

Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (Leibniz-IZW), Avantea Srl, Safari Park Dvůr Králové, Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association (Max Delbrück Center), Osaka University, **University of Padua**, Ol Pejeta Conservancy, Kenya Wildlife Service (KWS) & Wildlife Research and Training Institute (WRTI)

PER CONTRASTARE L'ESTINZIONE DEL RINOCERONTE

Su «Reproduction» pubblicati i risultati della valutazione di 65 procedure di prelievo di ovuli, maturazione in vitro degli ovociti e fecondazione in vitro

Data: 31 ottobre 2023

Il progetto BioRescue sviluppa e sperimenta tecnologie avanzate di riproduzione assistita (advanced assisted reproduction technologies, aART) per far fronte all'imminente estinzione della maggior parte delle specie e sottospecie di rinoceronte. In una nuova analisi scientifica pubblicata sulla rivista "Reproduction", l'équipe ha valutato 65 procedure aART condotte dal 2015 al 2022, comprendenti la stimolazione ormonale ovarica, il prelievo di ovuli (ovum pick-up, OPU), la maturazione in vitro degli ovociti, la fecondazione in vitro (IVF), la coltura di embrioni e la crioconservazione. La valutazione ha dimostrato che l'aART è sicura per le femmine donatrici, senza effetti dannosi per la salute, e rappresenta una tecnica di successo in quanto ha permesso di ottenere 51 embrioni. In effetti, le OPU regolari hanno giovato alla salute riproduttiva delle singole femmine di rinoceronte, migliorando la funzione ovarica, aumentando il numero di follicoli e favorendo la regressione di formazioni patologiche come le cisti ovariche.

Dal momento che la maggior parte delle specie e sottospecie di rinoceronte sono soggette ad una riduzione della riproduzione naturale e sono minacciate di estinzione, sono necessari nuovi approcci per la loro conservazione. Uno dei più promettenti è l'applicazione di tecnologie avanzate di riproduzione assistita (aART) come l'ovum pick-up (OPU) - il prelievo di ovociti immaturi dalle ovaie - e la fecondazione in vitro (IVF). Queste tecnologie consentono di creare embrioni in laboratorio, i quali possono poi essere trasferiti in madri surrogate per portare a termine la gestazione.

L'applicazione di aART è l'unica opzione per creare una progenie per il rinoceronte bianco settentrionale, una sottospecie di cui si conoscono solo due individui in vita - due femmine che non possono più rimanere incinte per portare avanti i propri embrioni.

Il progetto BioRescue, guidato dal Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (Leibniz-IZW), sviluppa e sperimenta queste tecnologie per migliorare il successo riproduttivo dei rinoceronti bianchi meridionali affidati all'uomo e per salvare il rinoceronte bianco settentrionale dall'estinzione. Il consorzio ha come priorità la sicurezza e il benessere degli animali coinvolti, il controllo di qualità e la valutazione del rischio etico, e valuta costantemente le sue nuove procedure scientifiche e veterinarie.

BioRescue ha eseguito 65 procedure aART dal 2015 al 2022 e ora ha pubblicato una valutazione di questi dati sulla rivista scientifica "Reproduction". Il team di autori, composto da Prof. Thomas Hildebrandt, Dr. Frank Göritz, Dr.ssa Susanne Holtze (del Leibniz-IZW), Dr.ssa Silvia Colleoni e Prof. Cesare Galli (di Avantea srl.), ha analizzato la salute degli animali e gli effetti su di essa delle procedure, e di fattori come età, stagionalità, la sottospecie e l'origine degli individui, lo stato ormonale e la ciclicità, nonché gli effetti del protocollo di stimolazione

in relazione alle percentuali di successo dell'OPU e della IVF con 20 femmine di rinoceronte bianco del sud e due del nord. I risultati più importanti sono:

- L'insieme delle procedure si è rivelato una garanzia di **successo per la produzione di embrioni di rinoceronte bianco**. Complessivamente, sono stati contati 1505 follicoli ovarici mediante ecografia transrettale. Di questi, 1171 follicoli sono stati perforati, risciacquati e aspirati. Il team ha recuperato 402 ovociti, 393 dei quali sono stati trasportati con successo al laboratorio Avantea. 150 di essi hanno potuto essere maturati e fecondati mediante iniezione piezo-intracitoplasmatica di sperma (ICSI) con una singola cellula spermatica. 75 embrioni si sono scissi e 51 blastocisti sono state infine crioconservate: 19 meridionali, 22 settentrionali e 10 ibridi con ovociti di rinoceronte bianco meridionale e spermatozoi di rinoceronte bianco settentrionale. Il numero di ovociti raccolti per procedura, il tasso di recupero degli ovociti e il tasso di successo nella produzione di embrioni sono **aumentati considerevolmente nel tempo** grazie all'ottimizzazione tecnica, al miglioramento delle prestazioni del team e agli effetti benefici accumulati da ripetute OPU sulla salute riproduttiva delle donatrici.
- Le OPU ripetute **non hanno dato indicazioni di effetti negativi sulla salute generale e riproduttiva**, come infiammazioni, alterazioni patologiche o calo della risposta alla stimolazione ovarica. Non ci sono state evidenze di effetti dannosi di procedure ripetute di OPU con precedente stimolazione ormonale sulla salute riproduttiva, sulla fertilità, sull'attività ciclica, sulla morfologia ovarica, sul numero di follicoli o sul successo in tutti i livelli del programma di IVF. È interessante notare che il rischio di anestesia è stato valutato come trascurabile, in quanto l'anestesia è risultata priva di complicazioni in tutte le 65 procedure riportate e in più di 500 procedure eseguite dal team su rinoceronti bianchi per la raccolta dello sperma, la valutazione della salute o l'inseminazione artificiale in passato. Anche nella femmina di rinoceronte bianco settentrionale Fatu, dopo dieci interventi eseguiti a intervalli di tre mesi, non sono stati riscontrati effetti dannosi o rischi.
- In effetti, vi sono chiare indicazioni di **benefici per la salute degli individui esposti agli OPU**. Una struttura ovarica cistica patologica in Fatu è regredita da 50 mm a 15 mm di diametro in tre anni e a seguito di 10 OPU. Dopo la rimozione di cisti ovariche in due rinoceronti bianchi meridionali durante le procedure di OPU, il numero di follicoli è aumentato e la morfologia delle ovaie è migliorata. La degenerazione del tratto riproduttivo è comune nelle femmine di rinoceronte che non si accoppiano regolarmente e non portano a termine una gravidanza. La degenerazione porta a una riduzione della fertilità e all'interruzione prematura della vita riproduttiva. Ripetute OPU possono impedire che ciò accada e aiutare a preservare o addirittura a ripristinare la salute riproduttiva, conclude il team di BioRescue.
- Le procedure di OPU **non ostacolano la riproduzione naturale**. Due femmine sono rimaste incinte a seguito di accoppiamento naturale, rispettivamente dopo quattro e cinque OPU. Una femmina di rinoceronte bianco meridionale precedentemente non in ciclo ovarico ha ripreso l'ovulazione, è rimasta incinta e ha partorito un figlio maschio sano dopo due OPU di successo. Ciò indica un'influenza positiva sull'attività ovarica. Poiché l'OPU ha migliorato la salute riproduttiva del rinoceronte bianco, questa "pulizia meccanica delle ovaie" potrebbe servire come trattamento opzionale di ripristino della fertilità per le femmine subfertili o infertili con patologie riproduttive minori, conclude il team.
- **L'età della donatrice di ovociti è fondamentale per il successo della IVF**. Nel gruppo di studio, non sono stati recuperati ovociti in circa la metà delle OPU con femmine di rinoceronte bianco di età superiore ai 24 anni. Nelle femmine di 24 anni o più giovani, solo il 6% delle OPU non ha prodotto ovociti. Il team non è stato in grado di produrre embrioni allo

stadio di blastocisti pronti per la crioconservazione da individui di età superiore ai 24 anni. Questi risultati implicano che il successo della fecondazione in vitro dell'ultima donatrice di ovociti di rinoceronte bianco settentrionale, Fatu (23 anni), potrebbe presto cessare, anche se un'alimentazione ottimale, l'esercizio fisico, il clima del Kenya, l'allevamento allo stato semi-brado e forse fattori legati alla sottospecie potrebbero prolungare questo periodo.

BioRescue sottolinea quanto sia importante mettere in pratica senza indugio queste nuove tecnologie, imparando allo stesso tempo dai risultati di queste analisi e migliorando le procedure. La valutazione regolare e la valutazione del rischio etico continueranno a essere un elemento cardine della missione di BioRescue, al limite di ciò che è tecnologicamente possibile nella conservazione. Il successo della generazione degli embrioni - in particolare di quelli del rinoceronte bianco settentrionale - sottolinea l'importanza della tecnologia e il suo potenziale nell'affrontare uno dei problemi globali più urgenti del nostro tempo, la drammatica perdita di biodiversità.

Questo declino causa un'incalcolabile perturbazione di servizi ecosistemici cruciali, favorendo al contempo l'emergere di nuovi agenti patogeni, che minano le basi della nostra stessa esistenza.

[Pubblicazione](#)

*Hildebrandt TB, Holtze S, Colleoni S, Hermes R, Stejskal J, Lekool Isaac, Ndeereh D, Omondi P, Kariuki, L. Mijele, D, Mutisya, S, Ngulu S, Diecke S, Hayashi K, Lazzari G, de Mori B, Biasetti P, Quaggio A, Galli C, Goeritz F (2023): In vitro fertilization (IVF) program in white rhinoceros. *Reproduction* 166/6, 383–399. DOI: [10.1530/REP-23-0087](https://doi.org/10.1530/REP-23-0087)*

[Boilerplates](#)

Osaka University, Germline Genetics in the Department of Genome Biology, Graduate School of Medicine

Il nostro obiettivo è comprendere meglio le cellule germinali, le uniche che trasmettono informazioni genetiche ed epigenetiche attraverso le generazioni. Ciò include la comprensione di come viene mantenuta la qualità dell'informazione ereditabile nel lignaggio delle cellule germinali; l'elucidazione dei diversi meccanismi alla base dell'anisogametogenesi; l'elucidazione del meccanismo per l'oogenesi sostenibile nelle ovaie; lo sviluppo di una nuova tecnologia che modella la differenziazione dei lignaggi delle cellule germinali.

www.med.osaka-u.ac.jp/eng/introduction/research/genome/germline

Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (Leibniz-IZW)

Il Leibniz-IZW è un istituto di ricerca tedesco di fama internazionale del Forschungsverbund Berlin e.V. e membro dell'Associazione Leibniz. La nostra missione è esaminare gli adattamenti evolutivi della fauna selvatica al cambiamento globale e sviluppare nuovi concetti e misure per la conservazione della biodiversità. Per raggiungere questo obiettivo, i nostri scienziati utilizzano le loro ampie competenze interdisciplinari di biologia e medicina veterinaria per condurre ricerche fondamentali e applicate - dal livello molecolare a quello paesaggistico - in stretto dialogo con il pubblico e le parti interessate. Inoltre, ci impegniamo a fornire servizi unici e di alta qualità alla comunità scientifica.

www.izw-berlin.de

Safari Park Dvůr Králové

Il Safari Park Dvůr Králové è un parco safari della Repubblica Ceca. È uno dei migliori allevamenti di rinoceronti al di fuori dell'Africa e l'unico luogo in cui il rinoceronte bianco settentrionale si è riprodotto sotto la tutela dell'uomo: entrambe le femmine rimaste, Najin e Fatu, sono nate qui. Lo zoo di Dvůr Králové coordina gli sforzi per salvare i rinoceronti bianchi settentrionali.

<https://safaripark.cz/en/>

Max Delbrück Center

Il Centro Max Delbrück per la Medicina Molecolare dell'Associazione Helmholtz (Centro Max Delbrück) è uno dei principali istituti di ricerca biomedica del mondo. Max Delbrück, originario di Berlino, è stato un premio Nobel e uno dei fondatori della biologia molecolare. Nelle sedi del Centro, a Berlino-Buch e a Mitte, ricercatori provenienti da circa 70 Paesi analizzano il sistema umano, studiando le basi biologiche della vita, dai suoi elementi più elementari ai meccanismi a livello di sistema. Comprendendo cosa regola o interrompe l'equilibrio dinamico di una cellula, di un organo o dell'intero organismo, possiamo prevenire le malattie, diagnosticarle prima e arrestarne la progressione con terapie personalizzate. I pazienti dovrebbero beneficiare il prima possibile delle scoperte della ricerca di base. Il Centro Max Delbrück sostiene pertanto la creazione di spin-off e partecipa a reti di collaborazione. Lavora in stretta collaborazione con la Charité - Universitätsmedizin Berlin nel Centro di Ricerca Sperimentale e Clinica (ECRC), gestito congiuntamente, nonché con l'Istituto di Salute di Berlino (BIH) della Charité e il Centro Tedesco per la Ricerca Cardiovascolare (DZHK). Fondato nel 1992, il Centro Max Delbrück impiega oggi 1.800 persone ed è finanziato per il 90% dal governo federale tedesco e per il 10% dallo Stato di Berlino.

www.mdc-berlin.de

Avantea

Avantea è un laboratorio di tecnologie avanzate per la ricerca biotecnologica e la riproduzione animale con sede a Cremona, Italia. Avantea vanta un'esperienza ventennale e un know-how nella riproduzione assistita del bestiame sviluppato in anni di ricerca nel campo biomedico e della riproduzione animale.

www.avantea.it/en/

Università di Padova

L'Università di Padova, in Italia, è una delle più antiche al mondo, con i suoi 800 anni di vita. Il suo Dipartimento di Biomedicina Comparata e Scienze dell'Alimentazione sta sviluppando una ricerca e una formazione all'avanguardia nel campo della conservazione e del benessere della fauna selvatica, con particolare attenzione alla valutazione etica dei progetti di ricerca e dei programmi educativi sviluppati dal Laboratorio Etico per la Medicina Veterinaria, la Conservazione e il Benessere Animale.

<https://www.unipd.it/en/>

<https://www.bca.unipd.it/en/>

Ol Pejeta Conservancy

Ol Pejeta Conservancy è il più grande santuario di rinoceronti neri dell'Africa orientale ed è l'unico posto in Kenya dove è possibile vedere gli scimpanzé. Ospita anche gli ultimi due rinoceronti bianchi settentrionali del pianeta. La sicurezza all'avanguardia della fauna selvatica di Ol Pejeta comprende un'unità K-9 specializzata, telecamere con sensori di movimento lungo la recinzione elettrica a energia solare e un'unità dedicata alla protezione dei rinoceronti.

<https://www.olpejetaconservancy.org/>

Kenya Wildlife Service

Il Kenya Wildlife Service è la principale istituzione governativa che conserva e gestisce la fauna selvatica per i kenioti e per il mondo intero. Inoltre, fa rispettare le leggi e i regolamenti in materia.

<http://kws.go.ke/>

Wildlife Research and Training Institute (WRTI)

Il Wildlife Research and Training Institute (WRTI) è un ente statale istituito ai sensi del Wildlife Conservation and Management Act No. 47 del 2013 per intraprendere e coordinare

la ricerca e la formazione sulla fauna selvatica attraverso approcci innovativi che consentano di fornire dati e informazioni accurate e affidabili per informare la formulazione delle politiche e il processo decisionale.

<https://wrti.go.ke/>

