makarewicz C (eds). Routledge: London; 113–122.
- Martín P, García-González R, Nadal J, Vergès JM. 2016. Perinatal ovicaprine remains and evidence of shepherding activities in Early Holocene enclosure caves: El Mirador (Sierra De Atapuerca, Spain). *Quaternary International* **414**: 316–329. DOI: 10.1016/j.quaint.2015.08.024
- Milhaud G, Nezeit J. 1991. Molar development in sheep: morphology, radiography, microhardness. *Recueil de Medecine Veterinaire* **167**: 121–127.
- Minagawa M, Wada E. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**: 1135–1140. DOI: 10.1016/0016-7037(84)90204-7
- Nitsch EK, Humphrey LT, Hedges REM. 2011. Using stable isotope analysis to examine the effect of economic change on breastfeeding practices in Spitalfields, London, UK. *American Journal of Physical Anthropology* **146**: 619–628. DOI: 10.1002/ajpa.21623
- Payne S. 1973. Kill-off Patterns in Sheep and Goats: the Mandibles from Aşvan Kale. *Anatolian Studies* **23**: 281–303. DOI: 10.2307/3642547
- Reynard LM, Tuross N. 2015. The known, the unknown and the unknowable: Weaning times from archaeological bones using nitrogen isotope ratios. *Journal of Archaeological Science* **53**: 618–625. DOI: 10.1016/j.jas.2014.11.018
- Richards MP, Mays S, Fuller BT. 2002. Stable carbon and nitrogen isotope values of bone and teeth reflect weaning age at the Medieval Wharram Percy site, Yorkshire, UK. *American Journal of Physical Anthropology* **119**: 205–210. DOI: 10.1002/ajpa.10124
- Roffet-Salque M, Gillis R, Evershed R, Vigne J-D. 2018. Milk as a pivotal medium in the domestication of cattle, sheep and goats. In *Hybrid Communities: Biosocial Approaches to Domestication and Other Trans-species Relationships*, Stepanoff C and Vigne J-D (eds). Routledge Studies in Anthropology. CRC Press; 127–143.
- Saña M, Tornero C. 2008. Consumption of animal resources at the sites of Akarçay Tepe and Tell Halula (Middle Euphrates Valley, 8th–6th Millenia cal. BC). In *Archaeozoology of Southwest Asia and Adjacent Areas VIII*, Vila E, Gourichon L, Buitenhuis H, and Choyke A (eds). 153–167.
- Saña M, Tornero C. 2012. Use of Animal Fibres during the Neolithisation in the Middle Euphrates Valley: An Archaeozoological Approach. *Paléorient* **38**: 79–91.
- Scharlotta I, Goude G, Herrscher E, Bazaliiskii VI, Weber AW. 2018. “Mind the gap”—Assessing methods for aligning age determination and growth rate in multi-molar sequences of dietary isotopic data. *American Journal of Human Biology* **30**: 1–13. DOI: 10.1002/ajhb.23163
- Schoeninger MJ, DeNiro MJ. 1984. Nitrogen and carbon isotopic composition of bone collagen from marine and terrestrial animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**: 625–639. DOI: 10.1016/0016-7037(84)90091-7
- Schurr MR. 1997. Stable Nitrogen Isotopes as Evidence for the Age of Weaning at the Angel Site: A

- Comparison of Isotopic and Demographic Measures of Weaning Age. *Journal of Archaeological Science* **24**: 919–927. DOI: 10.1006/jasc.1996.0171
- Schwertl M, Auerswald K, Schäufele R, Schnyder H. 2005. Carbon and nitrogen stable isotope composition of cattle hair: ecological fingerprints of production systems? *Agriculture, Ecosystems & Environment* **109**: 153–165. DOI: 10.1016/j.agee.2005.01.015
- Sherratt, A. G. 1981. Plough and pastoralism: aspects of the Secondary Products Revolution. In I. Hodder, G. Isaac, and N. Hammond (eds.) *Pattern of the Past: Studies in the Honour of David Clarke*, 261–306. Cambridge, Cambridge University Press.
- Sherratt, A. G. 1983. The Secondary Products Revolution of animals in the Old World. *World Archaeology* **15** (1): 90–104.
- Sierra A, Bréhard S, Montes L, Utrilla P, Saña M. 2019. Sheep exploitation and husbandry in first farming societies: from production to consumption in Central Pyrenees in the Early Neolithic. *Archaeological and Anthropological Sciences* **11**: 5813–5829. DOI: 10.1007/s12520-019-00907-3
- Sponheimer M, Robinson T, Ayliffe L, Roeder B, Hammer J, Passey B, West A, Cerling T, Dearing D, Ehleringer J. 2003. Nitrogen isotopes in mammalian herbivores: Hair $\delta^{15}\text{N}$ values from a controlled feeding study. *International Journal of Osteoarchaeology* **13**: 80–87. DOI: 10.1002/oa.655
- Stojanovski D et al. 2020. Living off the land: Terrestrial-based diet and dairying in the farming communities of the Neolithic Balkans. *PLoS ONE* **15** DOI: 10.1371/journal.pone.0237608
- Tieszen LL, Fagre T. 1993. Effect of Diet Quality and Composition on the Isotopic Composition of Respiratory CO_2 , Bone Collagen, Bioapatite, and Soft Tissues. In *Prehistoric Human Bone*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; 121–155. DOI: 10.1007/978-3-662-02894-0_5
- Tornero C. 2011. *Estrategias de explotación, gestión y apropiación del ganado en las primeras sociedades campesinas del valle medio del Eufrates (República Árabe de Siria). Integración de los análisis biogeoquímicos al estudio arqueofaunístico de tell Halula (Valle Medio d, Autonomous University of Barcelona*
- Towers J, Gledhill A, Bond J, Montgomery J. 2014. An Investigation of Cattle Birth Seasonality using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ Profiles within First Molar Enamel. *Archaeometry* **56**: 208–236. DOI: 10.1111/arc.12055
- Upex B, Dobney K. 2012. Dental enamel hypoplasia as indicators of seasonal environmental and physiological impacts in modern sheep populations: A model for interpreting the zooarchaeological record. *Journal of Zoology* **287**: 259–268. DOI: 10.1111/j.1469-7998.2012.00912.x
- Vatankhah M, Salehi SA. 2010. Genetic and non-genetic factors affecting Lori-Bakhtiari ewe body weight and its relationship with productivity. *Small Ruminant Research* **94**: 98–102. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2010.07.006
- Vigne J-D, Helmer D. 2007. Was milk a “secondary product” in the Old World Neolithisation process? Its role in the domestication of cattle, sheep and goats. *Anthropozoologica* **42**: 9–40.
- Warinner C, Tuross N. 2010. Brief communication: Tissue isotopic enrichment associated with growth depression in a pig: Implications for archaeology and ecology. *American Journal of Physical Anthropology* **141**: 486–493. DOI: 10.1002/ajpa.21222
- Webb EC, Stewart A, Miller B, Tarlton J, Evershed RP. 2016. Age effects and the influence of varying proportions of terrestrial and marine dietary protein on the stable nitrogen-isotope compositions of pig bone collagen and soft tissues from a controlled feeding experiment. *Science and Technology of Archaeological Research* **2**: 54–66. DOI: 10.1080/20548923.2015.1133121
- Weinreb MM, Sharav Y. 1966. Tooth development in sheep. *The Dental magazine and oral topics* **83**: 65–69.
- Witzel C, Kierdorf U, Frölich K, Kierdorf H. 2018. The pay-off of hypsodonty - Timing and dynamics of crown growth and wear in molars of Soay sheep. *BMC Evolutionary Biology* **18**: 1–14. DOI: 10.1186/s12862-018-1332-9
- Wright CC. 2014. *Calcium isotopes in sheep dental enamel: a new approach to studying weaning and dairying in the archaeological record*, University of Oxford
- Zazzo A, Balasse M, Passey BH, Moloney AP, Monahan FJ, Schmidt O. 2010. The isotope record of short- and long-term dietary changes in sheep tooth enamel: Implications for quantitative reconstruction of

paleodiets. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **74**: 3571–3586. DOI: 10.1016/j.gca.2010.03.017

Zazzo A, Balasse M, Patterson WP. 2006. The reconstruction of mammal individual history: refining high-resolution isotope record in bovine tooth dentine. *Journal of Archaeological Science* **33**: 1177–1187. DOI: 10.1016/j.jas.2005.12.006

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST
ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND
NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES
Celia Diez-Canseco Esteban

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

POSSIBILITIES OF SEQUENTIAL ISOTOPE ANALYSES OF DENTINE FOR THE STUDY OF LIFE CONDITIONS OF PAST ANIMAL POPULATIONS. NEW APPROACHES TO OBTAIN INTRA-TOOTH ISOTOPIC DATA FROM COLLAGEN (STABLE CARBON AND NITROGEN ISOTOPES) IN HYPSONDONT SPECIES

Celia Diez-Canseco Esteban



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI