

AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino

**Application of Media enriched with gemmotherapeutic extract of *Salix caprea* in IVM (In Vitro Maturation) procedures of equine oocytes**

**This is the author's manuscript**

*Original Citation:*

*Availability:*

This version is available <http://hdl.handle.net/2318/1620189> since 2016-12-06T15:54:00Z

*Publisher:*

SIVE

*Terms of use:*

Open Access

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available under a Creative Commons license can be used according to the terms and conditions of said license. Use of all other works requires consent of the right holder (author or publisher) if not exempted from copyright protection by the applicable law.

(Article begins on next page)

### UTILIZZO DI MEDIA ARRICCHITI CON ESTRATTI GEMMOTERAPICI DI SALIX CAPREA NELLE PROCEDURE DI IVM (IN VITRO MATURATION) DI OVOCITI EQUINI

A. Bertero, DMV<sup>1</sup>, L. Vincenti, DMV, PhD<sup>1</sup>, M. Giudo, CTF<sup>2</sup>, T. Nervo, DMV, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Settore di Clinica Ostetrica, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO), ITALIA*

<sup>2</sup> *Gealpharma, Bricherasio (TO), ITALIA*

Tipologia: **Ricerca Originale**

Area di interesse: **Riproduzione**

**Scopo del lavoro.** Gli estratti gemmoterapici sono utilizzati in medicina naturale, ma i principi attivi in essi contenuti non sono ancora del tutto noti<sup>1</sup>. Scopo di questo lavoro è stato valutare in via preliminare, attraverso un'applicazione in vitro, l'effetto dell'aggiunta di un gemmoderivato di *Salix caprea* (che nella donna sembra avere un effetto estrogeno-simile<sup>2</sup>) ai media impiegati nelle procedure di IVM (In Vitro Maturation) equina.

**Materiali e metodi.** Sono stati impiegati ovociti ottenuti da ovaie di cavalle sottoposte a macellazione commerciale, con anamnesi generale e riproduttiva sconosciute. I gameti sono stati processati secondo procedure standard<sup>3</sup> e divisi in 3 gruppi omogenei, contenenti all'incirca lo stesso numero di COCs (Cumulus-Oocyte Complex) compatti, espansi e con la sola corona radiata. I gruppi sono stati avviati a IVM per 36 ore a 38,5°C e in atmosfera umidificata con 5% di CO<sub>2</sub> in aria, nei seguenti rispettivi media:

G1) Medium di IVM privo di ormoni, ma addizionato di estratto di *Salix caprea* (1 g/l).

G2) Medium di IVM classico, addizionato con ormoni (menotropina - Menegon®, Ferring S.p.a., 46,95 UI/l) - controllo positivo.

G3) Medium di IVM non addizionato di ormoni - controllo negativo.

Al termine della procedura di IVM le cellule del cumulo sono state rimosse. La decumolazione è una procedura necessaria per permettere la valutazione microscopica di nucleo, citoplasma e globulo polare, al fine di determinare l'avvenuta maturazione dei gameti. La valutazione dello stadio maturativo raggiunto è, infatti, di tipo morfologico e si basa sulla presenza o assenza di alcune caratteristiche ovocitarie quali: globulo polare (gp - marker di maturazione nucleare), citoplasma con segregazione di aree chiare e scure (segno di maturazione citoplasmatica). La maturazione completa è raggiunta quando la maturazione nucleare e citoplasmatica sono entrambe presenti. Sulla base di tali parametri i gameti sono stati classificati in: ovociti con maturazione completa, ovociti con maturazione citoplasmatica, immaturi (im) e degenerati (deg). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante test di Fisher, utilizzando il software Graphpad Instat 3.0.

**Risultati.** Sono stati processati un totale di 232 ovociti suddivisi in G1 (N:86 ovociti di cui 20 compatti, 62 espansi e 4 dotati della sola corona radiata), G2 (N:72 di cui 16 compatti, 52 espansi e 4 corone), G3 (N:74 con 16 compatti, 54 espansi e 4 corone). Dopo IVM, G1 presentava 34 ovociti maturi con gp, 18 con sola maturazione citoplasmatica, 22 im e 12 deg. Del G2, 26 mostravano segni di maturazione completa con estrusione del gp, 16 segni di maturazione citoplasmatica, 14 erano im e 16 deg. G3 contava 22 cellule con estrusione del gp, 16 con maturazione citoplasmatica, 22 im e 14 deg.

**Conclusioni.** Alle concentrazioni impiegate (1 g/l) l'estratto di *Salix caprea* non ha mostrato effetti tossici o comunque dannosi a carico degli ovociti. Dall'analisi statistica dei dati non è emersa al-

cuna significatività nel confronto tra i gruppi: aumentare il numero di ovociti processati potrebbe migliorare la rappresentatività del campione. Per quanto riguarda il presunto effetto ormonale, questo non è stato provato e, sebbene l'analisi dei dati sembri mettere in dubbio la possibilità della sua esistenza, in realtà non possiamo escluderlo. In particolare il mancato riscontro di una differenza statisticamente significativa nel confronto tra i gruppi di controllo positivo e negativo, fornisce interessanti spunti di riflessione: lo studio si è svolto in primavera inoltrata, quando le popolazioni di ovociti raccolte dalle ovaie sono inevitabilmente in stadi maturativi avanzati poiché sottoposti a un'intensa stimolazione ormonale. Le cellule impiegate nello studio potevano essere, quindi, già in parte mature e questo può aver mascherato gli effetti ormonali espliciti dal terreno di controllo positivo e quelli eventuali del medium addizionato con l'estratto di *Salix caprea*. La soluzione a questo problema potrebbe risiedere nel raccogliere gli ovociti nel periodo di anaestrosi o di transizione degli animali, in modo da liberarsi dell'influenza degli ormoni endogeni. Il periodo autunno-invernale è infatti caratterizzato dall'assenza o comunque da basse concentrazioni di ormoni sessuali nel circolo sanguigno, fatto che eliminerebbe il problema della parziale maturazione dei gameti in vivo, consentendo di impiegare cellule in stadi maturativi meno avanzati rispetto a quelle utilizzate in questo lavoro. Infine un ultimo punto su cui si potrebbe intervenire riguarda la concentrazione dell'estratto. Non essendoci studi al riguardo, è stata impiegata una concentrazione arbitraria. Non avendo osservato effetti tossici, si potrebbe pensare di aumentarla, poiché il dosaggio adottato potrebbe essere non sufficiente per indurre gli effetti auspicati.

### **Bibliografia**

1. Phillipson (2007), *Phytochemistry* 68: 2960- 2972.
2. Paris e Moyses, *Matière Médicale*, Tome II, ed. Masson: 90, 1981.
3. Nervo et al. (2012), *Ippologia* 23(2):17-22.

### *Indirizzo per corrispondenza*

Dott.ssa Alessia Bertero - Via Chiabotto Frachet, 3 - 10060 Castagnole Piemonte (TO), ITALIA  
Cell. 349/4752230 - E-mail: alessia.bertero@gmail.com