

Effetti immunostimolanti in vitro ed in vivo di un nuovo estratto standardizzato di *Echinacea angustifolia* radice (Polinacea™)

P. Morazzoni^a, A. Cristoni^a, F. Di Pierro^b, C. Avanzino^c, D. Ravarino^d,
S. Stornello^d, M. Zucca^c, T. Musso^d

^aIndena SpA, Direzione scientifica, Milano, Italy

^bS.I.I.T., Direzione Scientifica, Trezzano S/N (Milano), Italy

^cDipartimento di Scienze Cliniche Biologiche, Università degli Studi di Torino, Torino, Italy

^dDipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia, Università degli Studi di Torino, Torino, Italy

Abstract

Polinacea™ è un nuovo estratto idroalcolico standardizzato ottenuto dalle radici di *Echinacea angustifolia* contenente echinacoside (> 4%), un polisaccaride con elevato peso molecolare identificato come IDN 5405 (> 5%) ed una frazione isobutilamidica (< 0,1%). Per i test in vitro è stata preparata Polinacea™ priva di lipopolisaccaridi batterici (LPS-free) al fine di evitare risposte non specifiche delle cellule immunocompetenti.

Polinacea™ LPS-free ha stimolato la funzionalità del sistema immunitario come evidenziato dalla percentuale di proliferazione e dalla produzione di γ -interferone in culture cellulari di linfociti T di ratti, stimulate da anti-CD3. Polinacea™ LPS-free non ha avuto un ruolo diretto sulla risposta macrofagica come valutato nel test di produzione di ossido nitrico utilizzando la linea cellulare di macrofagi J774.

Polinacea™, in vivo, ha mostrato un'azione immunostimolante riducendo la mortalità indotta da *Candida albicans* sia in ratti normali che in ratti trattati con ciclosporina A.

Parole chiave: *Echinacea angustifolia*; IDN 5405; attività immunostimolante.

1. Introduzione

La tradizione sull'impiego delle specie di *Echinacea* deriva dai nativi americani, poiché le tribù di indiani, comprendenti Cheyenne, Choctaw, Comanche, Crow, Dakota, Delaware, Pawnee, Hodatsa, Sioux ed altri, avevano l'abitudine di curarsi con preparati da questa pianta. I principali disturbi per cui venivano utilizzati questi preparati erano correlati a: stomatite, mal di denti, tonsillite, setticemie, morsi di serpente, raffreddori e stati infiammatori generali (1-3).

Durante la colonizzazione europea, l'*Echinacea* iniziò ad essere nota anche tra i coloni: nel 1852 entrò nel Dispensario Americano e divenne uno dei rimedi più popolari per i successivi 50 anni. Dal 1916 al 1950 l'*Echinacea* è stata riportata nel Formulario Nazionale degli Stati Uniti; in seguito, a causa del sopravvento della chimica sintetica nel settore farmaceutico, l'interesse medico è diminuito.

Nonostante ciò, l'utilizzo di *Echinacea* è rimasto popolare. In particolare è esploso l'impiego come integratore dietetico, con un picco di vendite stimato in circa 300 milioni di dollari (4) in seguito all'approvazione, negli Stati Uniti, del Dietary Supplement Health and Education Act (1994).

E' disponibile in letteratura un elevato numero di dati e questi sono correlati a diversi tipi di preparati ottenuti dalle tre più importanti specie di *Echinacea* spp. (*E. angustifolia*, *E. pallida*, *E. purpurea*). D'altra parte, sono ora disponibili centinaia di preparati commerciali in farmacie, drogherie e negozi di alimenti naturali dei Paesi più sviluppati e, di conseguenza, per evitare informazioni ingannevoli al consumatore, è assolutamente necessario un rigoroso parallelismo tra la composizione dei prodotti utilizzati nella letteratura disponibile e la composizione dei prodotti sul mercato.

Indipendentemente dal tipo di preparato, le principali indicazioni dell'*Echinacea* sono la prevenzione ed il trattamento del raffreddore comune, dell'influenza e delle infezioni delle vie respiratorie superiori (URIs). Il meccanismo d'azione proposto è correlato alla capacità di stimolare il sistema immunitario. In una revisione del 1996, Bauer (5) affermò che gli effetti farmacologicamente rilevanti sono stati dimostrati in vitro ed in vivo per il succo spremuto delle parti aeree di *E. purpurea* e per gli estratti alcolici delle radici di *E. angustifolia*, *E. purpurea* ed *E. pallida*. Secondo l'autore, gli effetti sono principalmente collegati ad una modulazione del sistema immunitario cellulare non specifico ed i composti responsabili di un tale effetto sono i polisaccaridi, le glicoproteine, i derivati dell'acido caffeico e le alchilamidi.

In seguito è stata dimostrata, in vitro, anche la stimolazione di diverse cellule immunitarie quali macrofagi, monociti e cellule Natural Killer (6-10).

Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che i preparati di Echinacea, oltre a stimolare questi componenti della risposta immunitaria, sono fortemente coinvolti nella riduzione dei processi infiammatori che svolgono un ruolo centrale nello sviluppo dei sintomi delle principali malattie per le quali la pianta viene impiegata (raffreddore comune e mal di gola). I componenti fenolici dei preparati di Echinacea, tra cui l'echinacoside, sono spesso descritti come responsabili di questi effetti (9).

E' disponibile un buon numero di dati in merito al ruolo svolto dalla frazione polisaccaridica nell'effetto immunostimolante dei preparati a base di Echinacea. In particolare, i polisaccaridi isolati da *E. purpurea* sono stati studiati a fondo per la loro capacità di attivare i macrofagi in topi, ratti e nell'uomo, insieme ad altre funzioni immunologiche (7,11,12).

Meno consistenti sono i dati disponibili sui componenti lipofili presenti nei preparati a base di Echinacea, anche se alcuni di questi, quali alchilammidi ed in particolare isobutilamidi, sono stati descritti produrre un forte effetto stimolante sulle funzioni dei fagociti e sull'azione inibitoria della lipossigenasi (13).

Le prove cliniche disponibili sui derivati dell'Echinacea (principalmente basati su *E. purpurea*) sono stati recentemente rivisti da Barrett (14). La globalità dei dati supporta l'impiego di questi preparati nel trattamento di URIs acute, il che corrisponde all'utilizzo più diffuso.

Sulla globalità dei risultati clinici e preclinici possono essere fatti due commenti.

Innanzitutto, anche considerando la molteplicità degli effetti prodotti dai preparati a base di Echinacea, non si può ritenere responsabile degli effetti biologici un solo componente attivo, e di conseguenza è ragionevole considerare come "principio attivo" l'estratto standardizzato.

Seconda cosa, la standardizzazione dell'estratto, nel caso dell'Echinacea, deve considerare almeno tre gruppi di molecole come elementi caratterizzanti del supposto effetto farmacologico.

In questo articolo, un nuovo estratto standardizzato dalle radici di *E. angustifolia* (Polinacea™) (15) è stato sottoposto a test sperimentali in vitro ed in vivo per accertarne l'azione immunostimolante. Al fine di evitare una risposta non specifica delle cellule immunitarie competenti, per gli studi in vitro i campioni di Polinacea™ sono stati purificati dai lipopolisaccaridi (LPS) di origine batterica, che sono un possibile contaminante della droga di partenza utilizzata per l'estrazione.

Nella maggior parte dei tests sperimentali, Polinacea™ è stata comparata con un polisaccaride ad elevato peso molecolare (IDN 5405) che è contenuto in essa. IDN 5405 è caratterizzato da un acido poligalatturonico parzialmente carbossimetilato con ramnagalatturonani (Fig. 1) ed è specifica dell'*E. angustifolia* (16).

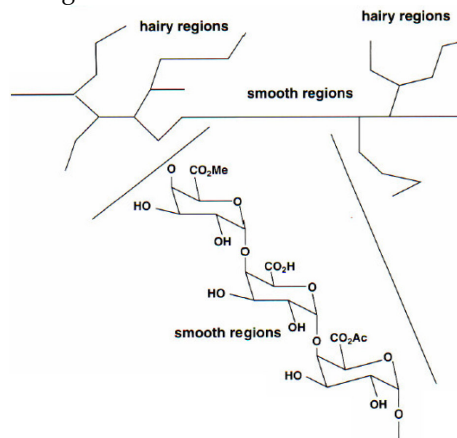


Figura 1 Struttura molecolare di IDN 5405

Esperimenti

2.1 Materiale vegetale

E. angustifolia DC (Asteraceae): le radici sono state raccolte nel Maggio 2003, da un campo coltivato e localizzato vicino a Verona, Italia. Un campione è tenuto nel Dipartimento di Botanica, Indena S.p.A., Settala (Milano). Questo materiale è il risultato di un lavoro di selezione iniziato nel 1998 ed ancora in corso, che è stato sviluppato seguendo le fasi brevemente descritte qui di seguito:

- raccolta dei semi da 23 diverse popolazioni di *E. angustifolia* selvaggia sparse entro l'area di distribuzione di questa specie in Nord America.
- Coltivazione delle sopra menzionate 23 specie di *E. angustifolia* in un campo di prova vicino a Como, Italia.
- Selezione basata su fenotipo e chemotipo, tra le popolazioni ed entro ciascuna popolazione, degli individui più soddisfacenti.
- Micropropagazione degli individui più soddisfacenti.
- Coltivazione di un piccolo campo di piante micropropagate, con lo scopo della produzione di semi.
- Coltivazione su più larga scala per la produzione di biomassa.

2.2 Estrazione e prodotti

Un lotto di Polinacea™ è stato ottenuto, secondo un procedimento brevettato (15), dalle radici di *E. angustifolia* coltivate e selezionate per il loro elevato contenuto di polisaccaridi ed echinacoside. Le radici sono state trattate con EtOH 90% per l'estrazione di echinacoside e poi contro-estratte con n-esano per l'eliminazione di isobutilamidi. Le radici umide sono state estratte con EtOH 15% e, in seguito, la frazione

polisaccaridica è stata ottenuta per precipitazione con EtOH. I due estratti secchi sono stati poi disciolti insieme ed essiccati per ottenere Polinacea™, con le seguenti caratteristiche: echinacoside 5,7%, IDN 5405 6,6% ed isobutilamidi 0,02% (per HPLC).

IDN 5405 è stato ottenuto come un polisaccaride puro (ca. 200000 Da) per purificazione dall'estratto con EtOH 15%, secondo un procedimento brevettato (16).

Campioni di Polinacea™ e IDN 5405 LPS-free sono stati preparati da Biosynth S.r.l. (Siena, Italia) attraverso la capacità di rimozione per affinità di SAEP (peptici sintetici anti-endotossina) secondo Rustici et al. (17).

2.3 *Animali*

Sono stati utilizzati topi inbred femmine Balb/c acquistati da Charles River (Calco, Italia).

Sono stati alloggiati in condizioni ambientali standard e nutriti con dieta per roditori con acqua ad libitum.

2.4 *Test pirogeni*

QLC-1000 (CAL quantitativo cromogenico da Bio-Whittaker) è stato impiegato per determinare e quantificare la presenza di LPS (18) in estratti originari o purificati di *E. angustifolia*. I prodotti sono stati sospesi in una soluzione salina apirogena per iniezione intravenosa. Diverse diluizioni dei campioni sono stati mescolati con lisato di *Limulus Amebocya* ed incubati a 37°C per 10 minuti. Una soluzione substrato è stata poi aggiunta ai campioni e la miscela è stata incubata a 37°C per 6 minuti. La reazione è stata interrotta con acido acetico 25% (v/v: acido acetico glaciale /acqua). I campioni contenenti LPS hanno sviluppato una colorazione gialla. L'assorbanza del campione è stata determinata tramite spettrofotometria a 405-410 nm con Processore II Behring ELISA. Dal momento che l'assorbanza è direttamente proporzionale alla quantità di LPS presenti, la concentrazione di LPS è stata calcolata da una curva standard.

2.5 *Saggio ossido nitrico in vitro su macrofagi isolati*

J774, una linea cellulare di macrofagi di ratto, è stata mantenuta in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Life Technologies Italia) integrata con 10% di FCS inattivato al calore (HyClone Laboratories, Logan, UT) e 2 mM L-glutammina (Life Technologies), a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Le cellule sono state posizionate su piastre microtitolo da 96 pozzetti a fondo piatto (10⁵ cellule in 100 µl/pozzetto) (19).

La produzione di NO è stata misurata tre volte come quantità di NO₂⁻ rilasciato nel mezzo di cultura. Interferone-γ (IFN-γ, 500 U/ml) e/o 1 µl/ml LPS (estratto fenolico e purificato cromatograficamente da *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 acquistato da Sigma Chemical & Co., St. Louis, MO) o prodotti a base di *E. angustifolia* (0,1-100 µg/ml) sono stati aggiunti alle culture J774. 50 µl di supernatante della cultura sono stati raccolti dopo 48 ore di incubazione e mescolati con un volume uguale di reagente Griess in una micropiastre Falcon da 96 pozzetti a fondo piatto. A₅₇₀ è stata monitorata con lettore micropiastre (Behring ELISA Processor II) con precedente sottrazione a A₆₅₀ (20). L'analisi quantitativa è stata eseguita per confronto con soluzioni standard di NaNO₂.

2.6 *Determinazione IFN-γ in vitro in linfociti T isolati*

I linfociti sono stati ottenuti da milze di ratti. Le milze rimosse asepticamente sono state posizionate in una soluzione salina tampone fredda con aggiunta di 5% FCS e la sospensione cellulare è stata arricchita con linfociti T per eluizione da colonne di lana di nylon come descritto da Julius et al. (21). La sospensione cellulare risultante conteneva più del 90% di cellule T, come determinato per analisi citofluorimetrica dopo marcatura con anticorpi monoclonali anti CD3 coniugati FITC utilizzando un FACScan (Necton-Dickinson, Mountain View, CA).

Quantità di 0,1 ml contenenti 4 x 10⁵ linfociti T di ratto sono stati posti per tre volte su piastre microtitolo da 96 pozzetti a fondo rotondo (Falcon) e sono stati aggiunti 0,1 ml del mezzo contenente Polinacea™ o IDN 5405 (0,1 - 10 µg/ml) e/o moAb anti-CD3 (Pharmingen, Milano, Italia). Le culture sono state incubate per 72 ore a 37°C in un incubatore umidificato al 5% di CO₂.

Il titolo di IFN-γ nei supernatanti di cellule T trattati come sopra indicato per 72 ore, è stato valutato con un kit commerciale ELISA (Amersham) (19).

2.7 *Candidosi sperimentale*

È stato utilizzato il metodo descritto da Martinez et al. (22), leggermente modificato.

Candida albicans (ceppo CA2) è stata gentilmente fornita dal dott. Cassone (Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia) ed è stata coltivata con aggiunta settimanale in agar Sabouraud di destrosio fresco (Biolife, Milano). CA2 è un ceppo agerminativo e si sviluppa in forma di lievito puro in vitro a 28°C o a 37°C in

mezzi micologici convenzionali. Per gli esperimenti, cellule di *C. albicans* sono state raccolte da piastre Sabouraud, sospese in PBS, contate in una camera Thoma e diluite per ottenere una concentrazione di $1,5 \times 10^6$ cellule/ml. Volumi di 0,2 ml della sospensione sono stati iniettati nella vena caudale laterale dei ratti.

Polinacea™ è stata somministrata nei ratti nella dose di 1 g kg^{-1} al giorno⁻¹ p.o. e a $0,1 \text{ g kg}^{-1}$ al giorno⁻¹ p.i. per 1 giorno prima e 6 giorni consecutivi dopo l'infezione. Ciclosporina A (Sigma) è stata diluita in olio d'oliva e somministrata p.o. alla dose di 10 mg kg^{-1} al giorno⁻¹ per 1 giorno prima e 4 giorni consecutivi dopo l'infezione. La mortalità in ogni gruppo dopo l'infezione ed il trattamento, è stata monitorata sino al 14° giorno dopo l'inoculazione con *C. albicans*.

2.8 Analisi statistica

Nei test sperimentali sulla candidosi, è stato impiegato il test chi-square sul numero finale di sopravvissuti. In altri tests sono stati utilizzati il test ANOVA e test di Dunnett delle comparazioni multiple.

3. Risultati

3.1 Produzione di NO da J774 dopo 48 ore di trattamento con Polinacea™ e IDN 5405

La produzione di NO, segnale di un'attivazione dei macrofagi, è stata testata in un modello di co-stimolazione con IFN- γ (500 U/ml). Polinacea™ ha dimostrato di essere un buon attivatore dose-dipendente delle funzioni dei macrofagi (Tabella 1), comunque il prodotto era fortemente contaminato da LPS (1000 ppm). Dopo l'eliminazione di LPS, come mostrato nella Tabella 2, Polinacea™ ha dimostrato di essere totalmente inefficace sulla capacità dei macrofagi di rilasciare NO. Inoltre, la frazione polisaccaridica pura (IDN 5405) è risultata molto attiva prima dell'eliminazione di LPS (dati non mostrati) e totalmente inefficace quando testata senza LPS (Tabella 3). Questi risultati suggeriscono che la presenza di LPS sia un fattore da considerare nella sperimentazione di modelli in vitro con estratti vegetali, almeno in questo campo di attività.

Tab. 1 Effetto in vitro di Polinacea™ (non privata di LPS) sulla produzione di NO₂ da macrofagi J774 stimolata da IFN- γ (500U/ml)

Co-trattamento	NO ₂ (nM)	
	IFN- γ	
Controllo	3,1	14,9
LPS	3,4	79,1*
Polinacea™ 100 mg/ml	4,8	56,4*
Polinacea™ 10 mg/ml	2,7	44,7*
Polinacea™ 1 mg/ml	3,0	21,0
Polinacea™ 0,1 mg/ml	3,2	11,1

* p<0,01

Tab. 2 Effetto in vitro di Polinacea™ (privata di LPS) sulla produzione di NO₂ da macrofagi J774 stimolata da IFN- γ (500U/ml)

Co-trattamento	NO ₂ (nM)	
	IFN- γ	
Controllo	0,0	21,8
LPS	5,4	49,3*
Polinacea™ 100 mg/ml	0,0	24,6
Polinacea™ 10 mg/ml	0,0	20,9*
Polinacea™ 1 mg/ml	0,0	21,4
Polinacea™ 0,1 mg/ml	0,0	16,1

* p<0,01

Tab. 3 Effetto in vitro di IDN 5405 (privato di LPS) sulla produzione di NO₂ da macrofagi J774 stimolata da IFN- γ (500U/ml)

Co-trattamento	NO ₂ (nM)	
	IFN- γ	
Controllo	0,0	16,8
LPS	6,4	50,0*
Polinacea™ 100 mg/ml	0,0	18,0
Polinacea™ 10 mg/ml	0,0	16,0*
Polinacea™ 1 mg/ml	0,0	17,8
Polinacea™ 0,1 mg/ml	0,0	17,7

* p<0,01

3.2 Produzione di IFN- γ in linfociti T di milza purificata di ratti stimolati con anti-CD3

Polinacea™ e IDN 5405 (entrambi senza LPS) hanno stimolato in modo dose-dipendente linfociti T isolati e stimolati con anti-CD3 per produrre e rilasciare IFN- γ (Fig. 2).

Questi risultati mostrano una buona risposta in termini di proliferazione delle cellule (dati non mostrati).

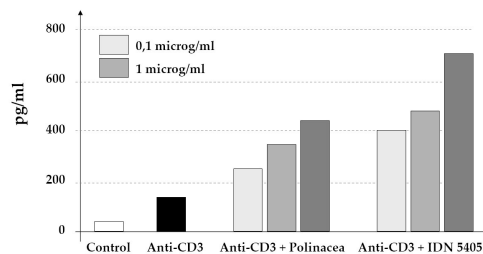


Fig. 2 Effetto di Polinacea™ e IDN 5405 sulla produzione di IFN- γ da linfociti T umani trattati con anti-CD3 (p < 0.01 vs aCD3)

3.3 Sopravvivenza in topi infettati con *C. albicans*

Polinacea™, somministrata per via orale alla dose di 1 g kg⁻¹ giorno⁻¹ per 7 giorni, si è dimostrata efficace (30%) nel ridurre la mortalità indotta dall'infezione da *C. albicans*; anche nel caso dell'immunosoppressione indotta da Ciclosporina (CsA), Polinacea™ è stata in grado di prevenire la morte degli animali (40%) (Tabella 4).

Polinacea™, somministrata per via peritoneale alla dose di 0,1 g kg⁻¹ giorno⁻¹, si è dimostrata efficace (40%) nel ridurre la mortalità indotta dall'infezione da *C. albicans* (Tabella 5). Questo effetto è stato inoltre supportato dal fatto che LPS somministrati ad un dosaggio (2 □g kg⁻¹ giorno⁻¹) corrispondente alla quantità somministrata con Polinacea™ contenente LPS, si sono dimostrati praticamente inefficaci.

Tab. 4 Effetto della somministrazione orale di Polinacea™ sulla sopravvivenza in topi normali ed immunosoppressi infettati con *Candida albicans*.

Trattamento	Nr.	Sopravvissuti
<i>C. albicans</i>	20	0
<i>C. albicans</i> - Polinacea™ (1 g kg ⁻¹ giorno ⁻¹ per 7 giorni)	20	6*
<i>C. albicans</i> - CsA (10 mg kg ⁻¹ giorno ⁻¹ per 5 giorni)	10	0
<i>C. albicans</i> - CsA (10 mg kg ⁻¹ giorno ⁻¹ per 5 giorni) + - Polinacea™ (1 g kg ⁻¹ giorno ⁻¹ per 7 giorni)	10	4*

* p < 0,01

Tab. 5 Effetto della somministrazione intraperitoneale di Polinacea™ ed estratto di *E. purpurea* sulla sopravvivenza in topi normali infettati con *Candida albicans*.

Trattamento	Nr.	Sopravvissuti
<i>C. albicans</i>	10	0
<i>C. albicans</i> - LPS (2 □g kg ⁻¹ giorno ⁻¹ per 7 giorni)	10	1
<i>C. albicans</i> - - Polinacea™ (0,1 g kg ⁻¹ giorno ⁻¹ per 7 giorni)	10	4*

* p < 0,01

4. Discussione

Secondo i risultati ottenuti in questo studio, alcuni aspetti dell'attività immunostimolante dei preparati a base di Echinacea potrebbe essere correlata al fatto che alcuni derivati vegetali possono essere contaminati da lipopolisaccaridi (LPS), un prodotto ad elevato peso molecolare proveniente dalla parete batterica e caratterizzato da un'elevata capacità, anche a concentrazioni molto basse (ppm), di attivare molte delle risposte immunologiche sia in vitro che in vivo. LPS, infatti, nei fagociti di mammifero, interagisce direttamente con la proteina che lega LPS, con il recettore CD14 e con il complesso Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 recentemente identificato che porta ad una rapida attivazione di una cascata di segnali intracellulari, che portano al rilascio di mediatori pro-infiammatori (23-24). Questo significa che molti degli estratti vegetali attualmente disponibili (in particolar modo quelli dove i solventi impiegati concentrano i polisaccaridi e quindi LPS) creano falsi risultati positivi in termini di stimolazione immunitaria, se testati in vitro o in vivo per somministrazione intravenosa o intraperitoneale.

In accordo con questo, Polinacea™ contenente LPS è risultata molto efficace nell'attivazione in vitro di macrofagi, valutata in termini di produzione di NO; al contrario, dopo l'eliminazione di LPS non abbiamo osservato alcuna attività. Su cellule T, i risultati sono stati differenti: i buoni risultati ottenuti con Polinacea™ contenente LPS (dati non mostrati) sono stati osservati anche dopo l'eliminazione di LPS, dimostrando che le cellule T potrebbero essere considerate il vero target di Polinacea™. Il polisaccaride purificato IDN 5405 ha mostrato lo stesso profilo di attivazione delle cellule T suggerendo il suo ruolo cardine nell'attività immunomodulante di Polinacea™. Questi dati, che mostrano il ruolo centrale delle cellule T nell'attività di Polinacea™, sono inoltre confermati dai risultati del tutto negativi ottenuti nel modello sperimentale, dove le cellule analizzate erano cellule B, cellule natural killer e granulociti (dati non mostrati).

Sulla base dei risultati in vitro sulle cellule T, abbiamo focalizzato il nostro interesse su quei tests in vivo, quale la candidosi in topi normali ed immunosoppressi, dove una risposta delle cellule T svolge un ruolo dannoso. Polinacea™, somministrata per via orale in questo modello sperimentale, ha mostrato di essere molto efficace nel contrapporsi all'infezione da *C. albicans* suggerendo una potenzialità d'impiego come immunostimolante.

Nello stesso modello sperimentale, Polinacea™ ha mostrato risultati molto interessanti quando somministrata per via intraperitoneale. Anche in questo caso l'effetto può essere considerato specifico dal momento che LPS testati ad una dose corrispondente alla quantità somministrata con l'estratto, si sono dimostrati completamente inefficaci.

In conclusione, il nostro studio dimostra che:

1. i prodotti dichiarati efficaci in vitro ed in vivo su cellule del sistema immunitario (per lo più su macrofagi) a seguito di somministrazione parenterale dovrebbero essere prima controllati per evitare la contaminazione da LPS;
2. l'attività di Polinacea™ sul sistema immunitario sembra essere principalmente mediata dall'interazione con cellule T;
3. è probabile che la maggior parte dell'attività svolta sulle cellule T da Polinacea™ sia dovuta alla presenza del polisaccaride ad elevato peso molecolare IDN 5405.

Polinacea™ ed il polisaccaride IDN 5405 sono tuttora sottoposti ad ulteriori esami biochimici e farmacologici allo scopo di definire in maniera esauriente il loro profilo biologico. Studi preliminari di sicurezza sono già stati eseguiti (tossicità acuta in roditori, e tossicità sub-acuta in ratti e cani) ed hanno dimostrato una buona tollerabilità del prodotto permettendo test clinici futuri.

BIBLIOGRAFIA DISPONIBILE SU RICHIESTA