



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

MONITORAGGIO NON INVASIVO DEL CICLO RIPRODUTTIVO NEL RINOCERONTE BIANCO PRESSO IL PARCO FAUNISTICO *LE CORNELLE*: ANALISI DEI METABOLITI FECALI DI ESTROGENO E PROGESTERONE

NON-INVASIVE MONITORING OF THE REPRODUCTIVE CYCLE IN THE WHITE RHINO
AT *LE CORNELLE* WILDLIFE PARK: ESTROGEN AND PROGESTERONE FECAL
METABOLITE ANALYSIS

Relatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Di Ianni

Correlatori:

Dott.ssa Mara Bertocchi

Dott. Maurizio Oltolina

Laureanda:
Stefania Del Missier

Indice

Abstract	4
Introduzione.....	5
Capitolo 1: I Giardini zoologici	7
1.1 Definizione.....	7
1.2 Cenni storici.....	8
1.3 Obiettivi dei Giardini Zoologici	10
1.3.1 Conservazione	10
1.3.2 Ricerca	12
1.3.3 Educazione	13
1.4 Quadro Normativo	14
1.5 Associazioni	16
1.6 Etica	18
Capitolo 2: Il Rinoceronte Bianco	20
2.1 Tassonomia.....	20
2.2 Distribuzione geografica e habitat	22
2.3 Anatomia e morfologia.....	23
2.4 Alimentazione.....	25
2.5 Comportamento	26
2.5.1 Ecologia e organizzazione sociale.....	26
2.5.2 Modelli di attività, uso dell'habitat e movimento.....	27
2.5.3 Comportamento riproduttivo	27
2.5.4 Gravidanza, parto e cure materne	28
2.6 Riproduzione	31
2.6.1 Anatomia maschile	31
2.6.2 Anatomia femminile	32

2.6.3 Estro e anestro	33
2.6.4 Gestazione e parto	35
2.6.5 Riproduzione artificiale	35
2.7 Conservazione	39
Capitolo 3: Monitoraggio dell'attività riproduttiva	43
3.1 Gli ormoni della riproduzione	43
3.1.1 Progesterone	43
3.1.2 Estrogeni.....	43
3.2 Scopi del monitoraggio.....	45
3.3 Monitoraggio non invasivo.....	47
3.3.1 Matrici Biologiche.....	49
3.4 Monitoraggio ecografico	54
3.5 Training.....	56
3.6 Monitoraggi precedenti	58
Capitolo 4: Attività sperimentale	64
4.1 Obiettivi	64
4.2 Materiali e metodi.....	66
4.2.1 Area di studio	66
4.2.2 Il reparto.....	68
4.2.3 Soggetti.....	70
4.2.4 Raccolta dei campioni fecali	73
4.2.5 Analisi di estrogeni e progesterone fecali	73
4.3 Risultati.....	78
4.4 Discussione	89
4.4.1 Limiti dello studio	93
Capitolo 5: Conclusioni	96
5.1 Conclusioni	96

5.2 Implicazioni future.....	98
Bibliografia	100
Sitografia	121

Abstract

Endangered animal species are constantly growing in number and, therefore, their protection is getting more and more crucial.

Protecting biodiversity, endangered animals and their habitats are among the most relevant goals of zoos. They operate both *in situ* (in natural habitats) and *ex situ* (in zoos). The goal of *in situ* conservation programs is to create self-sustaining populations. In order to reach this goal, a deep knowledge of reproductive physiology is required, as well as the ability to apply that knowledge to the control of captive breeding programs (Asa, 2010).

Rhinos belong to the endangered species; as a consequence, stabilizing a captive self-sustaining population is crucial, in order to both reintroduce some rhinos in their natural habitats and to establish a genetic *reservoir* (IUCN, 1998).

To achieve these goals effectively, the current knowledge of reproductive physiology is incomplete (Schwarzenberger *et al.*, 1998).

This study fits into literature by monitoring faecal metabolites of estrogen and progesterone in two females of white rhinos (*Ceratotherium simum simum*) bred in zoos.

Even though during the study there has been oestrous and mating episodes, neither rhinos has become pregnant.

Both this study and literature confirm that, in order to get a more precise insight into the reproductive status of this animal, a more frequent monitoring is advisable, along with the use of various biological matrices and ultrasonographic techniques.

Introduzione

La salvaguardia delle specie animali, la conservazione della biodiversità e la tutela dell'ambiente sono tematiche al giorno d'oggi sempre più attuali.

È ormai risaputo che diverse specie animali siano a rischio di estinzione e che, se non sottoposte alla dovuta tutela, una buona parte di esse potrebbe scomparire per sempre. Addirittura, i due terzi delle specie animali oggi esistenti potrebbero estinguersi definitivamente entro la fine di questo secolo (Raven, 2020).

I giardini zoologici hanno un ruolo attivo e partecipe nella tutela e nella salvaguardia delle specie selvatiche. Essi, infatti, collaborano tra di loro e con associazioni esterne alla progettazione e alla realizzazione di programmi di conservazione svolti sia *in situ* che *ex situ* (Hosey, *et al.*, 2013).

La conservazione *in situ* è una strategia che prevede l'attuazione di programmi protezionistici direttamente nell'habitat naturale dell'animale. Mentre per conservazione *ex situ* si intende il lavoro svolto dagli zoo nell'ambito dei giardini zoologici, perciò lontano dall'habitat naturale delle specie coinvolte (Hosey, *et al.*, 2013).

I rinoceronti sono tra gli animali più significativamente interessati dal pericolo di estinzione.

Il motivo di questa situazione di rischio, prolungata nel tempo, è da ricercare nella costante minaccia alla quale i rinoceronti in natura sono sottoposti a causa del bracconaggio, indirizzato a soddisfare l'illegale domanda di corno nel sud-est asiatico (Emslie *et al.*, 2019).

Delle cinque specie di rinoceronti ancora esistenti al mondo, quella del rinoceronte bianco (*Ceratotherium simum*) è ulteriormente suddivisa in due sottospecie: il rinoceronte bianco meridionale (*Ceratotherium simum simum*) e il rinoceronte bianco settentrionale (*Ceratotherium simum cottoni*). A causa del bracconaggio, quest'ultimo è classificato dalla *Red List of Threatened Species* della IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) come "criticamente in pericolo" (probabilmente estinto), contando solo due individui adulti in natura. Il rinoceronte bianco meridionale, invece, non è più considerato strettamente in pericolo poiché nel corso degli anni il numero degli animali è aumentato grazie alla lotta al bracconaggio e ad un'ottima gestione sul territorio.

Tuttavia, il rinoceronte bianco meridionale non può definirsi fuori pericolo finché in natura ci sarà la minaccia del bracconaggio (Emslie, 2019) e la popolazione in cattività non sarà in grado di autosostenersi (Swaigood *et al.*, 2006). Per questo motivo, secondo la *Red List*, viene definito come "quasi minacciato".

Ai fini della conservazione delle specie l'allevamento in cattività riveste un ruolo fondamentale.

Le popolazioni autosufficienti *ex situ*, infatti, fungono da serbatoio genetico per sostenere la popolazione oppure assicurare la reintroduzione degli animali in natura nei territori che una volta quella specie popolava (IUCN, 1998).

Tuttavia, il principale ostacolo alla costituzione di una popolazione *reservoir* in cattività è rappresentato dalla difficoltà di riproduzione del rinoceronte in cattività (Swaigood *et al.*, 2006) e dalle scarse conoscenze che possediamo in materia di biologia riproduttiva di questa specie, con studi riportati in letteratura talvolta contrastanti (Schwarzenberger *et al.*, 1998).

Questi due concetti sono strettamente interconnessi e si influenzano l'un l'altro.

Infatti, se la riproduzione in cattività risulta fallimentare, si può intervenire mediante le tecnologie di riproduzione assistita. Tuttavia, l'utilizzo di tali tecnologie esige una buona conoscenza della fisiologia riproduttiva della specie in cui sono applicate (Asa, 2010).

Con lo scopo di ampliare il panorama delle conoscenze scientifiche nell'ambito della biologia riproduttiva del rinoceronte, sono dunque stati realizzati diversi studi nel corso degli ultimi anni. Tali studi si sono delineati con la forma del monitoraggio non invasivo che è meglio tollerato dalle specie selvatiche. Il motivo per cui è meglio tollerato è legato al fatto che esso è di più agevole applicazione e consente di ottenere preziose informazioni con la stessa precisione del prelievo ematico ma evitando o minimizzando il contatto fisico con l'animale, in totale sicurezza per l'animale e per l'operatore e senza causare stress nell'animale. Inoltre, è più agevolmente applicabile nel free-range (Hodges *et al.*, 2010).

Si sono rivelati di fondamentale importanza, inoltre, il monitoraggio ecografico, tecnica non invasiva che fornisce informazioni dettagliate in tempo reale (Radcliffe *et al.*, 1996; Radcliffe *et al.*, 2001), e il *training* degli animali, diretto alla raccolta di matrici biologiche in assenza di stress.

Il presente studio si inserisce nel panorama della letteratura andando a monitorare il ciclo riproduttivo di due esemplari di rinoceronte bianco meridionale (*Ceratotherium simum simum*) ospitati presso il Parco Faunistico Le Cornelle, situato a Valbrembo (BG).

Il monitoraggio è stato effettuato mediante tecnica non invasiva. In particolare, sono stati raccolti campioni di materiale fecale, con successivo dosaggio dei metaboliti degli ormoni sessuali tramite metodica immunoenzimatica (EIA).

Capitolo 1

I Giardini zoologici

1.1 Definizione

Secondo il documento sulle buone pratiche redatto a partire dalla direttiva UE sui giardini zoologici, l'utilizzo del termine zoo vede la sua origine verso la metà del secolo scorso come abbreviazione di 'giardino zoologico', con riferimento a quello di Regent's Park di Londra fondato nel 1828 (Commissione europea, 2015).

Nel pensiero comune per giardino zoologico si intende un luogo nel quale sono semplicemente esposti animali selvatici (Finotello, 2013).

Tale definizione al giorno d'oggi è considerata riduttiva in quanto i giardini zoologici sono una realtà molto più complessa e con finalità più ampie rispetto alla mera esposizione di animali al pubblico con lo scopo dell'intrattenimento. Per giardino zoologico si intende infatti, qualsiasi complesso permanente nel quale vengono tenuti a scopo di esposizione, per almeno sette giorni l'anno, animali vivi di specie selvatiche ad esclusione dei circhi, dei negozi di animali da compagnia e dei complessi che gli Stati membri non assoggettano ai requisiti definiti dalla direttiva 1999/22/CE per il fatto che non espongono un numero significativo di animali o di specie e che tale esenzione non compromette gli obiettivi della direttiva (Consiglio dell'Unione europea, 1999).

Sul sito dell'Unione Italiana Zoo e Acquari (UIZA) vi è un'altra definizione di zoo secondo la quale esso è una struttura permanente e territorialmente stabile, aperta ed amministrata per il pubblico, che espone animali selvatici, allo scopo di promuovere e sostenere la salvaguardia della natura attraverso l'educazione del pubblico, la ricerca scientifica e la conservazione delle specie animali in situ ed ex situ (www.uiza.org).

1.2 Cenni storici

Per comprendere come gli zoo siano diventati quelle realtà complesse che oggi conosciamo, è necessario prendere in esame la storia di come questi sono nati e la loro evoluzione nel corso del tempo.

Esistono, infatti, testimonianze secondo le quali fin dall'antichità l'uomo ha allevato animali selvatici in cattività.

Le prime testimonianze risalgono a circa 4000 anni fa, all'epoca della civiltà egizia, nella quale gli animali erano tenuti nei giardini dei templi o accompagnavano i faraoni in battaglia, oppure ai popoli della Mesopotamia, dove questi animali venivano esibiti all'interno dei Giardini di Babilonia. Anche nell'antica Grecia abbiamo testimonianze di serragli, nei quali si allevavano gli animali selvatici per scopi di studio (Hosey *et al.*, 2013).

I Romani, invece, usavano utilizzare gli animali esotici per i combattimenti nelle arene contro i gladiatori. Alcuni autori (Baratay e Hardouin-Fugier, 2004) sostengono che i massacri che si svolgevano nelle arene ai danni degli animali fossero una sorta di vendetta verso i nemici sconfitti in battaglia, a causa delle perdite da loro inflitte mediante questi animali, ad esempio gli elefanti, frequentemente schierati come armi in battaglia. Sempre secondo gli autori questi massacri avevano lo scopo di intrattenere il pubblico, celebrando allo stesso tempo la potenza di Roma.

Dell'età medioevale abbiamo poche testimonianze, tuttavia i serragli più importanti di questo periodo sono i tre serragli di Federico II di Svevia, nel XIII secolo, situati in Italia. In quest'epoca lo scopo degli zoo era enfatizzare la potenza e la ricchezza della classe aristocratica (Finotello, 2013).

Le testimonianze degli zoo nel XVI e nel XVII secolo riportano ancora una volta di serragli privati, con lo scopo di intrattenere i reali e la loro corte. Spesso tali animali venivano inviati ad altri capi di stato in qualità di doni per sigillare alleanze, sottomissioni o trattati di pace, oppure erano oggetto di scambi (Baratay e Hardouin-Fugier, 2004).

A partire dal XVIII e dal XIX secolo vengono a delinearsi le prime caratteristiche che connotano lo zoo moderno. Con lo sviluppo dello zoo moderno questo per la prima volta diventa pubblico. La ragione dell'apertura ad un pubblico emerge in concomitanza ad un nuovo e crescente interesse nei confronti della storia naturale, alla necessità di mostrare alla popolazione la crescita degli imperi coloniali dai quali venivano importati animali sconosciuti (Hosey *et al.*, 2013), unitamente alla volontà di popolarizzare le conoscenze scientifiche (Baratay e Hardouin-Fugier, 2004).

Quest'ultima, insieme alla volontà di eliminare uno dei simboli della tirannia intellettuale, è la motivazione per cui nasce, nel 1793, il primo moderno giardino zoologico (Baratay e Hardouin-Fugier, 2004).

Si tratta del *Jardin des Plantes* a Parigi, i cui animali erano stati requisiti dal serraglio privato del re Luigi XVI e confiscati ad alcuni esibitori itineranti. La novità rappresentata dai Jardin des Plantes consiste nel fatto che l'interesse era per la prima volta focalizzato sulla ricerca.

Sulla scia del crescente successo ottenuto dai Jardin des Plantes di Parigi, nel 1828, venne fondato a Regent's Park il London Zoo. Lo zoo di Londra manterrà una posizione di leadership per quasi un secolo e sul suo modello nacquero diverse imitazioni.

L'influenza che il London Zoo aveva sugli altri zoo di Europa e del mondo era dovuta, secondo gli autori Hosey, Melfi e Pankhurst (2013), a due fattori chiave: il fondamento su principi scientifici e la posizione in un parco pubblico.

La vera innovazione, però, arrivò solo nel 1907 quando Carl Hagenbeck, commerciante e addestratore di animali, fondò lo zoo di Amburgo. Il cambiamento promosso da Hagenbeck consisteva in uno zoo nel quale le gabbie erano finalmente abolite, i visitatori venivano separati dagli animali mediante ampi fossati che ne garantivano la distanza di sicurezza e gli exhibit nei quali venivano alloggiati gli animali erano ricostruiti artificialmente ad arte, in modo tale che ricordassero il più possibile il loro l'habitat naturale. (Hosey *et al.*, 2013).

Questo modello rimase in voga per molti anni finché, a partire dagli anni Cinquanta e Settanta del XX secolo, gli zoo entrarono in un periodo di crisi, di declino, in cui molti di questi rischiarono la chiusura o furono effettivamente costretti a chiudere. In questo clima di incertezza, legato alla nascita dei movimenti animalisti da una parte e alla concorrenza dei novelli parchi divertimenti dall'altra, sorse l'esigenza negli zoo di cambiare, di evolversi e proprio in risposta a tale esigenza nacquero i parchi safari e i bioparchi. I primi sono dei parchi nei quali i recinti degli animali sono percorribili in auto, mentre i secondi sono dei parchi nei quali gli animali vengono esposti in exhibit che riproducono interamente il loro ecosistema (Hosey *et al.*, 2013).

In questo modo viene a definirsi il moderno giardino zoologico, perseguendo l'obiettivo di alti standard di benessere e condizioni di allevamento sempre migliori. Lo zoo moderno, inoltre, definisce in modo chiaro e definitivo i propri obiettivi che sono quelli che gli hanno garantito la sopravvivenza fino ai nostri giorni, restando tuttora attuali: conservazione, ricerca e educazione.

1.3 Obiettivi dei Giardini Zoologici

“Il parco zoologico, inteso come insieme di strutture zoologiche che comprendono il giardino zoologico, l’acquario e tutte le altre istituzioni da esse derivate, deve oggi essere identificato come un luogo gestito scientificamente e impegnato a pieno titolo in programmi di riproduzione in cattività, di conservazione, di studio e di ricerca, nonché come uno dei pochi e importanti centri pensati per la sensibilizzazione e l’educazione del pubblico, di tutti i livelli e classi di età, nei riguardi dei più scottanti problemi che investono la protezione e la gestione della Natura.” (Finotello, 2013).

I tre principali obiettivi del giardino zoologico sono quindi la conservazione delle specie animali a rischio, la ricerca e l’educazione e appaiono strettamente connessi tra di loro.

1.3.1 Conservazione

La conservazione delle specie in pericolo è ad oggi uno dei maggiori obiettivi degli zoo. (Hosey *et al.*, 2013).

Per conservazione si intende, secondo il documento *World Zoo and Aquarium Conservation Strategy (WZACS)* (Barongi *et al.*, 2015), la protezione a lungo termine delle popolazioni di specie negli habitat naturali.

La scienza che sostiene la conservazione è la biologia della conservazione definita come “la scienza applicata al mantenimento della diversità biologica sulla Terra” (Hunter, 1995), concetto strettamente connesso a quello di *biodiversità*, ovvero “la totalità di geni, specie ed ecosistemi in una regione” (WRI/MCN/UNEP/FAO/UNESCO, 1992). Risulta quindi evidente che per ‘conservazione della biodiversità’ non si intenda solo la biodiversità animale, ma anche quella di piante ed ecosistemi. Gli zoo sono egualmente impegnati nella salvaguardia di tutte e tre.

La biologia della conservazione gioca un ruolo fondamentale nella protezione della biodiversità tentando di contrapporsi all’impatto dell’uomo sull’ambiente (Wilson 1988; Reaka-Kudka *et al.* 1996). Le azioni perpetuate dall’uomo ai danni dell’ambiente causano una perdita dei luoghi dove gli animali vivono e la distruzione dei loro habitat naturali e, insieme alla caccia, hanno già causato l’estinzione di diverse specie animali e messo in pericolo molte altre che potrebbero estinguersi in futuro. Due terzi delle specie del mondo potrebbero scomparire entro la fine del secolo (Raven, 2002).

Fondata nel 1948, l’IUCN (*Unione Internazionale per la Conservazione della Natura*) è stata la prima organizzazione mondiale ad occuparsi di ambiente. La *IUCN Red List of Threatened Species*,

redatta più di cinquanta anni fa, è il più completo inventario del rischio di estinzione delle specie a livello mondiale. Essa, in principio, raccoglieva le valutazioni soggettive del livello di rischio di estinzione secondo i principali esperti delle diverse specie; dal 1994 le valutazioni sono basate su un sistema di categorie e criteri quantitativi e scientificamente rigorosi. L'ultima versione della Lista Rossa IUCN risale al 2001 (www.iucn.it). La lista rossa distingue le specie in "vulnerabile", "in pericolo", "in pericolo critico".

Il ruolo attivo nella conservazione della biodiversità e le attività di cui gli zoo si occupano con lo scopo di perseguire tale obiettivo, sono definiti da tre documenti strategici:

- *World Zoo Conservation Strategy* (IUDZG/CBSG, 1993) e successivi,
- *World Zoo and Aquarium Conservation Strategy* (WAZA, 2005),
- *Turning the Tide* (WAZA, 2009)

Nel concreto, il ruolo degli zoo si declina in quattro azioni:

- Allevare le specie in pericolo in un luogo sicuro dove mantenere uno stock della popolazione in attesa di essere successivamente reintrodotta in natura (conservazione *ex situ*);
- Sostegno e coinvolgimento pratico nei progetti di conservazione *in situ*;
- Educazione e sponsorizzazione del problema della conservazione;
- Promuovere la ricerca scientifica che apporti benefici alla scienza e alla pratica della conservazione;

La conservazione della biodiversità viene espletata mediante due modalità: conservazione *in situ* e conservazione *ex situ*.

Per conservazione *in situ* si intende l'attività finalizzata alla salvaguardia delle specie animali svolta all'interno del loro habitat naturale; la conservazione *ex situ*, ovvero negli zoo o nei parchi naturali, è invece quella sostenuta lontano dal loro habitat naturale, ed è la scelta verso la quale si propende quando la conservazione *in situ* non è fattibile o non è considerata sicura. Tali terminologie sono nate nel corso della *Convention of Biodiversity* (UN, 1992).

La reintroduzione in natura di una specie ospitata negli zoo è uno degli obiettivi dell'allevamento in cattività.

Non tutte le specie né tutti gli individui sono idonei a far parte di un programma di reintroduzione: per farne parte devono soddisfare determinati criteri conformi alle linee guida prodotte dal *SSC Reintroduction Specialist Group* approvate dal IUCN (Hosey *et al.*, 2013).

Diversi progetti hanno raggiunto una certa fama: in parte a causa dell'intenso monitoraggio, in parte perché riguardano specie che possono essere considerate dei veri e propri "fiori all'occhiello" (Hosey *et al.*, 2013).

Tra questi ricordiamo: il programma di reintroduzione del tamarino leone dorato (*Leontopithecus rosalia*) (Kleiman *et al.*, 1986; Stoinski *et al.*, 1997), dell'orice arabo (*Oryx leucoryx*), il cervo di padre David (*Elaphurus davidianus*), il bisonte americano (*Bison bison*), il bisonte europeo (*Bison bonasus*), il cavallo di Przewalski (*Equus przewalskii*) e la tigre siberiana (*Panthera tigris altaica*). Tuttavia, il binomio zoo e conservazione nel corso degli ultimi anni sta cambiando.

Ad oggi, benché l'allevamento in cattività sia ancora importante, sempre più interesse è rivolto verso lo sviluppo dei programmi in situ: si sta cercando di passare, infatti, dal concetto che 'gli zoo intraprendono programmi di conservazione' a 'le organizzazioni per la conservazione gestiscono gli zoo' (Zimmermann e Wilkinson, 2007).

Questa visione del futuro concorda con quella della WZCS e WZACS che ritiene che gli zoo debbano diventare dei "centri per la conservazione" con queste tre caratteristiche: promuovere una trasformazione nel comportamento dei visitatori degli zoo e dei responsabili delle decisioni, stabilire connessioni tra il lavoro ex situ degli zoo e le attività in situ e contribuire direttamente alle attività di conservazione in situ. (Hatchwell *et al.*, 2007).

1.3.2 Ricerca

Altro importante scopo dei giardini zoologici è la promozione della ricerca scientifica.

Lo zoo, infatti, è il solo ambiente che riesca a garantire il corretto studio degli animali esotici. La raccolta dei dati nell'habitat naturale potrebbe infatti risultare troppo complessa da un punto di vista logistico. Inoltre, la ricerca sul campo pare essere molto più dispendiosa in termini economici, rispetto a quella degli zoo. Infine, i risultati delle ricerche che vedono come soggetti gli animali in cattività possono dimostrarsi degli ottimi punti di partenza per la comprensione della biologia dei soggetti nel loro habitat naturale. La ricerca negli zoo consente quindi di andare oltre e seguire un approccio sperimentale rispetto alla pura osservazione possibile nell'ambiente selvatico (Hosey *et al.*, 2013).

Gli zoo, benché non siano stati primariamente fondati con tale scopo, possono vantare una lunga storia nello studio della biologia animale (Hutchins, 2001). Ad esempio, l'atto costitutivo della *Zoological Society* di Londra, fondata nel 1826, riporta che "tra i propositi di una collezione di animali vi debba essere la ricerca scientifica".

Il fine della ricerca scientifica all'interno degli zoo dev'essere in parte collegato ad un miglioramento degli zoo stessi e delle loro pratiche, quindi rivolto all'allevamento in cattività, alla conservazione e al benessere, e in parte volto a promuovere l'ampliamento delle conoscenze in ambito scientifico. Secondo il documento WZACS (WAZA, 2005) dovrebbero essere queste le finalità della ricerca scientifica nell'ambito dei giardini zoologici.

1.3.3 Educazione

L'ultima parte fondamentale della *mission* degli zoo è l'educazione del pubblico riguardo agli animali e la crescita dell'attenzione, della consapevolezza e del supporto nei confronti della conservazione delle specie animali e della natura in generale.

In questo contesto l'educazione può essere intesa come una passiva acquisizione di conoscenze che provengono dalla visita presso lo zoo, quindi dalla vista degli animali e dalla lettura dei cartelli. Questo tipo di apprendimento prende il nome di apprendimento informale. Nel caso in cui lo zoo si avvalga di forme di comunicazione più strutturate quali dimostrazioni, conferenze, visite scolastiche e brevi corsi, si parla di apprendimento formale (Hosey *et al.*, 2013).

In particolare, risulta essere importante il ruolo che gli zoo hanno nell'educazione alla conservazione, intesa come 'principi di educazione ambientale ed educazione alla sostenibilità' (WAZA, 2005). A tale scopo gli zoo possono capitalizzare la possibilità di mostrare al pubblico gli animali, unitamente al lavoro di conservazione *in situ* ed *ex situ* nel quale sono coinvolti (Hosey *et al.*, 2013).

Tuttavia, non sempre gli zoo sono in grado di espletare al meglio tale loro funzione. Uno studio di Mason (2008) al Wellington Zoo in Nuova Zelanda, infatti, ha rivelato che i visitatori pur percependo questo come uno degli scopi degli zoo, ritengono anche che l'intrattenimento sia una delle sue maggiori funzioni e sono meno consapevoli riguardo l'importanza degli zoo nella conservazione. Una ragione di ciò è probabilmente che gli zoo tendono a pubblicizzare maggiormente l'aspetto ludico piuttosto che il proprio ruolo nella conservazione, descritto invece superficialmente (Carr e Cohen, 2011).

È sempre necessario considerare che, benché gli zoo vedano chiaramente la connessione tra la conservazione, l'educazione e l'intrattenimento, questa potrebbe non essere sempre ovvia al di fuori del mondo degli zoo (Fraser e Sickler, 2009).

1.4 Quadro Normativo

Gli zoo solitamente operano nell'ambito di una struttura di convenzioni, direttive, leggi e procedure che si estendono attraverso legislazioni su più livelli: internazionale (inteso a livello globale), regionale, ovvero continentale, e nazionale (Hosey *et al.*, 2013).

Tra le convenzioni internazionali che regolano l'operato degli zoo sono incluse la *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES)* (UN, 1973) e la *Convention on Biological Diversity (CBD)* (UN, 1992) (Holst e Dickie, 2007).

La CITES è stata fondata nel 1973 da parte dei rappresentanti di 8 stati durante una conferenza a Washington DC. Lo scopo della CITES, che è entrata in vigore due anni dopo, è quello di regolamentare il commercio della flora e della fauna selvatiche con il proposito di tutelare la conservazione dell'ambiente e della biodiversità. Gli stati che hanno accettato di legarsi alla CITES hanno dovuto aderire ai suoi principi e recepirli mediante la propria legislazione (Hosey *et al.*, 2013).

Il maggior impatto della CITES sugli zoo riguarda la richiesta di permessi per la movimentazione degli animali appartenenti a specie ritenute dalla CITES stessa in pericolo o minacciate. Tali specie sono elencate in tre appendici al documento della CITES e vengono aggiornate ogni due anni (www.cites.org).

Un'altra convenzione internazionale che ha influenza sugli zoo e sul loro operato è la *Convention on Biological Diversity (CBD)* o *Convention on Biodiversity*. Firmata dai leaders di 150 paesi al summit delle Nazioni Unite tenuto a Rio de Janeiro nel 1992, la CBD è destinata alla promozione dello sviluppo sostenibile. Il testo, inoltre, riporta misure indirizzate alla conservazione in situ ed ex situ. (Hosey *et al.*, 2013).

L'Unione Europea e i suoi stati membri, tramite la Direttiva CE sugli zoo, possono riferirsi al lavoro di conservazione degli zoo per conformarsi alla CBD (Hosey *et al.*, 2013).

La Direttiva sui giardini zoologici (1999/22/CE) definisce un quadro normativo finalizzato alla conservazione della biodiversità, che deve essere recepito ed attuato dagli stati membri attraverso un sistema di licenze ed ispezioni che garantiscano l'attuazione da parte degli zoo di misure volte alla conservazione. Tali misure costituiscono dei requisiti che i giardini zoologici devono possedere: essi sono la partecipazione a ricerche scientifiche, formazioni e scambi di informazioni, la promozione dell'istruzione e della consapevolezza del pubblico, il rispetto del benessere animale e delle esigenze biologiche delle singole specie, impedire la fuga di animali e tenere registri aggiornati degli ospiti del giardino zoologico. (Commissione europea, 2015)

L'attuazione è demandata ai singoli stati membri che tramite disposizioni legislative locali si conformano alla direttiva. L'Italia ha attuato tale direttiva mediante un decreto legislativo che introduce alla disciplina normativa dei giardini zoologici (Decreto legislativo 21 marzo 2005 n. 73.)

1.5 Associazioni

Gli zoo, generalmente, non sono realtà isolate, ma fanno parte di una rete di associazioni a livello internazionale, nazionale e locale. Lo scopo di tali associazioni consiste nell'incentivare le buone pratiche di gestione e il professionalismo e nel promuovere la cooperazione tra gli zoo ai vari livelli al fine di perseguire al meglio gli obiettivi ultimi di ricerca, educazione e conservazione. (Hosey *et al.*, 2013)

Tra le associazioni di maggior rilievo attualmente presenti e attive sul panorama mondiale vi sono la *World Association of Zoos and Aquariums (WAZA)*, la *European Association of Zoos and Aquaria (EAZA)*, la *Association of Zoo and Aquariums (AZA)*, la *British and Irish Association of Zoos and Aquariums (BIAZA)*, la *Zoo and Aquarium Association (ZAA)* e la *Pan-African Association of Zoological Gardens and Aquaria (PAAZAB)* (Figura 1.1).



Fig. 1.1: Loghi delle principali associazioni a livello mondiale a cui fanno capo i giardini zoologici: AZA, BIAZA WAZA, ZAA, PAAZAB, EAZA.

La più antica di queste associazioni è la *German Association of Zoo Directors* del 1887, dalla quale nacque la *International Union of Directors of Zoological Gardens (IUDZG)* nel 1935, che dal 2000 verrà rinominata WAZA (EAZA, 2003).

La WAZA ha come obiettivo principale la coordinazione di un'azione congiunta a livello mondiale per sostenere la conservazione. Tale obiettivo, nel corso degli anni, è stato perseguito con successo mediante la pubblicazione di tre documenti relativi alle strategie per la conservazione delle specie animali: il *World Zoo Conservation Strategy (WZCS)* (IUDZG/CBSG, 1993), il *World Zoo and Aquarium Conservation Strategy (WZACS)* (WAZA, 2005) e un terzo documento dal titolo *"Turning the Tide: A Global Aquarium Strategy for Conservation and Sustainability"* (WAZA, 2009). Waza ha inoltre sviluppato un codice, detto *Code of Ethics* (WAZA, 1999), incentrato su temi quali la contracccezione, l'eutanasia e la movimentazione di animali tra gli zoo (Hosey *et al.*, 2013).

L'EAZA, fondata nel 1988, rappresenta gli zoo a livello europeo. La mission dell'EAZA è articolata su più punti: la pianificazione e la coordinazione della conservazione della fauna selvatica, l'educazione, un attivo contributo al dialogo su un livello internazionale e attività di consulenza all'Unione Europea. Un particolare interesse, tuttavia, è rivolto da parte di WAZA nei confronti della riproduzione in cattività. Promuove, infatti, il coinvolgimento in programmi di riproduzione in cattività, il primo dei quali è l'*European Endangered species Programmes* (EEPs). Per diventare membri dell'EAZA è necessario sottostare ad una procedura di accreditamento, rispondere ad elevati standard e rispettare il codice etico di EAZA (Hosey *et al.*, 2013).

La più grande associazione per numero di membri ad oggi è AZA, con sede negli Stati Uniti. Tra gli obiettivi che si pone AZA troviamo la conservazione, la ricerca, l'educazione e la volontà ispirare il rispetto nei confronti del mondo naturale, con particolare attenzione alla cura e al benessere animale.

1.6 Etica

A cavallo degli anni Cinquanta e Settanta del XX secolo, si è verificato un periodo di stagnazione e declino del mondo degli zoo che ha portato alla nascita dei primi movimenti ambientalisti e, successivamente, di quelli animalisti. A seguito dell'insorgenza di tali movimenti l'opinione pubblica ha iniziato a domandarsi, per la prima volta, se gli zoo dovessero ancora esistere o meno (Donahue e Trump, 2006).

Ancora oggi vengono mosse accuse nei confronti dei giardini zoologici e della loro esistenza, soprattutto ci si interroga su quale sia l'etica degli zoo e la filosofia alla base degli stessi, insinuando che il loro unico scopo possa essere quello di intrattenere un pubblico. (Hosey *et al.*, 2013)

Una delle critiche rivolte al mondo dei parchi faunistici deriva dal filosofo americano Dale Jamieson (1995), il quale sostiene che esiste una "presunzione di libertà" secondo la quale debba considerarsi moralmente sbagliato privare gli animali della loro libertà.

Per contro, Stephen Bostock (1993) sostiene che noi tolleriamo una perdita di libertà anche nei confronti degli esseri umani, in specifiche e limitate circostanze, e delinea tre argomentazioni in difesa della cattività:

- La cattività può rappresentare, in un'ottica utilitaristica, un vantaggio sia per l'uomo (educazione, conservazione, ricreazione e scoperta scientifica) che per gli animali, volendo considerare che la conservazione implica benefici per l'intera popolazione, anche se non sempre per il singolo animale;
- La cattività non rappresenta necessariamente una condizione di malessere per gli animali e talvolta può rappresentare una condizione di vita migliore rispetto a quella che avrebbero avuto in natura;
- Non è possibile comparare gli animali all'uomo nella disputa sulla moralità della cattività.

È inoltre necessario distinguere il termine '*cattività*' da '*confinamento*': per confinamento si intende una restrizione della libertà tale da interferire con la possibilità di vivere bene. Secondo questa definizione è il confinamento che causa danno all'animale, non la cattività in sé (DeGrazia, 2002).

Tale questione, sempre molto attuale e al centro dei dibattiti delle campagne anti-zoo, delle associazioni animaliste e per i diritti degli animali, appare quindi difficile da dirimere.

Un supporto agli zoo nelle questioni etiche proviene da organizzazioni e associazioni che suggeriscono loro linee guida volte a definire buone pratiche da seguire al momento delle

acquisizioni, del trasporto e dello smaltimento degli animali. Tra queste ricordiamo: *Zoos Expert Committee* nel Regno Unito, *BIAZA*, *EAZA* e *AZA* (Hosey *et al.*, 2013).

Capitolo 2

Il Rinoceronte Bianco

Il Rinoceronte bianco (*Ceratotherium simum*) è una delle cinque specie di rinoceronti ancora esistenti al mondo. L'Africa è l'habitat naturale di due di queste specie: il rinoceronte nero (*Dicero bicornis*) e il rinoceronte bianco (*Ceratotherium simum*); le altre tre specie sono originarie del continente asiatico: il rinoceronte di Sumatra (*Dicerorhinus sumatrensis*), il rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*) e il rinoceronte di Java (*Rhinoceros sondaicus*) (Miller e Buss, 2012).

2.1 Tassonomia

Regno: *Animalia*

Phylum: *Chordata*

Subphylum: *Vertebrata*

Classe: *Mammalia*

Ordine: *Perissodactyla*

Famiglia: *Rhinocerotidae*

Genere: *Ceratotherium* (Gray, 1867)

Specie: *Ceratotherium simum* (Burchell, 1817)

Sinonimi: *Rhinoceros simus* (Burchell, 1817)



Fig. 2.1: Esempio di rinoceronte bianco meridionale (Fotografia di Gabriela Negri – presso Parco Faunistico Le Cornelle)

Sottospecie:

- *Ceratotherium simum ssp. cottoni* (Lydekker, 1908)
- *Ceratotherium simum ssp. simum* (Burchell, 1817) (Figura 2.1)

Alcuni ricercatori hanno proposto di conferire lo status di specie sia al rinoceronte bianco settentrionale (*Ceratotherium simum cottoni*) che al rinoceronte bianco meridionale (*Ceratotherium simum simum*) (Groves *et al.*, 2010).

Tuttavia, lo status di sottospecie è stato comprovato da diversi studi, tra i quali il confronto tra il genoma mitocondriale intero di quattro rinoceronti bianchi settentrionali e il genoma di tre rinoceronti bianchi meridionali (Harley *et al.*, 2016) e lo studio di marcatori nucleari e

mitocondriali di un campione molto più ampio di esemplari esistenti e storici risalenti al XIX secolo. Entrambi i marcatori nucleari e mitocondriali hanno consentito la suddivisione della specie in due sottospecie distinte (Moodley *et al.*, 2018).

Attualmente, secondo la *Red list* delle specie a rischio della IUCN, il rinoceronte bianco settentrionale è definito “criticamente in pericolo” (possibilmente estinto in natura) e conta una popolazione di soli due individui maturi.

Si ritiene che negli anni Sessanta il numero di rinoceronti di questa sottospecie fossero 2360 (Emslie e Brooks, 1999). Tuttavia, a partire dall’aprile del 2003, nell’unica popolazione selvatica sopravvissuta confermata nel Garamba National Park nella Repubblica Democratica del Congo, il numero di rinoceronti bianchi settentrionali è calato rapidamente a causa di un’impennata del bracconaggio e nel 2006 si contavano soli quattro esemplari (Emslie *et al.*, 2006). A seguito di estese e sistematiche indagini a piedi, durante le quali non sono stati avvistati rinoceronti vivi, né sono state evidenziate tracce quali spore o sterco, questa sottospecie è stata dichiarata “probabilmente estinta”. Segnalazioni di rinoceronti bianchi sopravvissuti in una parte remota del Sudan meridionale devono ancora essere confermate (Emslie, 2020).

2.2 Distribuzione geografica e habitat

L'habitat naturale dei rinoceronti africani è strettamente collegato alla tipologia di dieta (Miller e Buss, 2012).

Il rinoceronte bianco necessita di terreni relativamente pianeggianti con vaste aree di erba corta e un accesso regolare all'acqua (Miller e Buss, 2012).

Il suo habitat naturale sono quindi le vaste praterie della savana (Owen-Smith, 2004).

Oggi il 97% di tutti i rinoceronti bianchi meridionali presenti in natura sono distribuiti sul territorio di quattro stati africani. Il Sud Africa è lo stato in cui sono collocati la maggior parte dei rinoceronti, seguito da Namibia, Kenya e Zimbabwe. Dell'areale del rinoceronte bianco fanno parte anche il Botswana, a seguito di progetti di reintroduzione, ed altri stati africani, che ospitano popolazioni di minor entità (Emslie *et al.*, 2019) (Figura 2.2).

Per quanto riguarda il rinoceronte bianco settentrionale il suo areale era definito in passato dai territori dell'Uganda nord-occidentale, del Ciad meridionale, del sud-ovest del Sudan meridionale, della parte orientale della Repubblica Centrafricana e del nord-est della Repubblica del Congo (Sydney, 1965).

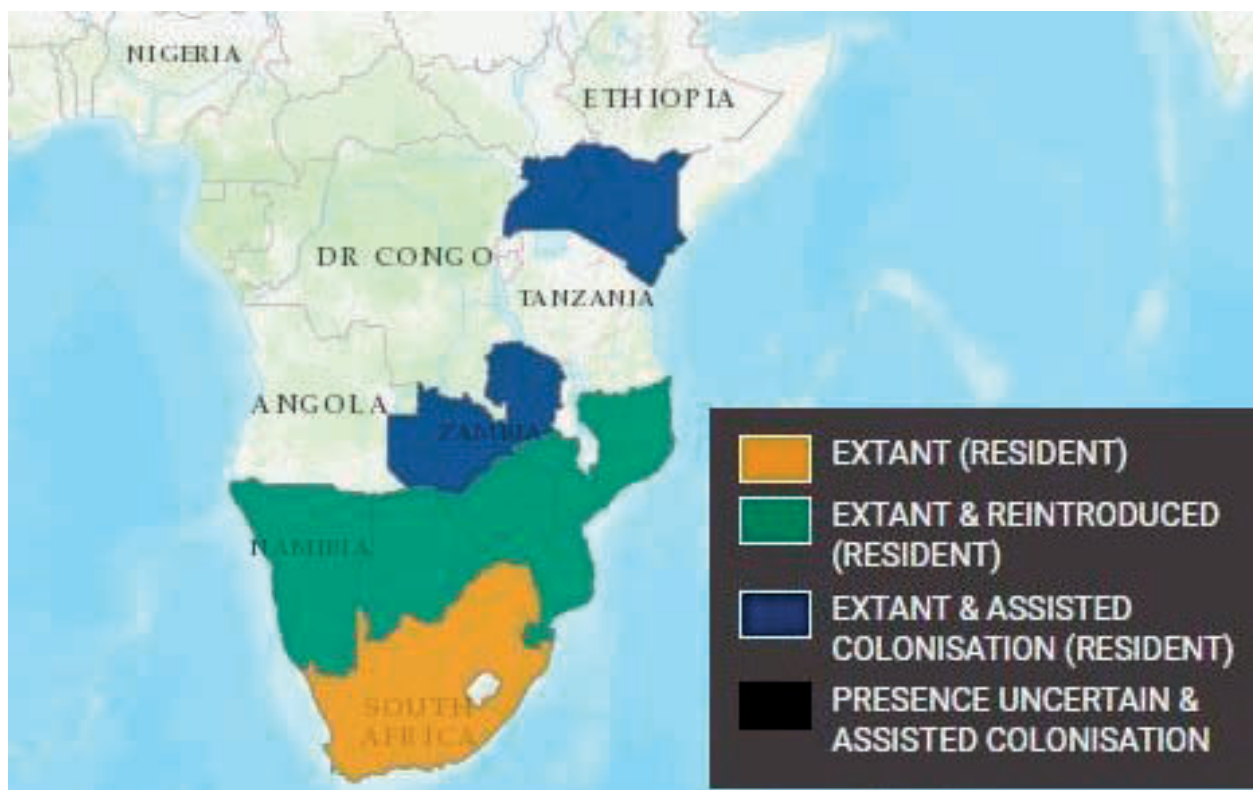


Fig. 2.2: Mappa delle zone geografiche facenti parte dell'areale del rinoceronte bianco meridionale (*Ceratotherium simum simum*).

Fonte: IUCN 2020.

2.3 Anatomia e morfologia

I rinoceronti bianchi (Figura 2.3) hanno un tronco a forma di barile, gambe spesse e corte, larghi piedi con tre dita che ne sostengono il peso (1,800 - 2,700 kg) e un cranio allungato e voluminoso (Miller e Buss, 2012).

La loro dentatura manca di incisivi e canini (Nardelli, 1988) e possiedono larghe e piatte labbra adatte al pascolo.

La loro pelle è spessa (circa 5 cm) con uno spesso derma vascolarizzato coperto da un'epidermide anch'essa piuttosto spessa (circa 1 cm) (Radcliffe e Morkel, 2007). Tutti i rinoceronti hanno le rughe, più o meno pronunciate a seconda della specie (Miller e Buss, 2012).

Il tratto distintivo del rinoceronte è la presenza di un corno o di una coppia di corni, a seconda delle specie, sul dorso del naso. L'unica specie con un solo corno è il *Rhinoceros*, le altre specie hanno due corni (*Ceratotherium*, *Diceros* e *Dicerorhinus*). I corni sono composti di filamenti tubulari di cheratina, simili a quelli dei capelli, e sono escrescenze della pelle. Dislocarlo risulta piuttosto facile a causa del fatto che non è direttamente attaccato al cranio ma posto su protuberanze ossee (Radcliffe e Morkel, 2007).



Fig. 2.3: Esempio di rinoceronte bianco meridionale (Fotografia di Yuri Colleoni – presso Parco Faunistico Le Cornelle).

Dal punto di vista dell'apparato gastroenterico, il rinoceronte è un animale monogastrico con camera di fermentazione posteriore (Stevens e Hume, 1995). La strategia digestiva del rinoceronte al pascolo è garantire un lento passaggio dell'alimento nell'intestino e guadagnare così un'alta efficienza digestiva (Kiefer 2002; Clauss *et al.*, 2005). La principale fonte di energia per questa specie è fornita dalla fermentazione microbica delle fibre vegetali nell'intestino posteriore (Clauss e Hatt, 2006).

2.4 Alimentazione

I rinoceronti, come altri mammiferi erbivori, possono essere suddivisi, sulla base della selezione di cibo vegetale in pascolatori (che si cibano di foglie ed erba corta), brucatori (che si cibano di foglie, steli di alberi e arbusti) e animali che seguono un'alimentazione intermedia tra le due precedenti categorie. La rispettiva nicchia di alimentazione si riflette in vari aspetti biologici (Gordon e Prins, 2008).

Da un punto di vista fisiologico la ritenzione di particelle è una caratteristica evolutiva delle specie da pascolo e si spiega con l'alta percentuale di fibre a fermentazione lenta presente nell'erba rispetto alle altre piante (Short *et al.*, 1974; Foose, 1982; Hummel *et al.*, 2006).

I rinoceronti bianchi sono considerati pascolatori (Miller e Buss, 2012), con una percentuale alimentare di erbe fino all'1% e nessuna assunzione di piante (Owen-Smith, 1988).

In natura la dieta del rinoceronte bianco contiene un alto tasso di fibre e una quantità di proteine da bassa a moderata (Clauss e Hatt, 2006), quindi, per formulare una dieta adeguata a un rinoceronte in cattività, bisogna tenere conto di questo presupposto.

Per gli animali in cattività la quantità della razione deve approssimativamente rispecchiare l'1-3% del peso corporeo, con non più di un terzo delle calorie totali ottenute da pellet (Miller, 2003).

Secondo le linee guida dell'EAZA per la gestione del rinoceronte bianco in cattività il fieno d'erba può essere somministrato ad libitum, affiancato da 30-40 kg di erba medica. Può essere fornita anche frutta fresca, benché, secondo Clauss e Hatt (2006), non vi siano reali ragioni nutrizionali a giustificazione di questa scelta alimentare. Frutta, verdura, cereali e prodotti commerciali a base di cereali non dovrebbero essere dati se non per scopi terapeutici o di training (Clauss e Hatt, 2006).

L'erba medica come foraggio esclusivo causa squilibri minerali, coliche e diarrea (Miller e Buss, 2012), mentre gli agrumi e altra frutta con un alto contenuto di vitamina C possono indurre un aumento nell'assorbimento intestinale di ferro e per questo motivo devono essere ridotti al minimo (Miller, 2003).

2.5 Comportamento

La comprensione del comportamento animale dovrebbe essere considerata una componente chiave per la gestione della fauna selvatica e per lo sviluppo delle strategie di conservazione (Hutchins e Kreger, 2006).

Le conoscenze e le competenze in questo modo acquisite hanno lo scopo di avvicinare ai seguenti obiettivi:

1. Sviluppo di efficaci metodi di allevamento e di mantenimento degli animali in cattività (Eisenberg e Kleiman, 1977; Kleiman, 1980; Boyd, 1991),
2. Promozione del benessere animale (Broom e Johnson, 1993, Mench e Mason, 1997, Poole, 1998)
3. Reintroduzione in natura di fauna selvatica allevata in cattività (Kleiman, 1989, Hutchins *et al.*, 1995, Miller *et al.*, 1998)
4. Conservazione *in situ* delle popolazioni di fauna selvatica esistenti (Hutchins e Geist, 1987, Clemmons e Buchholz, 1997, Festa-Bianchet e Apollonio, 2003)

2.5.1 Ecologia e organizzazione sociale

L'organizzazione sociale dei rinoceronti varia di specie in specie in stretta correlazione con le circostanze ecologiche in cui essi vivono (Laurie, 1982).

Il legame sociale più stabile instaurato dai rinoceronti è quello tra la madre e il suo più recente vitello. I maschi adulti, invece, sono solitamente solitari ed aggressivi (Owen-Smith, 2004). Essi, infatti, tendono a mantenere grandi distanze tra loro esprimendosi attraverso la comunicazione olfattiva: i segnali usati comunemente sono depositi di cumuli di sterco e spruzzi di urina. Inoltre, è possibile notare la presenza di graffi e altri segni di rottura sulla vegetazione che rappresentano un'evidenza visiva della presenza di altri maschi (Owen-Smith, 1975).

L'urinazione, nei rinoceronti, è altamente ritualizzata (Laurie, 1982). I rinoceronti bianchi, ad esempio, urinano più frequentemente durante i pattugliamenti dei loro territori (Owen-Smith, 1975).

Inoltre, i rinoceronti tendono a defecare in prossimità delle feci prodotte da altri rinoceronti (Laurie, 1982) e raschiano con le zampe posteriori nei cumuli di sterco per diffondere odori che annunciano la loro presenza sul territorio.

In alcune specie, tuttavia, le femmine adulte e sub adulte sono semi-sociali. Infatti, talvolta, possono riunirsi in gruppi temporanei o semi-stabili. Il contatto fisico, però, è limitato alla

relazione madre-figlio e a brevi incontri di accoppiamento tra adulti (Owen-Smith, 1975). Possono formarsi branchi stabili fino a sei individui e, occasionalmente, anche aggregazioni più grandi, che comprendono fino a dieci individui (Owen-Smith, 1975). Femmine adulte e subadulte si riuniscono in branchi per pascolare insieme (Van Gyseghem, 1984) e cooperare per la difesa di loro stesse dal possibile attacco di predatori.

2.5.2 Modelli di attività, uso dell'habitat e movimento

In libertà, i rinoceronti possono essere attivi sia di giorno che di notte (Goddard, 1967; Schenkel e Schenkel-Hullinger, 1969a; Schenkel e Schenkel-Hullinger, 1969b; Owen-Smith, 2004).

Nei grandi mammiferi il periodo e i modelli di attività sono influenzati da diversi fattori, tra i quali la temperatura ambientale e la conseguente abbondanza e distribuzione di cibo e di altre risorse essenziali come l'acqua e i compagni. I livelli di attività tendono ad essere minori durante le ore calde del giorno e ad aumentare nelle ore serali, quando la temperatura è più mite. Il rinoceronte bianco settentrionale era solito svolgere la maggior parte della sua attività di pascolo nel tardo pomeriggio e in serata (Van Gyseghem, 1984).

La tendenza allo spostamento sul territorio e l'estensione degli spostamenti variano enormemente in relazione all'habitat e alla sua qualità. I grandi mammiferi tendono infatti ad essere energicamente conservativi, perciò l'estensione entro cui spaziano nel loro territorio è dipendente dalla disponibilità di risorse critiche (cibo, acqua e compagni) (Hutchins e Kreger, 2006).

2.5.3 Comportamento riproduttivo

Tutte le specie di rinoceronte sono poligame e poliandriche (Owen-Smith, 2004).

Il corteggiamento e l'accoppiamento possono avvenire in qualunque ora del giorno (Goddard, 1967).

Il corteggiamento dei rinoceronti può essere protratto nel tempo e diventare aggressivo. Il maschio adotta un comportamento di 'guardia' nei confronti della femmina, seguendola, e aspettando che vada in estro pieno così da poter tentare un approccio ravvicinato e un contatto fisico (Estes, 1991; Owen-Smith, 2004). Il maschio di rinoceronte nero, talvolta, durante le fasi finali del corteggiamento, mette in atto una combinazione di approcci, dimostrazioni di

dominanza e minacce (Ritchie, 1963; Estes, 1991). In altre occasioni questo non avviene (Goddard, 1967).

Le femmine urinano frequentemente durante l'estro e i maschi verificano il loro stato riproduttivo saggiando le loro urine e reagiscono mediante la reazione di Flehmen (Goddard, 1967; Laurie, 1982).

Anche le femmine di rinoceronte potrebbero diventare aggressive, soprattutto se il corteggiamento avviene in cattività: possono causare graffi, tagli e ferite più profonde (Dutta, 1991).

Nel caso in cui alcuni maschi, che frequentino delle femmine in estro, incontrino altri maschi potrebbero dimostrarsi molto aggressivi nei loro confronti. Kretzschmar *et al.* (2004) hanno scoperto che i maschi territoriali liberi di rinoceronte bianco avevano livelli di androgeni nelle feci più alti quando accompagnavano femmine recettive rispetto a quando erano da soli. Alti livelli di attività testicolare erano correlati al picco di competizione intrasessuale e all'accoppiamento.

Nella specie dei rinoceronti bianchi non tutti i confronti tra maschi territoriali esitano in un combattimento e, quando succede, il combattimento è ritualizzato: si fissano uno di fronte all'altro opponendo i corni, strofinano il corno sul terreno e si scontrano con i reciproci corni in solo un quarto dei casi (Owen-Smith, 1975).

2.5.4 Gravidanza, parto e cure materne

Nelle femmine di rinoceronte è possibile riscontrare tipici segni comportamentali e fisici di gravidanza e prodromici al parto (Fouraker e Wagener, 1996).

Tra quelli mostrati a partire da 30 giorni prima del parto ritroviamo turgore della mammella e della vulva e distensione addominale (Gowda, 1969; Buechner e Mackler, 1976). Altri segni che è possibile evidenziare in questo periodo sono l'insorgenza della produzione lattea e la presenza di tappi di cera sui capezzoli (Hutchins e Kreger, 2006).

A partire dalle 48 ore prima del parto, si verificherà un aumento consistente della dimensione delle mammelle e il calo dell'appetito, la vulva potrebbe presentarsi dilatata e la partoriente manifesterà una condizione di irrequietezza (Hutchins e Kreger, 2006).

In natura, prima del parto, le femmine generalmente cercano un luogo intimo all'interno della fitta vegetazione per attendere il momento del parto (Owen-Smith, 2004). L'isolamento sociale è un comportamento piuttosto comune e riveste diverse funzioni: ridurre il rischio di predazione, permettere l'instaurarsi del legame tra la madre e il nascituro senza interferenze esterne,

prevenire l'eventualità di "rapimenti" e proteggere il cucciolo da eventuali scontri con adulti conspecifici (Hutchins, 1984).

Durante questo periodo e anche nel post partum, le femmine potrebbero diventare irritabili e aggressive nei confronti degli altri rinoceronti. Questo comportamento può verificarsi sia in natura che in cattività (Dittrich, 1967; Gowda, 1969; Buechner e Mackler, 1976; Laurie, 1982; Estes, 1991).

La gravidanza, oltre che mediante la rilevazione di segni comportamentali e fisici, può essere indagata anche mediante la misurazione delle modificazioni ormonali (Patton *et al.*, 1999).

La data in cui avverrà il parto può essere facilmente dedotta quando l'accoppiamento è stato osservato e si conosce la durata della gestazione della specie in questione (Hutchins *et al.*, 1996).

Nel caso del rinoceronte bianco la durata della gravidanza è di 485-518 giorni (Miller, 2003; Hermes e Hildebrandt, 2011).

Per tutte le specie di rinoceronte è tipica la nascita di un solo vitello per gravidanza (Owen-Smith, 2004).

Assistere alla nascita di un rinoceronte in natura è piuttosto raro.

Buechner e Mackler (1976) hanno descritto la nascita di un rinoceronte indiano presso il parco zoologico Smithsonian a Washington DC. La femmina incinta si presentava irrequieta e aveva le mammelle e la vulva gonfie e rosse. Dal canale del parto è emerso un liquido ambrato, segnalando la probabile rottura del sacco amniotico. Il parto è durato 5 ore, durante le quali la madre alternava la stazione eretta al decubito laterale, respirava affannosamente e sembrava sforzarsi. Non appena il vitello definitivamente ha lasciato il canale del parto, la madre si è girata, l'ha toccato con il naso, lo ha leccato e ha mostrato la reazione di Flehmen. Dopo due ore, ha espulso la placenta e successivamente l'ha mangiata, similmente a quanto fanno altri ungulati (Hutchins *et al.*, 1996).

Tale descrizione è simile, seppur con variazioni individuali, ad altre presenti in letteratura (Dittrich, 1967; Bhatia e Desai, 1975; Dutta, 1991).

I vitelli di solito si alzano per la prima volta tra i 30 minuti e un'ora dopo il parto (Bhatia e Desai, 1975). Cercano i capezzoli della madre non appena iniziano a camminare e il primo allattamento inizia dopo una o due ore da quando si sono alzati (Fouraker e Wagener, 1996).

Le femmine di rinoceronte non si allontanano dal cucciolo se non di pochi metri (Laurie, 1982) ma quando questo succede rimangono in contatto con lui mediante vocalizzazioni.

I nuovi nati rimangono presso la madre fino alla nascita del vitello della successiva gravidanza (Laurie, 1982). Le femmine, infatti, mostrano aggressività nei confronti dei loro vitelli più grandi solo durante la settimana precedente il parto; prima di allora, si limitano a sbuffare contro il vitello quando questo cerca di avvicinarsi o lo minacciano con l'esibizione delle zanne.

La separazione in alcuni casi può essere graduale e i subadulti riescono a mantenere i contatti con la madre e con i fratelli più giovani; in altri casi, invece, la separazione può avvenire rapidamente (Dutta, 1991).

Il perdurare di questa relazione è un evento che si verifica dopo una riproduzione fallita oppure dopo la perdita di un giovane vitello di un anno. Questa situazione è stata riportata in numerose altre specie di ungulati (Hutchins, 1984).

Mantenere i contatti con la madre può rivelarsi molto vantaggioso per la prole in quanto essi possono condividere con lei il suo stato di dominanza e la conoscenza del territorio e della posizione delle risorse critiche (Hutchins e Kreger, 2006).

2.6 Riproduzione

La comprensione della fisiologia riproduttiva delle specie di rinoceronte è stata interessata, nel corso del tempo, da significativi progressi (Roth, 2006).

Per tali miglioramenti è necessario ringraziare i progressi avvenuti nel campo delle tecniche endocrine ed ecografiche e i metodi di raccolta dello sperma divenuti sempre più efficienti. È soprattutto tramite il monitoraggio non invasivo dei metaboliti ormonali che gli scienziati hanno potuto studiare il ciclo riproduttivo, gli effetti della stagionalità e dei potenziali fattori di stress e diagnosticare la gravidanza, mettendo in evidenza le differenze di specie (Roth, 2006).

L'ausilio dell'ecografia, in particolar modo, ha consentito di indagare i cicli anovulatori, l'induzione dell'ovulazione, le patologie del tratto riproduttivo e di effettuare diagnosi precoce di gravidanza e di riassorbimento embrionale (Roth, 2006).

2.6.1 Anatomia maschile

I genitali esterni ed interni del maschio di rinoceronte comprendono il prepuzio, la piega prepuziale, il pene, le ghiandole sessuali accessorie, i dotti deferenti, gli epididimi e i testicoli (Schaffer *et al.*, 1990; Schaffer *et al.*, 1994; Schaffer *et al.*, 1998; Schaffer *et al.*, 2001; Zainal-Zahari *et al.*, 2002).

Durante l'urinazione e la marcatura territoriale il pene del rinoceronte appare rivolto caudalmente tra gli arti posteriori, mentre il pene completamente eretto si dirige cranialmente e presenta dei caratteristici lembi orizzontali e un processo del glande a forma di fungo. Queste caratteristiche suggeriscono che il rinoceronte sia un inseminatore craniale (Hermes e Hildebrandt, 2011).

Durante la penetrazione, della durata compresa fra i 45 e i 60 minuti, i lembi si dispiegano nella vagina della femmina mentre il processo del glande si blocca a livello del collo della vagina (Schaffer *et al.*, 1990; Zainal-Zahari *et al.*, 2002).

L'insieme delle ghiandole sessuali accessorie è costituito dalle ghiandole vescicolari, dalla prostata, costituita da due lobi triangolari, e dalle ghiandole bulbouretrali (Hermes e Hildebrandt, 2011). Nel rinoceronte bianco adulto sembra esserci una correlazione tra le dimensioni delle ghiandole sessuali accessorie e la qualità del seme prodotto (Schaffer *et al.*, 1994; Schaffer *et al.*, 1998; Zainal-Zahari *et al.*, 2002).

I testicoli presentano uno strato cutaneo spesso, dei voluminosi invogli testicolari e una mobilità tali da limitare la possibilità di effettuare una corretta palpazione testicolare. L'esame clinico dei

testicoli e delle ghiandole sessuali accessorie è pertanto affidato all'ecografia transcutanea e trans rettale, rispettivamente (Hermes e Hildebrandt, 2011).

2.6.2 Anatomia femminile

Gli organi riproduttivi della femmina di rinoceronte sono la vulva, il clitoride, il vestibolo, la vagina, la cervice, l'utero bicorni, gli ovidotti e le ovaie. (Hermes *et al.*, 2006) (Tabella 2.1).

I genitali esterni sono composti da verticali e simmetriche labbra vulvari interne ed esterne e da un prominente clitoride sulla commessura ventrale. Le labbra esterne protrudono caudoventralmente e solitamente sono nel rinoceronte bianco l'unica parte visibile a distanza. Modificazioni a livello dei genitali esterni sono associate all'estro (Hermes e Hildebrandt, 2011).

Nelle nullipare, il vestibolo e la vagina sono separati da una membrana imenale situata cranialmente all'orificio uretrale. La pervietà è garantita da piccole perforazioni (0.1-0.5 cm) e la rottura dell'imene si verifica al primo accoppiamento. Il fallimento dell'attività riproduttiva è generalmente associato alla persistenza dell'imene. Uno studio effettuato su un gruppo di femmine di rinoceronte bianco mature ha dimostrato che il fallimento dell'attività riproduttiva era correlato ad un'incidenza della persistenza dell'imene del 76% (Hermes *et al.*, 2006).

Inoltre, con l'avanzare dell'età l'imene diventa più fibroso e, nonostante la dimensione degli orifici cresca fino a 3 cm, la sua rottura diventa sempre più difficoltosa (Hermes e Hildebrandt, 2011).

La cervice è costituita da tre/cinque pieghe di tessuto connettivo fibroso interdigitate in maniera stretta. Il canale cervicale è tortuoso, con anse di 90° e fondi ciechi. La cervice risulta palpabile mediante la palpazione rettale (Hermes e Hildebrandt, 2011).

L'utero bicorni è formato da un corto corpo e due lunghe corna uterine. Nel rinoceronte bianco la lunghezza totale delle corna uterine può eccedere i 50 cm (Hermes e Hildebrandt, 2011).

Le ovaie, infine, presentano delle dimensioni che si differenziano enormemente tra le specie di rinoceronte, quelle del rinoceronte bianco variano dai 6 ai 9 cm. La rottura del follicolo si verifica sulla superficie dell'ovaio.

Anatomia del tratto riproduttivo della femmina di rinoceronte bianco							
Lunghezza o diametro							
Specie	Vestibolo (cm)	Vagina (cm)	Cervice (cm)	Corpo uterino (cm)	Corna uterine (cm)	Ovaie (cm)	Follicolo ovulatorio (cm)
Rinoceronte bianco	14-20	19-30	12-23	2-8	40-64	6-9	3.2-3.5

Tabella 2.1: Nella tabella sono indicate le lunghezze dei vari tratti genitali nella femmina di rinoceronte bianco meridionale.

Fonte: Hermes e Hildebrandt, 2011.

Mediante la palpazione rettale non è possibile raggiungere né l'utero né le ovaie. Quindi, a causa del fatto che la palpazione presenta un valore limitato in questa specie, l'esame clinico di tali strutture è effettuato tramite l'ausilio dell'ecografia trans rettale (Radcliffe *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 2001; Stoops *et al.*, 2004; Hermes *et al.*, 2006).

La determinazione dello status riproduttivo e della funzionalità e la diagnosi delle patologie riproduttive è affidata all'utilizzo dell'ecografia (Hermes e Hildebrandt, 2012).

2.6.3 Estro e anestro

I rinoceronti in natura sono descritti come riproduttori poliestrali non stagionali (Fouraker e Wagener, 1996; Kretzschmar *et al.*, 2004).

La lunghezza del ciclo estrale è diversa in ogni specie di rinoceronte ed è stata studiata mediante misurazioni nelle feci dei dosaggi di estrogeno e progesterone (Roth, 2006; Hermes *et al.*, 2007). In particolare, i dosaggi di progesterone endogeno si sono rivelati molto utili per monitorare la ciclicità riproduttiva e diagnosticare la gravidanza, poiché il progesterone cresce durante la fase luteale del ciclo, cala durante l'estro e rimane stabile durante la gravidanza. Il progesterone e i suoi metaboliti si sono dimostrati gli ormoni più efficaci per lo studio della fisiologia riproduttiva del rinoceronte bianco (Hodges e Green, 1989; Hindle *et al.*, 1992; Radcliffe *et al.*, 1997; Schwarzenberger *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001).

Nonostante possano verificarsi differenze individuali nella lunghezza del ciclo in tutte le specie in cattività, nei rinoceronti bianchi sono stati studiati due cicli estrali di diversa lunghezza (Patton *et al.*, 1999; Schwarzenberg *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2001) (Tabella 2.2).

Il più corto dei due (30-35 giorni) si ritiene che sia fertile, mentre il più lungo (66-70 giorni), quando osservato in femmine senza un'anamnesi di accoppiamento, è indicato come il primo segno di invecchiamento riproduttivo e di ridotta fertilità. In ogni caso, gli autori hanno anche

osservato una correlazione tra il ciclo lungo e il riassorbimento embrionale a seguito di una fecondazione artificiale.

Fisiologia riproduttiva della femmina di rinoceronte bianco	
Età alla pubertà	<i>F: 6-7 anni M: 10-12 anni</i>
Cilo estrale	<i>32-35 giorni o 66-70 giorni</i>
Lunghezza gestazione	<i>485-518 giorni</i>
Interparto	<i>2-3 anni</i>
Determinazione dell'estro	<i>Ecografia (follicolo ovulatorio)</i>
Diagnosi di gravidanza	<i>Urina: PdG Feci: pregnantriolo, progesterone</i>

Tabella 2.2: Nella tabella sono indicati i parametri riproduttivi specifici del rinoceronte bianco femmina.
Fonte: Miller e Buss, 2012.

Come avviene nella maggior parte dei mammiferi, l'ovulazione nei rinoceronti è indotta da un singolo preovulatorio picco di ormone luteinizzante, al termine della fase follicolare (Roth *et al.*, 2004; Stoops *et al.*, 2004).

La luteinizzazione e la formazione dei follicoli emorragici sono noti in tutte le specie di rinoceronte. L'incidenza dei follicoli emorragici nei rinoceronti bianchi in cattività, tuttavia, desta grande preoccupazione per il suo possibile effetto sulla riproduzione (Hermes e Hildebrandt, 2011).

L'anestro è una condizione comune nei rinoceronti bianchi ed è considerata la principale causa per lo scarso tasso riproduttivo in cattività. Infatti, il 50% delle femmine di rinoceronte bianco sono state definite in anestro (Schwarzenberger *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999).

I dati ormonali, i reperti ecografici e quelli post morte hanno rivelato che l'anestro è associato a differenti stati dell'attività ovarica. Le giovani femmine in anestro mostrano un'elevata attività ovarica e modificazioni follicolari regolari. In ogni caso, i follicoli, benché abbiano raggiunto le dimensioni adeguate a ovulare, non ovulano ma diventano atresici o emorragici (Hermes *et al.*, 2006).

Si ritiene che questa alta produzione follicolare conduca all'esaurimento degli ovociti: nelle femmine di mezza età lo sviluppo follicolare e, quindi, l'attività ovarica diventano dapprima irregolari per poi cessare, risultando in una prematura senescenza (Hermes *et al.*, 2004).

Schwarzenberger (comunicazione personale) sostiene che il trasferimento in altre strutture o l'introduzione di nuovi maschi abbia influenzato l'inizio o la ripresa di un'attività estrale regolare in alcuni animali.

Numerosi studi, infine, hanno rivelato che molte femmine di rinoceronte bianco sono acicliche o presentano cicli riproduttivi irregolari (Schwarzerberger *et al.*, 1998; Patton, *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001).

2.6.4 Gestazione e parto

La gestazione del rinoceronte ha una durata variabile a seconda della specie considerata, coprendo un arco di tempo compreso tra i 15 e i 18 mesi. La lunghezza della gravidanza del rinoceronte bianco è di 485-518 giorni (Miller, 2003; Hermes e Hildebrandt, 2011).

La diagnosi di gravidanza si effettua mediante il dosaggio delle concentrazioni di progesterone rilevato tra i tre e i cinque mesi dopo l'avvenuto concepimento o mediante un'ecografia tra la seconda e la quarta settimana. La vescicola embrionale è precocemente rilevabile all'ecografo a partire da quindici giorni dopo l'ovulazione (Portas *et al.*, 2005). Nelle specie di più grandi dimensioni, come il rinoceronte bianco, le immagini delle strutture embrionali e fetali ottenute con ecografia trans rettale sono limitate al primo trimestre (Hermes e Hildebrandt, 2011).

Il riassorbimento embrionale è stato rilevato sia in cattività che in natura nei rinoceronti bianchi, neri e di Sumatra (Berkeley *et al.*, 1997; Radcliffe *et al.*, 1997; Patton *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 2001; Garnier *et al.*, 2002; Roth *et al.*, 2004). Esso può essere causato da infiammazione uterina o piometra, nei casi individuali, ma questa condizione è clinicamente irregolare. Anche l'insufficienza luteale è stata ritenuta una possibile causa di riassorbimento embrionale in cattività (Hermes e Hildebrandt, 2011).

2.6.5 Riproduzione artificiale

La riproduzione assistita è uno dei metodi per preservare la diversità genomica delle specie, fornisce un aiuto prezioso all'allevamento in cattività finalizzato alla lotta all'estinzione e rappresenta un'importante opzione per perseguire l'obiettivo della reintroduzione in natura (Ververs *et al.*, 2015).

L'estinzione di una specie può avvenire a causa di diversi fattori come la perdita di habitat, causata dall'attività umana, il bracconaggio e gli effetti dell'inquinamento sulla fertilità e la fecondità della specie (Amin *et al.*, 2006); per tanto la riproduzione assistita può giocare un ruolo importante per supportare l'accoppiamento naturale e l'allevamento, con l'obiettivo finale di promuovere un incremento del numero di individui di una popolazione (Ververs *et al.*, 2015).

Le tecnologie di riproduzione assistita comprendono differenti tecniche tra le quali, ad esempio, il prelievo degli ovuli, la fecondazione in vitro e l'iniezione intracitoplasmatica di sperma e per la buona riuscita delle stesse è fondamentale avere una buona conoscenza del ciclo estrale e dell'anatomia del tratto riproduttivo di ciascuna specie (Hermes *et al.*, 2009a). Il principale limite rimane che le conoscenze a riguardo non sono ancora ben definite, soprattutto per quanto concerne le differenze tra animali in natura e in cattività (Hermes *et al.*, 2004; Hermes *et al.*, 2006; Goot *et al.*, 2013).

I vantaggi apportati dall'utilizzo delle tecnologie di riproduzione assistita sono l'eliminazione dei rischi legati al trasporto di animali vivi, per aumentare il numero di una popolazione in calo, e la riduzione del rischio di trasmissione di malattie. Inoltre, tramite queste tecnologie è possibile aumentare le possibilità di riproduzione di animali sterili o subfertili, oppure fisicamente o socialmente incapaci di accoppiarsi naturalmente. Infine, consentono di utilizzare materiale post morte prelevato da animali deceduti (ad esempio, lo sperma) (Ververs *et al.*, 2015).

Il prelievo di sperma viene effettuato con diversi metodi, in parte mutuati dalle tecniche ormai rodiate per il prelievo di sperma dagli stalloni. Purtroppo, non tutti questi metodi sono agevolmente applicabili anche con i rinoceronti, a causa del loro temperamento, spesso timoroso e aggressivo, che rende tali metodiche pericolose e impraticabili (Young, 1967; Schaffer *et al.*, 1990).

Il primo espediente per ottenere un campione di sperma è la vagina artificiale che, tuttavia, a causa delle dimensioni e dell'anatomia del pene di rinoceronte e a causa dell'inadeguata stimolazione sessuale, rende difficile la raccolta di eiaculato di buona qualità, con un'adeguata concentrazione di spermatozoi e motilità (Schaffer *et al.*, 1990).

Una tecnica più antica per indurre l'eiaculazione consiste nel massaggio del pene, che però non si è rivelata molto efficace. Spesso questa tecnica viene utilizzata in associazione alla stimolazione rettale ma la qualità del seme, anche in questo caso, non è così buona come con l'utilizzo di altre metodiche quali l'elettroeiaculazione, combinata con la stimolazione rettale (Schaffer *et al.*, 1990; Hermes *et al.*, 2005).

L'elettroeiaculazione viene effettuata in concomitanza alla sedazione ed è considerata un metodo accettabile per la raccolta dello sperma (Schaffer *et al.*, 1990; Roth *et al.*, 2005). Tramite l'elettroshock vengono stimulate le ghiandole sessuali del rinoceronte, poste ventralmente al retto e adiacenti al collo della vescica (Schaffer *et al.*, 1998; Hermes *et al.*, 2005). Spesso viene

effettuata contemporaneamente ad un massaggio del pene a causa del quale può verificarsi una contaminazione del campione dovuta all'urina (Schaffer *et al.*, 1990; Schaffer *et al.*, 1998).

Un metodo più delicato di applicare l'elettroeiaculazione è la somministrazione di ormoni che inducono la contrazione della muscolatura liscia come l'ossitocina e le prostaglandine.

Nei rinoceronti è utilizzata la raccolta post morte di seme appartenente ad animali recentemente deceduti di morte naturale oppure sottoposti ad eutanasia (Williams *et al.*, 1995; O'Brien e Roth, 2000).

La fecondazione artificiale nel rinoceronte è particolarmente complicata a causa della tortuosa vagina delle femmine di rinoceronte. Per ovviare a tale limite anatomico è stato sviluppato un catetere specifico per l'inseminazione artificiale in questa specie (Hermes e Hildebrandt, 2011).

Il seme utilizzato per la fecondazione artificiale può essere fresco, raffreddato oppure crioconservato (Ververs *et al.*, 2015). Solitamente nei giardini zoologici viene effettuata con seme fresco (Hildebrandt *et al.*, 2007). Questo, chiaramente, è possibile quando nella struttura sono presenti animali fertili di entrambi i sessi o posti ad un'accettabile distanza geografica; in caso di distanze maggiori viene utilizzato il seme congelato (Ververs *et al.*, 2015).

Secondo lo studio sostenuto da Hermes e collaboratori (2009b), dopo due sole inseminazioni effettuate in due cicli diversi con sperma congelato, è stato possibile l'instaurarsi di una gravidanza di successo.

Il frequente uso delle tecniche di riproduzione assistita potrebbe essere d'aiuto, in futuro, per creare popolazioni in cattività di specie di rinoceronte minacciate che siano in grado di autosostenersi, e per migliorare la diversità genetica quando si usano donatori di sperma non rappresentati in cattività o selvatici (Miller e Buss, 2012).

La fecondazione artificiale, quindi, rappresenta l'ultima speranza di salvare dall'estinzione i geni del rinoceronte bianco settentrionale (Emslie, 2020).

Gli ultimi quattro potenziali rinoceronti bianchi settentrionali allevati nello zoo di Dvur Kralove in Repubblica Ceca sono stati trasferiti in una riserva privata in Kenya sperando che questo li stimolasse a riprodursi. Sfortunatamente non sono stati prodotti vitelli prima che i due maschi morissero. Attualmente le due femmine non riproduttive sopravvissute rappresentano gli ultimi due esemplari rimasti in vita (Emslie, 2020).

Alcuni ricercatori hanno raccolto da queste due femmine degli oociti e conservano cellule spermatiche appartenenti a cinque maschi ormai tutti deceduti. Inoltre, le tecniche cellulari avanzate possono consentire di ampliare il patrimonio genetico artificialmente e, tramite la

fecondazione *in vitro*, infine, si potrebbero ottenere embrioni da impiantare in madri surrogate di rinoceronte bianco meridionale, producendo vitelli di rinoceronte bianco settentrionale (Pennington e Durrant, 2018; Emslie, 2020).

Non può esserci alcuna garanzia che tali tecniche avranno successo, ma sono stati fatti diversi progressi nella realizzazione di embrioni in laboratorio (Emslie, 2020).

2.7 Conservazione

Alla fine del XIX secolo i rinoceronti bianchi meridionali si trovavano sull'orlo dell'estinzione, con una popolazione di soli 20-50 individui (Emslie, 2020).

Successivamente, la popolazione è cresciuta e si è registrato tra il 1992 e il 2010 un tasso di crescita di +7,1% all'anno, fino ad arrivare ad un numero di circa 21.316 rinoceronti bianchi meridionali nel 2012 (Emslie, 2020).

Tra il 2012 e il 2017, la popolazione dei rinoceronti bianchi africani ha subito un importante declino (-15%), causato dall'incremento del bracconaggio. Il numero di rinoceronti bianchi in natura alla fine del 2017 è di 18.064 animali circa (Emslie, 2020). Oggi il numero di individui maturi è di 10.080 (Emslie, 2020), mentre il numero totale ammonta a 18.000 circa.

Alla fine del 2008 si contavano 750 rinoceronti bianchi meridionali in cattività (Emslie, 2020), oggi sono 671.

Oggi, il rinoceronte bianco è classificato come “quasi minacciato” sulla *Red List* IUCN SSC (Emslie, 2020; www.iucn.org) (Figura 2.4).



Fig. 2.4: Categoria di appartenenza del rinoceronte bianco meridionale alla IUCN Red List of Threatened Species che indica il rischio di estinzione della specie.

Fonte: www.iucnredlist.org.

Il motivo per cui lo stato del rinoceronte bianco meridionale è stato classificato così e non come “minima preoccupazione” come i numeri potrebbero suggerire, è la costante minaccia alla quale i rinoceronti in natura sono sottoposti a causa del bracconaggio, dell’illegale domanda di corno nel sud-est asiatico e del crescente aumento del coinvolgimento delle associazioni criminali internazionali organizzate nel bracconaggio (Emslie *et al.*, 2019).

Il principale motivo per cui i rinoceronti vengono braccati è l’alto valore sui mercati illegali del suo corno.

Il corno di rinoceronte possiede tradizionalmente due usi: un uso nell’ambito della medicina cinese e un uso ornamentale. In passato l’uso ornamentale era legato alla produzione di manici

per pugnali cerimoniali utilizzati nello Yemen e nel Medio-Oriente, oggi viene principalmente usato per realizzare oggetti intagliati di alto livello, quali ciotole o bracciali. Nella medicina tradizionale cinese, invece, il corno di rinoceronte viene utilizzato come farmaco antipiretico, nonostante non vi sia alcuna evidenza scientifica che ne comprovi tale effetto (Emslie, 2020).

Il 95% del corno di rinoceronte acquistato in Africa da destinare al mercato asiatico deriva dal bracconaggio, la restante percentuale, invece, da furti o vendite provenienti da trofei privati o esposizioni museali e dalla “pseudo-caccia”, ovvero una recente pratica che consiste in battute di caccia sportiva intraprese da individui provenienti da Paesi non tradizionali per la caccia con il solo scopo di rivendere il corno dell’animale cacciato sui mercati illegali (Emslie, 2020).

Fino a poco tempo fa, il bracconaggio non aveva un così forte impatto sul numero complessivo di rinoceronti bianchi, poiché le perdite venivano compensate e addirittura superate da incoraggianti tassi di crescita in altre popolazioni (Emslie, 2020).

Tuttavia, in seguito al declino della sottopopolazione più grande (Greater Kruger Park in Sudafrica), i numeri dei rinoceronti totali africani è diminuito del 15% negli anni tra il 2012 e il 2015, mentre i livelli di bracconaggio sono aumentati gravemente dal 2007 al 2014 (Emslie, 2020).

Diretta conseguenza dell’aumento del bracconaggio è stato l’aumento dei costi relativi alla protezione e dei rischi per gli investimenti e per il personale. Conseguentemente si è verificato un calo significativo dei prezzi di vendita degli animali vivi, una riduzione degli incentivi e alcuni proprietari privati in Sudafrica hanno deciso di sbarazzarsi dei loro animali (Emslie, 2020).

Il reale impatto numerico delle vittime del bracconaggio è difficile da stimare perché non tutte le carcasse vengono sempre rinvenute a causa della vastità dei territori (Ferreira *et al.*, 2018a).

Un altro fattore che ha influenzato il recente declino della popolazione del Kruger Park è stata una severa carestia che ha colpito il Sudafrica nel biennio 2015-2016, influenzando sia i tassi di mortalità che quelli di natalità (Ferreira *et al.*, 2018b). Esperti conservazionisti sudafricani prevedevano, nel gennaio del 2016, che questa siccità avrebbe potuto uccidere più che il bracconaggio (Groenewald, 2016).

Fortunatamente, a partire dal 2016-2017, la siccità nel Sud Africa è terminata (Emslie *et al.*, 2019), mentre il bracconaggio, dopo il picco del 2014, è fortemente diminuito in risposta al notevole aumento delle forze dell’ordine e agli sforzi di protezione (Emslie, 2020).

La sopravvivenza dei rinoceronti è quindi affidata all’efficace protezione messa in atto dagli stati dell’area di distribuzione e da proprietari privati.

Al fine di tutelarli sono ora concentrati in santuari recintati, riserve, aree di conservazione e zone di protezione intensiva, dove l'applicazione della legge può essere concentrata a livelli efficaci (Emslie, 2020).

Molto importante è anche l'attività di monitoraggio svolta che consente di gestire le sottopopolazioni: ad esempio, ha portato alla traslocazione di animali da popolazioni in eccesso per crearne di nuove (Emslie, 2020).

Le strategie di protezione della popolazione di rinoceronti sono coordinate in parte dal settore privato e in parte dallo stato (Emslie, 2020). Tali strategie comprendono anche la vendita all'asta di rinoceronti bianchi e una limitata caccia sportiva dei maschi in eccedenza che hanno lo scopo di creare incentivi per la conservazione nel settore privato e generare i fondi necessari per aiutare a pagare i costi di monitoraggio, protezione e gestione dei rinoceronti (Emslie, 2020). Ora quasi la metà dei rinoceronti bianchi di tutta l'Africa è gestita dal settore privato, per la maggior parte all'interno dei territori sudafricani (Emslie *et al.*, 2019).

Nel 1977 tutte le specie di rinoceronte africano sono state inserite nell'Appendice I della CITES e quindi il commercio internazionale di rinoceronti e dei loro prodotti è stato vietato. Nel 1994, a causa dell'aumento del numero di esemplari, la popolazione sudafricana è stata inserita nell'Appendice II ma solo limitatamente al commercio di animali vivi verso "destinazioni approvate ed accettabili" e all'esportazione di trofei di caccia. A seguito di queste manovre il numero degli esemplari è quasi triplicato (Emslie, 2020).

Iniziative su più livelli si spendono per la conservazione delle specie di rinoceronte: internazionali, nazionali, locali e regionali. Tra quelle africane ricordiamo il "Gruppo per la gestione del rinoceronte della Comunità per lo sviluppo del Sudafrica" (SADC), il "Gruppo per la gestione del rinoceronte dell'Africa orientale" e il "Gruppo per la sicurezza del rinoceronte e dell'elefante dell'Africa meridionale" (RESG). A livello continentale, invece, l'organo di coordinamento per la conservazione dei rinoceronti è L'African Rhino specialist Group dell'IUCN SSC. (Emslie, 2020).

Infine, un ruolo importante nella conservazione dei rinoceronti, così come di tutte le altre specie in cattività, è affidata alla cura delle associazioni zoologiche che pubblicano le Best Practice Guidelines per ogni specie detenuta negli zoo. EAZA e AZA, inoltre, hanno istituito dei Taxon Advisory Groups (TAGs) destinati a tutte le specie animali ospitate dalle istituzioni membri di tali associazioni.

Tutte le specie di rinoceronte sono gestite da un programma: gli European Endangered Species Programmes (EEPs) dell'EAZA e gli Species Survival Programmes (SSPs) dell'AZA sono pensati per

le diverse specie ed affidati alla gestione degli zoo che hanno dimostrato non solo un grande interesse ma anche una profonda conoscenza della specie. Essi mirano alla conservazione delle specie in salute e alla salvaguardia della salute genetica degli animali.

Capitolo 3

Monitoraggio dell'attività riproduttiva

3.1 Gli ormoni della riproduzione

3.1.1 Progesterone

Il progesterone è uno steroide sessuale prodotto principalmente dall'ovaio, dalle ghiandole adrenali e dalla placenta (Asher *et al.*, 1989; Burgess *et al.*, 2012).

La formazione del progesterone a partire dall'ovaio è affidata al corpo luteo, che è la struttura in cui si converte il follicolo dopo che è avvenuta l'ovulazione. Dopo l'ovulazione ha inizio una fase del ciclo estrale che prende il nome di *fase luteale*. Durante questa fase si verifica un aumento di tessuto luteale e dell'attività secretoria (Asa, 2010).

Le principali funzioni del progesterone sono quelle di inibire il comportamento sessuale in tutte le specie animali; infatti, in fase luteale l'attività sessuale è soppressa, e prepara l'utero e la mammella all'eventuale gravidanza. Qualora non si sia instaurata una gravidanza il corpo luteo regredisce (Asa, 2010).

La fase luteale viene anche definita diestro, negli ungulati. Con questo termine viene indicato il periodo tra due fasi estrali (Asa, 2010).

L'organo deputato al metabolismo del progesterone è il fegato. Esso è in grado di degradare il progesterone in diversi metaboliti, la maggior parte dei quali viene escreta tramite le feci (Schwarzenberger *et al.*, 1996a; Schwarzenberger *et al.*, 1997; Rabiee *et al.*, 2001; Rabiee *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2005). I metaboliti del progesterone sono almeno 18, ognuno dei quali possiede la propria struttura chimica e la propria polarità (Schwarzenberger *et al.*, 1996b; Schwarzenberger *et al.*, 1997; Rabiee *et al.*, 2001; Rabiee *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2005;).

3.1.2 Estrogeni

Gli estrogeni sono ormoni sessuali prodotti dalle gonadi a partire da stimoli provenienti dalla ghiandola pituitaria. Essa, infatti, produce l'*ormone follicolo stimolante* (FSH), il quale agisce a livello delle gonadi stimolando la produzione di estrogeni che, a loro volta, vanno a stimolare una struttura ovarica, il follicolo, che si sviluppa e cresce in dimensioni (Asa, 2010).

La fase di crescita e sviluppo del follicolo prende il nome di *fase follicolare*. Durante questa fase il follicolo, grazie all'azione degli estrogeni, aumenta le proprie dimensioni e subisce delle modificazioni che lo portano, al termine di tale fase, alla sua rottura con conseguente rilascio

dell'ovulo, atresia e regressione del follicolo stesso (Adams, 1999). Tale evento prende il nome di *ovulazione*.

Il momento che precede l'ovulazione è caratterizzato da un picco della concentrazione degli estrogeni. Il picco degli estrogeni esercita sia una funzione di feedback positivo che di feedback negativo: agisce sulla produzione di FSH, tramite feedback negativo, riducendone la produzione; agisce, tramite feedback positivo, incrementando la sintesi e il rilascio di un altro ormone prodotto dall'ipofisi: LH o ormone luteinizzante (Asa, 2010).

Gli estrogeni, inoltre, agiscono stimolando l'espressione delle caratteristiche fisiche dell'estro: turgore labiale, gonfiore e arrossamento perineale e secrezione uterina sanguinolenta in proestro (Asa, 2010).

Benché il monitoraggio degli estrogeni e del progesterone siano entrambi fondamentali per lo studio della fisiologia riproduttiva, solo il progesterone e i suoi metaboliti si sono dimostrati efficaci in tutte le specie e particolarmente affidabili nei rinoceronti bianchi (Hodges e Green, 1989; Hindle *et al.*, 1992; Radcliffe *et al.*, 1997; Schwarzenberger *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001).

La valutazione dell'attività riproduttiva a partire dagli estrogeni si è dimostrata impegnativa in tutte le specie di rinoceronti, tranne che nel rinoceronte indiano. Alcuni studi hanno mostrato che gli estrogeni possono essere misurati e che riflettono i cambiamenti nello status riproduttivo nel rinoceronte bianco (Hindle *et al.*, 1992); altri, tuttavia, hanno fallito la validazione (Ramsay *et al.*, 1987; Brett *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2018).

3.2 Scopi del monitoraggio

La principale motivazione per cui il monitoraggio dell'attività riproduttiva dei rinoceronti in cattività è di fondamentale importanza, è che attualmente la popolazione in cattività non è in grado di autosostenersi (Swaigood *et al.*, 2006). Infatti, nonostante molti soggetti nati in libertà siano stati in grado di riprodursi anche in cattività, molte femmine nate, invece, in cattività si riproducono poco e troppo lentamente. La conseguenza di questa condizione è che il programma di conservazione della specie viene messo in crisi (Swaigood *et al.*, 2006).

L'allevamento in cattività è indispensabile ai fini della conservazione delle specie: le popolazioni autosufficienti fungono da serbatoio genetico per integrare la popolazione oppure assicurare la reintroduzione degli animali in libertà nei territori che una volta quella specie popolava (IUCN, 1998).

Benché i programmi di reintroduzione in natura di animali cresciuti in cattività possano essere complessi, di lunga durata, costosi e, talvolta, con scarse possibilità di successo (Kleiman, 1996), hanno tuttavia un ruolo significativo nel recupero delle singole specie (Frantzen *et al.*, 2001; O'Toole *et al.*, 2002; Wanless *et al.*, 2002; Britt *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2005).

Per garantire la conservazione della specie e la reintroduzione servono programmi di allevamento che sostengano la crescita della popolazione in cattività, considerandola come una fonte o una risorsa per il selvatico. Per perseguire questo obiettivo, la popolazione in cattività dovrebbe riprodurre, per quanto possibile, la composizione genetica della popolazione selvatica al momento della cattura e dovrà fornire in futuro un numero adeguato di animali (Earnhardt, 2010).

La diretta conseguenza è, quindi, che la gestione e il controllo della riproduzione diventano la chiave per il mantenimento a lungo termine delle specie negli zoo e nei centri di riproduzione (Kleiman, 2010).

La gestione della genetica potrebbe richiedere l'ausilio delle tecniche di inseminazione artificiale e di altre tecnologie di riproduzione assistita, l'utilizzo delle quali esige, almeno, una conoscenza di base della fisiologia riproduttiva maschile, delle dinamiche del ciclo estrale e del controllo dell'ovulazione (Asa, 2010).

Pertanto, da una parte, la corretta interpretazione dei dati ormonali richiede almeno una certa conoscenza della fisiologia della specie in questione, dall'altra, i metodi di monitoraggio basati sull'analisi ormonale devono prima fornire le informazioni fisiologiche di base (metabolismo

ormonale, modelli di secrezione ed escrezione) da cui dipende la loro successiva applicazione pratica (Hodges *et al.*, 2010).

Tutti i progressi realizzati nella conoscenza della fisiologia riproduttiva delle femmine di rinoceronte sono da attribuire, prevalentemente, a tre sostanziali scoperte (Roth *et al.*, 2018).

La prima di queste è l'introduzione del monitoraggio non invasivo dei metaboliti ormonali che ha consentito, mediante valutazioni indirette delle concentrazioni ematiche degli ormoni, di avviare numerosi studi dettagliati sulle dinamiche endocrine dei cicli riproduttivi e della gravidanza del rinoceronte, sia in cattività (Berkeley *et al.*, 1997; Stoops *et al.*, 2014), che in libertà (Garnier *et al.*, 1998; van der Goot *et al.*, 2013).

Dopo un decennio, si è reso possibile utilizzare l'ecografia transrettale per visualizzare i tratti riproduttivi di questa specie (Schaffer e Beehler, 1990; Adams *et al.*, 1991), consentendo un'osservazione diretta dell'attività ovarica della gravidanza.

Infine, il terzo fondamentale cambiamento relativo all'allevamento e alla gestione degli animali si è sviluppato grazie a un lavoro congiunto di ricercatori, veterinari e keepers che hanno cooperato per integrare il condizionamento operante nella routine di base degli animali (Roth *et al.*, 2018). In questo modo essi hanno potuto essere addestrati per il prelievo volontario di sangue, l'ecografia transrettale e transaddominale e persino l'inseminazione artificiale (AI) transcervicale, eseguiti con procedure seriali per studiare la funzione riproduttiva in tempo reale (Roth *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2004; Stoops *et al.*, 2004; Stoops *et al.*, 2016).

L'utilizzo combinato di questi strumenti sta garantendo la raccolta di dati più corretti e precisi sulla funzione ovarica e sulla gravidanza del rinoceronte, chiarendo i risultati e correggendo le teorie inesatte dei precedenti studi e promuovendo nuove scoperte (Roth *et al.*, 2018).

Dunque, dal momento che conosciamo molto poco dell'endocrinologia della maggior parte dei mammiferi, risulta particolarmente importante continuarne lo studio. Infatti, solamente il 2% dei mammiferi è conosciuto nei dettagli, percentuale che scende significativamente se si prendono in considerazione uccelli, rettili, anfibi e invertebrati (Monfort, 2003; Wildt *et al.*, 2003).

3.3 Monitoraggio non invasivo

La grande varietà di cambiamenti fisici e fisiologici, che accompagnano le modificazioni a livello ovarico, quali gonfiore delle labbra, arrossamento perineale e secrezioni sanguinolente, può fornire, in maniera non invasiva, qualche informazione circa l'attività riproduttiva di diversi animali (Asa, 2010).

Tuttavia, il monitoraggio ottimale della funzione riproduttiva è ottenibile tramite il monitoraggio degli ormoni sessuali (estrogeni e progesterone), ma non sempre è possibile effettuarlo sugli animali esotici, soprattutto quelli intrattabili o in condizione di libertà, in sicurezza e senza causare stress (Hodges *et al.*, 2010).

È quindi stato necessario validare dei protocolli, per effettuare monitoraggi non invasivi, che garantissero la medesima efficacia dei dosaggi ormonali a partire da campioni ematici.

I primi tentativi di monitoraggio degli steroidi urinari risalgono agli anni Settanta. L'oggetto di studio di questi preliminari tentativi sono stati i cicli ovarici e la gravidanza dei primati in cattività. A partire dai primi anni Ottanta, il dosaggio ormonale a partire da campioni di urina è stato adattato anche ad altre specie animali in cattività. Infine, alla fine degli anni Ottanta, venivano effettuati saggi di steroidi sessuali estratti da campioni fecali provenienti da diverse specie (Monfort, 2003).

Dal 1980 ai primi anni Novanta, la metodica di monitoraggio predominante è stato il dosaggio a partire dalle urine e venne applicata in maniera estensiva. Tuttavia, benché tale tecnica sia veloce ed economica, la raccolta dei campioni di urina è di difficile attuazione. Al contrario la raccolta dei campioni fecali è piuttosto semplice, pertanto, gli zoo preferiscono tale tecnica di monitoraggio, nonostante sia più laboriosa e costosa (Hodges *et al.*, 2010).

Hodges e colleghi (2010) descrivono gli enormi progressi raggiunti nel campo dei monitoraggi non invasivi degli ormoni e, conseguentemente, dei progressi nella conoscenza della funzione riproduttiva degli animali esotici.

Oggi è possibile effettuare misurazioni degli ormoni steroidei a partire da diverse matrici biologiche, quali sangue, urine, feci e saliva, senza causare effetti negativi sul benessere dell'animale oggetto del monitoraggio.

Il vantaggio del monitoraggio non invasivo è l'evitamento del contatto fisico ed è perciò da preferire ad altri metodi (Hodges *et al.*, 2010).

Il saggio degli ormoni steroidei viene eseguito mediante due diverse tipologie di test immunologici.

Il primo è il *saggio radioimmunologico* (RIA), nel quale vengono utilizzati ormoni marcati radioattivamente come tracciante competitivo nel processo di quantificazione.

Il secondo è il *saggio immunoenzimatico* (EIA), che prevede l'utilizzo di preparati marcati con enzimi o biotina. Tale tipologia di test non è isotopica, perciò con implica problemi legati all'utilizzo e allo smaltimento di prodotti radioattivi ed è meno costosa. Inoltre, l'esito del test si evidenzia mediante un cambiamento di colore, che è più facile quantificare, ed è rilevato da una strumentazione meno costosa (Hodges *et al.*, 2010).

La scelta del test immunologico da utilizzare è effettuata tenendo in considerazione diversi fattori: tipologia di informazione ricercata, vie di escrezione dell'ormone da indagare, praticabilità della raccolta, caratteristiche della tecnica da utilizzare (Silva *et al.*, 2017; Brown, 2018).

I criteri da prendere in esame per la scelta della tipologia di test sono:

- Sensibilità = minima quantità di ormone rilevabile;
- Precisione = ripetitività dei dosaggi;
- Accuratezza = capacità di rilevare le corrette quantità di ormone nel campione;
- Specificità = grado di specificità dell'anticorpo stesso e possibile influenza delle sostanze interferenti (effetti della matrice). Le sostanze interferenti vanno tenute sotto controllo e, se presenti, vanno rimosse tramite un processo che prende il nome di *purificazione*.

Ai fini del monitoraggio dell'attività ovarica è utile dimostrare le fluttuazioni positive e negative nelle concentrazioni degli ormoni o dei loro metaboliti ormonali coincidenti con le manifestazioni del comportamento estrale, con il tempo di ovulazione o con l'inizio della gravidanza (Hodges *et al.*, 2010).

3.3.1 Matrici Biologiche

Gli ormoni della riproduzione possono essere dosati a partire da diverse matrici biologiche.

Secondo Hodges e colleghi (2010) la scelta della matrice zoologica da preferire è strettamente legata a diversi fattori:

- Tipo di informazioni richieste;
- Tecniche di analisi coinvolte;
- Differenze di specie nel metabolismo degli steroidi e nelle vie di escrezione degli stessi;
- Praticità di raccolta, soprattutto per campionamenti estesi a lunghi periodi.

Le matrici biologiche maggiormente utilizzate per effettuare dosaggi ormonali sono: sangue, saliva, urina e feci.

Sangue

Il metodo più diretto e rapido per la misurazione della maggior parte degli ormoni è il dosaggio effettuato tramite il prelievo di campioni di sangue. Il siero e il plasma rappresentano la matrice che fornisce il maggior numero di informazioni sugli ormoni in circolo ed è quindi la via più utilizzata (Hodges *et al.*, 2010).

L'utilizzo dei campioni ematici per i monitoraggi ormonali presenta diversi vantaggi e svantaggi (Hodges *et al.*, 2010).

Tra i principali vantaggi legati al prelievo di sangue ci sono il numero ridotto di problemi associati alla preparazione dei campioni per le analisi: i campioni di sangue non necessitano di complicate procedure di estrazione o di idrolisi prima dell'esame.

Inoltre, il campione di sangue fornisce informazioni in tempo reale riguardo lo stato degli ormoni oggetto di analisi. Il dosaggio degli ormoni nel sangue non è soggetto al *lag time* (tempo di ritardo) come l'analisi dei metaboliti ormonali.

Infine, questa matrice biologica consente di realizzare monitoraggi delle modificazioni ormonali a breve termine.

Il maggior svantaggio implicato nell'utilizzo dei campioni ematici per i dosaggi ormonali è l'impossibilità di effettuare la procedura di prelievo in maniera routinaria negli zoo. Trattandosi di animali selvatici, infatti, è necessaria la cattura e il contenimento degli stessi e, talvolta, anche della sedazione. Per questi motivi i prelievi di sangue non sono sempre praticabili quotidianamente. Potrebbe tuttavia essere possibile, a seguito di un adeguato lavoro di *training*

con l'animale, ovviare alla necessità della cattura e della sedazione, effettuando il prelievo sanguigno senza causare stress all'animale e con pochi rischi sia per l'animale che per l'operatore. Il prelievo di sangue longitudinale è stato, quindi, impiegato in diversi studi per monitorare il ciclo estrale e la gravidanza di diverse specie animali, tra cui il rinoceronte (Berkeley *et al.* 1997; Roth *et al.* 2001, Roth *et al.*, 2004).

Inoltre, il sangue è stato utilizzato come controllo per validare l'uso di altre matrici biologiche nelle procedure di monitoraggio non invasivo, quali feci o urine. In tali studi si è dimostrato una corrispondenza tra gli ormoni circolanti e quelli escreti (Berkeley *et al.* 1997; Heistermann *et al.*, 1997; Goymann *et al.* 1999; Walker *et al.*, 2002)

Saliva

Mediante la tecnica del *training*, ovvero rinforzi positivi e ricompense alimentari, si possono ottenere campioni di saliva tramite i quali effettuare monitoraggi ormonali (Hodges *et al.*, 2010). Con gli animali di grossa taglia è possibile prelevare dalla cavità orale diversi millilitri di saliva direttamente in appositi contenitori. Alternativamente, è anche possibile offrire all'animale oggetti da masticare che si impregnino di saliva (Hodges *et al.*, 2010).

Una volta raccolto il campione è necessario congelarlo (Hodges *et al.*, 2010).

In questa matrice biologica sono presenti piccole quantità di steroidi, pertanto la misurazione deve essere effettuata tramite procedure molto sensibili.

Gli ormoni entrano nella saliva per mezzo della diffusione passiva, quindi le loro concentrazioni non sono influenzate dal flusso della saliva (Riad-Fahmy *et al.* 1982).

La concentrazione degli ormoni nella saliva è sempre minore rispetto a quella del sangue, poiché nella saliva è presente solamente la loro frazione non legata (Hodges *et al.*, 2010).

Benché vi siano studi, riportati nei rinoceronti, che descrivano monitoraggi di successo degli steroidi riproduttivi effettuati a partire da campioni salivari (Czekala e Callison, 1996; Gomez *et al.*, 2004), vi sono altri studi (Fenske, 1996; Atkinson *et al.* 1999) che definiscono di limitata utilità l'utilizzo dei campioni di saliva per il monitoraggio della funzione riproduttiva e ritengono che essi abbiano una scarsa correlazione con gli ormoni circolanti.

Urine

L'analisi degli ormoni urinari è stata considerata per molto tempo l'alternativa non invasiva più simile al sangue (Hodges *et al.*, 2010).

I numerosi progressi apportati al metodo di analisi degli ormoni urinari lo hanno migliorato in termini di facilità di esecuzione, sensibilità ed affidabilità e hanno promosso la generazione di profili ormonali in diverse specie (Hodges *et al.*, 2010).

La raccolta dei campioni di urina viene effettuata per caduta, mediante un contenitore posto sotto lo scarico o in un canale nel pavimento, oppure tramite aspirazione direttamente da terra mediante pipette o siringhe. La quantità di urina necessaria per ciascun campione è di 0,2-1 ml (Hodges *et al.*, 2010).

Dopo ogni raccolta, i campioni devono essere congelati. È meglio congelarli in due aliquote per evitare eccessivi cicli di congelamento/scongelamento e come precauzione contro possibili perdite (Hodges *et al.*, 2010).

La maggior parte degli steroidi viene escreta nelle urine in forma coniugata (Hodges *et al.*, 2010). Un importante vantaggio nell'utilizzo della matrice urinaria per il dosaggio degli ormoni steroidei consiste nel fatto che la procedura di lavorazione di tale matrice non necessita di estrazione (Hodges *et al.*, 2010).

Sulla base del tasso di *clearance*, che varia a seconda dell'ormone e della specie, e della frequenza del campionamento è stato stabilito il *lag time*, ovvero il tempo che intercorre tra la secrezione di un ormone (valore ematico) e l'escrezione dei suoi metaboliti rilevabili nei campioni urinari. Il tempo di ritardo è stato stimato di due ore da Bahr e collaboratori (2000) ma generalmente il range di riferimento è compreso tra le 6 e le 14 ore (Czekala *et al.* 1992; Brown *et al.*, 1995; Monfort *et al.*, 1995; Monfort *et al.*, 1997; Busso *et al.*, 2005).

Dunque, ai fini dell'interpretazione dei cambiamenti nei patterns di escrezione degli ormoni urinari, è necessario tenere in considerazione che essi riflettono degli eventi fisiologici avvenuti diverse ore prima.

Feci

Una grande quantità di ormoni steroidei è escreta tramite le feci (Hodges *et al.*, 2010).

Le feci, esattamente come le urine, possiedono il vantaggio di essere una matrice biologica che garantisce l'esecuzione del monitoraggio non invasivo.

La facilità di raccolta dei campioni fecali, infatti, è legata al fatto che essi possono essere prelevati direttamente da terra, senza interferire nelle condizioni abituali degli animali e, se vivono in gruppo, senza separarli. È tuttavia fondamentale, sia per i campioni fecali che per quelli urinari,

raccogliere solo i campioni di origine certa ed evitare cross-contaminazioni tra feci e urine (Hodges *et al.*, 2010).

Un altro vantaggio di questa matrice biologica consiste nel fatto che per l'esecuzione delle procedure di analisi di metaboliti ormonali sono sufficienti campioni di piccole quantità; solo nel caso in cui la dieta dell'animale sia ad alto contenuto di fibre, come nel caso del rinoceronte, potrebbero rivelarsi necessarie aliquote di maggiore quantità (Hodges *et al.*, 2010).

Tuttavia, uno svantaggio può essere rappresentato dal fatto che, talvolta, nei campioni fecali, gli steroidi non sono distribuiti in maniera uniforme. In questi casi, i campioni devono essere resi omogenei con una mano guantata o con una spatola prima del trasferimento nel contenitore di trasformazione (Brown *et al.*, 1994; Wasser *et al.*, 1996; Millspaugh e Washburn, 2003).

Un altro svantaggio, proprio della scelta della matrice fecale, è legato alla possibile influenza sulle concentrazioni dei metaboliti causata dai metodi di lavorazione e conservazione delle feci (Terio *et al.*, 2002; Hunt e Wasser, 2003; Millspaugh e Washburn, 2003; Galama *et al.*, 2004).

Il modo più efficace per conservare per lunghi periodi un campione fecale è il congelamento alla temperatura di -20°C, da preferire allo stoccaggio nei solventi alcolici (Hodges *et al.*, 2010).

I campioni variano nella consistenza e nel contenuto di acqua. I valori dei livelli delle concentrazioni degli ormoni fecali devono essere espressi per unità di peso, specificando se il peso considerato sia quello umido del materiale fresco, oppure la polvere secca dopo la liofilizzazione (Hodges e Heistermann, 2003).

Gli steroidi si trovano nelle feci in forma non coniugata.

Prima di dosare i metaboliti ormonali presenti nei campioni fecali, diversamente da quanto avviene nell'analisi di quelli urinari, è necessario compiere un procedimento di estrazione. L'estrazione può essere effettuata mediante diverse procedure, scelte sulla base dell'ormone che deve essere misurato, del metodo di stoccaggio utilizzato o delle preferenze personali dell'operatore (Heistermann *et al.*, 1993; Shideler *et al.*, 1994; Schwarzenberger *et al.*, 1996c; Palme e Möstl 1997; Whitten *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2001).

Inoltre, qualora si decida di utilizzare questa matrice biologica per il monitoraggio degli ormoni, è necessario considerare il *lag time* o tempo di ritardo, dovuto al passaggio degli ormoni lungo l'intestino. Per questo motivo il *lag time* degli ormoni nelle feci è più lungo rispetto a quello delle urine (6-48 ore) e, inoltre, può essere influenzato anche da altri fattori, quali la dieta, lo stato di salute e il livello di stress (Hodges *et al.*, 2010).

È importante sapere il tempo di ritardo proprio di ciascun ormone e di ciascuna specie per poter interpretare correttamente i cambiamenti nei livelli ormonali nelle feci, in relazione agli eventi fisiologici (Hodges *et al.*, 2010).

3.4 Monitoraggio ecografico

La conoscenza della biologia riproduttiva di base è incompleta per un gran numero di specie non domestiche. Tale mancanza di preziose informazioni influisce negativamente sull'auto sostenibilità delle popolazioni animali in cattività (Radcliffe *et al.*, 2001).

L'intrattabilità dei rinoceronti ha in passato limitato i tentativi di ricerca, causando uno scarso consenso, tra i membri della comunità scientifica, riguardo i parametri riproduttivi di questa specie (Radcliffe *et al.*, 1997).

Nonostante l'ecografia fosse già frequentemente utilizzata sugli animali domestici, l'uso sugli ungulati non domestici è stato per lungo tempo insufficiente (Radcliffe *et al.*, 2001).

L'ecografia transrettale ha un enorme potenziale e potrebbe apportare significativi miglioramenti nella gestione in cattività delle specie esotiche minacciate (Radcliffe *et al.*, 2001).

L'ultrasonografia è uno strumento di inestimabile valore perché è una tecnica non invasiva che fornisce dettagli immediati riguardo eventi riproduttivi altrimenti sconosciuti (Radcliffe *et al.*, 1996; Radcliffe *et al.*, 2001).

Gli aspetti che è stato possibile indagare, secondo Radcliffe e collaboratori (2001) mediante l'ausilio dello strumento ecografico sono:

- La misurazione in millimetri dell'anatomia delle strutture ovariche e fetali;
- La determinazione del tasso di crescita del follicolo dominante (3 mm al giorno in questa specie);
- Lo studio dell'ovulazione e la forma del follicolo pre-ovulatorio (piriforme);
- La caratterizzazione dei cambiamenti dei parametri fetali durante la gravidanza;
- La previsione dell'età gestazionale compresa tra i 2 mesi e il termine della gravidanza tramite la misurazione dell'occhio o del piede del feto;
- Il sessaggio fetale;
- Lo studio del corpo luteo e del corpo emorragico.

Un notevole vantaggio fornito da questo strumento è la possibilità di utilizzarlo direttamente in campo, raccogliendo informazioni utili e veloci sullo stato riproduttivo dei rinoceronti in libertà (Radcliffe *et al.*, 1996).

In passato, diversi studi hanno usato l'ecografia su animali immobilizzati o condizionati all'uso del travaglio ma si sono concentrati solamente sull'aspetto della fattibilità e sullo studio dell'anatomia riproduttiva (Schaffer e Beehler, 1990; Adams *et al.*, 1991).

Il primo studio a lungo termine che ha indagato le dinamiche riproduttive tramite l'utilizzo dell'ecografia è stato condotto da Radcliffe e collaboratori nel 1997. La principale innovazione di Radcliffe è stata l'introduzione del travaglio a stallo libero (Figura 3.1 a,b), nel quale l'animale è libero di entrare e di uscire e tramite il quale è possibile eseguire ecografie transrettali senza sedazione (Radcliffe *et al.*, 1995; Radcliffe *et al.*, 1997).

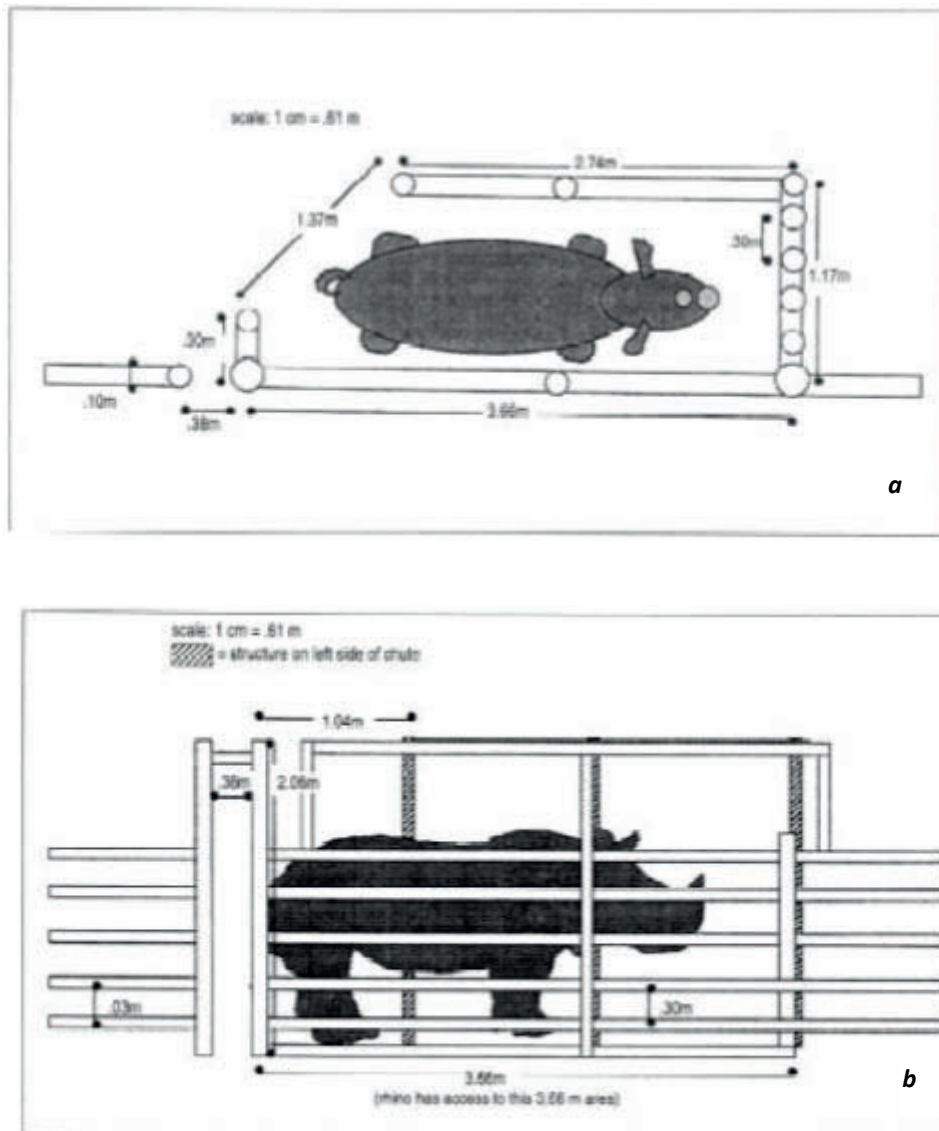


Fig. 3.1 a,b: Nelle immagini sono riportati dei disegni che mostrano un esemplare di rinoceronte nero (*Dicero bicornis*) all'interno di un travaglio a stallo libero. La prima immagine (a) si presenta in veduta dall'alto; mentre la seconda (b) in veduta laterale.

Fonte: Radcliffe *et al.*, 1996.

L'uso seriale dell'ultrasonografia transrettale ha come ultimo e fondamentale scopo quello di affiancare ed agevolare le tecniche di riproduzione assistita per garantire l'auto sostenibilità delle specie animali in cattività (Hildebrandt *et al.*, 2007; Hermes *et al.*, 2009a; Hermes *et al.*, 2009b).

3.5 Training

Tutti gli animali necessitano di essere manipolati per diversi scopi. Tra questi ricordiamo i trattamenti medici, le routinarie procedure veterinarie, il trasporto e molto altro.

Tali procedure, poiché richiedono la manipolazione o il contenimento dell'animale, sono solitamente fonte di stress (Hosey *et al.*, 2013)

Lo stress legato alla manipolazione può essere ridotto in diversi modi, benché un approccio calmo e non rumoroso possa essere considerato la via più semplice.

È quindi utile, durante la manipolazione, far in modo che l'animale associ a queste procedure delle conseguenze positive (ad esempio, carezze) che possano, nel tempo, ridurre il grado di paura e avversione nei confronti della manipolazione stessa (LeNeindre *et al.*, 1996).

Gli animali, infatti, imparano attraverso l'esperienza che la manipolazione è un evento positivo o neutrale.

Con questo metodo si può indurre l'instaurarsi di una relazione positiva o neutrale tra l'animale e i suoi keepers (Hemsworth, 2003; Waiblinger *et al.*, 2006).

Tuttavia, è importante ricordare che la manipolazione diretta non è sempre fattibile poiché potrebbe essere potenzialmente pericolosa sia per il guardiano che per l'animale.

Il modo più efficace per ridurre lo stress legato alla manipolazione è il *training*.

Per *training* si intende l'addestramento in cui l'uomo determina ciò che l'animale impara (Mellen e Ellis, 1996).

L'apprendimento si verifica quando un evento aumenta o riduce la probabilità che un determinato comportamento si ripeta in futuro (Pearce, 2008).

Negli zoo, gli animali sono costantemente manipolati, influenzando come si comporteranno in futuro. Questo avviene quotidianamente in maniera informale, attraverso le pratiche dell'allevamento. In questo caso si parla di "*training passivo*", perché l'espressione del comportamento animale non è influenzato da una predeterminata attività di *training*, ma da quello che l'animale apprende passivamente dall'interazione con il keeper (Hosey *et al.*, 2013).

Si parla invece di "*training attivo*" quando il cambiamento della condotta dell'animale è raggiunto mediante lo stimolo del comportamento desiderato con cambiamenti studiati e appropriati nell'ambiente dell'animale o nelle interazioni con il guardiano. Ad esempio, per far rientrare gli animali nei box la notte, i keepers possono mostrare in serata del cibo agli animali e poi lasciarlo all'interno del box: gli animali impareranno a rientrare nei box perché si aspetteranno di trovarvi del cibo. Questa strategia viene definita "adescamento" (Hosey *et al.*, 2013).

La tecnica maggiormente usata oggi nei zoo per addestrare gli animali alla manipolazione è il “condizionamento operante”. Secondo questa tecnica lo stimolo, che può essere una ricompensa o una punizione, è associato a una risposta (Hosey *et al.*, 2013).

Se al fine di rinforzare un comportamento si applica uno stimolo positivo o ricompensa, in modo tale che aumentino le possibilità che tale comportamento si verifichi di nuovo in futuro, si parla di “addestramento con rinforzo positivo”; mentre, se lo stimolo consiste in qualcosa che gli animali tendono ad evitare o da cui gli animali vorrebbero allontanarsi (punizione) e che quindi scoraggerà la ripetizione di quel comportamento, si parla di “addestramento con rinforzo negativo” (Hosey *et al.*, 2013).

I rinforzi e le punizioni possono avere diverse forme, a seconda delle preferenze dell’animale.

Un buon rinforzo è qualcosa che all’animale piace molto o che funziona: per questo motivo il cibo è spesso usato come rinforzo positivo.

Per “punizione” invece, si intende qualcosa che gli animali eviterebbero. A dispetto del termine, “punizione” non implica necessariamente “dolore”, ma può essere semplicemente la rimozione delle attenzioni date loro dal keeper, cosa che per molti animali non è gradita.

Il *training* presenta diversi gradi di complessità intrinseca:

- Una delle forme più semplici di *training* consiste nel “catturare” un comportamento che si vorrebbe che si verificasse nuovamente in futuro e rinforzarlo elargendo un premio.
- Un altro caso è quello in cui il comportamento desiderato non esiste ancora nel repertorio comportamentale dell’animale. In questo caso è necessario rinforzare comportamenti che si avvicinano a quello desiderato, mediante un procedimento chiamato “modellamento”. Ogni lieve cambiamento, nel comportamento dell’animale, che si avvicina a quello ricercato deve essere rinforzato.
- In caso contrario qualora si voglia dissuadere l’animale dall’esprimere un dato comportamento è possibile trattenere la ricompensa (punizione) oppure rinforzare un comportamento alternativo.

Diversi addestratori si avvalgono dell’ausilio di fischietti, *clicker*, o qualunque altro suono non udito abitualmente dall’animale. Tramite questi strumenti i *trainers* operano un “rinforzo secondario o condizionato”, ovvero comunicano all’animale che la risposta è corretta e che il premio è imminente. Ovviamente il rinforzo secondario funziona solo se utilizzato in modo onesto e subito dopo il comportamento che si intende rinforzare.

3.6 Monitoraggi precedenti

Tra le poche teorie al momento maggiormente accreditate riguardanti la fisiologia riproduttiva del rinoceronte spicca quella che sostiene la presenza di due tipologie di cicli ovarici, uno più lungo e uno più corto. Diversi autori sostengono tale teoria.

Tra questi ricordiamo Schwarzenberger e collaboratori che hanno pubblicato uno studio nel quale descrivono diversi patterns riproduttivi (1998).

A questo studio hanno partecipato ventuno rinoceronti bianchi (sia meridionali che settentrionali) in cattività e mediante la tecnica del monitoraggio non invasivo e usando test immunoenzimatici è stata indagata la presenza del metabolita del progesterone 20-oxo-pregnano. Oltre ai campioni fecali, prelevati solitamente 2-3 volte alla settimana, sono stati raccolti anche i dati relativi alle manifestazioni estrali e all'accoppiamento. Il monitoraggio ha avuto la durata di 6-56 mesi.

Tutti i campioni sono stati tempestivamente congelati a -20°C .

A seguito dell'analisi dei dati ottenuti, sono state definite la fase follicolare (FP) e la fase luteale (LP), sulla base dei valori fecali di 20-oxo-pregnano. L'inizio della LP è stato definito al primo punto dopo che i valori erano aumentati a $>50\text{ ng/g}$ e rimasti $>120\text{ ng/g}$ per almeno due valori consecutivi; la fine, invece, è indicata dal primo di due valori consecutivi $<120\text{ ng/g}$.

La durata del ciclo estrale è stata calcolata tra l'inizio della LP e l'inizio di quella successiva.

Sulla base delle concentrazioni ricavate dall'analisi dei campioni fecali Schwarzenberger e colleghi (1998) individuano patterns altamente variabili raggruppabili in quattro categorie:

1. Cicli estrali regolari di 10 settimane e 20-oxo-P $> 800\text{ ng/g}$.
2. Cicli estrali di 4-10 settimane e 20-oxo-P = $250\text{-}750\text{ ng/g}$.
3. Cicli estrali apparentemente non regolari e 20-oxo-P = $100\text{-}200\text{ ng/g}$.
4. Assenza apparente di attività luteale e 20-oxo-P $< 100\text{ ng/g}$.

Gli autori hanno individuato cicli estrali di due categorie di lunghezza differente:

1. Cicli di categoria 1 ($n = 10$): $68,5 \pm 3,5$ giorni, di cui FP = $12,4 \pm 0,9$ giorni e LP = $55,9 \pm 3,2$ giorni.
2. Cicli di categoria 2 ($n = 11$): $68,9 \pm 3,3$ giorni, di cui FP = $14,6 \pm 2,2$ giorni e LP = $53,5 \pm 2,3$ giorni.

Le categorie 3 e 4 sono caratterizzate dalla presenza di strutture cistiche che potrebbero o no diventare luteinizzate. In ogni caso gli animali appartenenti a tali categorie hanno manifestato attività luteale erratica o assente.

In questo studio si osserva una lunghezza del ciclo estrale di 10 settimane / 70 giorni che entra in conflitto con i risultati di altri studi realizzati sui rinoceronti bianchi che suggeriscono l'esistenza di cicli estrali della durata di circa un mese.

Tra questi ultimi è doveroso ricordare lo studio eseguito da Patton e collaboratori nel 1999.

Anche in tale studio il monitoraggio dell'attività riproduttiva è stato effettuato mediante la tecnica del monitoraggio non invasivo dei metaboliti fecali del progesterone.

I soggetti partecipanti allo studio sono tredici femmine di rinoceronte bianco meridionale.

I campioni fecali sono stati raccolti con una media di 2,8 campioni settimanali per ogni animale e sono stati stoccati ad una temperatura di -20°C.

Anche per questo studio sono state tenute in considerazione le manifestazioni comportamentali dell'estro e gli accoppiamenti.

La processazione dei campioni è stata effettuata mediante saggio radioimmunologico.

Il ciclo estrale è stato individuato a partire da un pattern di livelli di pregnano nei quali si verificano due valori consecutivi <150 ng/g, seguiti da un picco di almeno tre valori >250 ng/g, prima di un calo fino a un nadir di due valori <150 ng/g.

Quindi, le osservazioni comportamentali non hanno giocato un ruolo nella determinazione della presenza del ciclo.

Una volta determinata la presenza del ciclo sono stati applicati dei set di criteri per determinare la lunghezza del ciclo e le sue fasi.

Per la definizione dell'inizio della LP è stato considerato se si siano verificati comportamenti sessuali (accoppiamento o monta): se si sono verificati segnano l'inizio della LP, se non si sono verificati l'inizio viene stabilito sei giorni prima rispetto al primo valore di pregnano >150ng/g.

La fine della LP è stata individuata con la riduzione dei valori di pregnano a concentrazioni corrispondenti a meno della metà della media delle tre concentrazioni più alte della fase luteale, per due valori consecutivi.

La fase interluteale è stata individuata tra la fine della fase luteale e l'accoppiamento successivo; mentre il ciclo estrale risulta dalla somma della durata della LP e della durata della fase interluteale.

Sono quindi stati descritte due categorie di ciclo estrale:

1. Ciclo di 1 mese (tipo I) = circa 35 giorni (definito "tipico").
2. Ciclo di 2 mesi (tipo II) = circa 65 giorni (definito "patologico").

Il ciclo di tipo II è caratterizzato da una fase luteale più lunga.

L'accoppiamento si è verificato in corrispondenza del nadir di pregnano in entrambe le tipologie di ciclo.

Dopo circa 6,4 giorni dall'accoppiamento il pregnano torna a salire sopra i 150 ng/g; queste tempistiche sono in parte legate al numero di giorni impiegati per la metabolizzazione del progesterone e il raggiungimento delle feci da parte dei suoi metaboliti (Hindle e Hodges, 1990). Sono state individuate anche femmine acicliche, con attività luteale erratica e bassi livelli di pregnano.

Brown e collaboratori, in uno studio del 2001, propongono una terza teoria della fisiologia riproduttiva del rinoceronte bianco.

Tale studio consiste in un monitoraggio non invasivo dell'attività riproduttiva di quarantacinque rinoceronti, di cui tredici femmine di rinoceronte bianco.

La matrice biologica scelta per questo studio è quella fecale. Sono stati raccolti dai tre ai sette campioni fecali alla settimana per le femmine e successivamente congelati e stoccati alla temperatura di -20°C. Le analisi delle concentrazioni sono state realizzate mediante saggio radioimmunologico.

Sulla base dei profili di progesterone fecale misurati è stato definito l'inizio della LP come il primo punto dopo l'aumento della p del 50% oltre il valore basale. Tale aumento permane per almeno due settimane. La fine, invece, è segnalata da due consecutivi valori che ritornano alle concentrazioni basali.

Secondo Brown e collaboratori la concentrazione basale di progesterone è 1,22 µg/g; i picchi misurati in fase luteale sono invece tra i 3 e i 24 µg/g.

La lunghezza del ciclo si estende dall'inizio della LP all'inizio della LP successiva.

L'anestro è stato definito come il periodo interluteale eccedente di due volte la lunghezza di una normale FP (circa 30 giorni).

Sono quindi stati distinti due tipi di cicli:

- Cicli lunghi > 50 giorni (media 70 giorni)
- Cicli corti < 45 giorni (media 33 giorni)

La media delle concentrazioni dei metaboliti estrogenici era di 92,6 ng/g, con fluttuazioni occasionali che raggiungevano i 200 ng/g.

In uno studio condotto da Radcliffe e collaboratori (1997) su una femmina multipara di rinoceronte bianco meridionale di 33 anni è stato effettuato il primo confronto tra le immagini ottenute mediante l'ausilio dell'ecografia transrettale e i dosaggi dei metaboliti fecali del

progesterone. I campioni sono stati raccolti, approssimativamente, 3 volte a settimana e congelati e stoccati alla temperatura di -20°C; l'analisi è stata condotta tramite il test radioimmunologico. Le ecografie sono state effettuate tramite l'ausilio del travaglio, a cui l'animale è stato addestrato con l'uso del cibo come rinforzo positivo.

Nel corso dello studio sono stati osservati due cicli che non hanno dato esito a gravidanza, della durata di 33 e 35 giorni, e due cicli che hanno dato luogo a gravidanza con successivo riassorbimento embrionale, di 73 e 78 giorni ciascuno.

Mediante l'ecografia è stata esaminata una corta *fase follicolare* (durata di 9 giorni), durante la quale è stato individuato un follicolo pre-ovulatorio delle dimensioni di 30 mm e piriforme.

È stata individuata l'ovulazione, confermata dal collasso o dall'evacuazione del follicolo pre-ovulatorio maturo. L'ovaio controlaterale appariva quiescente.

L'ovulazione si è verificata 24 ore dopo l'osservazione dell'accoppiamento con il maschio.

I valori delle concentrazioni dei metaboliti progestinici sono cresciuti 7-9 giorni dopo l'ovulazione documentata e sono rimasti elevati per 19-22 giorni prima di ritornare ai valori basali.

L'ovulazione è stata riscontrata al nadir delle concentrazioni di progesterone fecale.

L'uso dell'ecografia, in questo studio, è risultato fondamentale ai fini della determinazione del momento dell'ovulazione, della differenziazione tra inizio gravidanza e fase luteale non gravidica e dell'identificazione precoce della perdita embrionale.

Nonostante i progressi nella conoscenza dei meccanismi alla base della fisiologia riproduttiva dei rinoceronti, il successo riproduttivo in cattività è ancora lontano.

Sono stati identificati problemi attribuibili alla cattività a lungo termine, responsabili dei fallimenti riproduttivi delle specie in cattività, in particolar modo dei rinoceronti (Hermes et al., 2004).

Storicamente, periodi di mancata riproduzione in femmine di rinoceronte nullipare, anche della durata di 10-15 anni, non erano considerati un problema. Nuove evidenze, tuttavia, suggeriscono che una prolungata esposizione a steroidi sessuali endogeni e lunghi periodi non riproduttivi, inducano negli animali in cattività una condizione di "invecchiamento riproduttivo asimmetrico", le cui conseguenze sono ridotta fertilità, durata della vita riproduttiva minore e, eventualmente, acidicità irreversibile (Hermes et al., 2004).

Una femmina di rinoceronte bianco in età riproduttiva dovrebbe produrre nove vitelli. Considerando che la durata della gravidanza è di 16 mesi e la lattazione di 12 mesi, ogni femmina dovrebbe mostrare solo 90 cicli estrali durante l'intera vita riproduttiva (Hermes et al., 2004).

Nelle femmine non riproduttive in cattività è possibile osservare fino a 310 cicli estrali e all'età di 16 anni ne hanno già mostrato 90, in concomitanza con i primi sintomi di alterazioni patologiche del tratto genitale (Hermes *et al.*, 2001).

In casi estremi è stata dimostrata la fine della vita riproduttiva 15 anni prima rispetto alle femmine che si riproducono con successo (Hildebrandt *et al.*, 2000).

La causa di questa prematura senescenza è il processo di invecchiamento riproduttivo asimmetrico (Figura 3.2). Infatti, gli organi riproduttivi delle femmine che non sono in grado di riprodursi sono esposti per prolungati periodi all'azione degli steroidi sessuali dovuta alla costante attività ovarica (Hermes *et al.*, 2004).

I principali effetti dell'invecchiamento riproduttivo asimmetrico sono lo sviluppo progressivo di patologie del tratto genitale con conseguente riduzione della fertilità (Montali *et al.*, 1997) e l'esaurimento dello stock di follicoli (Sopelak and Butcher, 1982; Hinrichs, 1997).

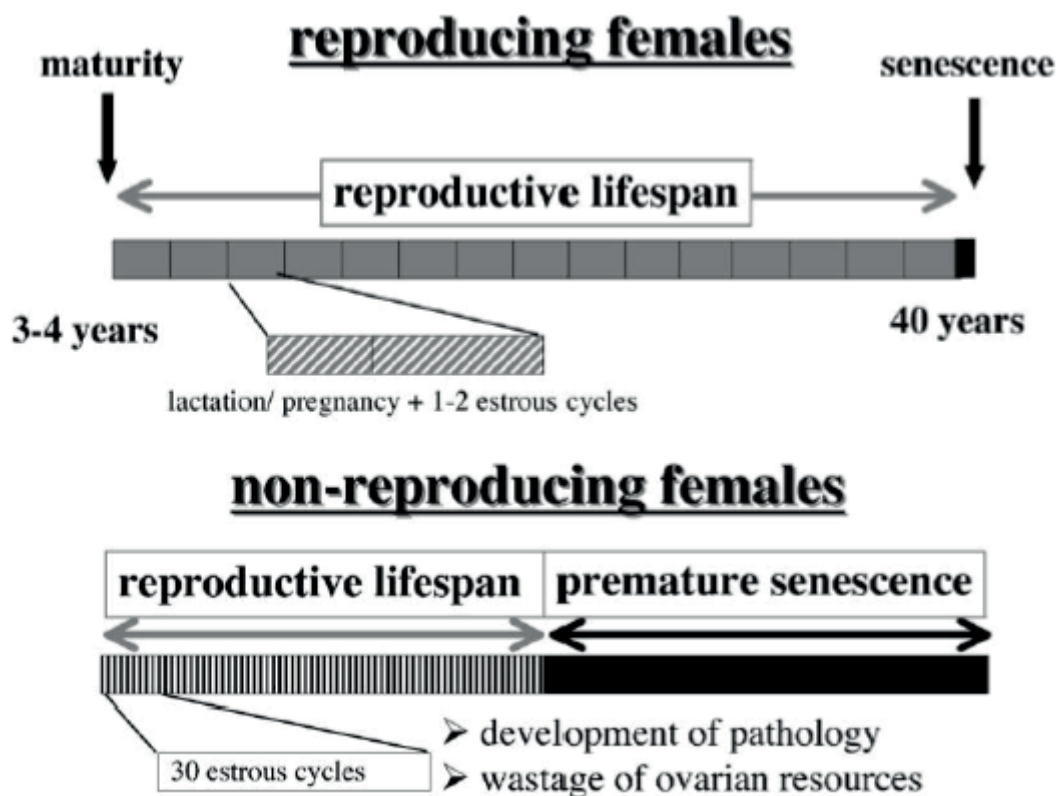


Fig. 3.2: Grafico schematico del processo di invecchiamento riproduttivo in esemplari di rinoceronte femmina in cattività, riproduttivi e non riproduttivi.

Fonte: Hermes *et al.*, 2004

Tra le patologie più frequentemente riscontrate nelle femmine non riproduttive ricordiamo il leiomioma del tratto riproduttivo e l'iperplasia cistica (Hermes *et al.*, 2004).

Lo sviluppo del tumore dipendente dagli ormoni steroidei e la promozione della crescita dei tumori da parte di estrogeni e progesterone sono da tempo stati dimostrati (Kawaguchi *et al.*, 1989; Rein *et al.*, 1995; Maruo *et al.*, 2000; Walker, 2002).

Un'altra condizione che caratterizza la fisiologia riproduttiva delle femmine di rinoceronte in cattività è l'anovulazione, ovvero l'assenza di ovulazione.

Il solo monitoraggio endocrino non è in grado di definire se un ciclo sia ovulatorio o meno, in quanto i rialzi e i cali delle concentrazioni di progesterone da soli non possono confermare l'avvenuta ovulazione (Roth *et al.*, 2018).

Mediante l'uso dell'ecografia, invece, è possibile evidenziare la presenza di cicli anovulatori: è infatti evidente la presenza di follicoli anovulatori persistenti (PAF) che luteinizzano e producono concentrazioni di progesteroni pari e di simile durata rispetto a quelle prodotte dal corpo luteo durante la LP post-ovulatoria (Roth *et al.*, 2018).

Ecograficamente, è possibile vedere onde follicolari che non raggiungono mai le dimensioni pre-ovulatorie (Hermes *et al.*, 2012).

Concentrazioni piatte di progesterone indicano piuttosto un periodo di anestro (Patton *et al.*, 1999; Schwarzenberger *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001).

Capitolo 4

Attività sperimentale

4.1 Obiettivi

Il presente studio si pone l'obiettivo di analizzare, tramite la modalità del monitoraggio non invasivo, il ciclo riproduttivo di due femmine di rinoceronte bianco meridionale (*Ceratotherium simum simum*) in cattività con la finalità di indagare alcuni aspetti della fisiologia riproduttiva.

Una maggiore conoscenza della fisiologia riproduttiva del rinoceronte bianco risulta essere fondamentale allo scopo di incentivare la riproduzione in cattività e, quindi, la definizione di popolazioni autosufficienti che contribuiscano alla conservazione della specie. Questo aspetto è molto importante poiché uno degli scopi di maggior rilievo della ricerca scientifica, nell'ambito dei giardini zoologici, è la conservazione della specie (Barongi *et al.*, 2015).

Studi come questo, effettuati *in situ*, possono consentire in futuro applicazioni pratiche sugli animali in libertà e avere ripercussioni positive anche sull'acquisizione di nozioni riguardanti gli stessi (Garnier *et al.*, 1998; Garnier *et al.*, 2002; van der Goot *et al.*, 2013; Freeman *et al.*, 2014).

Gli animali in cattività, infatti, rappresentano i soggetti di ricerca ideali nelle specie selvatiche, poiché il loro stato consente di mantenere la regolarità del campionamento e, inoltre, le tecniche possono essere validate più facilmente rispetto a quanto solitamente avviene negli studi di campo (Schwarzenberger, 2007). In particolare, i monitoraggi non invasivi possono, una volta validati in cattività, essere utilizzati facilmente negli studi sugli animali in natura (Schwarzenberger *et al.*, 1996b, 1997; Whitten *et al.*, 1998; Möstl e Palme, 2002; von der Ohe e Servheen, 2002; Monfort, 2003; Graham, 2004; Millspaugh e Washburn, 2004; Möstl *et al.*, 2005; Touma e Palme, 2005; Ziegler e Wittwer, 2005; Keay *et al.*, 2006; Lane, 2006).

Tale studio si inserisce nel panorama di una vasta letteratura in grado di fornire, tuttavia, solo limitate informazioni riguardo la fisiologia riproduttiva di questa specie e i pochi dati esistenti spesso si dimostrano in conflitto tra loro (Schwarzenberger *et al.*, 1998).

Nel corso degli ultimi decenni, infatti, sono stati pubblicati diversi studi che hanno tentato di definire in maniera univoca la lunghezza del ciclo estrale del rinoceronte bianco. Owen-Smith (1973; 1975), sulla base di osservazioni comportamentali, ha ipotizzato una lunghezza di circa 30 giorni. Nel 1982, uno studio ha dimostrato che la lunghezza del ciclo varia tra multipli di circa 30 giorni (Lindemann), mentre nel corso di un'indagine basata sull'analisi degli ormoni urinari

correlati a citologia vaginale ed ispezioni rettali, sono stati esaminati cicli della lunghezza compresa tra i 38 e i 58 giorni (Wagner, 1986).

Hindle e i suoi collaboratori (1992), invece, hanno riportato mediante saggi di estrogeni e progesterone urinari dei cicli della lunghezza di 32 giorni.

Negli ultimi anni è scientificamente diffusa l'ipotesi che le femmine di rinoceronte bianco presentino due tipologie di cicli.

Secondo una prima ipotesi i due cicli sarebbero entrambi della durata di 10 settimane circa, con una differenza nella durata della fase luteale: $55,9 \pm 3,2$ giorni nel ciclo di categoria I e $53,5 \pm 2,3$ giorni nel ciclo di categoria II (Schwarzenberger *et al.*, 1998).

Secondo un'altra ipotesi, sostenuta da Patton e collaboratori (1999), si descrive un ciclo di tipo I di circa 35 giorni e un ciclo di tipo II di circa 75 giorni, mentre Brown e collaboratori (2001) rilevano un ciclo corto di lunghezza inferiore ai 45 giorni (media = 33 giorni) e un ciclo lungo di lunghezza superiore ai 50 giorni (media = 70 giorni).

Tuttavia, non è ancora chiaro secondo quale meccanismo si verifichino cicli lunghi o cicli corti (Roth, 2006).

Inoltre, in diversi studi condotti su femmine in cattività è stata dimostrata la presenza di diverse irregolarità nei cicli e di periodi di aciclicità (Schwarzenberger *et al.*, 1998, Patton *et al.*, 1999, Brown *et al.*, 2001) e l'instaurarsi di patologie riproduttive (Hermes *et al.*, 2004). È, tuttavia, ancora necessario approfondire quali siano le cause e i meccanismi alla base di queste irregolarità riproduttive.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Area di studio

Questo studio è stato condotto presso il Parco Faunistico *Le Cornelle*, un giardino zoologico privato situato nel comune di Valbrembo in provincia di Bergamo, ai piedi della Val Brembana.

Il parco, che si estende in un'area di 126.000 mq, ospita circa 1.200 animali rappresentanti 120 specie diverse.

Fondato dal signor Angelo Ferruccio Benedetti, Le Cornelle in principio era solo una rivendita di armi e uccelli da richiamo destinati alla caccia. Successivamente è diventato un centro di import/export di animali esotici con un traffico che si estendeva in tutta Europa.

L'apertura ai visitatori e quindi la vera e propria fondazione del Parco risalgono al 19 aprile dell'anno 1981, a seguito dell'acquisto dei primi due animali presentati al pubblico: un cammello e un leone.

Sin dai primi anni (1985), nonostante ospitasse solo pochi animali, il Parco è entrato a far parte del EEP (*European Endangered Species Programme*), ovvero un programma europeo di allevamento e conservazione per la salvaguardia di specie minacciate. Esso incoraggia, monitora e fornisce utili informazioni volte all'allevamento di animali selvatici in cattività con lo scopo di, eventualmente, reintrodurre determinate specie in natura o rafforzarne la popolazione selvatica.

In Europa questo progetto si delinea sotto la guida e la tutela di EAZA (*European Association of Zoos and Acquaria*), associazione di cui il Parco Le Cornelle è membro, che presenta coordinatori di specie che seguono e monitorano tutti gli esemplari di ciascuno zoo di Europa.

Nel corso degli anni il Parco è cresciuto, tanto in dimensioni quanto in numero e varietà di specie animali. Ad esempio, nel 1988, è stata introdotta la testuggine gigante delle Seychelles (*Geochelone gigantea*), tra il 1989 e il 2000 è stato introdotto un numeroso gruppo di giraffe (*Giraffa camelopardalis*) e nel 1994 sono giunti al Parco degli esemplari bianchi di tigre del bengala (*Panthera tigris tigris*) che si sono presto guadagnati il titolo di "simbolo del Parco".

Il Parco è visitabile esclusivamente a piedi, secondo un percorso che può essere liberamente scelto dal visitatore.

Sono presenti diverse aree tematiche all'interno del parco, esplorabili durante la visita, le quali sono nate nel corso degli anni a seguito dell'ampliamento progressivo messo in atto dalla famiglia Benedetti. Tra queste ricordiamo la *Selva Tropicale*, un'area vasta 7.000 mq che ospita 40 specie tra mammiferi, rettili e volatili. È attraversata da una passerella che permette al visitatore di immergersi in un habitat tropicale attentamente ricreato dove gli animali vivono in semilibertà.

È il primo esempio italiano di percorso pedonale tra gli animali esotici e vanta la voliera più vasta d'Italia.

L'*Isola Aldabra* è una serra tropicale che deve il suo nome all'atollo di Aldabra, facente parte dell'arcipelago delle Seychelles. È vasta 1.000 mq e presenta un'ambientazione tropicale tipica delle Isole Seychelles ricreata mediante l'importazione della vegetazione autoctona di questi territori. Nella serra sono ospitati vari animali esotici, tra cui le testuggini giganti delle Seychelles. *Pinnawala* è il nome dato ad un'altra area tematica del parco, chiamata anche "Oasi degli elefanti". Quest'area deve il suo nome alla volontà del parco di omaggiare il "Pinnawala Elephant Orphanage", struttura a organizzazione statale posta sotto la supervisione del *Dipartimento dei Giardini Zoologici Nazionali dello Sri Lanka*, che il Parco Le Cornelle contribuisce a sovvenzionare mediante donazioni. In quest'area sono ospitati due esemplari di elefante indiano (*Elephas maximus*).

L'area tematica che ospita i soggetti di questo studio è la *Savana*. Gli exhibit di questo reparto riproducono l'habitat naturale africano di animali quali il rinoceronte bianco (*Ceratotherium simum*) e la zebra di Grant (*Equus quagga boehmi*).

Infine, l'ultima area tematica inaugurata nel parco, aperta ai visitatori ufficialmente nel 2019, è il *Rettilario*.

4.2.2 Il reparto

Il reparto dedicato ai rinoceronti bianchi all'interno del Parco *Le Cornelle*, è collocato al suo ingresso, presso l'area tematica della Savana (Figura 4.1).



Fig. 4.1: Mappa del Parco Faunistico Le Cornelle, l'area in rosso indica il reparto dedicato ai rinoceronti bianchi meridionali.

Fonte: www.lecornelle.it.

Esso è costituito da una parte esterna, chiamata exhibit, dove gli animali vivono durante il giorno, e una parte interna nella quale sono situati i ricoveri notturni.

Il recinto esterno, che presenta una forma quadrata, possiede un'estensione di 1300 mq ed è confinante con la restante parte dell'area tematica della Savana, costituita dall'exhibit che ospita le zebre di Grant (*Equus quagga boehmi*) e i cobo lichi (*Kobus leche*). Il contatto diretto con quest'ultimi non è possibile in quanto sono separati dai rinoceronti mediante un piccolo recinto all'esterno destinato alla separazione degli animali o allo svolgimento delle attività di training. Nonostante la separazione fisica, è comunque garantito il contatto visivo.

L'exhibit è allestito con l'utilizzo di arricchimenti fisici permanenti che hanno la finalità di renderlo il più simile possibile all'habitat naturale dei rinoceronti, ovvero la Savana. All'interno possiamo notare, infatti, la presenza di rocce e tronchi, un ruscello con cascata, nel quale possono rinfrescarsi o bere, una pozza di fango e un albero morto utilizzato come latrina comune.

Non sono presenti veri e propri rifugi o nascondigli ma gli animali possono beneficiare di una zona dell'exhibit più profonda, che costituisce una fossa, nella quale riescono a nascondersi alla vista

dei visitatori. Tale fossa rimane in ombra nelle ore più calde della giornata, pertanto viene sfruttata dagli animali per ripararsi dal sole.

Per rendere l'exhibit più confortevole e gradito agli animali, vengono utilizzati arricchimenti ambientali.

Per i soggetti del nostro studio, gli arricchimenti più spesso utilizzati sono di tipo alimentare: mele e carote che vengono sparse lungo tutto l'estensione dell'exhibit e, talvolta, nascoste. Tuttavia, possono essere utilizzati anche pellettato e ramaglie, solitamente gelso o bagolato.

Più raramente i keepers utilizzano anche arricchimenti di altra natura: arricchimenti sensoriali, quali anice, menta e chiodi di garofano, anch'essi sparsi nell'exhibit, e arricchimenti strutturali, ovvero cumuli di sabbia.

Il perimetro dell'exhibit è circondato da una staccionata di legno piuttosto bassa. La separazione tra animali e visitatori, infatti, è garantita, dalla presenza di un fossato profondo.

Sono presenti diversi punti di osservazione: uno a sinistra dell'exhibit, uno dal vialone principale e un'isoletta che protrude verso il centro del reparto, consentendo un'osservazione più da vicino degli animali.

Il reparto esterno è separato da quello interno tramite un cancello. Dopo il passaggio attraverso questo cancello gli animali accedono ad un corridoio interno, nascosto alla vista dei visitatori, che li conduce ai propri box. Essi sono tre, uno per ciascun rinoceronte allevato nel parco.

Ogni box è chiuso da un portone automatizzato, che conduce al suddetto corridoio. L'accesso ai box destinato ai keeper e ai veterinari avviene tramite un cancello, attraverso il quale possono essere effettuati esercizi di training con gli animali.

Tutti i reparti interni sono costituiti da superfici facilmente lavabili e disinfettabili. La pulizia dei box viene effettuata quotidianamente.

Gli animali escono dai box al mattino per andare nell'exhibit e vi rientrano alla chiusura del parco. L'entrata e l'uscita dai ricoveri interni avviene in concomitanza e con l'aiuto della somministrazione dei pasti.

4.2.3 Soggetti

I due esemplari su cui si basa il presente studio sono due esemplari di rinoceronte bianco ospitati presso il Parco Faunistico Le Cornelle: Geraldine e Lara (Tabella 4.1)

NOME del SOGGETTO	N° MICROCHIP	SPECIE	SESSO	ETÀ	PROVENIENZA
Geraldine (soprannome: Shanny)	RMP15-00630	<i>Ceratotherium simum simum</i>	Femmina	12 anni (Nata il 30/08/2009)	Nata presso il Serengeti Park di Hodenhagen (Germania)
Lara	RMP15-00254	<i>Ceratotherium simum simum</i>	Femmina	10 anni (Nata il 21/02/2011)	Nata presso il Serengeti Park di Hodenhagen (Germania)

Tabella 4.1: Nella tabella sono indicati il nome, il numero di microchip, la specie, il sesso, l'età e il luogo di nascita dei soggetti sperimentali.

Mediante un'attenta osservazione degli animali è stato possibile individuare alcune caratteristiche fisiche che consentono di distinguere i due soggetti dello studio.

Il tronco di Geraldine (Figura 4.2) è piuttosto tozzo e presenta numerose pieghe cutanee; gli arti sono piuttosto corti.

Possiede una gobbetta sul dorso, prima della groppa, poco accentuata.

Ha la testa quadrata, la bocca poco affusolata, gli occhi piccoli e incavati e piccole orecchie.

Il corno tende verso sinistra (Figura 4.3).



Fig. 4.2: La fotografia mostra uno dei due soggetti dello studio, Geraldine (Fotografia di Gabriela Negri – presso il Parco Faunistico le Cornelle).



Fig. 4.3: La fotografia mostra un dettaglio della testa di Geraldine (Fotografia di Gabriela Negri – presso il Parco Faunistico le Cornelle).

La silhouette di Lara è più affusolata e gli arti sono più lunghi (Figura 4.4).

Le orecchie sono grosse, lo spazio frontale è più largo, rispetto a Geraldine, e la bocca è più affusolata. Il corno tende a destra (Figura 4.5).



Fig. 4.4: La fotografia mostra uno dei due soggetti dello studio, Lara (Fotografia di Gabriela Negri – presso il Parco Faunistico le Cornelle).



Fig. 4.5: *La fotografia mostra un dettaglio della testa di Lara (Fotografia di Gabriela Negri – presso il Parco Faunistico le Cornelle).*

4.2.4 Raccolta dei campioni fecali

L'analisi dell'attività ovarica dei due soggetti è avvenuta tramite il dosaggio degli steroidi sessuali a partire da una matrice biologica fecale.

A tale scopo sono stati raccolti 33 campioni di feci, di cui 17 appartenenti a un soggetto (Geraldine) e 16 appartenenti all'altro (Lara), nell'arco di 11 mesi compresi tra giugno 2019 e aprile 2020.

I suddetti campioni sono stati prelevati esclusivamente nel reparto interno; si tratta quindi di feci prodotte durante la notte e raccolte la mattina seguente dopo la liberazione degli animali nell'exhibit.

La scelta di limitare la raccolta dei campioni alle circostanze in cui essi venivano prodotti all'interno è legata all'impossibilità di attribuire la corretta appartenenza a ciascun animale delle feci prodotte nel reparto esterno, a causa dell'abitudine di questi soggetti di defecare nello stesso luogo. I rinoceronti, infatti, hanno l'abitudine di defecare su mucchi di letame comune (Laurie, 1982; Patton *et al.*, 1999).

Una volta raccolti, i campioni sono stati conservati in cella frigorifera ad una temperatura di -20°C presso il Parco.

4.2.5 Analisi degli estrogeni e del progesterone fecali

Ai fini della determinazione della concentrazione dei metaboliti di estrogeni e progesterone si è deciso di adottare la metodica immunoenzimatica (EIA), mediante l'utilizzo dei kit commerciali *Arbor Assay DetectX® Progesterone Metabolites Enzymes immunoassay Kit K068-H1* e *Arbor Assay DetectX® 17β-Estradiol Enzyme Immunoassay Kit K030-H1*.

L'acquisto dei kit è stato effettuato dal Parco *Le Cornelle*.

Tali kit sono specie-indipendenti e validati per il dosaggio a partire da matrici biologiche, quali estratti essiccati di feci e urine.

Le analisi sono state effettuate presso il dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino, con la supervisione della professoressa Elisabetta Macchi.

È stato eseguito il seguente protocollo di analisi:

Fase 1: Estrazione degli ormoni steroidei (metodologia basata sul lavoro di Schatz e Palme, 2001, modificato).

1. I campioni da analizzare, ancora congelati, sono stati essiccati ponendoli in stufa a 65°C per 48 ore;
2. Ciascun campione essiccato è stato finemente polverizzato mediante l'utilizzo di un frullatore elettrico;
3. A partire da ogni campione polverizzato è stata prelevata un'aliquota di 250 mg. Il materiale rimanente di ciascun campione è stato opportunamente identificato e conservato in congelatore allo scopo di poter ripetere, qualora se ne verifichi la necessità, le analisi oggetto di questo studio oppure per procedere alla realizzazione di ulteriori indagini.
4. Ogni aliquota è stata messa in una provetta segnalata con il codice identificativo del campione e, ad ognuna di esse, sono stati aggiunti 3 ml di etere dietilico, lavorando sotto cappa.
5. Tramite l'utilizzo di un vortex, le provette sono state mescolate per 3 minuti ciascuna e, successivamente, sono state poste in congelatore per 2 ore. Trascorso tale intervallo di tempo la parte rimasta liquida di ciascun campione è stata travasata in provette di estrazione, sempre opportunamente identificate, che sono state lasciate sotto cappa, a temperatura ambiente, overnight.
6. Trascorse 24 ore tutte le provette sono state tappate con paraffina e poste in congelatore, in attesa delle fasi successive del processo di analisi.

Fase 2: Dosaggio degli ormoni steroidei

Progesterone:

1. Preparazione dei reagenti per l'allestimento delle piastre di lettura, seguendo il protocollo DetectX®:
 - Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente per almeno 30 minuti;
 - Preparazione *Assay Buffer*: effettuare una diluizione 1:5 aggiungendo 1 parte di concentrato a 4 parti di acqua deionizzata. Una volta diluita, la soluzione rimane stabile per 3 mesi alla temperatura di 4°C;
 - Preparazione *Wash Buffer*: effettuare una diluizione 1:20 tramite l'aggiunta di 1 parte di concentrato a 19 parti di acqua deionizzata. Una volta diluita, la soluzione è stabile per 3 mesi a temperatura ambiente;
 - Preparazione standard: etichettare 6 provette da #1 al #6. Pipettare 990 µL di *Assay Buffer* nella provetta n°1 e 300 µL nelle provette dalla n°2 alla n°6. La

soluzione stock di progesterone contiene un solvente organico, pertanto è necessario risciacquare la pipetta diverse volte per garantire una corretta somministrazione. Aggiungere con attenzione 10 μL della soluzione stock di progesterone alla prima provetta e vortexare. Successivamente, prende 200 μL di soluzione di progesterone dalla provetta n°1, aggiungerli alla provetta n°2 e quindi vortexare. Ripetere le diluizioni seriali per le provette dalla n°3 alla n°6. Le concentrazioni di progesterone nelle provette dalla n°1 alla n°6 saranno 10000, 4000, 1600, 640, 256 e 102.4 pg/mL (Tabella 4.2).

Utilizzare tutti gli Standards entro due ore dalla preparazione.

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6
Assay Buffer Volume (μL)	990	300	300	300	300	300
Addition	Stock	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
Vol of Addition (μL)	10	200	200	200	200	200
Final Conc (pg/mL)	10000	4000	1600	640	256	102.4

Tabella 4.2: Protocollo di allestimento piastre per dosaggio progesterone (gli standard sono indicati con la sigla "Std", seguita dal numero corrispondente allo standard).

2. Esecuzione del protocollo:

- Preparare la piastra per l'analisi in doppio con NSB (*no specific binding*), standard e campioni;
- Pipettare 50 μL di campione o standard nei pozzetti della piastra;
- Pipettare 75 μL di Assay Buffer nei pozzetti NSB;
- Pipettare 50 μL di Assay Buffer nei pozzetti B0 o Zero standard (*maximum binding*);
- Aggiungere 25 μL di progesterone coniugato DetectX® a ciascun pozzetto;
- Aggiungere 25 μL dell'anticorpo del progesterone DetectX® a ciascun pozzetto, tranne quello NSB;
- Picchiettare delicatamente i lati della piastra per garantire un'adeguata miscelazione dei reagenti. Coprire la piastra con la pellicola protettiva e agitare a temperatura ambiente per un'ora.

- Aspirare la piastra e lavarla 4 volte con 300 μ L di *Wash Buffer*. Asciugare la piastra su carta assorbente;
- Aggiungere 100 μ L del substrato TMB a ciascun pozzetto;
- Incubare la piastra a temperatura ambiente per 30 minuti, senza agitarla;
- Aggiungere 50 μ L di soluzione bloccante (*stop solution*) in ciascun pozzetto;
- Leggere la densità ottica generata da ciascun pozzetto ad una lunghezza ottica di 450 nm tramite l'utilizzo del lettore "Sirio S".
- Utilizzare il *4PLC software* per calcolare la concentrazione di progesterone in ciascun campione.

Estradiolo:

1. Preparazione dei reagenti per l'allestimento delle piastre di lettura, seguendo il protocollo DetectX[®]:

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente per almeno 30 minuti;
- Preparazione *Assay Buffer*: effettuare una diluizione 1:5 aggiungendo 1 parte di concentrato a 4 parti di acqua deionizzata. Una volta diluita, la soluzione rimane stabile per 3 mesi alla temperatura di 4°C;
- Preparazione *Wash Buffer*: effettuare una diluizione 1:20 tramite l'aggiunta di 1 parte di concentrato a 19 parti di acqua deionizzata. Una volta diluita, la soluzione è stabile per 3 mesi a temperatura ambiente;
- Preparazione standard: etichettare 6 provette da n°1 al n°5. Pipettare 450 μ L di *Assay Buffer* nella provetta n°1 e 375 μ L nelle provette dalla n°2 alla n°5. La soluzione stock di estradiolo contiene un solvente organico, perciò è opportuno risciacquare la pipetta diverse volte per garantire una corretta somministrazione. Aggiungere con attenzione 50 μ L della soluzione stock di estradiolo alla prima provetta e vortexare. Successivamente, prendere 125 μ L di soluzione di estradiolo dalla provetta n°1, aggiungerli alla provetta n°2 e quindi vortexare. Ripetere le diluizioni seriali per le provette dalla n°3 alla n°5. Le concentrazioni di estradiolo nelle provette dalla n°1 alla n°5 saranno 10000, 2500, 625, 156.25 e 39.06 pg/mL (Tabella 4.3).

Utilizzare tutti gli Standards entro due ore dalla preparazione.

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
Assay Buffer (μL)	450	375	375	375	375
Addition	Stock	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4
Vol of Addition (μL)	50	125	125	125	125
Final Conc (pg/mL)	10000	2500	625	156.25	39.06

Tabella 4.3: Protocollo di allestimento piastre per dosaggio estradiolo (gli standard sono indicati con la sigla "Std", seguita dal numero corrispondente allo standard).

2. Esecuzione del protocollo:

- Preparare la piastra per l'analisi in doppio con NSB (*no specific binding*), standard e campioni;
- Pipettare 50 μL di campione o standard nei pozzetti della piastra;
- Pipettare 75 μL di *Assay Buffer* nei pozzetti NSB;
- Pipettare 50 μL di *Assay Buffer* nei pozzetti B0 o Zero standard (*maximum binding*);
- Aggiungere 25 μL di estradiolo coniugato DetectX® a ciascun pozzetto;
- Aggiungere 25 μL dell'anticorpo dell'estradiolo DetectX® a ciascun pozzetto, tranne quello NSB;
- Picchiettare delicatamente i lati della piastra per garantire un'adeguata miscelazione dei reagenti. Coprire la piastra con la pellicola protettiva e agitare a temperatura ambiente per due ore.
- Aspirare la piastra e lavarla 4 volte con 300 μL di *Wash Buffer*. Asciugare la piastra su carta assorbente;
- Aggiungere 100 μL del substrato TMB a ciascun pozzetto;
- Incubare la piastra a temperatura ambiente per 30 minuti, senza agitarla;
- Aggiungere 50 μL di soluzione bloccante (*stop solution*) in ciascun pozzetto;
- Leggere la densità ottica generata da ciascun pozzetto ad una lunghezza ottica di 450 nm tramite l'utilizzo del lettore "Sirio S".
- Utilizzare il *4PLC software* per calcolare la concentrazione di estradiolo in ciascun campione.

4.3 Risultati

Il campione del presente studio è costituito da due soggetti di sesso femminile, che quindi non possono rappresentare adeguatamente l'intera popolazione di 671 animali (dati ZIMS, dicembre 2018).

I campioni raccolti sono 33, dei quali 17 provenienti da un soggetto (Geraldine) e 16 provenienti dall'altro (Lara).

La frequenza della raccolta dei campioni non è stata regolare nel corso dello studio.

Per quanto riguarda il primo soggetto (Geraldine), è stato raccolto un campione fecale nei mesi di giugno 2019, agosto 2019, ottobre 2019, novembre 2019 e aprile 2020; sono stati raccolti 2 campioni nei mesi di luglio 2019, settembre 2019, dicembre 2019, gennaio 2020, febbraio 2020 e marzo 2020.

Invece, per quanto riguarda il secondo soggetto (Lara) è stato raccolto un solo campione fecale nei mesi di luglio 2019, agosto 2019, settembre 2019, ottobre 2019, novembre 2019 e aprile 2020; mentre sono stati raccolti 2 campioni nei mesi di giugno 2019, dicembre 2019, gennaio 2020, febbraio 2020 e marzo 2020.

I campioni sono stati raccolti in giorni diversi, per i due soggetti, fino al mese di ottobre 2019; a partire dal campione del mese di novembre 2019 la raccolta è stata effettuata per entrambi gli animali nello stesso giorno.

Nella tabella (Tabella 4.4) sono riportate le date di raccolta del campione e l'animale di appartenenza.

Numero campione	Nome animale	Data raccolta campione
Campione 1	Geraldine	21-06-2019
Campione 2	Geraldine	14-07-2019
Campione 3	Geraldine	20-07-2019
Campione 4	Geraldine	17-08-2019
Campione 5	Geraldine	16-09-2019
Campione 6	Geraldine	26-09-2019
Campione 7	Geraldine	20-10-2019
Campione 8	Geraldine	16-11-2019
Campione 9	Geraldine	18-12-2019
Campione 10	Geraldine	28-12-2019
Campione 11	Geraldine	02-01-2020
Campione 12	Geraldine	18-01-2020
Campione 13	Geraldine	02-02-2020
Campione 14	Geraldine	18-02-2020
Campione 15	Geraldine	03-03-2020
Campione 16	Geraldine	14-03-2020
Campione 17	Geraldine	21-04-2020
Campione 18	Lara	12-06-2019
Campione 19	Lara	18-06-2019
Campione 20	Lara	10-07-2019
Campione 21	Lara	22-08-2019
Campione 22	Lara	21-09-2019
Campione 23	Lara	15-10-2019
Campione 24	Lara	16-11-2019
Campione 25	Lara	18-12-2019
Campione 26	Lara	28-12-2019
Campione 27	Lara	02-01-2020
Campione 28	Lara	18-01-2020
Campione 29	Lara	02-02-2020
Campione 30	Lara	18-02-2020
Campione 31	Lara	03-03-2020
Campione 32	Lara	14-03-2020
Campione 33	Lara	21-04-2020

Tabella 4.4: Nella tabella sono indicati la numerazione dei campioni, l'animale di appartenenza e la data di raccolta di ciascun campione.

Sulla base dell'osservazione delle manifestazioni estrali, monitorate dai keepers del parco, sono state individuate, nel corso dello studio, 2 fasi estrali di Geraldine e 5 di Lara.

Date fasi estrali Geraldine:

- 28-29/07/2019
- 31/12/2019.

In entrambi i casi si è verificato un accoppiamento con il maschio che non ha dato esito ad una gravidanza. Gli estri di Geraldine non si sono verificati in corrispondenza della raccolta di un campione: nel caso del primo estro individuato la raccolta del Campione 20 è avvenuta una settimana prima; nel caso del secondo estro la raccolta è avvenuta tre giorni prima.

Date fasi estrali Lara:

- 20/06/2019
- 21-22/08/2019
- 21-22/09/2019
- 20/02/2020
- 20/04/2020

Durante gli estri avvenuti nelle giornate del 21 e 22 agosto 2019, 20 febbraio 2020 e 20 aprile 2020 si sono verificati degli accoppiamenti con il maschio, tuttavia nessuno di questi ha portato all'instaurarsi di una gravidanza.

Da ciascun campione è stata estratta e dosata la concentrazione di metaboliti di estrogeni e progesterone presenti secondo la metodologia precedentemente descritta. I risultati sono riportati nelle seguenti tabelle (Tabelle 4.5 e 4.6).

Numero campione	Data raccolta campione	P4 Geraldine (ng/g)	E2 Geraldine (ng/g)
Campione 1	21-06-2019	2033,10	43,72
Campione 2	14-07-2019	3346,20	23,22
Campione 3	20-07-2019	2690,20	35,22
Campione 4	17-08-2019	2033,10	45,48
Campione 5	16-09-2019	3986,20	45,47
Campione 6	26-09-2019	1201,10	34,35
Campione 7	20-10-2019	1369,10	40,35
Campione 8	16-11-2019	3986,20	29,60
Campione 9	18-12-2019	1089,10	29,22
Campione 10	28-12-2019	321,20	38,58
Campione 11	02-01-2020	1089,10	28,74
Campione 12	18-01-2020	808,50	60,68
Campione 13	02-02-2020	1369,10	24,98
Campione 14	18-02-2020	1089,10	24,10
Campione 15	03-03-2020	474,30	35,22
Campione 16	14-03-2020	168,10	65,64
Campione 17	21-04-2020	203,31	45,47

Tabella 4.5: Nella tabella sono indicati i dosaggi dei metaboliti fecali del progesterone e dell'estradiolo in ciascun campione appartenente a Geraldine.

Numero campione	Data raccolta campione	P4 Lara (ng/g)	E2 Lara (ng/g)
Campione 18	12-06-2019	474,3	29,22
Campione 19	18-06-2019	920,5	35,23
Campione 20	10-07-2019	1201,1	24,98
Campione 21	22-08-2019	1089,1	45,48
Campione 22	21-09-2019	2033,1	69,16
Campione 23	15-10-2019	2690,2	19,74
Campione 24	16-11-2019	2033,1	22,26
Campione 25	18-12-2019	310,3	21,62
Campione 26	28-12-2019	310,3	45,48
Campione 27	02-01-2020	120,11	24,98
Campione 28	18-01-2020	474,3	45,48
Campione 29	02-02-2020	203,31	23,62
Campione 30	18-02-2020	584,5	55,72
Campione 31	03-03-2020	2033,1	35,22
Campione 32	14-03-2020	2690,2	50,6
Campione 33	21-04-2020	3986,2	45,48

Tabella 4.6: *Nella tabella sono indicati i dosaggi dei metaboliti fecali del progesterone e dell'estradiolo in ciascun campione appartenente a Lara.*

Al fine di poter effettuare un confronto tra i dati ottenuti dall'estrazione dei metaboliti dei due steroidi, sono stati realizzati degli istogrammi, due per ciascun animale, che riportano le concentrazioni di entrambi gli ormoni (Figura 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9).

La ragione per cui si è scelto di separare i dosaggi dei due ormoni, esprimendoli in due istogrammi differenti, è da imputare all'elevato divario fra i due range di dati, i quali, inseriti nel medesimo grafico, non rendevano possibile una corretta visualizzazione degli stessi.

Nei grafici sottostanti è possibile visualizzare il dosaggio dei due ormoni in ciascun campione, espresso mediante la stessa unità di misura (ng/g), che in un unico grafico non sarebbe stato possibile.

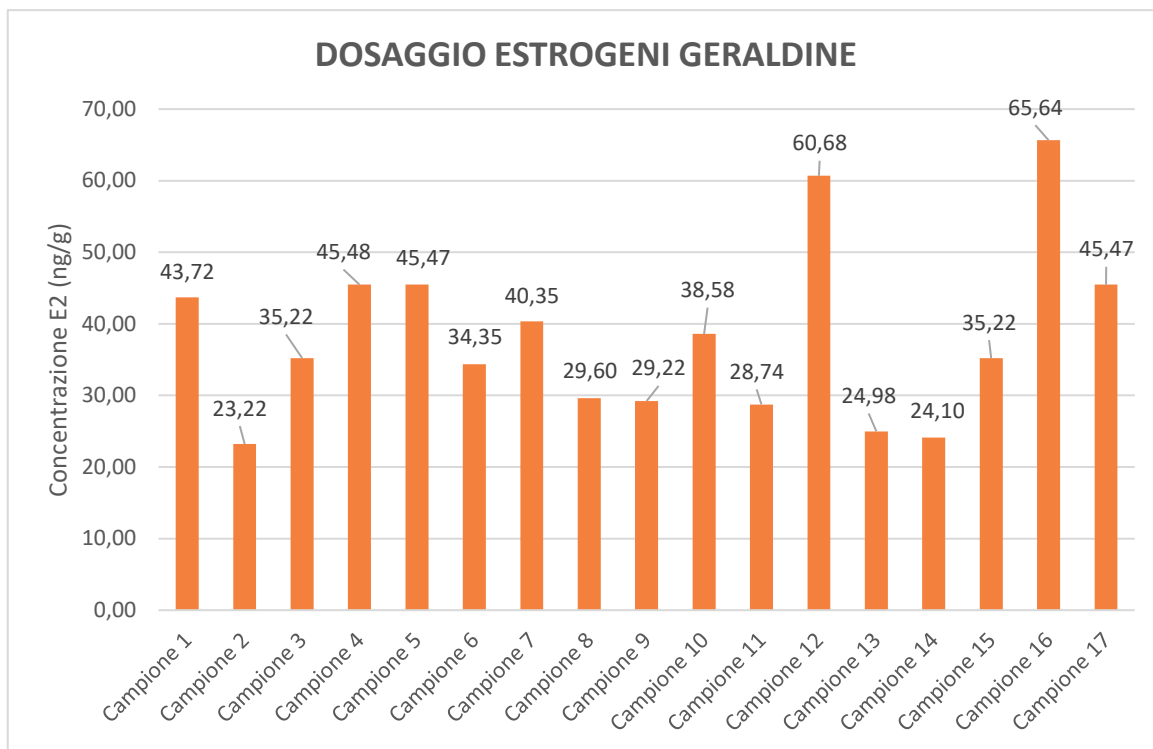


Fig. 4.6: Valori delle concentrazioni dei metaboliti dell'estradiolo (espressi in ng/g) rinvenuti nei campioni fecali di Geraldine raccolti durante lo studio.

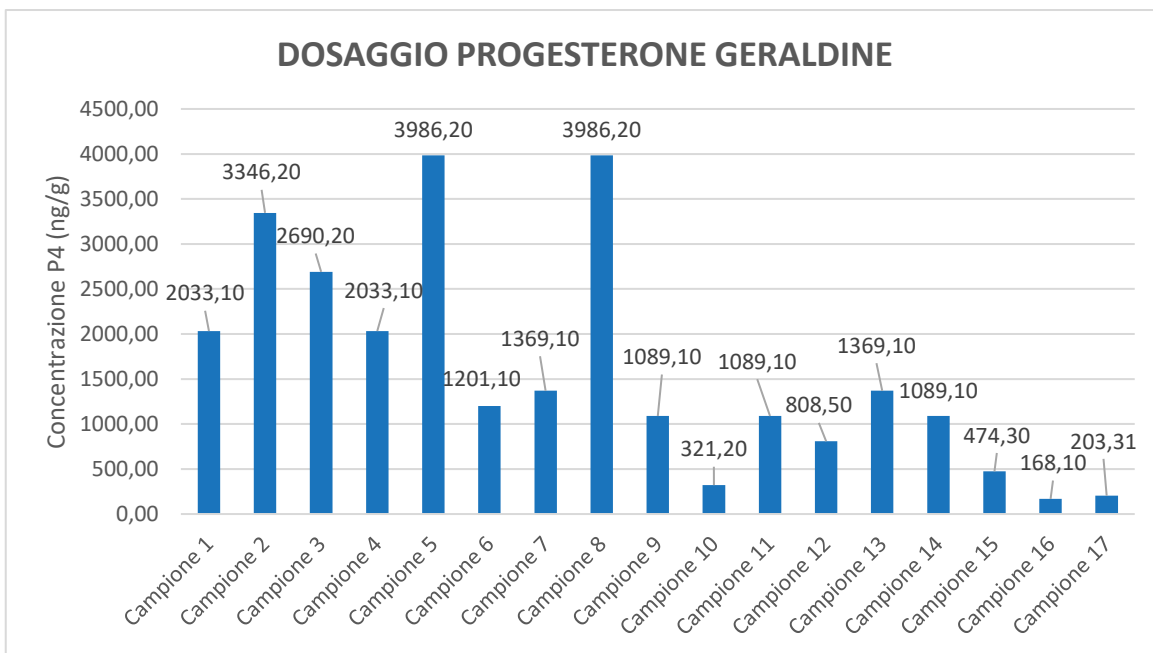


Fig. 4.7: Valori delle concentrazioni dei metaboliti del progesterone (espressi in ng/g) rinvenuti nei campioni fecali di Geraldine raccolti durante lo studio.

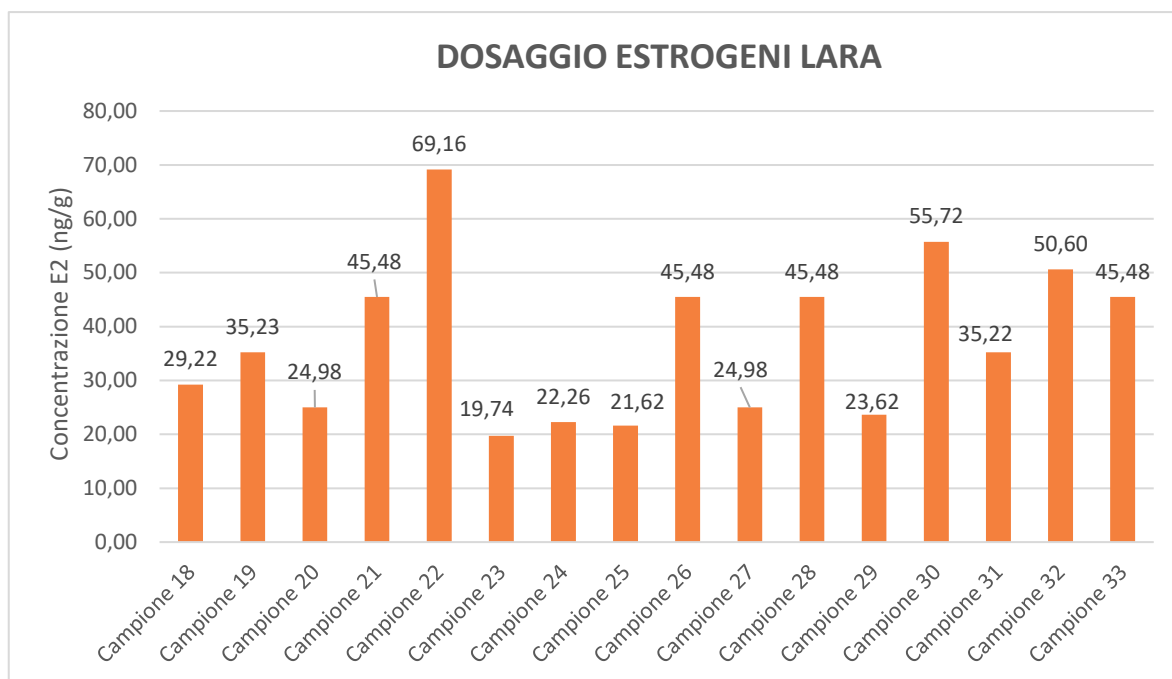


Fig. 4.8: Valori delle concentrazioni dei metaboliti dell'estradiolo (espressi in ng/g) rinvenuti nei campioni fecali di Lara raccolti durante lo studio.

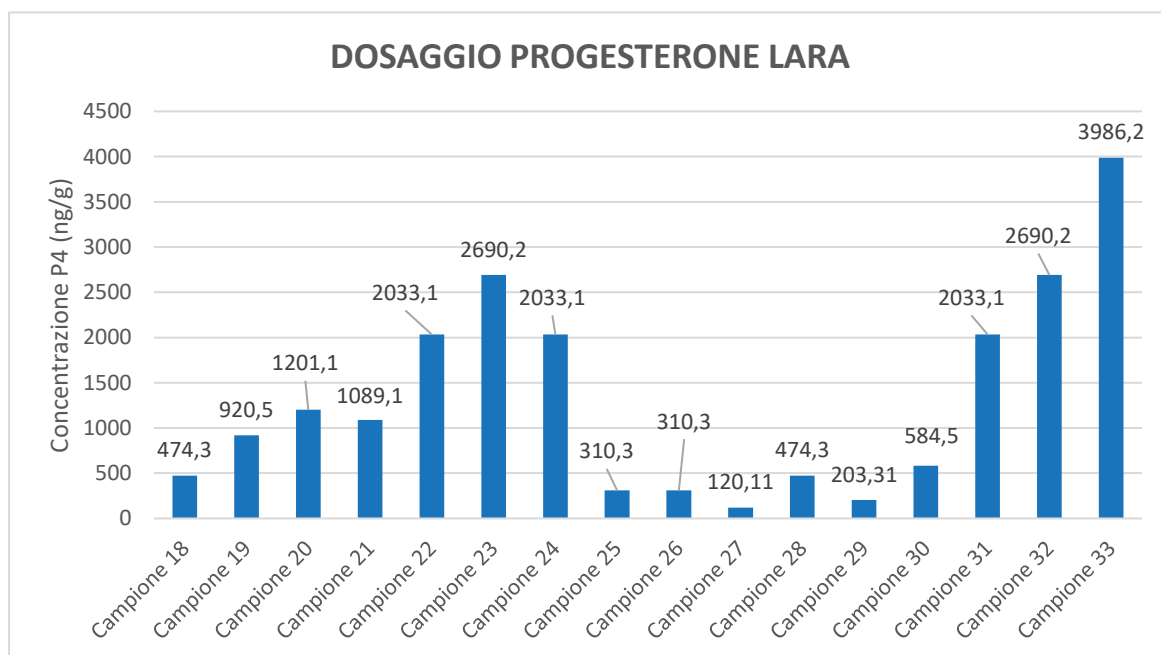


Fig. 4.9: Valori delle concentrazioni dei metaboliti del progesterone (espressi in ng/g) rinvenuti nei campioni fecali di Lara raccolti durante lo studio.

Sono stati calcolati, inoltre, i valori medi delle concentrazioni di estrogeni e progesterone estratte a partire dai campioni fecali di ciascun animale (Figura 4.10 a, b; 4.11 a,b).

La media dei valori di estrogeni di Geraldine, calcolata su 17 misurazioni è risultata 38,24 ng/g, mentre, quella del progesterone 1603,35 ng/g.

Per quanto riguarda Lara, il valore medio della concentrazione dei metaboliti degli estrogeni è 37,14 ng/g, mentre il valore relativo alla concentrazione di progesterone è 1322,11 ng/g, calcolate a partire dai 16 campioni raccolti.

Nei grafici sono riportate le concentrazioni medie dei metaboliti estrogenici e progestinici rilevate nelle feci di entrambi gli animali.

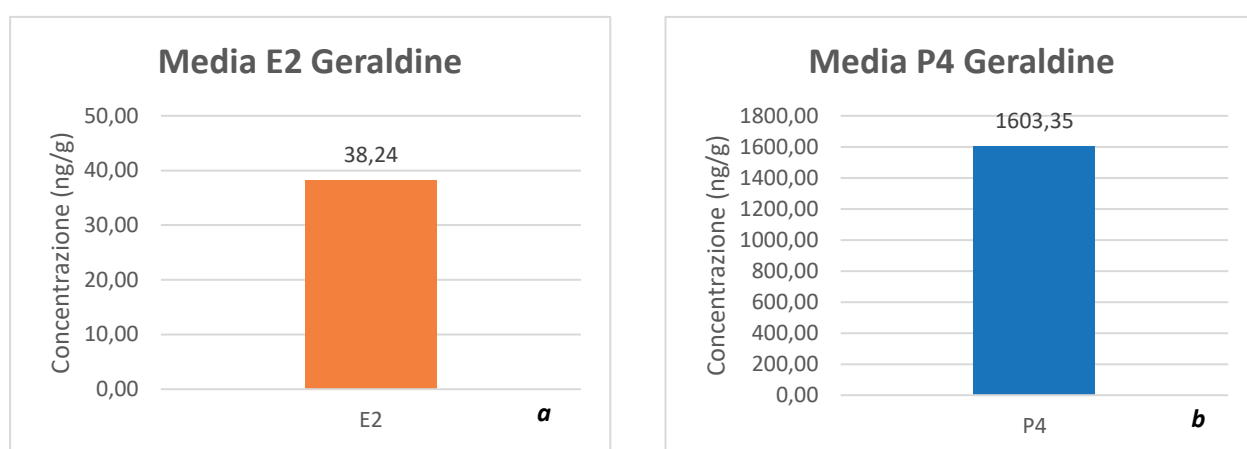


Fig. 4.10 a,b: Valori medi delle concentrazioni dei metaboliti di estradiolo e progesterone (espressi in ng/g) rinvenuti nei campioni fecali di Geraldine raccolti durante lo studio.

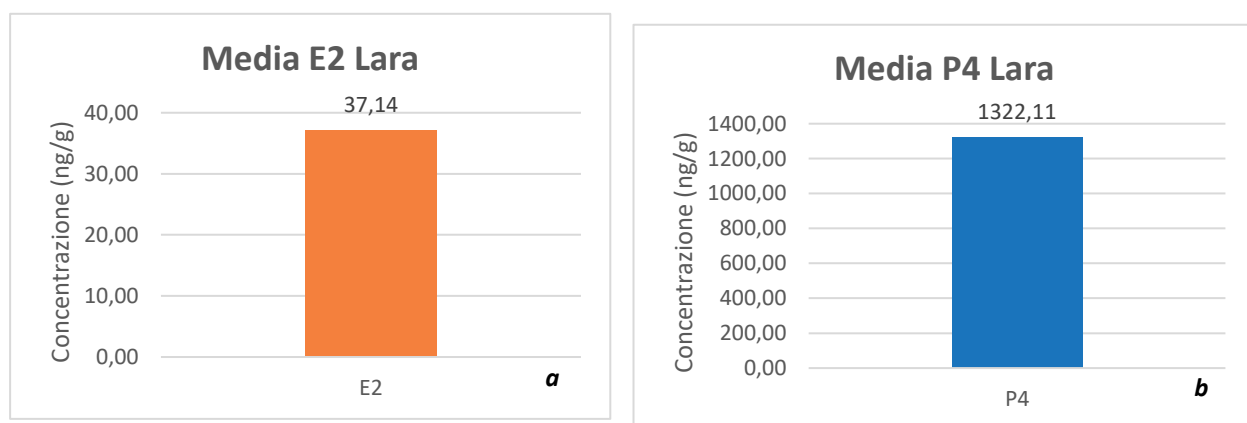


Fig., 4.11 a,b: Valori medi delle concentrazioni dei metaboliti di estradiolo e progesterone (espressi in ng/g) rinvenuti nei campioni fecali di Lara raccolti durante lo studio.

In due occasioni, la raccolta del campione fecale di Lara è stata effettuata in corrispondenza delle manifestazioni estrali. Il Campione 21 (E2 = 45,48 ng/g, P4 = 1089,10 ng/g) e il Campione 33 (E2 = 45,48 ng/g, P4 = 3986,20 ng/g), infatti, sono stati entrambi raccolti un giorno dopo la registrazione delle manifestazioni estrali.

Pertanto, a causa del fatto che gli steroidi in circolo prima di essere escreti con le feci necessitano di un processo di metabolizzazione, la concentrazione di un dato metabolita nelle feci, rispecchierà la condizione ematica ormonale dei giorni precedenti alla raccolta del campione.

Il tempo di ritardo o *lag time* (periodo di tempo che intercorre tra la secrezione e l'escrezione dell'ormone), che dipende dalla specie animale considerata, dagli specifici tempi di metabolizzazione dell'ormone e dalle vie di metabolizzazione proprie di ciascun ormone, può variare da 12 ore a più di 2 giorni (Schwarzenberger *et al.*, 1996b).

Come è possibile vedere dal grafico (Figura 4.12), la concentrazione dei metaboliti fecali degli estrogeni, presenti nei campioni raccolti il giorno successivo rispetto all'evidenza della manifestazione dell'estro, era la medesima nei due campioni.

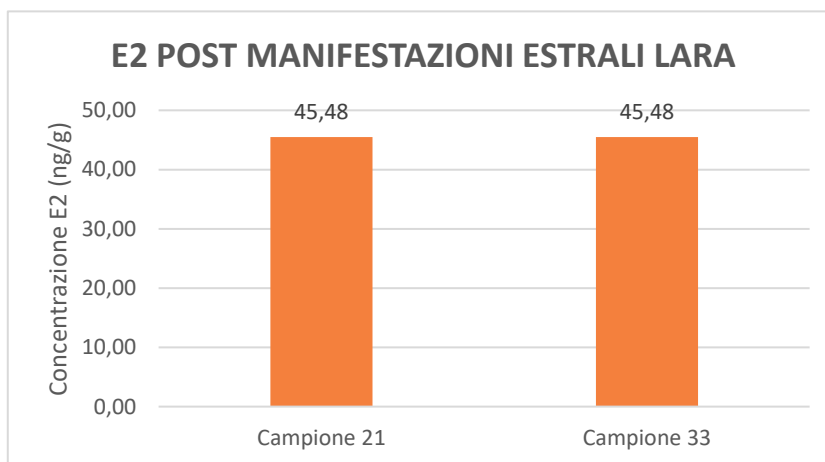


Fig. 4.12: Confronto tra i valori delle concentrazioni dei metaboliti di estradiolo (espressi in ng/g) rinvenuti nei campioni fecali 21 e 33 di Lara raccolti il giorno dopo la rilevazione delle manifestazioni estrali.

I dosaggi di ciascun ormone sono stati inseriti anche all'interno di grafici della serie temporale (Figura 4.13 a,b; 4.14 a,b), al fine di vedere se vi fossero fluttuazioni dei due steroidi coerenti con la letteratura e per ricercare sequenze di valori nelle quali si potesse ravvisare il ciclo di tipo 1 o di tipo 2 (Schwarzenberger *et al.*, 1998, Patton *et al.*, 1999, Brown *et al.*, 2001).

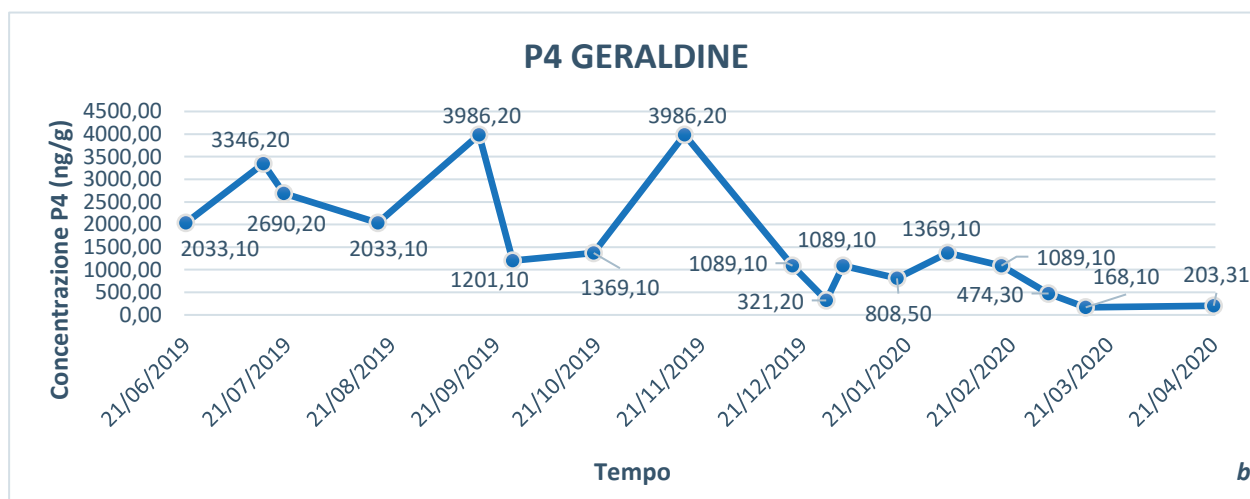
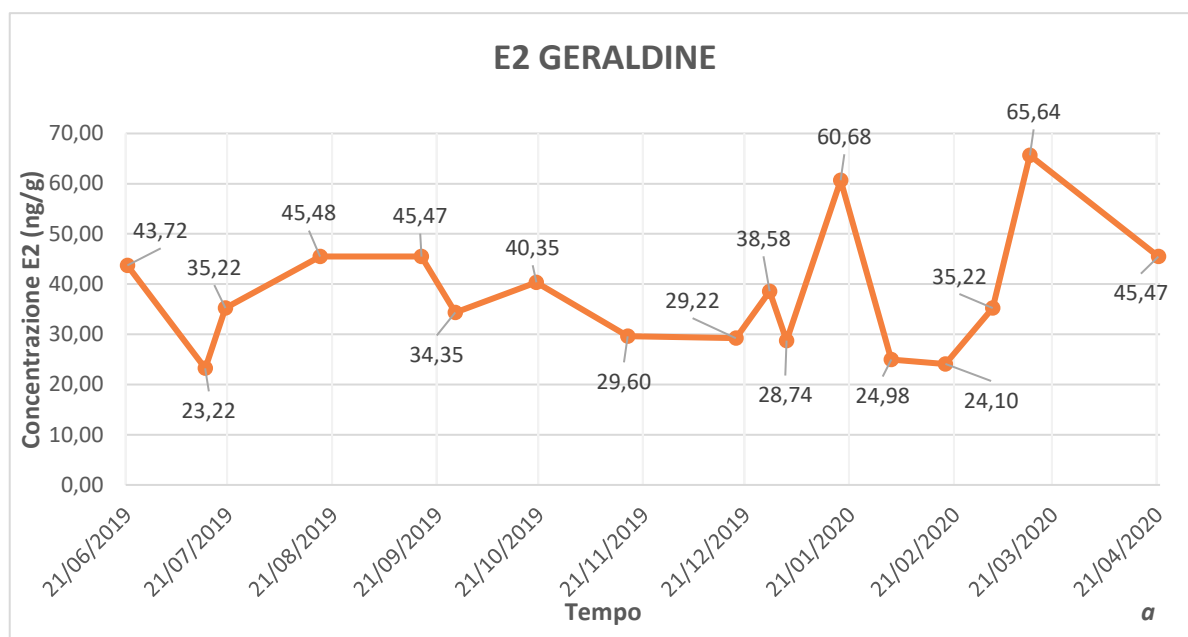


Fig. 4.13 a,b: Nel grafico della serie temporale sono indicate le modificazioni nel tempo dei valori delle concentrazioni dei metaboliti di estradiolo e progesterone (espressi in ng/g), rinvenuti nei campioni fecali di Geraldine.

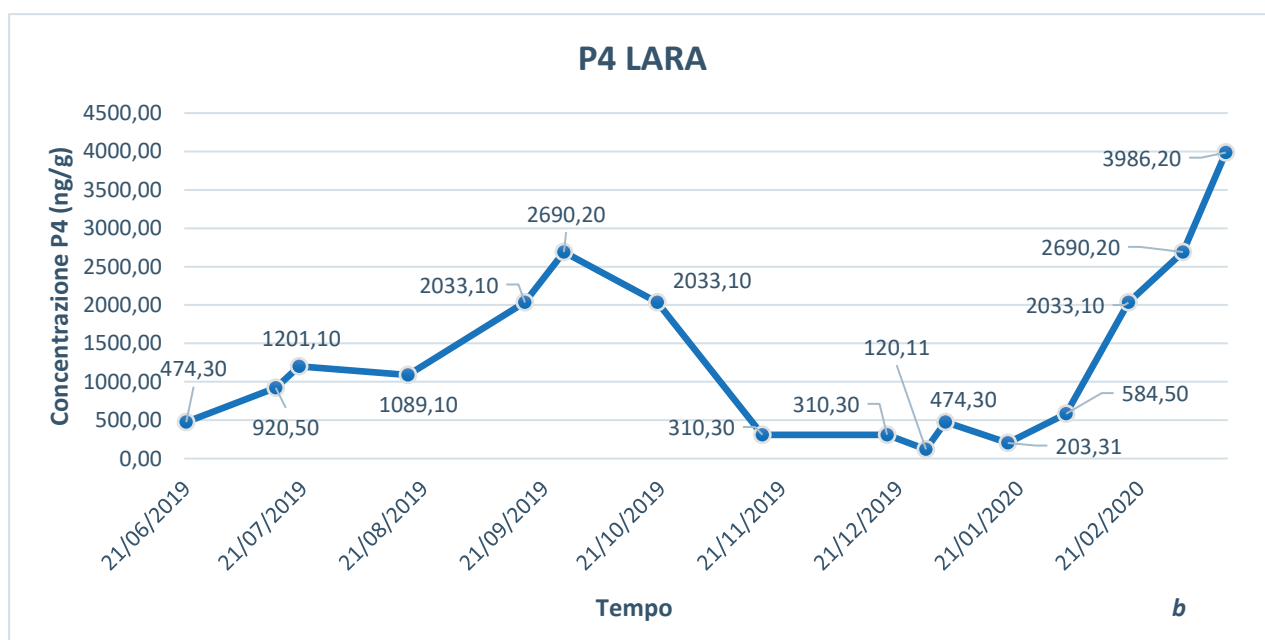
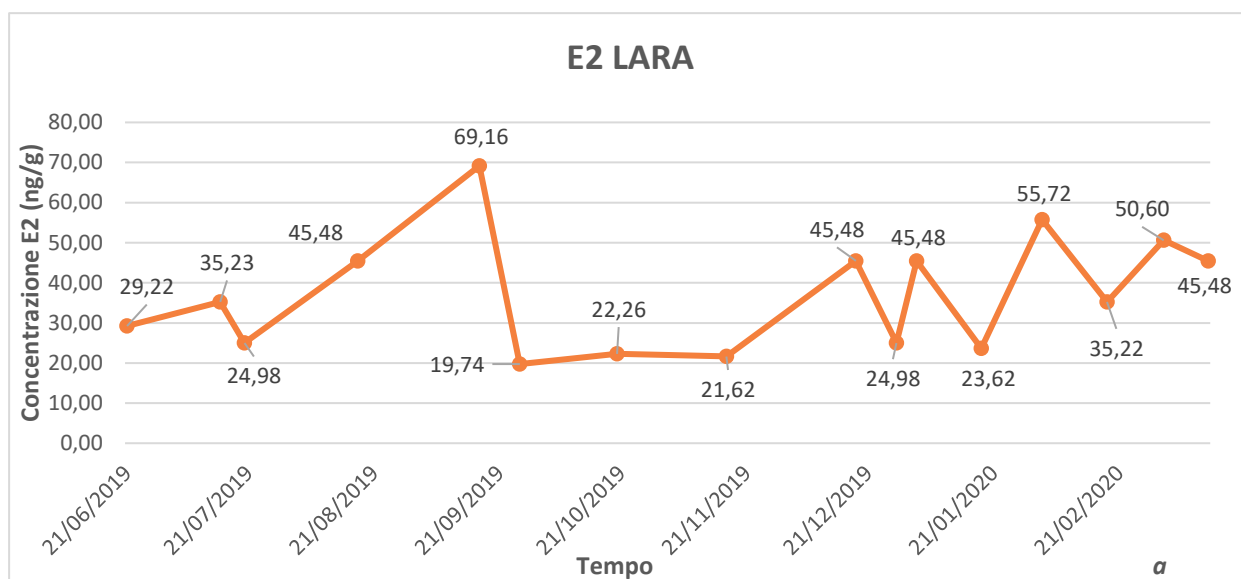


Fig. 4.14 a,b: Nel grafico della serie temporale sono indicate le modificazioni nel tempo dei valori delle concentrazioni dei metaboliti di estradiolo e progesterone (espressi in ng/g), rinvenuti nei campioni fecali di Lara.

4.4 Discussione

Il numero di campioni raccolti è risultato insufficiente per studiare i *patterns* di ciclicità ovarica. Non è stato possibile individuare l'inizio nè la fine della LP, né la lunghezza dei cicli riproduttivi, né se si siano verificati dei periodi di anestro, inteso, secondo la definizione di Brown e collaboratori (2001), come un periodo interluteale eccedente di due volte la lunghezza di una normale LP (30 giorni).

Tali valutazioni sono state effettuate a partire dalle variazioni dei valori del progesterone nel tempo, grazie a monitoraggi stretti. Ad esempio, in altri studi, nei quali sono stati raccolti campioni ad una maggior frequenza, si è potuto valutare le fluttuazioni dei valori del progesterone nel corso del tempo ed individuare la LP e, conseguentemente la lunghezza del ciclo ovarico (Radcliffe *et al.*, 1997; Schwarzenberger *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001).

Nonostante non vi siano ad oggi dei valori di riferimento, sono stati presi in considerazione i valori medi delle concentrazioni dei metaboliti di estrogeni e progesterone nei due animali, per confrontarli tra loro e con degli studi precedenti presenti in letteratura.

I valori medi degli estrogeni sono sovrapponibili tra i due animali: la media dei metaboliti estrogenici di Geraldine è 38,24 ng/g, mentre quella di Lara è 37,14 ng/g.

Entrambi i valori, tuttavia, si discostano fortemente dal valore indicato nello studio condotto da Brown e collaboratori (2001), nel quale il dato relativo alla concentrazione basale di estrogeni è 92,6 ng/g. Inoltre, anche i picchi di estradiolo rilevati in questo studio (Campione 12 = 60,68 ng/g, Campione 16 = 65,64 ng/g e Campione 22 = 69,16 ng/g) non raggiungono il valore basale indicato dallo studio di Brown e colleghi (2001).

I valori relativi al progesterone sono 1603,35 ng/g per Geraldine e 1322,11 ng/g per Lara.

Per quanto riguarda il progesterone, la concentrazione basale segnalata da Brown e collaboratori (2001) è 1220 ng/g. I valori medi di entrambi gli animali eccedono la concentrazione basale dimostrata nello studio di Brown.

Invece, in uno studio condotto da van der Goot e collaboratori (2015), la concentrazione basale di progesterone rilevata è stata di 700 ng/g. Rispetto a tale valore la concentrazione nei due partecipanti a questo studio è superiore.

I picchi di progesterone rappresentati dal Campione 2 (3346,20 ng/g), Campione 5 (3986,20 ng/g), Campione 8 (3986,20 ng/g) e dal Campione 33 (3986,20 ng/g) rientrano nel range indicato nello studio di riferimento (3000-24000 ng/g) (Brown *et al.*, 2001).

Nel corso della valutazione dei grafici della serie temporale di uno dei due soggetti (Geraldine), è stato possibile notare una tendenza alla proporzionalità inversa tra i dosaggi dei due ormoni.

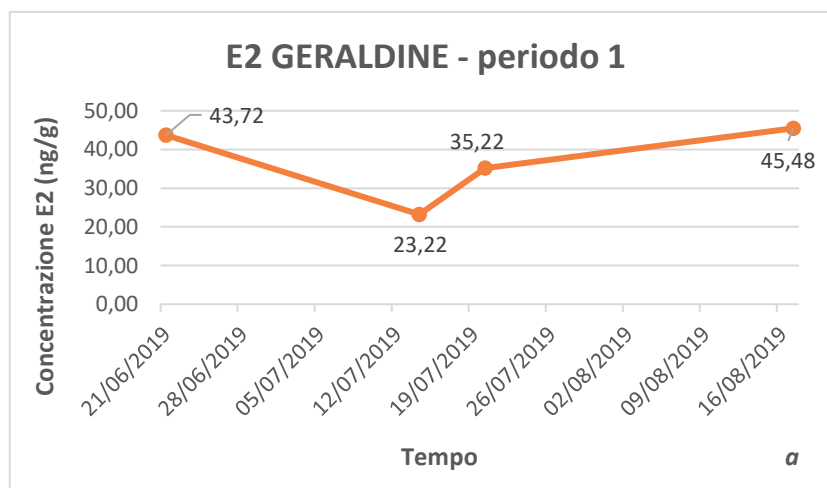
Infatti, secondo la letteratura, nel rinoceronte così come in altre specie di mammiferi, l'alternanza delle fasi del ciclo estrale è garantita da fluttuazioni ormonali e caratterizzate dall'aumentare degli estrogeni contemporaneamente al calo del progesterone e dall'aumentare del progesterone legato al calo degli estrogeni.

Le concentrazioni del progesterone, in particolare, sono molto utili per il monitoraggio della ciclicità riproduttiva perché il progesterone cresce durante la fase luteale e cala durante l'estro. (Roth, 2006).

Il primo periodo preso in considerazione corrisponde ai primi quattro campioni di Geraldine raccolti: Campioni da 1 a 4.

Il secondo periodo, invece, corrisponde ai Campioni da 9 a 17.

Nel primo periodo, come evidenziato dai grafici (Figura 4.15 a,b), i dosaggi ormonali hanno dimostrato una tendenza inversamente proporzionale. Al picco di progesterone (3346,20 ng/g) del Campione 2 corrisponde il nadir dell'estradiolo (23,22 ng/g).



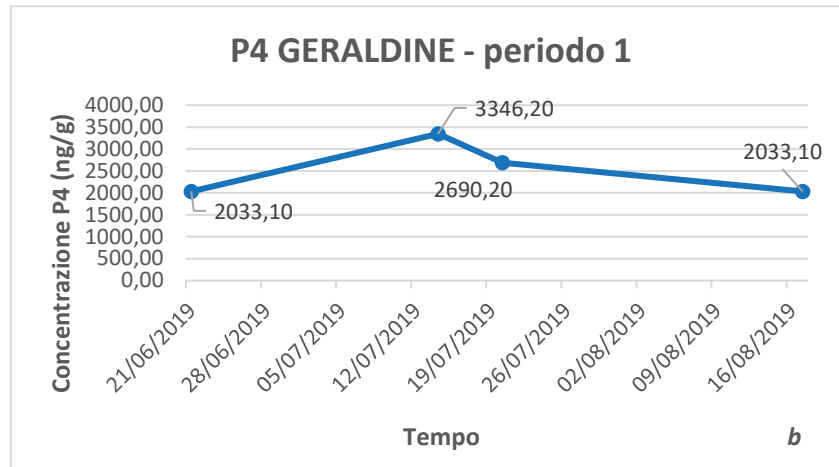


Fig. 4.15 a,b: Nel grafico della serie temporale riferito al periodo 1 sono indicate le modificazioni nel tempo dei valori delle concentrazioni dei metaboliti di estradiolo e progesterone (espressi in ng/g), rinvenuti nei campioni fecali di Geraldine. Da notare la tendenza alla proporzionalità inversa delle fluttuazioni dei due ormoni.

Anche nel secondo periodo è possibile notare un andamento inversamente proporzionale nella modificazione delle concentrazioni degli ormoni analizzati, seppur meno evidente rispetto al primo periodo (Figura 4.16 a,b).

Il Campione 16 ($E2 = 65,64$ ng/g, $P4 = 168,10$ ng/g), come mostrato dei grafici, è caratterizzato da un picco di estradiolo cui corrisponde un nadir di progesterone. L'ovulazione dovrebbe verificarsi al nadir della caduta della concentrazione di progesterone (Radcliffe *et al.*, 1997; Patton *et al.*, 1999).

Tuttavia, nel Campione 12 ($E2 = 60,68$ ng/g, $P4 = 808,50$ ng/g) benché si sia registrato un altro picco di estrogeni e benché si sia verificato un contestuale calo del progesterone rispetto al campione precedente, esso non si presenta come nadir.

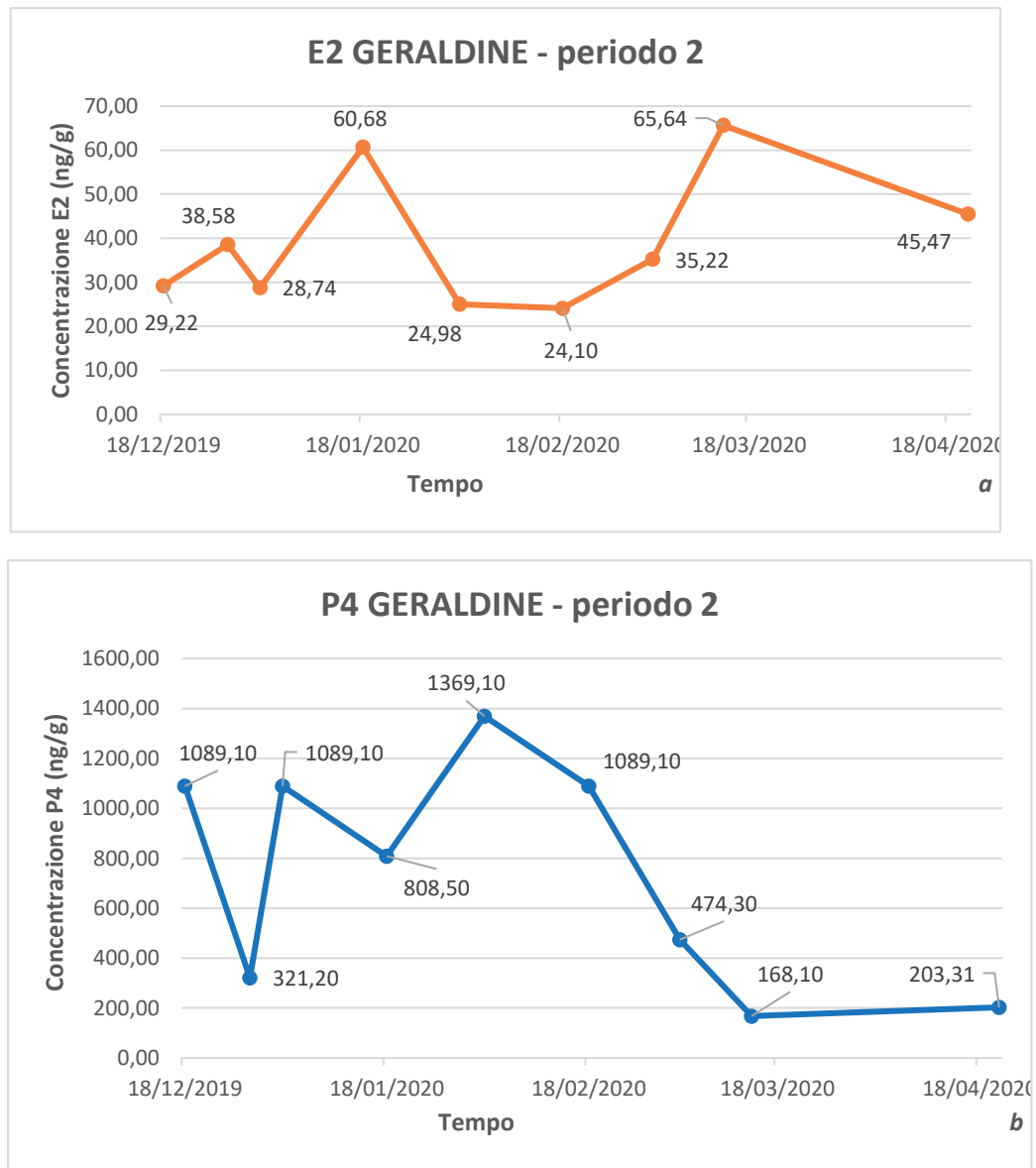


Fig. 4.16 a,b: Nel grafico della serie temporale riferito al periodo 1 sono indicate le modificazioni nel tempo dei valori delle concentrazioni dei metaboliti di estradiolo e progesterone (espressi in ng/g), rinvenuti nei campioni fecali di Lara. Da notare la tendenza alla proporzionalità inversa delle fluttuazioni dei due ormoni.

Tali rilevazioni, tuttavia, non vedono un riscontro nella letteratura.

In letteratura, infatti, non sono riportati studi che mettono in correlazione una proporzionalità inversa negli andamenti dei metaboliti fecali degli estrogeni e del progesterone. L'assenza di studi in tal senso è legata al fatto che gli autori che hanno indagato entrambi gli steroidi sessuali a partire dalla matrice biologica fecale, concordano nel definire gli estrogeni fecali non utili ai fini del monitoraggio e il monitoraggio stesso più impegnativo (Ramsay *et al.*, 1987; Brett *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2018).

La ragione del mancato interesse nella valutazione degli estrogeni fecali è dovuta all'assenza di correlazioni significative tra i profili estrogenici fecali e specifiche manifestazioni estrali (Brown *et al.*, 2001). Infatti, le concentrazioni dei metaboliti estrogenici rilevate presentano spesso delle fluttuazioni variabili, non correlate ai valori di progesterone, né alle rilevazioni delle manifestazioni estrali o dell'ovulazione (Brown *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2018).

In uno studio sono stati riconosciuti dei picchi di estradiolo che precedevano un aumento delle concentrazioni di progesterone durante la LP. Tuttavia, in tale studio sono stati rilevati picchi anche in altri momenti del ciclo e, pertanto, le concentrazioni dell'estradiolo fecale sono state definite variabili (Brown *et al.*, 2001).

L'unico studio in cui è stato possibile notare un andamento ciclico con tendenze opposte dei due ormoni sessuali è stato effettuato a partire dalla raccolta della matrice biologica urinaria (Hindle *et al.*, 1992). Nel corso di tale studio sono stati registrati aumenti dei metaboliti estrogenici durante i periodi bassa escrezione del progesterone e il picco degli estrogeni si è verificato il giorno precedente l'inizio dell'incremento del progesterone. Inoltre, dopo l'estro, si è verificato un sostanziale aumento del progesterone che si è interrotto prima dell'estro successivo, contestualmente ad un nuovo aumento dell'estradiolo.

4.4.1 Limiti dello studio

Durante lo svolgimento del presente studio si sono resi evidenti diversi limiti.

Il primo limite è la scarsa ampiezza del campione: i soggetti che hanno partecipato allo studio sono solo due animali, provenienti dal medesimo giardino zoologico. Pertanto, un così esiguo campione risulta essere non sufficientemente rappresentativo dell'intera popolazione in cattività dei rinoceronti bianchi meridionali.

Il monitoraggio è stato improntato solo su questi due animali perché inizialmente si voleva effettuare un monitoraggio della gravidanza di questi due soggetti. Nel momento in cui è risultato evidente che i due soggetti non erano gravidi, lo studio ha cambiato direzione, indirizzandosi verso un monitoraggio della funzione riproduttiva degli stessi.

Il limite di maggior importanza riscontrato al momento dell'analisi dei dati raccolti è la frequenza del prelievo dei campioni che si è rivelata insufficiente al fine del raggiungimento dell'obiettivo dello studio. È risultato evidente, infatti, che la raccolta dei campioni effettuata due o, addirittura, una volta al mese sia totalmente insufficiente per poter valutare le fluttuazioni degli steroidi ed individuare un ciclo estrale completo. Sulla base dello studio delle ricerche effettuate da diversi

altri autori (Schwarzenberger *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; van der Goot *et al.*, 2013; van der Goot *et al.*, 2015) sarebbe stato più utile una frequenza di raccolta di almeno una volta alla settimana.

La difficoltà nel raccogliere campioni fecali con una frequenza maggiore rispetto a quella del presente studio è legata all'abitudine di questa specie di defecare in una latrina comune, solitamente attorno allo stesso albero (Laurie, 1982; Patton *et al.*, 1999). Tale abitudine rende impossibile distinguere le feci di ciascun animale. Si è perciò dovuto limitare la raccolta dei campioni alle occasioni in cui i soggetti defecavano durante la notte all'interno dei box.

Un altro limite è legato alla scelta della matrice biologica utilizzata per l'estrazione dei metaboliti di estrogeni e progesterone. Infatti, se è vero che in diverse specie animali le feci sono un ottimo campione biologico per il dosaggio dei metaboliti del progesterone, secondo diversi autori (Radcliffe *et al.*, 1997; Graham *et al.*, 2001; Schwarzenberger e Brown, 2013), lo stesso non vale sempre per l'estradiolo. Secondo Hindle e collaboratori (1992), difatti, la matrice biologica ottimale per il dosaggio della concentrazione dei metaboliti estrogenici è l'urina.

L'urina non è stata utilizzata nel nostro studio per due motivi.

Il primo motivo è che inizialmente si pensava di poter correlare i valori ottenuti dai campioni fecali con un'altra matrice biologica, ovvero il sangue. Tuttavia, a causa della scarsa compliance degli animali, non è stato possibile ottenere un numero adeguato di campioni ed effettuare i prelievi nei momenti adatti per essere confrontati con i campioni fecali. Bisogna, infatti, tenere in considerazione il tempo di ritardo legato al metabolismo degli ormoni e alla loro comparsa nelle feci (*lag time*) (Hodges *et al.*, 2010).

Il secondo motivo è strettamente legato alle caratteristiche di questa matrice biologica. Infatti, il prelievo delle urine è molto più laborioso e di difficile realizzazione volendo evitare contaminazioni, mentre quello delle feci risulta essere molto più facile e comodo. Perciò molti zoo preferiscono l'uso dei campioni fecali (Hodges *et al.*, 2010).

Inoltre, è importante sottolineare che un altro limite è rappresentato dal fatto che la letteratura sul monitoraggio del ciclo estrale del rinoceronte bianco è ancora molto scarsa e le informazioni finora ottenute sono limitate, poco chiare e talvolta discordanti fra loro. Tali limiti della letteratura sull'argomento si sono rivelati delle limitazioni nello svolgimento dello studio poiché risulta più difficile appoggiarsi ad altri studi ed ai loro dati per effettuare un confronto con i dati raccolti.

Un altro limite riscontrato nello studio è stato l'impossibilità di avvalersi dell'ausilio dell'ecografia a causa della mancata compliance degli animali ingaggiati nello studio perché non adeguatamente preparati tramite il lavoro di *training*. L'ecografia, come dimostrano studi di altri autori (Radcliffe *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 2018), è uno strumento molto utile per il monitoraggio dell'ovulazione in questa, come in altre specie. Risulta evidente, quindi, come il monitoraggio ecografico dell'ovulazione avrebbe potuto essere di aiuto nel monitoraggio dell'intero ciclo estrale e indirizzare la raccolta dei campioni, suggerendo il momento migliore per il loro prelievo al fine di indagare la fisiologia riproduttiva dei soggetti dello studio. Inoltre, l'impiego dell'ecografo avrebbe potuto fornire un supporto in ogni momento del ciclo, correlando i risultati endocrini ottenuti dai campioni fecali con le immagini delle modificazioni dell'apparato riproduttivo raccolte.

Infine, in mancanza del presidio ecografico, si sarebbero dovute tenere adeguatamente in considerazione le manifestazioni estrali comportamentali, raccogliendo, quindi, i campioni anche sulle base delle stesse. Effettuando il prelievo dei campioni successivamente all'osservazione delle manifestazioni dell'estro, si sarebbe potuto riscontrare a quale valore di estrogeni e progesterone è l'estro stesso correlato.

Anche in questo caso non è stato possibile direzionare la raccolta dei campioni sulla base delle manifestazioni estrali dovendosi limitare ai campioni raccolti all'interno dei box, quando questi erano presenti.

Capitolo 5

Conclusioni

5.1 Conclusioni

Il presente studio non ha fornito una quantità adeguata di dati a garantire un efficace monitoraggio dell'attività riproduttiva dei due animali oggetto di esame.

Infatti i campioni e, quindi, i dati raccolti non si sono rivelati sufficienti per mostrare fluttuazioni ormonali tali da individuare dei patterns riproduttivi, dei cicli estrali completi o le fasi che li costituiscono.

La frequenza con la quale sono stati raccolti i campioni fecali non si è rivelata soddisfacente per mettere in evidenza i patterns ormonali descritti nella letteratura di riferimento (Schwarzenberger *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001).

Tuttavia, nel monitoraggio di uno dei due soggetti (Geraldine) sono stati individuati, due periodi nei quali è stata evidenziata una tendenza inversamente proporzionale tra le concentrazioni dei due ormoni. Tale tendenza esprime l'alternanza tra fluttuazioni positive e negative tipica degli ormoni riproduttivi durante il ciclo estrale che, però, non è stato possibile delimitare nel tempo per mancanza di dati.

Inoltre, è emerso che la media della concentrazione basale dei metaboliti estrogenici è minore rispetto a quanto riportato in letteratura (Brown *et al.*, 2001). Il valore medio era simile nei due animali, perciò entrambi si discostano dal valore di riferimento.

Per quanto riguarda il progesterone, il valore medio è risultato diverso per i due soggetti ma, in entrambi i casi, era superiore rispetto al valore basale di riferimento (Brown *et al.*, 2001).

Durante il periodo di raccolta del materiale fecale sono state individuate e puntualmente registrate da parte dei keepers le manifestazioni estrali fisiche di entrambi i soggetti ed è anche stato riportato quando si sono verificati accoppiamenti con il soggetto maschio del gruppo.

In nessun caso l'accoppiamento ha dato esito all'instaurarsi di una gravidanza.

Questo dato trova riscontro nella letteratura, secondo la quale la riproduzione e l'instaurarsi della gravidanza per i rinoceronti in cattività sono un evento lento e difficile (Swaigood *et al.*, 2006).

Quindi, al fine di garantire una condizione di auto sostenibilità alle popolazioni di rinoceronti in cattività, come si evince dalla letteratura (Swaigood *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2018) e dai risultati di questo studio, sono necessarie ulteriori indagini per ampliare le nostre conoscenze riguardo la fisiologia riproduttiva di questa specie ed incrementarne la riproduzione in cattività.

In particolare, a partire dalle difficoltà e dai limiti riscontrati nello studio e dall'analisi di precedenti studi realizzati con lo stesso fine, si è resa evidente la necessità di realizzare studi a più ampio spettro, impostando monitoraggi più frequenti, a partire da diverse matrici biologiche (Strike e Pickard, 2000) e affiancati alla raccolta di immagini ecografiche (Roth *et al.*, 2018).

5.2 Implicazioni future

La comprensione della fisiologia riproduttiva del rinoceronte bianco, così come delle altre specie di rinoceronte, ha goduto di impressionanti progressi nel corso del tempo (Roth, 2006).

Ciò nonostante, le informazioni disponibili a riguardo non sono abbondanti e, spesso, i pochi dati esistenti si dimostrano in conflitto tra loro (Schwarzenberger *et al.*, 1998).

Esistono, infatti, molte altre sfide scientifiche che i ricercatori dovranno affrontare per mettere in chiaro diversi aspetti ad oggi ancora oscuri della fisiologia riproduttiva del rinoceronte (Roth, 2006).

Ad esempio, benché sia stata dimostrata, in questa specie, la presenza di cicli estrali definiti “normali”, alternati alla comparsa di cicli aberranti, non sono ancora stati chiariti quelli che sono i meccanismi alla base dell’insorgenza di questi ultimi. Conseguentemente, ad oggi non è noto come poter prevenire tali cicli aberranti (Roth, 2006).

Inoltre, grazie all’ausilio dell’ecografia è ora possibile diagnosticare con assoluta certezza l’avvenuta fecondazione e la gravidanza (Radcliffe *et al.*, 2001), tuttavia non esiste ancora un test di gravidanza che permetta di effettuare, in questa specie, diagnosi precoce (Roth, 2006).

Infine, riguardo il riassorbimento embrionale precoce, dimostrato in tutte le specie di rinoceronte, non si è ancora arrivati a definirne la prevalenza e quali siano le cause sottostanti che ne incentivino l’insorgenza (Roth, 2006).

Partendo dal presente studio, per un’indagine futura sarebbe opportuno superare i limiti evidenziati nel corso dello studio stesso, considerando un campione più ampio, che rispecchi maggiormente la popolazione dei rinoceronti bianchi in cattività. Si potrebbe inoltre prendere in considerazione l’età degli animali, come è stato fatto in altri studi (Schwarzenberger *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2001), ed indagare se questa abbia un effetto sui profili steroidei (Brown *et al.*, 2001).

Per un monitoraggio più preciso, un’ulteriore metodica suggerita da alcuni Autori sarebbe quella di associare il dosaggio degli ormoni steroidei a partire dalla matrice biologica fecale e la raccolta delle immagini ecografiche (Radcliffe *et al.*, 1997; Hermes *et al.*, 2006).

In più, potrebbe essere interessante indagare la correlazione tra i dosaggi ormonali o dei metaboliti, estratti da diverse matrici biologiche quali sangue, urina, feci e saliva. Tenendo, quindi, in considerazione i tempi di metabolizzazione ed escrezione degli ormoni, potrebbe essere possibile confrontare valori ricavati a partire da differenti matrici biologiche.

Uno studio come questo potrebbe condurre all'individuazione di parametri di riferimento che consentano di effettuare monitoraggi efficaci a partire da ogni matrice biologica, incentivando l'utilizzo del monitoraggio non invasivo.

Ancora, per uno studio futuro, sarebbe utile incrementare l'attività di *training* con gli animali, per poter ottenere con regolarità campioni di sangue senza causare stress o danni agli animali; la raccolta di campioni di feci, più indicati per l'analisi del progesterone, può inoltre essere associata alla raccolta di campioni di urina, più utili per l'analisi degli estrogeni, come suggerito da Strike e Pickard (2000).

Al fine di colmare le lacune ancora presenti nella nostra comprensione della fisiologia riproduttiva del rinoceronte, sarà necessaria la combinazione di tutte le tecniche di monitoraggio e di riproduzione assistita apprese finora insieme alla collaborazione tra istituti zoologici, università, organizzazioni di ricerca e governi (Pennington e Durrant, 2019).

Il progresso delle esistenti tecniche di riproduzione assistita e lo sviluppo di tecniche innovative, permetteranno un'applicazione più ampia delle stesse e sosterranno le possibilità di successo riproduttivo e la conservazione in questa specie (Pennington e Durrant, 2019).

Potrebbe essere necessario validare procedure e protocolli risultanti da sperimentazioni ben progettate e ripetute nel tempo e collaudare in questa specie le tecniche di trasferimento embrionale che non sono ancora state tentate nel rinoceronte (Pennington e Durrant, 2019).

I ricercatori dovranno promuovere il progresso delle tecniche di riproduzione assistita impiegate fino ad oggi e lavorare attivamente allo studio di opzioni innovative, quali l'utilizzo delle cellule staminali (Saragusty *et al.*, 2016).

In questo senso sono già stati fatti progressi riprogrammando le linee cellulari di fibroblasti di rinoceronte bianco settentrionale, precedentemente raccolte e congelate, creando con successo cellule staminali pluripotenti indotte da questa specie funzionalmente estinta (Korody *et al.*, 2017). In questo modo potrebbero essere generati gameti di rinoceronte bianco settentrionale a partire da cellule staminali pluripotenti indotte, seguite da produzione *in vitro* di embrioni da trasferire in madri surrogate sincronizzate di rinoceronte bianco meridionale (Pennington e Durrant, 2019).

Lo sviluppo di protocolli *ad hoc* per i rinoceronti e i progressi nell'ambito della ricerca scientifica, potranno contribuire in modo fondamentale alla conservazione dei rinoceronti e fungere da modello per la conservazione di altre specie animali in pericolo (Pennington e Durrant, 2019).

Bibliografia

- **Adams G.P.** (1999) “Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants.” *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 54, pp. 17-32.
- **Adams G.P., Plotka E.D., Asa C.S., Ginther O.J.** (1991), “Feasibility of characterizing reproductive events in large nondomestic species by transrectal ultrasonic imaging.” *Zoo Biology*, 10, pp. 247-259.
- **Amin R., Thomas K., Emslie R.H., Foose T.J., Strien N.** (2006), “An overview of the conservation status of and threats to rhinoceros species in the wild”, *International Zoo Yearbook*, 40, pp.96-117
- **Asa C.S.** (2010), “Reproductive Physiology”, in: *Wild Mammals in Captivity: Principles and techniques*, ed. D.G. Kleiman, K.V. Thompson, and C. Kirk Baer, Chicago: University of Chicago Press, pp. 411-428.
- **Asher G., Peterson A., Duganzich D.** (1989), “Adrenal and ovarian sources of progesterone secretion in young female fallow deer”, *Dama dama*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85, pp. 667-675.
- **Atkinson S., Combeles C., Vincent D., Nachtigall P., Pawloski J., Breese M.** (1999), “Monitoring of progesterone in captive female false killer whales, *Pseudorca crassidens*.”, *General and Comparative Endocrinology*, 115, pp. 323-332.
- **Bahr N.I., Palme R., Möhle U., Hodges J. K., Heistermann M.** (2000), “Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual non-human primates.”, *General and Comparative Endocrinology*, 117, pp. 427- 438.
- **Baratay E., Hardouin Fugier E.** (2004), “Zoo: A History of Zoological Gardens in the West”, London: Reaktion Books.
- **Barongi R., Finken F. A., Parker M., Gusset M.** (eds) (2015), “Committing to Conservation: The World Zoo and Aquarium Conservation Strategy”. Gland: WAZA Executive Office, pp. 69
- **Berkeley E.V., Kirkpatrick J.F., Schaffer N.E., Bryant W.M., Threlfall W.R.** (1997), “Serum and fecal steroid analysis of ovulation, pregnancy, and parturition in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*)”, *Zoo Biology*, 16, pp.121-132

- **Bhatia C.L., Desai J.H.** (1975), “Breeding the Indian rhinoceros at Delhi Zoological Park. In Breeding endangered species in captivity”, Martin, R. D. (Ed.). London: Academic Press, pp.303-307.
- **Bostock, S. St. C.** (1993), “Zoos and Animal Rights”, London: Routledge.
- **Boyd L.E.** (1991), “The behavior of Przewalski’s horses and its importance to their management”, Applied Animal Behaviour Science, 29, pp. 301-318.
- **Brett R.A., Hodges J.K., Wanjohi E.** (1989), “Assessment of reproductive status of the black rhinoceros (*Rhinoceros bicornis*) in the wild.” Symposia of The Zoological Society of London, 61, pp. 147-161.
- **Britt A., Welch C., Katz A.** (2003), “Can small, isolated primate populations be effectively reinforced through the release of individuals from a captive population?”, Biological Conservation, 115, pp. 319-327
- **Broom D.M., Johnson K.G.** (1993), “Stress and animal welfare”, London: Chapman and Hall.
- **Brown J.L.** (2018), “Comparative ovarian function and reproductive monitoring of endangered mammals.”, Theriogenology, 109, pp. 2-13.
- **Brown J.L., Bellem A.C., Fouraker M., Wildt D.E., Roth T.L.** (2001), “Comparative analysis of gonadal and adrenal activity in the black and white rhinoceros in North American by noninvasive endocrine monitoring”, Zoo Biology, 20, pp. 463-485.
- **Brown J.L., Wasser S.K., Wildt D.E., Graham L.H.** (1994), “Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non- invasively in feces.”, Biology of Reproduction, 51, pp. 776-786
- **Brown J.L., Wemmer C.M., Lehnhardt J.** (1995), “Urinary cortisol analysis for monitoring adrenal activity in elephants.” Zoo Biology, 14, pp. 533-542.
- **Buechner H.K., Mackler S.F.** (1976), “Breeding behavior in the Indian rhinoceros. Proceedings of the AAZPA Annual Conference 1976”, pp. 153-180.
- **Burgess E.A., Lanyon J.M., Brown J.L., Blyde D., Keeley T.** (2012), “Diagnosing pregnancy in free-ranging dugongs using fecal progesterone metabolite concentrations and body morphometrics: A population application.” General and Comparative Endocrinology, 177, pp. 82-92.

- **Busso J.M., Ponzio M.F., Dabbene V., de Cuneo M.F., Ruiz R.D.** (2005) “Assessment of urine and fecal testosterone metabolite excretion in Chinchilla lanigera males.” *Animal Reproduction Science*, 86, pp. 339-351.
- **Carr N., Cohen S.** (2011), “The public faces of zoos: images of entertainment, education and conservation”, *Antrozoos*, 24, pp.175-189.
- **Clauss M., Hatt J.M.**, (2006), “The feeding of rhinoceros in captivity”, **International Zoo Yearbook**, 40, pp. 197-209
- **Clauss M., Polster C., Kienzle E., Wiesner H., Baumgartner K., von Houwald F., Ortman S., Streich W.J., Dierenfeld E.S.** (2005), “Studies on digestive physiology and feed digestibilities in captive Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*)”. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89 pp. 229–237.
- **Clemmons J.R., Buchholz R.** (1997), “Behavioural approaches to conservation in the wild”, Cambridge: Cambridge University Press.
- **Commissione europea** (2015), Direttiva UE sui giardini zoologici: documento sulle buone pratiche
- **Consiglio dell’Unione europea** (1999), “Direttiva 1999/22/CE del Consiglio del 29 marzo 1999 relativa alla custodia degli animali selvatici nei giardini zoologici”, *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. 100 del 2 maggio 2005.
- **Czekala N.M., Callison L.** (1996), “Pregnancy diagnosis in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) by salivary hormone analysis.”, *Zoo Biology*, 15, 37-44.
- **Czekala N.M., Roocroft A., Bates M., Allen J., Lasley B.L.** (1992), “Estrogen metabolism in the Asian elephant (*Elephas maximus*).”, *Zoo Biology*, 11, pp. 75-80.
- **DeGrazia D.** (2002), “Animal Rights: A Very Short Introduction”, Oxford: Oxford University Press.
- **Dittrich L.** (1967), “Breeding the Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) at Hanover Zoo”, *International Zoo Yearbook*, 7, pp. 161–162.
- **Donahue J., Trump E.** (2006), “The Politics of Zoos: Exotic Animals and their Protectors”, DeKalb, IL: Northern Illinois University Press.
- **Dutta A.K.** (1991), “Unicornis: the great Indian onehorned rhinoceros”, Delhi, Konark Publishers.

- **Earnhardt J.M.** (2010), “The Role of Captive Populations in Reintroduction Programs”, in: *Wild Mammals in Captivity: Principles and techniques*, ed. D.G. Kleiman, K.V. Thompson, and C. Kirk Baer, Chicago: University of Chicago Press, pp. 268-280.
- **EAZA (European Association of Zoos and Aquaria)** (2003), “From the EAZA Office: fifteen years E(C)AZA”, *EAZA Newsletter*, 44, pp.5-8.
- **Eisenberg J.F., Kleiman D.G.** (1977), “The usefulness of behavioural studies in developing captive breeding programmes for mammals”, *International Zoo Yearbook*, 17, pp. 81–89
- **Emslie R.** (2020), “*Ceratotherium simum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020”: e.T4185A45813880. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-1.RLTS.T4185A45813880.en>
- **Emslie R. e Brooks M.** (1999), “African Rhino: Status Survey and Action Plan” IUCN, Gland, Switzerland.
- **Emslie R., Milliken T., Talukdar B., Burgess G., Adcock K., Balfour D., Knight M.H.** (2019), “African and Asian Rhinoceroses – Status, Conservation and Trade: A report from the IUCN Species Survival Commission (IUCN/SSC) African and Asian Rhino Specialist Groups and TRAFFIC to the CITES Secretariat pursuant to Resolution Conf. 9.14 (Rev. CoP17)”. CoP18 Doc. 83.1 Annex 2. CITES Secretariat, Geneva, Switzerland. http://www.rhinoresourcecenter.com/pdf_files/156/1560170144.pdf.
- **Emslie R.H., Reid C., Tello J.** (2006), “Report on the different target species counted and evidence of poaching activity recorded during aerial surveys undertaken in Southern Garamba national park and adjoining Domaine de Chasse Gangala na Bodio”, Democratic Republic of Congo 17th-30th March 2006. APF/ICCN Report.
- **Estes R.D.** (1991), “The behavior guide to African mammals”, Berkeley, CA, University of California Press.
- **Fenske M.** (1996), “Saliva cortisol and testosterone in the guinea pig: Measures for the endocrine function of adrenals and testes.”, *Steroids*, 61, pp. 647-650.
- **Ferreira S.M., Hass T., Le Roex, N, Greaver, C., Simms, C.** (2018b), “Evaluating the protection of rhinoceroses from poaching”. Unpublished SANParks report.
- **Ferreira S.M., Le Roex N., Greaver C.** (2018a), “Species-specific drought impacts on black and white rhinoceroses”. Unpublished SANParks report

- **Festa-Bianchet M., Apollonio M.** (2003), “Animal behavior and wildlife conservation”, Washington, DC: Island Press.
- **Finotello P.L.** (2013), “Breve storia dei giardini zoologici italiani”, *Nuova Museologia*, 28, pp. 6-13.
- **Foose T.J.**, (1982), “Trophic Strategies of Ruminant Versus Nonruminant Ungulates”, PhD thesis, University of Chicago, Chicago, p. 337.
- **Fouraker M., Wagener T.** (Eds) (1996), “AZA rhinoceros husbandry manual”, Fort Worth, TX: Fort Worth Zoological Park
- **Frantzen M.A.J., Ferguson J.W.H., de Villiers M.S.** (2001), “The conservation role of captive African wild dogs (*Lycaon pictus*)”, *Biological Conservation*, 100, pp. 253-260.
- **Fraser J., Sickler J.** (2009), “Measuring the cultural impact of zoos and aquariums”, *International Zoo Yearbook*, 43, pp.103-112.
- **Freeman E.W., Meyer J.M., Bird J., Adendorff J., Schulte B.A., Santymire R.M.** (2014) “Impacts of environmental pressures on the reproductive physiology of subpopulations of black rhinoceros (*Diceros bicornis bicornis*) in Addo Elephant National Park”, *South Africa. Conservation Physiology*, 2.
- **Galama W.T., Graham L.H., Savage A.** (2004), “Comparison of fecal storage methods for steroid analysis in black rhinoceros (*Diceros bicornis*).”, *Zoo Biology*, 23, pp. 291-300.
- **Garnier J.N., Green D.I., Pickard A.R., Shaw H.J., Holt W.V.** (1998), “Non-invasive diagnosis of pregnancy in wild black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) by faecal steroid analysis.”, *Reproduction, Fertility and Development* 10, pp. 451-458.
- **Garnier J.N., Holt W.V., Watson P.F.**, (2002), “Non-invasive assessment of estrous cycles and evaluation of reproductive seasonality in the female wild black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*)”, *Reproduction*, 123, pp.877–889.
- **Goddard J.** (1967), “Mating and courtship of the black rhinoceros”, *East African Wildlife*, 4, pp. 69–75.
- **Gomez A., Jewell E., Walker S. L., Brown J. L.** (2004), “Use of salivary steroid analysis to assess ovarian cycles in the Indian rhinoceros.” *Zoo Biology*, 23, pp. 501-512.
- **Gordon I.J., Prins H.H.T.** (2008), “The Ecology of Browsing and Grazing”, Springer, Berlin
- **Gowda C.D.K.** (1969), “Breeding the great Indian rhinoceros at Mysore Zoo”, *International Zoo Yearbook*, 9, pp. 101–102.

- **Goymann W., Möstl E., van't Hof T., East M. L., Hofer H.** (1999), "Non-invasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*." *General and Comparative Endocrinology*, 114, pp. 340-348.
- **Graham L. H.** (2004), "Non-invasive monitoring of reproduction in zoo and wildlife species." *Annual Review of Biomedical Sciences*, 6, pp. 91-98.
- **Graham L., Schwarzenberger F., Möstl E., Galama W., Savage, A.** (2001), "A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum." *Zoo Biology*, 20, pp. 227-236.
- **Green A.J., Fuentes C., Figuerola J., Viedma C., Ramón N.** (2005), "Survival of marbled teal (*Marmaronetta angustirostris*) released back into the wild." *Biological Conservation*, 121, pp. 595-601.
- **Groenewald Y.** (2016), "Drought could kill more rhinos than poaching", *Oxpeckers Investigative Environmental Journalism*, <https://oxpeckers.org/2016/01/drought-could-kill-more-rhinos-than-poaching>.
- **Groves C.P., Fernando P. and Robovský J.** (2010), "The Sixth Rhino: A Taxonomic Re-Assessment of the Critically Endangered Northern White Rhinoceros" *PLoS ONE*, 5(4)
- **Harley E.H., de Waal M., Murray S., O'Ryan, C.** (2016), "Comparison of whole mitochondrial genome sequences of northern and southern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum*): the conservation consequences of species definitions", *Conservation Genetics*, 17(6), pp. 1285–1291
- **Hatchwell M., Rubel A., Dickie L. A., West C., Zimmermann A.** (2007) "Conclusion: the future of zoos", in A. Zimmerman, M. Hatchwell, L. Dickie, and C. West (eds), *Zoos in the 21st Century: Catalysts for Conservation?*, Cambridge: Cambridge University Press, pp. 343-360.
- **Heistermann M., Tari S., Hodges J.K.** (1993), "Measurement of faecal steroids for monitoring ovarian function in New World primates, *Callitrichidae*." *Journal of reproduction and fertility*, 99, pp. 243-251.
- **Heistermann M., Trohorsch B., Hodges J. K.** (1997), "Assessment of ovarian function in the African elephant (*Loxodonta africana*) by measurement of 5 α -reduced progesterone metabolites in plasma and urine." *Zoo Biology*, 16, pp. 273-284.
- **Hemsworth P.H.** (2003), "Human-animal interactions in livestock production", *Applied Animal Behaviour Science*, 81, pp. 185-198.

- **Hermes R., Goeritz F., Streich W.J., Hildebrandt T.B.** (2007), “Assisted reproduction in female rhinoceros and elephants - Current status and future perspective”, *Reproduction in Domestic Animals* 42, pp.33–44.
- **Hermes R., Göritz F., Portas T.J., Bryant B.R., Kelly J.M., Maclellan L.J., Keeley T., Schwarzenberger F., Walzer C., Schnorrenberg A., Spindler R.E., Saragusty J., Kaandorp S., Hildebrandt T.B.** (2009a), “Ovarian superstimulation, transrectal ultrasound-guided oocyte recovery, and IVF in rhinoceros.”, *Theriogenology*, 72, pp. 959-968.
- **Hermes R., Göritz F., Saragusty J., Sós E., Molnar V., Reid C.E., Schwarzenberger F., Hildebrandt T.B.** (2009b), “First successful artificial insemination with frozen-thawed semen in rhinoceros.”, *Theriogenology*, 71, pp. 393-399.
- **Hermes R., Hildebrandt T.B.**, (2011), “Rhinoceros theriogenology” In: Miller R.E., Fowler M.E. (Editors). *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*. Vol. 7. Elsevier Health Sciences, pp.546-561
- **Hermes R., Hildebrandt T.B., Blottner S., Walzer C., Silinski S., Patton M.L., Wibbelt G., Schwarzenberger F., Goritz F.** (2005), “Reproductive soundness of captive southern and northern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *Cs. cottoni*): evaluation of male genital tract morphology and semen quality before and after cryopreservation”, *Theriogenology*, 63, pp.219-238.
- **Hermes R., Hildebrandt T.B., Göritz F.** (2004), “Reproductive problems directly attributable to long-term captivity-asymmetric reproductive aging”, *Animal Reproduction Science*, 82-83, pp. 49–60.
- **Hermes R., Hildebrandt T.B., Walzer C. Göritz F., Patton M.L., Silinski S., Anderson M.J., Reid C.E., Wibbelt G., Tomasova K., Schwarzenberger F.** (2006), “The effect of long non-reproductive periods on the genital health in captive female white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *C.s. cottoni*)”, *Theriogenology*, 65, pp.1492–1515.
- **Hermes R., Hildebrandt T.B., Walzer C., Göritz F., Gray C., Niemuller C., Schwarzenberger F.** (2012), “Estrus induction in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*).”, *Theriogenology*, 78, pp. 1217-1223.
- **Hermes R., Hildebrandt T.B., Walzer C., Göritz F., Schwarzenberger F.** (2001). “Reproductive assessment in the captive white rhinoceroes – current standing.”, in: Ochs,

- A., Frädrich H. (Eds.), International Studbook for the African White Rhinoceros, 9° edizione, Zoological Garden Berlin, Berlin, Germany, pp. 4-13.
- **Hildebrandt T.B., Hermes R., Pratt N.C., Brown J.L., Montali R.J., Schmitt D.L., Fritsch G., Göritz F.** (2000), "Ultrasonography of the urogenital tract in elephants (*Loxodonta africana* and *Elephas maximus*): an important tool for assessing female reproductive function." *Zoo Biology*, 19, pp. 321-332.
 - **Hildebrandt T.B., Hermes R., Walzer C., Sos E., Molnar V., Mezosi L., Schnorrenberg A., Silinski S., Streich J., Schwarzenberger F., Goritz F.** (2007), "Artificial insemination in the anoestrous and the postpartum white rhinoceros using GnRH analogue to induce ovulation", *Theriogenology*, 67, pp. 1473-1484.
 - **Hindle J.E., Hodges J.K.** (1990), "Metabolism of oestradiol-17 b and progesterone in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*).", *Journal of reproduction and fertility*, 90, pp. 571-580.
 - **Hindle J.E., Möstl E., Hodges J.K.** (1992), "Measurement of urinary oestrogens and 20a-dihydroprogesterone during ovarian cycles of black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceroses." *Journal of Reproduction and Fertility*, 94, pp. 237-249.
 - **Hinrichs K.** (1997), "Irregularities of the estrous cycle and ovulation in mares", in: Youngquist R.S. (Ed.), *Current therapy in large animal theriogenology*, W.B. Saunders Company, London, UK, pp. 166-171.
 - **Hodges J.K., Green D.I.** (1989), "The development of an enzyme-immunoassay for urinary pregnanediol-3-glucuronide and its application to reproductive assessment in exotic mammals." *Journal of Zoology*, 219, pp. 89-99.
 - **Hodges J.K., Heistermann M.** (2003), "Field endocrinology: Monitoring hormonal changes in free-ranging primates.", in: *Field and laboratory methods in primatology*, ed. J.M. Setchell e D.J. Curtis, Cambridge: Cambridge University Press, pp. 282-294.
 - **Hodges K., Brown J., Heistermann M.** (2010), "Endocrine Monitoring of Reproduction and Stress", in: *Wild Mammals in Captivity: Principles and techniques*, ed. D.G. Kleiman, K.V. Thompson, and C. Kirk Baer, Chicago: University of Chicago Press, pp. 447-468.
 - **Holst B., Dickie L.A.** (2007), "How do national and International regulations and policies influence the role of zoos and aquariums in conservation?", in A. Zimmerman, M.

Hatchwell, L. Dickie, and C. West (eds), *Zoos in the 21st Century: Catalysts for Conservation?*, Cambridge: Cambridge University Press, pp. 22-33.

- **Hosey G., Melfi V., Pankhurst S.** (2013), *“Zoo Animals”*, Oxford University Press.
- **Hummel J., Südekum K.H., Streich W.J., Clauss M.** (2006), “Forage fermentation patterns and their implications for herbivore ingesta retention times”, *Functional Ecology*, 20, pp. 989–1002.
- **Hunt K.E., Wasser S.K.** (2003), “Effect of long-term preservation methods on fecal glucocorticoid concentrations of grizzly bear and African elephant.” *Physiological and Biochemical Zoology*, 76, pp. 918-928.
- **Hunter Jr. M.L.** (1995,) *“Fundamentals of Conservation Biology”*, Oxford: Blackwell Science.
- **Hutchins M.** (1984), “The mother–offspring relationship in mountain goats (*Oreamnos americanus*)”, PhD dissertation, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- **Hutchins M.** (2001), “Research: overview”, in C. E. Bell (ed.), *Encyclopedia of the World’s Zoos*, Chicago, IL/London: Fitzroy Dearborn, pp. 1076-1080.
- **Hutchins M., Geist V.** (1987), “Behavioural considerations in the management of mountain-dwelling ungulates”, *Mountain Research and Development*, 7, pp. 135–144
- **Hutchins M., Kreger M.D.** (2006), “Rhinoceros behaviour: implications for captive management and conservation”, *International Zoo Yearbook*, 40, pp. 150–173
- **Hutchins M., Sheppard C., Casedi G.** (1995), “Behavioral considerations in the captive management, propagation and reintroduction of endangered birds.”, in: *Captive conservation of endangered species*. Gibbons, E. F., Durrant, B., Demarest, J. (Eds). Albany, NY: State University of New York Press, pp. 263–289.
- **Hutchins M., Thomas P., Asa C.** (1996), “Pregnancy and parturition in captive mammals”, in: *Wild mammals in captivity: principles and techniques*. Kleiman, D. G., Allen, M. E., Thompson, K. V., Lumpkin, S. (Eds). Chicago, IL: University of Chicago Press, pp. 468–496.
- **IUCN (International Union for Conservation of Nature)** (1998), “IUCN guidelines for re-introductions”, IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group, Gland, Switzerland.
- **IUDZG/CBSG (International Union of the Directors of Zoological Gardens/Conservation Breeding Specialist Group) (The World Zoo Organization and the Captive Breeding Specialist Group of the IUCN/SSC)** (1993), *“The World Zoo Conservation Strategy: The*

Role of the Zoos and Aquaria of the World in Global Conservation”, Chicago, IL: Chicago Zoological Society.

- **Jamieson D.** (1995), “Zoo Revisited”, B. G. Norton, M. Hutchins, E. Stevens, and T. L. Maple (eds), *Ethics on the Ark: Zoos, Animal Welfare and Wildlife Conservation*, Washington, DC: Smithsonian Institution Press, pp. 52-66.
- **Kawaguchi K., Fujii S., Konishi I., Nanbu Y., Nonogaki H., Mori T.** (1989), “Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle.” *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 160, pp. 637-641.
- **Keay J. M., Singh J., Gaunt M. C., Kaur T.** (2006), “Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: a literature review.”, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37, pp. 234-244.
- **Kiefer B.** (2002), “Qualität und Verdaulichkeit der vom Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum simum*) aufgenommenen Nahrung”. Vet. med. thesis, University of Munich, Germany.
- **Kleiman D.** (1980), “The sociobiology of captive propagation. In *Conservation biology: an evolutionary–ecological perspective*” Soule, M. E., Wilcox, B. A. (Eds). Sunderland, MA: Sinauer Associates, pp. 243–261
- **Kleiman D.G** (1996), “Reintroduction programs”, in: *Wild mammals in captivity: Principles and techniques*, ed. D. Kleiman, M. Allen, K. Thompson, and S. Lumpkin, Chicago: University of Chicago Press, pp. 297-314.
- **Kleiman D.G.** (1989), “Reintroduction of captive mammals for conservation: guidelines for reintroducing endangered species into the wild”, *Bioscience*, 39, pp. 152–161
- **Kleiman D.G.** (2010), introduzione a “Reproductive Physiology”, in: *Wild Mammals in Captivity: Principles and techniques*, ed. D.G. Kleiman, K.V. Thompson, and C. Kirk Baer, Chicago: University of Chicago Press, pp. 411-428
- **Kleiman D.G., Beck B.B., Dietz J.M., Dietz L.A., Ballou J.D., Coimbra-Filho A.C.** (1986), “Conservation program for golden leon tamarins: captive research and management, ecological studies, educational strategies and reintroduction”, in K. Benirschke (ed.), *Primates: The Road to Self-Sustaining Populations*, New York: Springer, pp. 959-979.
- **Korody M.L., Pivaroff C., Nguyen T.D., Peterson S.E., Ryder O.A., Loring J.F.** (2017) “Four new induced pluripotent stem cell lines produced from northern white rhinoceros with non-integrating reprogramming factors.” *bioRxiv*

- **Kretzschmar P., Ganslosser U., Dehnhard M.** (2004), “Relationship between androgens, environmental factors and reproductive behavior in male white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*)”, *Hormones and Behavior*, 45, pp. 1–9.
- **Lane J.** (2006), “Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals?” *Animal Welfare*, 15, pp. 331-342.
- **Laurie A.** (1982), “Behavioural ecology of the greater one-horned rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*)”, *Journal of Zoology*, 196, pp. 307–341.
- **LeNiendre P, Boivin X., Boissy A.** (1996), “Handling of extensively kept animals”, *Applied Animal Behaviour Science*, 49, pp. 73-81.
- **Lindemann H.** (1982), “African rhinoceros in captivity.”, MSc. Thesis, University of Copenhagen, Denmark.
- **Maruo T., Matsuo H., Samoto T., Shimomura Y., Kurachi O., Gao Z., Wang Y., Spitz I.M., Johansson E.** (2000), “Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis.” *Steroids*, 65, pp. 585-592.
- **Mason P.** (2008) “Roles of the modern zoo: conflicting or complementary?”, *Tourism Review International*, 11, pp.251-263.
- **Mellen J.D, Ellis S.** (1996), “Animal learning and husbandry training techniques”, in: D.G Kendra, M.E. Allen, K.V. Thompson, S. Lumpkin (eds), *Wild Mammal in Captivity: Principles and Techniques*, Chicago, IL: University of Chicago Press, pp. 88-99.
- **Mench J., Mason G.J.** (1997), “Behaviour. In *Animal welfare*”, pp. 127–141, Appleby, M. C. & Hughes, B. O. (Eds). Wallingford: CAB International
- **Miller B., Biggins D., Vargas A., Hutchins M., Hanebury L., Godbey J., Anderson S., Wemmer C., Oldemeier J.** (1998), “The captive environment and reintroduction: the black-footed ferret as a case study with comments on other taxa”, in: *Second nature: environmental enrichment for captive animals*. Shepherdson, D., Mellen, J., Hutchins, M. (Eds.) Washington, DC: Smithsonian Institution Press, pp. 97–112
- **Miller M.A.** (2003), “Rhinocerotidae (Rhinoceroses)”, in: Fowler ME, Miller R.E. (Editors). *Zoo and wild animal medicine*, ed.5, St. Louis, MO, Saunders.
- **Miller M.A., Buss P.E.** (2012), “Rhinocerotidae (Rhinoceroses)”, in: Miller R.E., Fowler M.E. (Editors). *Fowler's Zoo and wild animal medicine*, Vol. 8., Elsevier Health Sciences, pp.574-583.

- **Millspaugh J.J., Washburn, B.E.** (2003). “Within-sample variation of fecal glucocorticoid measurements.”, *General and Comparative Endocrinology*, 132, pp. 21-26.
- **Millspaugh, J. J., Washburn, B. E.** (2004), “Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation.”, *General and Comparative Endocrinology*, 138, pp. 189–199.
- **Monfort S.L.** (2003), “Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations.”, in: *Reproduction and integrated observation science*, ed. D. E. Wildt, W. Holt, A. Pickard, Cambridge: Cambridge University Press pp. 147-165.
- **Monfort S.L., Harvey-Devorshak E., Geurts L., Williamson L.R., Simmons H., Padilla L., Wildt D.E.** (1995), “Urinary androstanediol glucuronide is a measure of androgenic status in Eld’s deer stags (*Cervus eldi thamin*).”, *Biology of Reproduction*, 53, pp. 700-706.
- **Monfort S.L., Wasser S.K., Mashburn K.L., Burke M., Brewer B.A., Creel, S.R.** (1997), “Steroid metabolism and validation of noninvasive endocrine monitoring in the African wild dog (*Lycaon pictus*).” *Zoo Biology*, 15, pp. 533-548.
- **Moodley Y., Russo I.-R.M., Robovsky J., Dalton D., Kotzé A., Smith S., Stejskal J., Ryder O.A., Hermes R., Walzer C., Bruford M.W.** (2018), “Contrasting evolutionary history, anthropogenic declines and genetic contact in the northern and southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum*)”, *Proceedings B of the Royal Society of London*, 285, pp. 1–9.
- **Moreira N., Monteiro-Filho E.L.A., Moraes W., Swanson W.F., Graham L.H., Pasquali O.L., Gomes M.L.F., Morais R.N., Wildt D.E., Brown J.L.** (2001), “Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus.”, *Zoo Biology*, 20, pp. 103-116.
- **Möstl E., Palme R.** (2002), “Hormones as indicators of stress.”, *Domestic Animal Endocrinology*, 23, pp. 67-74
- **Möstl E., Rettenbacher S., Palme R.** (2005), “Measurement of corticosterone metabolites in birds’ droppings: an analytical approach.” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046, pp. 17-34.
- **Nardelli F.** (1988), “The rhinoceros: A monograph”, London, U.K., Basilisk Press
- **O’Toole L., Fielding A.H., Haworth P.F.** (2002), “Re-introduction of the golden eagle into the Republic of Ireland.” *Biological Conservation*, 103, pp. 303-312.

- **O'Brien J.K., Roth T.L.** (2000), "Post-coital sperm recovery and cryopreservation in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*) and application to gamete rescue in the African black rhinoceros (*Diceros bicornis*)", *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, pp.263-271.
- **Owen-Smith N.** (1975), "The social ethology of the white rhinoceros *Ceratotherium simum* (Burchell, 1817)", *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 38, pp. 337–384
- **Owen-Smith N.** (2004), "Rhinoceroses" in: Grzimek's animal life encyclopedia (2nd edn), 15. Mammals IV, Hutchins, M., Kleiman, D. G., Geist, V., McDade, M. (Eds). Farmington Hills, MI: Gale Group, pp. 249–262.
- **Owen-Smith N.**, (1988), "Megaherbivores: the influence of very large body size on ecology", Cambridge University Press, Cambridge
- **Owen-Smith R.N.** (1973), "The behavioral ecology of the white rhinoceros." Ph.D. Dissertation. University of Wisconsin.
- **Palme R., Möstl E.** (1997), "Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood." *Z. Säugetierkunde*, 62, pp. 162-167.
- **Patton M.L., Swaisgood R.R., Czekala N.M., White A.M., Fetter G.A., Montagne J.P., Reiches R.G., Lance V.A.** (1999), "Reproductive cycle length and pregnancy in southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) as determined by fecal pregnane analysis and observation of mating behavior", *Zoo Biology*, 18, pp. 111–127.
- **Pearce J.M.** (2008), "Animal Learning and Cognition" (3° edizione), Hove: Psychology Press.
- **Pennington P.M., Durrant B.S.** (2019), "Assisted reproductive technologies in captive rhinoceroses", *Mammal Review*, 49, pp. 1-15.
- **Poole T.B.** (1998) "Meeting a mammal's psychological needs" in: *Second nature: environmental enrichment and captive animals*. Shepherdson, D. R., Mellen, J. D. & Hutchins, M. (Eds). Washington, DC: Smithsonian Institution Press, pp. 83–94.
- **Portas T.J., Hermes R., Bryant B.R.** (2005), "Seminoma in a southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*)", *Vet Record*, 157, pp.556–558.
- **Rabiee A.R., Macmillan K.L., Schwarzenberger F.** (2001), "The effect of level of feed intake on progesterone clearance rate by measuring faecal progesterone metabolites in grazing dairy cows." *Animal Reproduction Science*, 67, pp. 205-214.

- **Rabiee A.R., Macmillan K.L., Schwarzenberger F.** (2002), "Plasma, milk and faecal progesterone concentrations during the oestrous cycle of lactating dairy cows with different milk yields." *Animal Reproduction Science*, 74, pp. 121-131
- **Radcliffe R.W., Bommarito M.P., Osofsky S.A.** (1996), "Ultrasonography as a tool in the conservation of the african rhinoceros: ex situ and in situ applications", *Pachyderm*, 21, pp. 55-59.
- **Radcliffe R.W., Czekala N.M., Osofsky S.A.** (1997) "Combined serial ultrasonography and fecal progesterin analysis for reproductive evaluation of the female white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*): preliminary results." *Zoo Biology*, 16, pp. 445-456.
- **Radcliffe R.W., Eyres A.I., Patton M.L., Czekala N.M., Emslie R.H.** (2001), "Ultrasonographic characterization of ovarian events and fetal gestational parameters in two southern black rhinoceros (*diceros bicornis minor*) and correlation to fecal progesterone", *Theriogenology*, 55, pp. 1033-1049.
- **Radcliffe R.W., Morkel PvdB,** (2007), "Rhinoceros anesthesia". In West G, Heard D, Cawklett N, editors: *Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia*, Ames, IA, Blackwell Publishing.
- **Radcliffe R.W., Osofsky S.A., Eyres A.I.** (1995) "Design and applications of a "free-stall" chute for passive restraint of the non-sedated white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*)", in: *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians! Wildlife Disease Association/American Association of Wildlife Veterinarians*. Edited by R.E. Junge. East Lansing, Michigan, USA, pp. 430-434.
- **Ramsay E.C., Kasman L.H., Lasley B.L.** (1987), "Urinary steroid evaluations to monitor ovarian function in exotic ungulates. V. Estrogen and pregnanediol-3-gluronide excretion in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*).", *Zoo Biology*, 6, pp. 275-282.
- **Raven P.H.** (2002), "Science, sustainability, and the human prospect", *Science*, 297, pp. 954-958.
- **Reaka-Kudka M. L., Wilson D. E., Wilson E. O.** (eds) (1996), "Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources", Washington, DC: Joseph Henry Press.
- **Rein M.S., Barbieri R.L., Freidman A.J.** (1995), "Progesterone A critical role in the pathogenesis of uterine myomas." *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 172, pp. 14-18.

- **Riad-Fahmy D., Read F., Walker R. F., Griffiths K.** (1982), “Steroids in saliva for assessing endocrine function.”, *Endocrine Review*, 4, pp. 367-395.
- **Ritchie A.T.A.** (1963), “The black rhinoceros (*Diceros bicornis* L.)”, *East African Wildlife Journal*, 1, pp. 54-62.
- **Rolland R.M., Hunt K.E., Kraus S.D., Wasser S.K.** (2005), “Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites.”, *General and Comparative Endocrinology*, 142, pp. 308-317.
- **Roth T.L.** (2006), “A review of the reproductive physiology of rhinoceros species in captivity”, *International Zoo Yearbook*, 40, pp. 130-143.
- **Roth T.L., Bateman H.L., Kroll J.L., Steinetz B.G., Reinhart P.R.** (2004), “Endocrine and ultrasonographic characterization of a successful pregnancy in a Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*) supplemented with a synthetic progestin.”, *Zoo Biology*, 23, pp. 219-238.
- **Roth T.L., O’Brien J.K., McRae M.A., Bellem A.C., Romo S. J., Kroll J.L., Brown J.L.** (2001), “Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian cycle and early pregnancy in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*).” *Reproduction*, 121, pp. 139-149.
- **Roth T.L., Schook M.W., Stoops M.A.** (2018), “Monitoring and controlling ovarian function in the rhinoceros.”, *Theriogenology*, 109, pp. 48-57.
- **Roth T.L., Stoops M.A., Atkinson M.W., Blumer E.S., Campbell M.K., Cameron K.N., Citino S.B., Maas A.K.** (2005), “Semen collection in rhinoceroses (*Rhinoceros unicornis*, *Diceros bicornis*, *Ceratotherium simum*) by electroejaculation with a uniquely designed probe”, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36, pp. 617-627
- **Saragusty J., Diecke S., Drukker M., Durrant B., Friedrich Ben-Nun I., Galli C., Göritz F., Hayashi K., Hermes R., Holtze S., Johnson S., Lazzari G., Loi P., Loring J.F., Okita K., Renfree M.B., Seet S., Voracek T., Stejskal J., Ryder O.A., Hildebrandt T.B.** (2016), “Rewinding the process of mammalian extinction.”, *Zoo Biology*, 35, pp. 280-292.
- **Schaffer N., Bryant W., Agnew D., Meehan T., Beehler B.** (1998), “Ultrasonographic monitoring of artificially stimulated ejaculation in three rhinoceros species (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*, *Rhinoceros unicornus*)”, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29, pp.386–393.

- **Schaffer N.E., Beehler B., Jeyendran R.S., Balke B.** (1990), “Methods of semen collection in an ambulatory greater one-horned rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*)”, *Zoo Biology*, 9, pp. 211–221.
- **Schaffer N.E., Beehler B.A.** (1990), “Preliminary studies on the anatomy and ultrasonic images of the reproductive structures of three species of rhinoceroses (*Rhinoceros unicornis*, *Diceros bicornis*, *Ceratotherium simum*).”, in: *Proceedings of the american association of zoo veterinarians*, South Padre Island, TX, pp. 215-220.
- **Schaffer N.E., Foley G.L., Gill S., Pope C.E.** (2001), “Clinical implications of rhinoceros reproductive tract anatomy and histology”, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 32, pp.31–46.
- **Schaffer N.E., Zainal-Zahari, Z., Suri, M.S.M., Jainudeen, M.R., Jeyendran, R.S.** (1994), “Ultrasonography of the reproductive anatomy in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*)”, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 25, pp. 337–348.
- **Schatz S., Palme R.** (2001), “Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function”, *Veterinary Research Communications*, 25, pp. 271-287.
- **Schenkel R., Schenkel-Hullinger L.** (1969a), “Ecology and behaviour of the black rhinoceros (*Diceros bicornis* L.): a field study”, Hamburg, Paul Parney.
- **Schenkel R., Schenkel-Hullinger L.** (1969b), “The Javan rhinoceros in Ujung Kulon Nature Reserve: its ecology and behaviour”, *Acta Tropica*, 26, pp. 98–135.
- **Schwarzenberger F., Möstl E., Palme R., Bamberg, E.** (1996b), “Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals.”, *Animal Reproduction Science*, 42, pp. 515-526.
- **Schwarzenberger F., Palme R., Bamberg E., Möstl, E.** (1997), “A Review of Faecal Progesterone Metabolite Analysis for Non-Invasive Monitoring of Reproductive Function in Mammals”, *Zeitschrift Fuer Saeugetierkunde*, Germany.
- **Schwarzenberger F., Rietschel W., Vahala J., Holeckova D., Thomas P., Maltzan J., Baumgartner K., Schaftenaar W.** (2000), “Fecal progesterone, estrogen, and androgen metabolites for noninvasive monitoring of reproductive function in the female Indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*.” *General and Comparative Endocrinology*, 119, pp. 300-307.

- **Schwarzenberger F., Toma S.K., Hole C.D., Matern B., Mi S.E.** (1996a), “Measurement of fecal steroids in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) using group-specific enzyme immunoassays for 20-oxo-pregnanes.” *Zoo Biology*, 15 pp. 159-171.
- **Schwarzenberger F., Tomasova K., Holeckova D., Matern B., Möstl E.** (1996c), “Measurement of faecal steroids in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) using group-specific enzyme immunoassays for 20-oxo-pregnanes.” *Zoo Biology*, 15, pp. 159-171.
- **Schwarzenberger F., Walzer C., Tomasova K., Vahala J., Meister J., Goodrowe K.L., Zima J., Straub F., Lynch M.** (1998), “Fecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*)”, *Animal Reproduction Science*, 53, pp.173–190.
- **Schwarzenberger, F.** (2007), “The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species”. *International Zoo Yearbook*, 41, pp. 52-74.
- **Schwarzenberger, F., Brown, J.** (2013), “Hormone monitoring: An important tool for the breeding management of wildlife species.”, *Wiener tierärztliche Monatsschrift*, 100, pp. 209-225.
- **Shideler S.E., Savage A., Ortuno A.M., Moorman E.A., Lasley B.L.** (1994), “Monitoring female reproductive function by measurement of fecal estrogen and progesterone metabolites in the white- faced saki (*Pithecia pithecia*).” *American Journal of Primatology*, 32, pp. 95-108.
- **Short H., Blair R., Segelquist C.,** (1974), “Fiber composition and forage digestibility by small ruminants” *J. Wildlife Manag.* 38, pp. 197–209.
- **Silva A.R., Moreira N., Pereira A.F., Peixoto G.C., Maia K.M., Campos L.B., Borges A.A.** (2017), “Estrus Cycle Monitoring in Wild Mammals: Challenges and Perspectives.”, *Theriogenology*, Rita Payan Carreira, IntechOpen, London, UK.
- **Sopelak V.M., Butcher R.L.** (1982). “Decreased amount of ovarian tissue and maternal age affect embryonic development in old rats.” *Biology of Reproduction*, 27, pp. 449-455.
- **Stevens C.E., Hume I.D.** (1995), “Comparative physiology of the vertebrate digestive system”, Cambridge: Cambridge University Press.
- **Stoinskin T. S., Beck B., Bowman M., Lehnhardt J.** (1997) “The Gateway zoo program: a recent initiative in golden leon tamarin reintroduction”, *American Society of Primatologists, Special Topics in Primatology*, 1, pp.29-41.

- **Stoops M.A., Campbell M.K., DeChant C.J., Hauser J., Kottwitz J., Pairan R.D., Shaffstall W., Volle K., Roth T.L.** (2016), “Enhancing captive Indian rhinoceros genetics via artificial insemination of cryopreserved sperm.”, *Animal Reproduction Science*, 172, pp. 60-75.
- **Stoops M.A., Pairan R.D., Roth T.L.** (2004), “Follicular, endocrine and behavioral dynamics of the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) estrous cycle”, *Reproduction*, 128, pp. 843–856.
- **Stoops M.A., West G.D., Roth T.L., Lung N.P.** (2014), “Use of urinary biomarkers of ovarian function and altrenogest supplementation to enhance captive breeding success in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*).” *Zoo Biology*, 33, pp. 83-88.
- **Strike T., Pickard A.** (2000), “Non-invasive hormone analysis for reproductive monitoring in female southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*)”, in: A.B. Plowman ed., 2000, 2nd Annual Symposium on Zoo Research. Paignton, Devon, 6-7 Luglio 2000. Londra: Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland.
- **Swaigood R.R., Dickman D.M., White A.M.** (2006), “A captive population in crisis: Testing hypotheses for reproductive failure in captive-born southern white rhinoceros females”, *Biological Conservation*, 129, 4, pp. 468-476.
- **Sydney J.** (1965), “The past and present distribution of some African ungulates”, *Transactions of the Zoological Society of London*, 3, pp. 1–397.
- **Terio K.A., Brown J.L., Moreland R., Munson L.** (2002), “Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah.”. *Zoo Biology*, 21, pp. 215-222.
- **Touma C., Palme R.** (2005), “Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation.” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046, pp. 54-74.
- **UN (United Nation)** (1973), “Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES)”, Washington, DC: UNEP.
- **UN (United Nation)** (1992), “Convention on Biodiversity (CBD)”, *International Environmental Laws: Multilateral Treaties*, 992, pp.1-43.
- **van der Goot A.C., Dalerum F., Ganswindt A., Martin G.B., Millar R.P., Paris M.C.J.** (2013), “Faecal progestagen profiles in wild southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*)”, *African Zoology*, 48, pp. 143-151.

- **van der Goot A.C., Martin G.B., Millar R.P., Paris M.C., Ganswindt A.** (2015) “Profiling patterns of fecal 20-oxopregnane concentrations during ovarian cycles in free-ranging southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*)”. *Animal Reproduction Science*, 161, pp. 89-95.
- **Van Gyseghem R.** (1984), “Observations on the ecology and behaviour of the northern white rhinoceros (*Ceratotherium simum cottoni*)”. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 49, pp. 348–358.
- **Ververs C., van Zijl Langhout, M., Govaere J., Van Soom A.,** (2015), “Features of reproduction and assisted reproduction in the white (*Ceratotherium simum*) and black (*Diceros bicornis*) rhinoceros”, *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 84(4), pp.175-187.
- **von der Ohe, C. G., Servheen, C.** (2002), “Measuring stress in mammals using fecal glucocorticoids: opportunities and challenges.”, *Wildlife Society Bulletin*, 30, pp. 1215-1225.
- **Wagner R.A.** (1986), “Monitoring the reproductive cycle of one southern white rhinoceros.” In: Silberman MS, Silberman SD, editors. *Proceedings of the Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians*, pp. 14–15
- **Waiblinger S., Boivin X., Pedersen V., Tosi M-V, Janczak A.M., Visser E.K., Jones R.B.** (2006) “Assessing the human-animal relationship in farmed species: a critical review”, *Applied Animal Behaviour Science*, 101, pp. 185-142.
- **Walker C.L.** (2002), “Role of hormonal and reproductive factors in the ethiology and treatment of uterine leiomyoma.”, *Recent Progress in Hormone Research*, 57, pp. 277-293.
- **Walker S.L., Waddell W.T., Goodrowe, K.L.** (2002), “Reproductive endocrine patterns in captive female and male red wolves (*Canis rufus*) assessed by fecal and serum hormone analysis.”, *Zoo Biology*, 21, pp. 321-335.
- **Wanless R.M., Cunningham J., Hockey P.A.R., Wanless J., White R.W., Wiseman R.** (2002), “The success of a soft-release reintroduction of the flightless Aldabra rail (*Dryolimnas [cuvieri] aldabranus*) on Aldabra Atoll, Seychelles.”, *Biological Conservation*, 107, pp. 203-210.
- **Wasser S.K., Papageorge S., Foley C., Brown J.L.** (1996), “Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid

concentrations throughout the estrous cycle.” *General and Comparative Endocrinology*, 102, pp. 255-262.

- **WAZA (World Association of Zoos and Aquariums)** (1999), “Code of Ethics”, Liebefeld-Berne: WAZA
- **WAZA (World Association of Zoos and Aquariums)** (2005), “Building a Future for Wildlife: The World Zoo and Aquarium Conservation Strategy”, Liebefeld-Berne: WAZA Executive Office.
- **WAZA (World Association of Zoos and Aquariums)** (2009), “Turning the Tide: A global Aquarium Strategy for Conservation and Sustainability”, Berne: WAZA
- **Whitten P.L., Brockman D.K., Stavisky R.C.** (1998), “Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone–behavior interactions.”, *Yearbook of Physical Anthropology*, 41 pp. 1-23.
- **Whitten P.L., Stavisky R.C., Aureli F., Russell E.** (1998), “Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*)”. *American Journal of Primatology*, 44, pp. 57-69.
- **Wildt D.E., Ellis S., Janssen, D., Buff J.** (2003), “Toward more effective reproductive science for conservation.”, in: *Reproductive science and integrated conservation*, eds W. V. Holt, A. R. Pickard, J. C. Rodger & D. E. Wildt), Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 2-20.
- **Williams K.R., Dyche W.K., Brinders J., Molteno F., van der Lanken M., Armstrong D.L., Simmons L.G.** (1995), “Longevity in vitro and glycerol toxicity of epididymal sperm recovered from a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*)”, *Theriogenology*, 43, pp. 353-353.
- **Wilson E. O.** (ed.) (1988), “BioDiversity”, Washington, DC: National Academy Press.
- **WRI/IUCN/UNEP/FAO/UNESCO (World Resources Institute/ The World Conservation Union/ United Nations Environment Programme in consultation with Food and Agriculture Organization and the United Nations Education, Scientific and Cultural Organization)** (1992), “Global Biodiversity Strategy: Guidelines for Action to Save, Study and Use Harth’s Biotic Wealth Sustainably and Equitably”, Washington, DC: WRI.
- **Young E.** (1967), “Semen extraction by manipulative technique in the Black rhinoceros *Diceros bicornis*”, *International Zoo Yearbook*, 7, pp. 166-167.

- **Zainal-Zahari Z., Rosnina Y., Wahid H., Jainudeen M.R.** (2002), “Gross anatomy and ultrasonographic images of the reproductive system of the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*)”, *Anatomia Histologia Embryologia*, 31, pp. 350–354.
- **Ziegler T. E., Wittwer D. J.** (2005), “Fecal steroid research in the field and laboratory: improved methods for storage, transport, processing, and analysis.”, *American Journal of Primatology*, 67, pp. 159-174.
- **Zimmermann A., Wilkinson R.** (2007), “The conservation mission in the wild: zoo and conservation NGOs?”, in A. Zimmerman, M. Hatchwell, L. Dickie, and C. West (eds), *Zoos in the 21st Century: Catalysts for Conservation?*, Cambridge: Cambridge University Press, pp. 303-322.

Sitografia

- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
<http://www.cites.org/>
- International Rhino Foundation
<http://www.rhinos.org/>
- International Union for the Conservation of Nature and Natural Resource (World Conservation Union)
<http://www.iucn.org/>
- IUCN Red List of Threatened Species
<http://www.iucnredlist.org/>
- Parco Faunistico Le Cornelle
<http://www.lecornelle.it/>
- Unione Italiana Zoo e Acquari
<http://www.uiza.org/>