

UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL  
FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN  
FARMACIA**

Relatore: Prof.ssa Raffaella Colombo

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di  
*Matteo Scaramazza*

Anno Accademico 2024/2025

<b>1. Introduzione</b>	
1.1 Il microbiota intestinale: composizione e funzioni principali.....	1
1.2 Relazione tra microbiota e salute dell'uomo.....	2
1.3 I probiotici: definizione, funzioni, nuovi orizzonti.....	4
<b>2. Akkermansia muciniphila: caratteristiche generali</b>	
2.1 Scoperta e classificazione.....	7
2.2 Ruolo fisiologico e metabolico.....	9
2.3 Effetti sulla barriera intestinale e sul sistema immunitario.....	13
<b>3. Effetti benefici e studi scientifici</b>	
3.1 Regolazione della barriera intestinale.....	15
3.2 Modulazione dell'infiammazione.....	18
3.3 Effetti sul metabolismo energetico e lipidico.....	20
3.4 Evidenze cliniche principali.....	23
<b>4. Akkermansia muciniphila come probiotico di nuova generazione</b>	
4.1 Definizione di probiotico e criteri di selezione.....	25
4.2 Differenze tra ceppo vivo e ceppo pastorizzato.....	32
4.3 Sicurezza, stabilità e tollerabilità.....	39
<b>5. Integrazione e applicazioni pratiche</b>	
5.1 Motivazioni per l'integrazione.....	44
5.2 Possibili formulazioni e modalità di assunzione.....	49
5.3 Ruolo del farmacista nella consulenza sull'uso dei probiotici.....	55
<b>6. Prospettive future e conclusioni</b>	
6.1 Possibili sviluppi nel campo dell'integrazione alimentare.....	60
6.2 Conclusioni.....	64
<b>7. Bibliografia</b>	

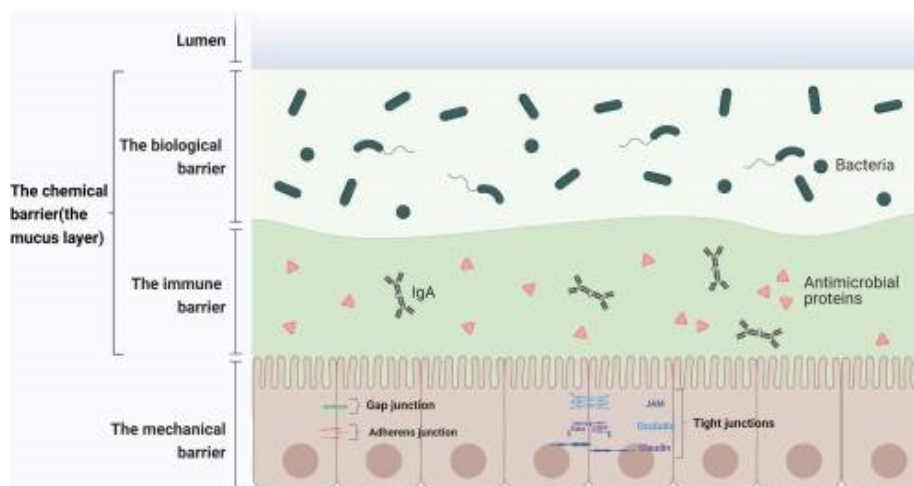
# 1. Introduzione

## 1.1 Il microbiota intestinale: composizione e funzioni principali

Il microbiota intestinale è considerato dall'AIFA a tutti gli effetti un organo aggiuntivo, in quanto è cruciale nel benessere fisico dell'essere umano, con un ruolo fondamentale nel metabolismo, nella difesa immunitaria e nell'equilibrio generale dell'organismo.

L'ecosistema intestinale comprende tre componenti fondamentali:

1. La barriera intestinale, la quale ha il compito di proteggere l'organismo da sostanze tossiche e nocive e contemporaneamente essere responsabile dell'assorbimento dei nutrienti;
2. Il “secondo cervello” è una struttura di tipo neuroendocrino la quale ha vari compiti, tra cui quello di dare vita ad azioni specifiche come le contrazioni o il rilascio degli enzimi digestivi, o integrare ed elaborare gli stimoli che il corpo umano riceve interagendo così anche con il sistema nervoso centrale;
3. Il microbiota intestinale. [1,2]



**Figura 1.** Struttura e componenti della barriera intestinale

*Rappresentazione schematica delle principali componenti della barriera intestinale, comprendenti barriera meccanica, chimica, immunitaria e biologica, e del loro ruolo nel mantenimento dell'omeostasi mucosale. Adattata da rif. [3]*

Il tratto gastrointestinale umano contiene un gran numero di specie microbiche, sia patogene che non patogene, le quali si sono co-evolute con il genoma umano e differiscono per composizione e funzione in base alla loro posizione, età, sesso, etnia e alla dieta seguita dall'ospite, e per questo si può considerare il corpo umano come l'unione di cellule batteriche e umane.

## **1.2 Relazione tra microbiota e salute dell'uomo**

Il microbiota è importante nello sviluppo della risposta immunitaria in quanto l'interazione tra il tratto gastrointestinale e il microbiota residente è ben bilanciata nei soggetti sani, mentre uno scompenso o la sua degradazione può portare a malattie intestinali e non.

In seguito a un disequilibrio tra i batteri buoni e quelli cattivi si instaura uno stato di disordine, detto disbiosi, il quale è correlato, non soltanto a malattie del tratto gastrointestinale, ma anche a malattie come diabete e obesità, dermatite, malattie cardiovascolari, neurologiche e psichiche.

Un microbiota sano svolge invece numerose ed importanti funzioni ovvero, protegge l'apparato cardiocircolatorio, elimina le sostanze tossiche, favorisce la digestione degli alimenti e contribuisce alla sintesi di vitamine essenziali come la vitamina K, e le vitamine del gruppo B. Un'ulteriore funzione del microbiota è quella di regolare la peristalsi intestinale che, interagendo con il sistema immunitario, impedisce la crescita di molti microrganismi dannosi.

Il microbiota è costituito prevalentemente da funghi, virus e batteri che normalmente vivono in equilibrio: questa condizione è detta eubiosi e il mantenimento di tale condizione è molto importante poiché permette alle varie componenti del microbiota di essere funzionalmente efficaci e soprattutto di essere sincronizzate sia tra loro sia con gli altri componenti dell'ecosistema intestinale.

[1,2]

I funghi costituiscono un microbioma e comprendono: Candida, Saccharomyces, Aspergillus e Penicillium. Questi infatti rivestono un ruolo importante grazie alle

complesse interazioni funghi-funghi, funghi-ospite e funghi-batteri che influenzano la salute e in alcuni casi anche le malattie dell'ospite.

I virus invece, influenzano lo stato di salute dell'ospite interferendo con la struttura della comunità e della funzione batterica.

Infine i batteri sono procarioti, ovvero organismi unicellulari privi di nucleo e l'analisi delle comunità microbiche intestinali ha evidenziato la presenza di tre varianti predominanti ovvero *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*. [1,2,4]

A livello di *phyla* dominanti il microbiota è formato solo da due specie: *Bacteroides* e *Firmicutes* i quali rappresentano circa il 90% dei batteri presenti nell'intestino umano e di conseguenza, al variare del loro rapporto essendo essi presenti in così grandi quantità, facilitano l'instaurarsi di disbiosi con la conseguenza di portare all'insorgenza di malattie non soltanto dell'apparato digerente ma, come visto in precedenza, anche ad altre patologie come il diabete o l'obesità.

Uno dei parametri che fa sì che il microbiota si modifichi è l'età in quanto nei primi due anni di vita e in età avanzata quest'ultimo può essere molto instabile con diverse variazioni, o addirittura mancare come negli anziani, mentre nella fase centrale della vita umana questo non accade.

I fattori in grado di alterare negativamente la composizione del microbiota intestinale possono essere ricondotti principalmente a due categorie. Da un lato vi sono le infezioni che possono determinare una condizione di disbiosi acuta, modificando rapidamente l'equilibrio della popolazione microbica intestinale. Dall'altro lato agiscono fattori più subdoli e persistenti, come ad esempio una alimentazione scorretta o l'assunzione cronica di farmaci, che nel tempo possono indurre variazioni profonde e durature nella composizione del microbiota.

La letteratura scientifica evidenzia come l'utilizzo di inibitori di pompa protonica, di cortisonici e contraccettivi orali possono contribuire allo sviluppo di disbiosi subdole, mentre l'utilizzo di antibiotici possono portare a disbiosi acute con sintomi quali, diarrea, dolori addominali e meteorismi. Quando si instaura uno stato di disbiosi cronica questo porta ad avere importanti alterazioni funzionali i

quali coinvolgono soprattutto la barriera intestinale. Ciò avviene perchè la barriera intestinale è selettiva grazie alla presenza delle *tight junctions*, le quali mettono in collegamento le varie cellule intestinali e permettono il passaggio bidirezionale delle sostanze tra il torrente circolatorio e il lume intestinale. Queste giunzioni sono molto condizionate nella loro funzionalità da alcune sostanze prodotte dal metabolismo del microbiota intestinale. L'alterazione di quest'ultimo, comporta di riflesso l'alterazione delle funzionalità delle *tight junction* con la possibilità quindi di avere il passaggio di sostanze tossiche, allergeni e di microbi nel torrente circolatorio con la probabilità di portare all'insorgenza di varie malattie e per questo motivo è necessario mantenere l'eubiosi del microbiota intestinale. [1,2]

### **1.3 I probiotici: definizione, funzioni, nuovi orizzonti**

La parola probiotico è stata utilizzata per la prima volta da Lilly e Stellwell, due ricercatori statunitensi, nel 1965 per descrivere sostanze secrete da un batterio che stimolano l'accrescimento di un altro batterio. Nel 1971 Sperti, un ricercatore e inventore statunitense, la usò per descrivere estratti tissutali in grado di stimolare l'accrescimento microbico, ma solo nel 1974, Parker, un microbiologo e ricercatore, usò la parola probiotico per identificare “un supplemento dietetico di origine microbica con l'aggiunta di organismi e sostanze che contribuiscono al bilancio microbico intestinale”. Successivamente Fuller, microbiologo britannico, nel 1989 la modificò in “integratore alimentare contenente microbi vivi che ha effetto benefico sull'ospite migliorando il suo bilancio microbico intestinale”.

La definizione oggi internazionalmente accettata di probiotico è quella enunciata nel 2001 dalla FAO e dalla WHO: “*Live microorganism which when administered in adequate amounts confer a health benefits on the host*”. [5,6]

In Italia il Ministero della Salute ha definito i probiotici “microrganismi che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di esercitare funzioni benefiche per l'organismo”. Questa definizione sottolinea tre aspetti fondamentali del concetto di probiotico, ovvero che deve trattarsi di microrganismi vivi

somministrati in quantità adeguate e deve determinare un beneficio documentato per la salute dell'ospite. Non è quindi sufficiente la semplice presenza del microrganismo in un prodotto ma è anche necessario che sia vivo, assunto a una dose efficace e supportato da evidenze scientifiche.

A differenza degli Stati Uniti, in Europa è accettato che i probiotici abbiano *claim* per la salute a patto che siano supportati da trial ben condotti in popolazioni selezionate e volontari sani. [7] Per *health claim* si intende qualunque indicazione riportata in etichetta, nella presentazione o nella comunicazione commerciale di un alimento che affermi, suggerisca o sottintenda l'esistenza di un rapporto tra il consumo dell'alimento stesso, o di uno dei suoi componenti, e un beneficio per la salute umana. In ambito europeo, tali indicazioni sono oggetto di valutazione scientifica da parte dell'EFSA, la quale esamina le prove fornite a supporto del *claim*, mentre la decisione finale circa la loro autorizzazione spetta alla Commissione europea e agli Stati membri. [8] Il termine *claim* individua le indicazioni riportate in etichetta o nelle comunicazioni commerciali di un alimento o di un nutriente, i quali suggeriscano l'esistenza di un rapporto positivo tra il consumo del prodotto e la salute dell'organismo.

Alla base dell'attività dei probiotici c'è la loro capacità di interagire con le cellule epiteliali intestinali dell'ospite e con altre cellule umane attraverso meccanismi chimico-fisici o segnali immuni simili a quelli del microbiota commensale. Per poter essere utilizzati negli alimenti e negli integratori alimentari i probiotici devono soddisfare diversi requisiti, tra i quali ritroviamo, il fatto di essere attivi a livello intestinale in quantità adeguata, essere considerati sicuri per l'uomo, quindi non portare antibiotico-resistenza acquisita o trasmissibile. [9]

La disbiosi è il principale bersaglio per l'utilizzo dei probiotici, grazie a una grande varietà di meccanismi ben documentati che vanno dal blocco dei siti di adesione dei patogeni, alla loro distruzione da parte delle batteriocine o delle proteasi, alla regolazione del sistema immune.

Non sempre però è evidente il legame fra questi meccanismi d'azione con specifici *claim*, e di conseguenza è anche necessario definire le caratteristiche e i criteri

fondamentali per la produzione industriale di un ceppo probiotico sia che esso debba essere utilizzato come alimento, farmaco o bioterapico. I microrganismi utilizzati come probiotici devono avere le seguenti caratteristiche:

- Essere considerati *Generally Recognized As Safe* (GRAS),
- Essere di origine umana, vivi, resistenti al pH acido dello stomaco e a quello alcalino della bile e dell'intestino tenue,
- Essere capaci ad aderire alla mucosa collocandosi fra altri batteri vivi e di esercitare attività metabolica.

È importante anche l'identificazione a livello del ceppo sia per motivi di sicurezza sia per il tipo di azione. Quest'ultimo deve essere caratterizzato mediante il profilo di macro-restrizione del cromosoma determinato tramite processo di elettroforesi in campo pulsato. In conclusione l'uso dei probiotici si basa sul principio del *microbial interference treatment* (MIT) atto a favorire il mantenimento di un microbiota equilibrato, ostacolando in tal modo i microrganismi patogeni poiché sono in grado di inviare segnali alle cellule epiteliali intestinali ed ai macrofagi.

[4]

Per quanto riguarda i nuovi orizzonti nell'uso dei probiotici si sta andando sempre più nella direzione che va oltre l'utilizzo di quest'ultimo solo per il benessere intestinale, ma anzi si stanno concentrando maggiormente sull'asse "intestino-cervello", sull'asse "intestino-pelle", sulla salute fisica degli sportivi e sulla modulazione di infiammazioni croniche o silenti, con il potenziale di poter essere utilizzati anche contro patologie più serie come il carcinoma coloretale. Un ambito che in futuro avrà sempre più importanza sarà quello adibito allo sviluppo di probiotici di precisione e specifici da poter utilizzare in determinate condizioni e ceppi, così da ottenere risposte sempre più efficaci.

## 2. Akkermansia muciniphila: caratteristiche generali

### 2.1 Scoperta e classificazione

*Akkermansia muciniphila* prende il nome in onore di Antoon D. L. Akkermans, un biologo olandese, mentre il termine *muciniphila*, il quale significa letteralmente “che ama la mucina”, richiama la peculiare capacità di questa specie batterica di degradare la mucina e utilizzare il muco intestinale come principale fonte di carbonio e azoto contribuendo al tempo stesso al mantenimento del suo equilibrio fisiologico.

Dalla sua scoperta - avvenuta nel 2004 nel laboratorio diretto dal professore Willem De Vos a Wageningen in Olanda - è stato ampiamente studiato ed è considerato come uno dei più promettenti microrganismi di nuova generazione per la salute umana.

Ciò che è stato studiato fino ad ora è l'importanza di questo microrganismo nel prevenire e migliorare la sindrome metabolica, la quale è l'insieme di più condizioni quali l'ipertensione, l'obesità, il diabete, l'infiammazione cronica, e le conseguenti malattie neurodegenerative e cancerogene. Tuttavia a fronte di queste promettenti evidenze biologiche e cliniche, la sua applicazione in ambito alimentare e nutraceutico richiede ancora particolare cautela, come dimostra il fatto che *A. muciniphila* non rientri attualmente nella lista QPS dell'EFSA. La QPS (*Qualified Presumption of Safety*) è il sistema adottato dall'EFSA per identificare i microrganismi considerati presumibilmente sicuri per l'impiego nella catena alimentare sulla base di una chiara identità tassonomica, di un adeguato *body of knowledge* e dell'assenza di criticità di sicurezza rilevanti. La mancata inclusione in tale lista è dovuta al fatto che, secondo le più recenti rivalutazioni EFSA, evidenziano il persistere di alcune *safety concerns* relative al microrganismo vivo, che al momento non consentono di formulare una presunzione generale di sicurezza, nonostante il favorevole profilo osservato per la forma pastorizzata come *novel food*. [10]

Dal 2004 si sono susseguite numerose ricerche in collaborazione con il professore Patrice Cani dell'Università Cattolica di Louvain in Belgio, le quali hanno portato a conoscere ogni elemento del suo corredo genetico, portandolo ad essere il primo batterio non coltivabile il cui genoma è stato interamente sequenziato nel 2011. Questo ha evidenziato che il genoma da 2,7 Mb si codifica in 61 proteine coinvolte nella degradazione della mucina, tra cui diverse glicosil idrosilasi, proteasi, solfatasi e sialidasi. L'analisi ha inoltre rilevato che il 43% di tutte le proteine che si prevede vengano secrete siano state annotate come proteine ipotetiche, molte delle quali potrebbero essere a loro volta coinvolte nella degradazione e nell'elaborazione della mucina.

La caratterizzazione genomica ha inoltre evidenziato la presenza di due regioni genomiche appartenenti a sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), un meccanismo di difesa dei batteri contro virus e materiale genetico estraneo, oltre a numerose sequenze derivate da fagi. Questo suggerisce che le infezioni virali abbiano probabilmente avuto un ruolo importante nella storia evolutiva e nella speciazione di *A. muciniphila*.

Negli ultimi anni, alcune evidenze sperimentali hanno portato a riconsiderare la classificazione di *A. muciniphila* come batterio strettamente anaerobio. Sebbene questa specie sia tradizionalmente descritta come anaerobia, diversi studi hanno mostrato che essa è in grado di tollerare, almeno per tempi limitati, l'esposizione all'ossigeno manifestando quindi caratteristiche che la avvicinano, in parte, agli anaerobi facoltativi. In particolare il lavoro di Becken e collaboratori ha evidenziato che alcuni ceppi di *A. muciniphila* possono sopravvivere e crescere in condizioni di bassa disponibilità di ossigeno mantenendo però tassi di vitalità significativi in ambienti microaerofili. Questo dato appare particolarmente interessante se si considera che condizioni di questo tipo sono presenti in prossimità della superficie mucosale del tratto gastrointestinale, ossia proprio nella nicchia ecologica in cui il batterio risiede. Tale capacità di adattamento conferma quindi la stretta relazione tra le caratteristiche metaboliche di *A. muciniphila* e il

microambiente intestinale, contribuendo a spiegare la sua peculiare distribuzione lungo il tratto gastroenterico. [11]

## **2.2 Ruolo fisiologico e metabolico**

Dopo aver descritto le principali caratteristiche biologiche e tassonomiche di *Akkermansia muciniphila*, è importante analizzarne il ruolo fisiologico e metabolico all'interno dell'ecosistema intestinale.

Il batterio è localizzato prevalentemente nelle porzioni distali dell'intestino tenue e del colon dove utilizza la mucina come principale fonte di energia e di nutrienti necessari alla sintesi di amminoacidi e gruppi zuccherini indispensabili al proprio sviluppo. Diversi studi hanno dimostrato che *A. muciniphila* è in grado di utilizzare i monosaccaridi derivati dalla mucina tra cui: fucosio, galattosio, N-acetilglucosamina e N-acetilgalattosamina come fonti primarie di carbonio e azoto. Tuttavia la presenza dei singoli zuccheri non sembra sufficiente a sostenere in modo efficace la proliferazione batterica ed in particolare nel caso del galattosio, non è stata rilevata alcuna crescita. Al contrario la combinazione di mucina con un singolo zucchero si associa a un incremento dello sviluppo cellulare, suggerendo che *A. muciniphila* dipenda non solo dal metabolismo dei monosaccaridi, ma anche dalla presenza di ulteriori componenti derivati dalla mucina necessari a garantire condizioni ottimali.

Questa dipendenza da componenti specifici della mucina suggerisce che *A. muciniphila* non sfrutti in modo efficiente substrati più semplici, come il glucosio, quando questi rappresentano l'unica fonte di carbonio disponibile. L'analisi dell'espressione genica ha infatti mostrato che in presenza di glucosio il batterio aumenta l'espressione dei geni coinvolti nel suo metabolismo, inclusi quelli che codificano per enzimi come  $\alpha$ -amilasi e  $\alpha$ -glucosidasi. Tuttavia tale condizione si accompagna anche alla sovraregolazione di numerose proteine associate alla risposta allo stress batterico, indicando che il glucosio, da solo, non costituisce un ambiente metabolico favorevole per la specie. In questo senso il suo utilizzo sembra rappresentare una strategia transitoria di acquisizione energetica,

verosimilmente utile in condizioni di competizione nell'ambiente luminale. Coerentemente con questa osservazione, il metabolismo di *A. muciniphila* risulta rapido ma non costante nel tempo, suggerendo l'esaurimento di alcuni fattori necessari a sostenere la proliferazione quando il batterio utilizza esclusivamente monosaccaridi come substrato. In particolare l'andamento osservato in presenza del solo fucosio o della combinazione di fucosio e glucosio è risultato simile, indicando che tali zuccheri, da soli, non sono sufficienti a garantire uno sviluppo prolungato. Al contrario, gli amminozuccheri come N-acetilglucosammina (GlcNAc) e N-acetilgalattosammina (GalNAc), favoriscono una crescita più lineare e sostenuta. Ciò suggerisce che, nel metabolismo basato su zuccheri non amminici, il fattore limitante possa essere rappresentato dalla disponibilità di una fonte di azoto favorevole, cosa che invece GlcNAc e GalNAc sarebbero in grado di fornire *in vivo*. [11]

Dopo quasi un decennio di ricerche si è riusciti in parte a chiarire i meccanismi biochimici e molecolari attraverso cui esso esplica la sua attività probiotica nell'intestino dell'uomo. Infatti alcune molecole strutturali fungono da segnale di comunicazione con gli enterociti presenti; tra queste gioca un ruolo fondamentale *Amuc\_100*, una proteina costitutiva dei pili dell'*Akkermansia*. [12,13]

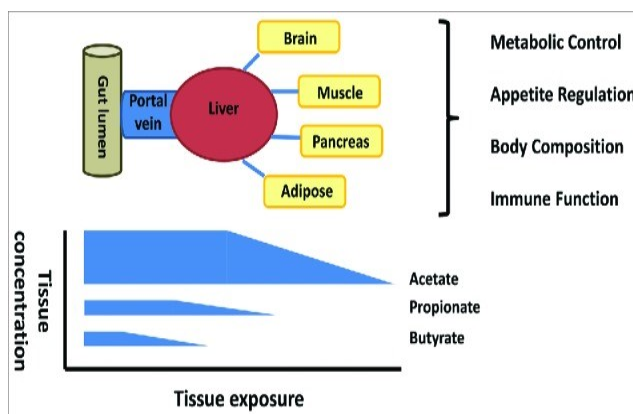
Quest'ultima svolge un ruolo fondamentale in diversi processi fisiologici chiave all'interno dell'intestino. Infatti risulta importante per migliorare la secrezione di muco intestinale, mantenere l'equilibrio della viscosità della mucosa e salvaguardare l'integrità della barriera epiteliale intestinale. Degradando i componenti della mucosa, *A. muciniphila* genera acidi grassi a catena corta, i quali svolgono un duplice ruolo ovvero riducono efficacemente le reazioni infiammatorie e prevengono un aumento della permeabilità intestinale. La ricerca ha inoltre dimostrato che essa può aumentare lo spessore del rivestimento intestinale, rafforzare le funzioni di barriera e promuovere la crescita di comunità microbiche benefiche.

Questi fenomeni indicano il metabolismo del glucosio in *A. muciniphila* come meccanismo temporaneo di acquisizione di energia in caso di spostamento nell'ambiente luminale fortemente competitivo.

È noto che *A. muciniphila* produca acidi grassi a catena corta come prodotti del catabolismo degli zuccheri, vale a dire: acetato, propionato e piccole quantità di succinato.

Il succinato è normalmente un intermedio nel processo di conversione dei carboidrati alimentari in propionato. Quando si accumula esso viene secreto all'esterno della cellula suggerendo che la sua conversione in propionato rappresenti una fase limitante della via metabolica.

Il succinato viene inoltre riassorbito in misura significativa da *A. muciniphila* durante la fase stazionaria della crescita batterica, indicando un suo possibile riutilizzo per un ulteriore guadagno energetico. Per crescita batterica si intende l'aumento del numero di cellule microbiche nel tempo, determinato dalla disponibilità di nutrienti e dalla capacità del microrganismo di utilizzarli in modo efficiente per sostenere i processi metabolici e la divisione cellulare.



**Figura 2.** Produzione degli acidi grassi a catena corta da parte del microbiota intestinale e principali effetti metabolici

*Schema della formazione degli acidi grassi a catena corta da parte del microbiota intestinale e dei loro effetti a livello intestinale, epatico e sistemico, con particolare riferimento ad acetato, propionato e butirato. Adattata da Morrison e Preston, Gut Microbes, 2016, fig. 1. [14]*

La dieta rappresenta uno dei fattori più importanti nel modulare la struttura, la composizione e la funzione del microbioma intestinale umano. Nel caso di *A.*

*muciniphila* l'influenza dei fattori dietetici appaiono evidenti già nelle primissime fasi della vita, essa è presente nell'organismo umano fin dai primi giorni di vita, quando inizia a colonizzare l'intestino. In questa fase precoce, così come avviene per i bifidobatteri, il suo sviluppo è favorito dagli oligosaccaridi del latte materno, molecole che svolgono una funzione prebiotica e contribuiscono a limitare la proliferazione di batteri patogeni, continuando a crescere in abbondanza fino ad arrivare a costituire il 3-5% del microbiota batterico. Da studi recenti è emerso che la betaina materna aumenta transitoriamente l'abbondanza di *A. muciniphila* sia *in vivo* che *in vitro*. È stato inoltre dimostrato che anche i carboidrati complessi non coniugati che fungono da prebiotici per il microbiota intestinale neonatale promuovono l'espansione di *Akkermansia*. [1,2,11] Inoltre l'integrazione con inulina, butirrato, psillio e beta-glucano derivati dall'avena possono portare ad un aumento della quantità di *Akkermansia*, ma non solo, anche i polifenoli alimentari, composti di origine vegetale con proprietà antiossidanti e antinfiammatorie ne aumentano l'abbondanza. Sebbene la biogeografia di *A. muciniphila* lungo il tratto gastrointestinale umano non sia ancora completamente caratterizzata, numerose evidenze indicano una sua localizzazione preferenziale a livello della mucosa intestinale. Inoltre la sua presenza è stata rilevata anche nell'intestino tenue, suggerendo un potenziale ruolo fisiologico che si estende oltre il colon e che potrebbe influenzare processi digestivi, immunitari ed endocrini lungo l'intero asse intestinale.

L'attività mucinolitica di questo batterio, lungi dal compromettere la barriera intestinale, sembra stimolare un aumento compensatorio della produzione di muco da parte delle cellule caliciformi, contribuendo al rinnovamento e al mantenimento dell'integrità dello strato mucoso. Questo processo favorisce la preservazione della funzione barriera dell'epitelio intestinale, riducendo la permeabilità intestinale e limitando la traslocazione di microrganismi patogeni e lipopolisaccaridi nel circolo sistemico. Di conseguenza, *A. muciniphila* svolge un ruolo chiave nella prevenzione dell'infiammazione cronica di basso grado, spesso associata a disordini metabolici e infiammatori.

### 2.3 Effetti sulla barriera intestinale e sul sistema immunitario

La barriera intestinale rappresenta una struttura fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo, poichè separa l'ambiente luminale, ricco di antigeni alimentari e componenti microbiche, dal compartimento interno dell'ospite. Essa è costituita da più elementi strettamente integrati tra loro: lo strato di muco, l'epitelio intestinale con le sue giunzioni intercellulari e la componente immunitaria associata.

Il microbiota intestinale svolge un ruolo essenziale nel mantenimento dell'integrità di questa barriera, tra i microrganismi commensali maggiormente studiati, *A. muciniphila* emerge come uno dei principali regolatori del suo equilibrio. [1,2,11] In particolare l'attività metabolica di questo microrganismo stimola un aumento compensatorio della sintesi di muco da parte delle cellule caliciformi, favorendo il rinnovamento dello strato di muco e il mantenimento di una separazione efficace tra microbiota ed epitelio. Parallelamente *A. muciniphila* modula l'espressione delle proteine delle giunzioni strette, come zonula occludens-1, occludina e claudine, le quali risultano fondamentali per la regolazione della permeabilità paracellulare. L'aumento dell'espressione di queste proteine contribuisce a ridurre la permeabilità intestinale e a limitare la traslocazione nel circolo sistemico di componenti microbiche pro-infiammatorie come i lipopolisaccaridi. Questo meccanismo risulta particolarmente rilevante nella prevenzione della cosiddetta "leaky gut", termine che descrive una condizione di aumentata permeabilità intestinale dovuta a una compromissione della funzione barriera dell'epitelio, frequentemente associata a stati infiammatori cronici e alterazioni metaboliche.

Un ulteriore contributo al mantenimento della barriera intestinale deriva dalla produzione di metaboliti bioattivi, in particolare acidi grassi a catena corta (*Short Chain Fatty Acids-SCFA*), quali propionato e acetato, generati direttamente o indirettamente dal metabolismo della mucina.

Gli SCFA esercitano un effetto trofico sulle cellule epiteliali intestinali e agiscono come molecole segnale, promuovendo la differenziazione cellulare, la produzione

di muco e il rafforzamento delle difese barriera. Nel complesso, queste evidenze indicano che *A. muciniphila* contribuisce in modo determinante alla stabilità strutturale e funzionale della barriera intestinale.

Il sistema immunitario intestinale costituisce a sua volta una componente essenziale della barriera mucosale, svolge un ruolo centrale nel mantenimento dell'equilibrio tra tolleranza nei confronti del microbiota commensale e risposta difensiva verso agenti patogeni. In questo contesto *A. muciniphila* esercita una significativa attività immunomodulante influenzando sia l'immunità innata sia quella adattiva.

A livello dell'immunità innata *A. muciniphila* interagisce con le cellule epiteliali intestinali e con le cellule immunitarie residenti attraverso componenti strutturali della sua membrana esterna. In particolare, la proteina *Amuc\_1100* è in grado di attivare recettori dell'immunità innata, come il *Toll-like receptor 2* (TLR2) inducendo una risposta immunitaria controllata e non eccessivamente pro-infiammatoria. [11,13] Questa interazione favorisce l'espressione di molecole coinvolte nel rafforzamento della barriera epiteliale e contribuisce al mantenimento della tolleranza immunologica nei confronti del microbiota residente.

Numerose evidenze sperimentali indicano inoltre che la presenza di *A. muciniphila* è associata a una riduzione della produzione di citochine pro-infiammatorie, quali TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 $\beta$ , e a un aumento di mediatori antinfiammatori, in particolare l'interleuchina-10. Questo profilo citochinico contribuisce a limitare lo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico di basso grado, tipico di diverse condizioni patologiche, tra cui obesità, diabete di tipo 2 e malattie infiammatorie croniche intestinali.

Per quanto riguarda l'immunità adattiva *A. muciniphila* influenza l'equilibrio delle popolazioni linfocitarie attraverso la produzione di SCFA, che promuovono la differenziazione delle cellule T regolatorie.

Queste cellule svolgono un ruolo fondamentale nel controllo delle risposte immunitarie eccessive e nella soppressione delle risposte pro-infiammatorie

mediate da cellule Th1 e Th17. L'aumento delle cellule T regolatorie associato alla presenza di *A. muciniphila* contribuisce quindi al mantenimento dell'omeostasi immunitaria e alla prevenzione di risposte autoimmuni o infiammatorie inappropriate. [11]

Recenti studi hanno inoltre evidenziato che non solo il batterio vitale, ma anche alcune sue componenti strutturali, come le vescicole extracellulari e le forme inattivate o pasteurizzate, sono in grado di esercitare effetti immunomodulatori. [12,13] Tali elementi conservano infatti la capacità di interagire con il sistema immunitario dell'ospite, rafforzando le difese mucosali e inducendo risposte antinfiammatorie, con potenziali vantaggi in termini di sicurezza e applicazione clinica.

### **3. Effetti benefici e studi scientifici**

#### **3.1 Regolazione della barriera intestinale**

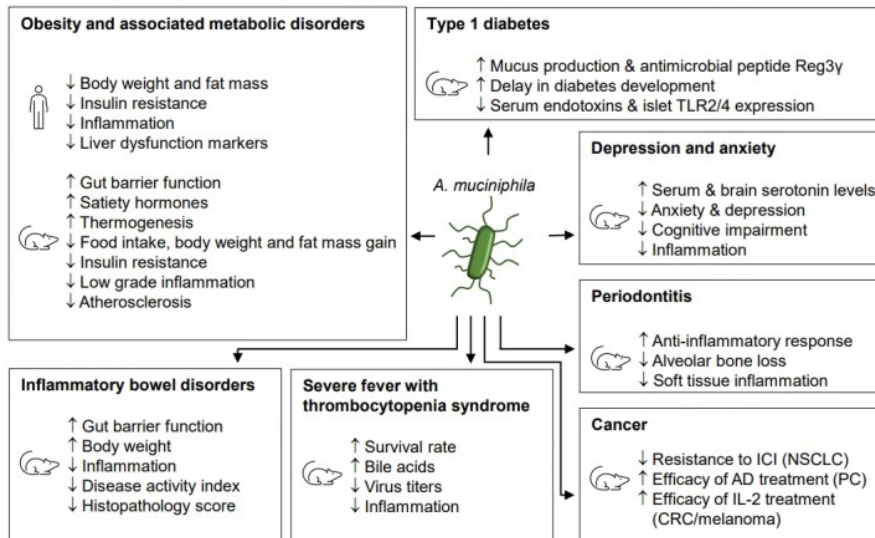
La barriera intestinale costituisce un sistema altamente specializzato e dinamico, fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo. Essa assolve una duplice funzione, da un lato consente l'assorbimento selettivo dei nutrienti, dall'altro impedisce il passaggio incontrollato di microrganismi, tossine e antigeni dal lume intestinale al circolo sistemico. La sua integrità dipende dall'interazione coordinata tra strato mucoso, epitelio intestinale, giunzioni intercellulari e sistema immunitario associato alla mucosa. In tale contesto, il microbiota intestinale svolge un ruolo essenziale nella regolazione e nel mantenimento della funzione di barriera.

Tra i microrganismi commensali maggiormente studiati *A. muciniphila* si distingue per il suo contributo al mantenimento dell'integrità intestinale. Questo batterio, specializzato nella degradazione della mucina è stato inizialmente considerato come un possibile fattore di indebolimento della barriera. Tuttavia, le evidenze disponibili indicano che la sua presenza si associa, al contrario, a un rafforzamento dello strato mucoso.

L'attività mucinolitica di *A. muciniphila* stimola una risposta compensatoria dell'epitelio, con incremento della sintesi e della secrezione di nuove mucine, in particolare MUC2. Ne consegue un continuo rinnovamento dello strato di muco, con mantenimento del suo spessore e della sua funzionalità. Tale processo garantisce un'efficace separazione tra il microbiota luminale e la superficie epiteliale, limitando il contatto diretto tra batteri e cellule dell'ospite e riducendo, di conseguenza, il rischio di attivazione infiammatoria e di danno tissutale. Inoltre, *A. muciniphila*, contribuisce alla conservazione della fisiologica organizzazione del muco, caratterizzata da uno strato interno più denso e sostanzialmente sterile e da uno strato esterno più permissivo alla colonizzazione microbica.

Oltre a modulare lo strato mucoso, *A. muciniphila* esercita un'azione diretta sull'epitelio intestinale, promuovendo il rafforzamento delle giunzioni intercellulari deputate al controllo della permeabilità paracellulare. Le *tight junctions*, costituite da proteine quali *zonula occludens-1*, occludina e claudine rappresentano un elemento cruciale della barriera intestinale, in quanto regolano il passaggio selettivo di soluti e ostacolano la traslocazione di molecole proinfiammatorie. Studi sperimentali hanno mostrato che la presenza di *A. muciniphila* si associa ad un aumento dell'espressione genica e ad una migliore organizzazione di tali proteine, con conseguente riduzione della permeabilità intestinale e della traslocazione sistemica di componenti microbiche, quali i lipopolisaccaridi che contribuiscono all'infiammazione sistemica. Questo aspetto risulta particolarmente rilevante, poiché l'endotossiemia metabolica è considerata uno dei principali meccanismi coinvolti nello sviluppo dell'infiammazione cronica di basso grado e delle alterazioni metaboliche a essa correlate. [11]

Nel complesso, tali evidenze si inseriscono in un quadro più ampio di effetti benefici esercitati da *A. muciniphila*, sintetizzati nella figura 3.



**Figura 3.** Principali effetti benefici associati ad *Akkermansia muciniphila* su peso corporeo, metabolismo, barriera intestinale e infiammazione

*Sintesi dei principali effetti benefici associati alla somministrazione di Akkermansia muciniphila nei modelli sperimentali, con particolare riferimento a metabolismo energetico, infiammazione, funzione barriera e omeostasi intestinale. Adattata da Segers e de Vos, microbiome research reports, 2023, fig.1. [15]*

Un ulteriore meccanismo attraverso cui *A. muciniphila* esercita i propri effetti benefici è rappresentato dalla produzione di metaboliti bioattivi, in particolare acidi grassi a catena corta, quali acetato e propionato. Questi composti derivano sia dal metabolismo della mucina sia dalle interazioni trofiche con altri microrganismi intestinali, configurando *A. muciniphila* come un nodo centrale nelle reti metaboliche del microbiota. Gli SCFA esercitano un'azione trofica sull'epitelio, favorendo la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza cellulare, e agiscono inoltre come molecole segnale attraverso l'attivazione dei recettori accoppiati a proteine G, come GPR41 e GPR43. Mediante tali vie, essi contribuiscono al mantenimento dell'integrità della barriera, promuovendo sia la produzione di muco sia l'espressione delle proteine delle *tight junctions*.

Le evidenze più recenti suggeriscono che gli effetti favorevoli di *A. muciniphila* non dipendono esclusivamente dalla presenza del batterio vitale. Un ruolo rilevante sembra essere svolto anche dalle componenti strutturali e dalle molecole derivate, tra cui le vescicole extracellulari le quali partecipano alla comunicazione tra il microrganismo e le cellule dell'ospite. Tali vescicole, contenenti proteine,

lipidi e altre molecole bioattive, sono in grado di interagire direttamente con l'epitelio intestinale modulandone l'espressione genica e sostenendo la funzione barriera. In modelli sperimentali di danno intestinale e colite, la somministrazione è stata associata ad un miglioramento dell'integrità epiteliale, a una riduzione della permeabilità intestinale e a un incremento dell'espressione di mucine e proteine delle *tight junctions*.

Di particolare interesse in ambito farmaceutico è l'osservazione che anche forme inattivate o pastorizzate di *A. muciniphila* conservano una significativa attività biologica. Studi preclinici e clinici hanno evidenziato che la somministrazione della forma pastorizzata è in grado di migliorare l'integrità della barriera intestinale, riducendo i marcatori di permeabilità e rafforzando le giunzioni epiteliali con un profilo di sicurezza potenzialmente più favorevole rispetto al batterio virale. Tali risultati hanno contribuito a definire *A. muciniphila* come un probiotico di nuova generazione e, più in generale, come una promettente fonte di postbiotici funzionali, ossia preparazioni ottenute da microrganismi inattivati o dai loro componenti bioattivi capaci di esercitare effetti benefici sull'ospite. [11-13,16]

### **3.2 Modulazione dell'infiammazione**

L'infiammazione rappresenta una risposta fisiologica essenziale del sistema immunitario a stimoli dannosi, tuttavia quando assume carattere cronico costituisce un elemento patogenetico rilevante nello sviluppo di numerose patologie metaboliche, gastrointestinali e sistemiche. In questo contesto il microbiota intestinale svolge un ruolo cruciale nella regolazione delle risposte immunitarie e *A. muciniphila* è emerso come uno dei microrganismi commensali più rilevanti per il suo potenziale.

Evidenze precliniche e cliniche indicano che *A. muciniphila* è in grado di attenuare stati infiammatori sia a livello intestinale sia sistemico attraverso molteplici meccanismi integrati. Un aspetto centrale riguarda la capacità di ridurre

l'espressione di citochine pro-infiammatorie quali interleuchina-6, TNF  $\alpha$  e IL-1- $\beta$ , considerati marcatori chiave dell'infiammazione cronica.

In modelli murini di colite indotta da trinitrobenzene solfonico, la somministrazione di *A. muciniphila* ha determinato una significativa *down-regulation* dell'espressione del *pathway* IL6/STAT3, suggerendo un'azione diretta sull'inibizione delle vie molecolari responsabili della cascata infiammatoria. Tale effetto si associa inoltre a un aumento della diversità microbica intestinale, condizione generalmente correlata a un ambiente meno pro-infiammatorio. [1,2,11]

Ulteriori studi hanno evidenziato la capacità di *A. muciniphila* di modulare importanti vie di trasduzione del segnale coinvolte nella risposta infiammatoria. In modelli sperimentali di infiammazione indotta da lipopolisaccaride, la sua somministrazione è stata associata a una riduzione dell'attività del *pathway* TLR2/MyD88/NF $\kappa$ B. L'inibizione di tali vie non solo limita la produzione di mediatori infiammatori ma contribuisce anche al mantenimento dell'integrità della barriera intestinale, poiché l'attivazione cronica di NF- $\kappa$ B è nota per compromettere l'espressione delle proteine delle *tight junction*.

Un ulteriore contributo alla modulazione dell'infiammazione deriva dalla produzione di metaboliti bioattivi, in particolare acidi grassi a catena corta quali acetato, propionato e butirato. Questi composti, derivanti dal metabolismo della mucina e dalle interazioni con altri membri del microbiota agiscono come molecole segnale in grado di influenzare direttamente le risposte immunitarie. Attraverso il legame con recettori specifici, quali GPR41, GPR43 e GPR109A, gli SCFA esercitano effetti anti-infiammatori, inibendo la produzione di mediatori pro-infiammatori e promuovendo l'espansione di cellule T regolatorie (Treg). Queste ultime svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della tolleranza immunitaria mediante la secrezione di citochine anti-infiammatorie, come l'interleuchina-10.

Gli effetti immunomodulatori di *A. muciniphila* non si limitano soltanto alla produzione di metaboliti, ma coinvolgono anche un'interazione diretta con le

cellule del sistema immunitario. Studi preclinici hanno dimostrato che il batterio è in grado di stimolare la produzione di interleuchina-22 da parte della *innate lymphoid cells* e di promuovere la sintesi di acido retinoico da parte delle cellule dendritiche, processi che favoriscono la riparazione mucosale e la regolazione della risposta immunitaria locale. Parallelamente, una maggiore abbondanza di *A. muciniphila* è stata associata a un incremento della popolazione di cellule T regolatorie, contribuendo al contenimento delle risposte pro-infiammatorie.

Parallelamente una maggiore abbondanza di *A. muciniphila* è stata associata a un incremento della popolazione di cellule T regolatorie, contribuendo al contenimento delle risposte pro-infiammatorie.

Gli effetti di questo microrganismo si estendono anche a livello sistemico. In modelli murini di invecchiamento, la sua somministrazione è stata associata a una riduzione dei livelli di IL-6 sia nel circolo periferico sia a livello cerebrale, con un concomitante miglioramento delle funzioni cognitive, suggerendo un possibile ruolo nella modulazione dell'infiammazione sistemica legata all'età. Analogamente, in condizioni patologiche quali obesità, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari, l'integrazione con *A. muciniphila* è risultata associata a una riduzione dei livelli sistemici di lipopolisaccaride, contribuendo a limitare l'attivazione di risposte immunitarie pro-infiammatorie.

Nel complesso, la modulazione dell'infiammazione da parte di *A. muciniphila* appare come un processo multifattoriale che coinvolge l'inibizione delle vie di segnalazione pro-infiammatorie, la produzione di metaboliti immunomodulatori, l'interazione diretta con le cellule immunitarie e la modulazione della composizione del microbiota, contribuendo così al mantenimento di un ambiente meno permissivo allo sviluppo dell'infiammazione cronica. [11,17]

### **3.3 Effetti sul metabolismo energetico e lipidico**

La regolazione del metabolismo energetico e lipidico rappresenta un nodo fisiologico centrale per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo, con implicazioni dirette nello sviluppo di patologie metaboliche quali obesità, diabete

di tipo 2 e steatosi epatica non alcolica. [17] In questo ambito, il microbiota intestinale è emerso come un importante modulatore dei processi metabolici, e *Akkermansia muciniphila* è stato identificato come uno dei microrganismi più promettenti per la regolazione dell'equilibrio energetico e del metabolismo lipidico.

Le numerose evidenze precliniche e cliniche suggeriscono che *A. muciniphila* intervenga su diversi aspetti della fisiologia metabolica, influenzando la spesa energetica, la distribuzione del tessuto adiposo e l'efficienza nell'utilizzo dei nutrienti. In modelli murini alimentati con diete ad alto contenuto lipidico, la somministrazione del batterio, in particolare nella forma pasteurizzata, è stata associata a una riduzione dell'aumento di peso corporeo e della massa grassa, in assenza di variazioni significative dell'introito calorico. [11,13] Tali effetti sono stati correlati a un incremento della spesa energetica e dell'attività spontanea, suggerendo un ruolo nella modulazione del bilancio energetico complessivo.

L'aumento della spesa energetica non sembra dipendere da un incremento della termogenesi nel tessuto adiposo bruno, ma piuttosto da modificazioni nei processi di turnover delle cellule epiteliali intestinali e nella gestione complessiva dell'energia, indicando un effetto sistemico sull'efficienza metabolica. Parallelamente è stata osservata una maggiore escrezione energetica fecale, suggerendo un coinvolgimento nella regolazione dell'assorbimento dei nutrienti e della quota di energia effettivamente trattenuta dall'organismo. [18]

Per quanto riguarda il metabolismo lipidico, *A. muciniphila* esercita effetti favorevoli su diversi aspetti contribuendo al miglioramento del profilo metabolico complessivo. In modelli sperimentali, la sua somministrazione è stata associata a una riduzione dell'accumulo di lipidi nei tessuti periferici inclusi fegato e tessuto adiposo, con effetti protettivi nei confronti della steatosi epatica e dell'ipertrofia adipocitaria. In particolare, nei modelli murini con dieta ricca di grassi, il trattamento ha determinato una diminuzione del contenuto epatico di trigliceridi, del peso corporeo e del volume adipocitario, accompagnata da un miglioramento della tolleranza al glucosio.

Questi effetti risultano in parte mediati da alterazioni nella composizione degli acidi biliari e nell'attivazione dell'asse intestino-fegato FXR-FGF15. L'attivazione del recettore nucleare FXR (*Farnesoid X Receptor*) a livello intestinale induce la produzione di FGF15, che agisce sul fegato modulando la sintesi degli acidi biliari secondari, promuovendo l'attivazione di vie metaboliche associate alla riduzione dei depositi lipidici e al miglioramento della sensibilità insulinica. [19]

Ulteriori evidenze derivano da modelli sperimentali alternativi, come l'utilizzo di *caenorhabditis elegans* nei quali la somministrazione di *A. muciniphila* pasteurizzata ha determinato una riduzione dell'accumulo lipidico totale e dei livelli di acidi grassi liberi. Analisi trascrittomiche hanno evidenziato un'attivazione delle vie della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi e una concomitante inibizione della loro biosintesi, suggerendo uno spostamento dell'equilibrio metabolico verso un profilo più favorevole. [20]

I benefici metabolici di *A. muciniphila* si estendono anche al metabolismo glucidico. In modelli animali e in studi preliminari sull'uomo, livelli più elevati del batterio sono stati associati a un miglioramento della tolleranza al glucosio e della sensibilità insulinica. Tali effetti possono derivare sia dalla riduzione dell'infiammazione sistemica, sia dalla modulazione della secrezione di ormoni enteroendocrini coinvolti nella regolazione del metabolismo energetico.

A livello molecolare, sono stati proposti diversi meccanismi alla base di tali effetti. In particolare, alterazioni dei livelli di mono-palmitoil-glicerolo, ligando endogeno del recettore PPAR- $\alpha$ , sono state osservate in soggetti obesi dopo supplementazione con *A. muciniphila*. L'attivazione di questo recettore, noto per regolare l'espressione di geni coinvolti nella  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi e nel metabolismo lipidico, suggerisce un possibile collegamento diretto tra il microrganismo e il controllo delle principali vie metaboliche energetiche. [21]

### 3.4 Evidenze cliniche principali

Alla luce dei molteplici meccanismi fisiologici e molecolari descritti nei paragrafi precedenti *Akkermansia muciniphila* è emersa come uno dei microrganismi intestinali di maggiore interesse in ambito biomedico. Negli ultimi anni, l'attenzione della ricerca si è progressivamente spostata dai modelli preclinici agli studi clinici sull'uomo con l'obiettivo di valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia in differenti contesti fisiopatologici. Sebbene le evidenze cliniche siano ancora limitate rispetto ai dati sperimentali, esse risultano complessivamente coerenti con i meccanismi biologici precedentemente descritti e delineano un profilo clinico promettente. [7,11]

Studi osservazionali basati su analisi metagenomiche hanno evidenziato che una maggiore abbondanza di *A. muciniphila* nel microbiota intestinale si associa a uno stato metabolico più favorevole. In soggetti normopeso e metabolicamente sani il batterio risulta infatti più rappresentata rispetto a individui affetti da obesità, sindrome metabolica, diabete di tipo 2 o steatosi epatica non alcolica.

In particolare, la sua presenza correla negativamente parametri quali l'indice di massa corporea, circonferenza vita, livelli di trigliceridi plasmatici e marcatori di infiammazione sistemica, mentre mostra una correlazione positiva con la sensibilità insulinica. Sebbene tali studi non consentano di stabilire un nesso causale, essi supportano l'ipotesi di un possibile ruolo di *A. muciniphila* come biomarcatore di salute metabolica. [11,22]

Un passaggio fondamentale verso l'applicazione clinica è rappresentato dagli studi di intervento. Il primo trial randomizzato, controllato con placebo, condotto su soggetti in sovrappeso e obesi con insulino-resistenza, ha dimostrato che la somministrazione quotidiana di *A. muciniphila*, sia in forma vitale sia pasteurizzata è sicura e ben tollerata. Durante il periodo di trattamento non sono stati osservati eventi avversi significativi né alterazioni clinicamente rilevanti dei parametri ematochimici, confermando la compatibilità del microrganismo con l'organismo umano. Questo dato assume particolare rilievo, considerando che la natura

mucinolitica del batterio avrebbe potuto teoricamente sollevare dubbi in merito a un possibile danneggiamento dello strato mucoso. Al contrario, le evidenze cliniche confermano un effetto favorevole sulla funzione barriera.

Coerentemente con quanto osservato nei modelli sperimentali la somministrazione di *A. muciniphila* si associa a un miglioramento dei marcatori indiretti di integrità della barriera intestinale. In particolare nei soggetti trattati è stata osservata una riduzione dei livelli plasmatici di lipopolisaccaridi e di marcatori di endotossemia metabolica, suggerendo una diminuzione della permeabilità intestinale, tale evidenza supporta l'ipotesi di un'azione protettiva sull'epitelio intestinale anche nell'uomo.

Parallelamente la riduzione dell'endotossemia si accompagna a un miglioramento del profilo infiammatorio sistemico. Nei soggetti trattati con *A. muciniphila* pastorizzata è stata osservata una diminuzione dei livelli circolanti di alcuni marcatori infiammatori tra cui la proteina C-reattiva e specifiche citochine pro-infiammatorie, sebbene non tutti i parametri abbiano raggiunto una significatività statistica. Tali risultati, seppur preliminari risultano coerenti con il ruolo immunomodulatorio del microorganismo e suggeriscono un potenziale effetto nella riduzione dell'infiammazione cronica di basso grado.

Gli effetti clinicamente più rilevanti riguardano la modulazione del metabolismo energetico e glucidico. Nei soggetti trattati con la forma pastorizzata sono stati osservati miglioramenti della sensibilità insulinica, valutata mediante indici surrogati, e una riduzione dei livelli di insulina a digiuno. Questi risultati si inseriscono coerentemente nel quadro fisiopatologico, il miglioramento della funzione barriera e la riduzione dell'infiammazione i quali contribuiscono alla regolazione del metabolismo glucidico. [7,11]

Per quanto concerne il metabolismo lipidico, alcuni studi hanno riportato una riduzione dei livelli di colesterolo totale e delle lipoproteine a bassa densità, nonché una tendenza al miglioramento di altri parametri cardiometabolici. Sebbene l'entità di tali effetti sia moderata, essa assume rilevanza clinica in considerazione della breve durata degli interventi e dell'assenza di modifiche

dietetiche significative. Ciò suggerisce un possibile ruolo di *A. muciniphila* come modulatore complementare del metabolismo lipidico, nell'ambito di strategie integrate di prevenzione e gestione delle patologie metaboliche.

Un aspetto di particolare interesse è rappresentato dalla maggiore efficacia, in alcuni parametri, della forma pasteurizzata rispetto al batterio vitale. Tale osservazione indica che gli effetti benefici di *A. muciniphila* non dipendono esclusivamente dalla sua attività metabolica diretta, ma anche da componenti strutturali e molecole bioattive in grado di interagire con l'epitelio intestinale e il sistema immunitario. Questa evidenza rafforza il concetto di *A. muciniphila* come postbiotico funzionale, caratterizzato da maggiore stabilità, sicurezza e standardizzazione rispetto ai probiotici tradizionali.

Nonostante i risultati incoraggianti le evidenze cliniche attualmente disponibili presentano alcune limitazioni. La maggior parte degli studi è condotta su campioni numericamente ridotti, con una durata relativamente breve su popolazioni selezionate (prevalentemente soggetti in sovrappeso o con alterazioni metaboliche).

Pertanto sono necessari ulteriori studi clinici randomizzati su larga scala e di maggiore durata per confermare l'efficacia di *A. muciniphila* in diversi contesti patologici e per definire i dosaggi e le modalità di somministrazioni ottimali.

[7,11,17]

## **4. Akkermansia muciniphila come probiotico di nuova generazione**

### **4.1 Definizione di probiotico e criteri di selezione**

L'interesse crescente verso *A. muciniphila* come possibile probiotico di nuova generazione si inserisce in un contesto scientifico in cui il concetto stesso di probiotico è stato progressivamente precisato e reso più rigoroso. Prima di discutere la posizione di *A. muciniphila* all'interno di questa categoria risulta quindi importante chiarire la definizione di probiotico attualmente accettata e i

criteri che un microrganismo deve avere per essere selezionato e proposto come tale.

La definizione più ampiamente riconosciuta di probiotico deriva dal lavoro congiunto di FAO/WHO ed è stata successivamente riaffermata e chiarita dal consenso ISAPP (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*), un'associazione scientifica internazionale che riunisce esperti nel campo dei probiotici, dei prebiotici e del microbiota, con l'obiettivo di promuovere la ricerca, fornire definizioni e raccomandazioni condivise dalla comunità scientifica.

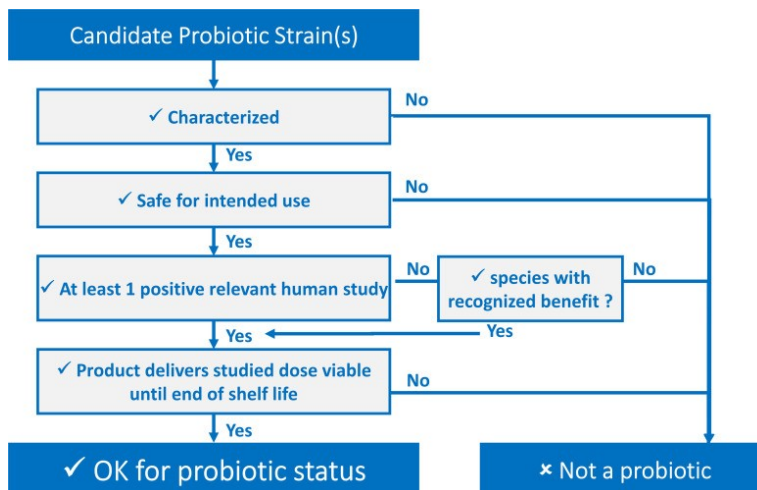
Secondo tale definizione i probiotici sono “microrganismi vivi che quando somministrati in quantità adeguate conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite”. Il documento di consenso ISAPP del 2014 ribadisce esplicitamente la validità data dalla FAO/WHO precisandone inoltre l'ambito d'uso e sottolineando la necessità di impiegare il termine probiotico in modo scientificamente accurato per distinguere prodotti con evidenze reali, da prodotti genericamente associati al microbiota. [5]

Ne consegue che non tutti i microrganismi benefici o commensali intestinali possono essere definiti probiotici in senso stretto. Infatti a tal fine è necessario che vi siano evidenze cliniche nell'uomo, un'adeguata caratterizzazione del ceppo, la garanzia della sua vitalità e di una quantità efficace nel prodotto finale. Questa precisazione è particolarmente importante nel caso di *A. muciniphila* poiché il suo sviluppo applicativo coinvolge anche forme pasteurizzate/non vitali, le quali richiedono una distinzione terminologica rispetto alla definizione classica di probiotico. Il consenso ISAPP sui postbiotici del 2021 sottolinea infatti che la vitalità è un requisito essenziale del probiotico, mentre preparazioni inattivate rientrano in un'altra categoria concettuale. [16]

La selezione di un microrganismo come probiotico non può basarsi esclusivamente sulla sua presenza nel microbiota umano o su associazioni osservative con lo stato di salute. I documenti FAO/WHO sulla valutazione dei probiotici negli alimenti e i contributi più recenti di ISAPP e di esperti del settore definiscono un percorso

articolato di qualificazione, il quale include: caratterizzazione microbiologica, valutazione della sicurezza, dimostrazione di efficacia e qualità del prodotto.

Il report FAO/WHO del 2002 in particolare propone una procedura sistematica per la valutazione dei probiotici e indica come requisiti minimi la corretta identificazione del ceppo, la valutazione di sicurezza e la dimostrazione sperimentale del beneficio. Il documento Binda et al. del 2020, elaborato nell'ambito di un gruppo di lavoro internazionale, riassume in modo ancora più sintetico e operativo i criteri per qualificare un microrganismo come probiotico. Questi criteri sono 4 e sono: sufficiente caratterizzazione, sicurezza per l'uso previsto, almeno uno studio clinico umano positivo e la presenza nel prodotto in forma vitale e in quantità efficace fino alla fine della *shelf-life*. [23]



**Figura 4.** Criteri per la qualificazione di un microrganismo come probiotico

*Schema decisionale per la valutazione dei microrganismi candidati a probiotici, basato sui principali criteri definiti dalla letteratura scientifica, tra cui caratterizzazione del ceppo, sicurezza per l'uso previsto, dimostrazione di efficacia clinica e presenza nel prodotto in forma vitale e in quantità adeguata fino alla fine della shelf life. Adattata da Binda et al., Nutrients, 2020, Fig.1 [23]*

Il primo criterio di selezione riguarda la caratterizzazione microbiologica e genetica. Per poter attribuire a un microrganismo lo status di probiotico non è sufficiente identificarlo a livello di specie, è necessario definirne chiaramente anche il ceppo poiché le proprietà funzionali, la sicurezza e la stabilità possono variare in modo rilevante tra ceppi diversi della stessa specie. Le linee guida FAO/WHO raccomandano una identificazione mediante metodi fenotipici e genotipici e il deposito del ceppo in una collezione internazionale riconosciuta.

Nel caso di *A. muciniphila*, questo criterio assume particolare rilievo perché la letteratura più recente evidenzia una certa eterogeneità intra-specie con filogruppi e differenze genotipiche potenzialmente associate a proprietà metaboliche differenti. Review recenti sottolineano infatti, che gli effetti biologici di *A. muciniphila* possono dipendere dal ceppo, dalla forma di preparazione e dal contesto fisiologico dell'ospite. Questo rafforza la necessità di evitare generalizzazioni e di riferirsi in modo preciso al ceppo impiegato negli studi sperimentali e clinici. [24,25]

Dal punto di vista della selezione quindi la caratterizzazione di *A. muciniphila* come candidato a *next generation probiotic*, richiede non solo conferma tassonomica, ma anche una descrizione accurata di stabilità, proprietà fenotipiche, condizioni di crescita e profilo genetico. Tale esigenza è coerente con l'approccio richiesto in ambito nutraceutico dove la riproducibilità del prodotto è un elemento imprescindibile.

Il secondo criterio fondamentale è la sicurezza per l'uso previsto.

Nei percorsi classici di selezione dei probiotici, questo passaggio comprende la valutazione di potenziale patogenicità, tossigenicità, profilo di resistenza agli antibiotici, eventuali effetti avversi in modelli preclinici e successivamente tollerabilità nell'uomo. Le linee guida FAO/WHO collocano la *safety assessment* come passaggio centrale prima di qualsiasi rivendicazione funzionale.

Nel caso di *A. muciniphila* la questione sicurezza è stata particolarmente attenzionata per due motivi: da un lato si tratta di un batterio Gram-negativo, quindi con caratteristiche strutturali che richiedono un'attenta valutazione, dall'altro la sua attività mucinolitica ha inizialmente sollevato dubbi teorici sul possibile impatto negativo sulla barriera mucosa. Tuttavia l'evidenza disponibile ha progressivamente mostrato che *A. muciniphila* è un microrganismo commensale ben caratterizzato, non tossinogeno e avirulento e componente del microbiota intestinale umano normale.

Inoltre i dati preclinici e clinici non hanno evidenziato segnali di danno alla barriera intestinale nei contesti studiati.

Il parere EFSA del 2021 su pasteurised *A. muciniphila* come *novel food* rappresenta un passaggio chiave in questa direzione. [26] La letteratura recente che discute criticamente la supplementazione di *A.muciniphila* insiste comunque sul fatto che la sicurezza debba essere interpretata in modo contestuale ovvero tramite dose, durata di trattamento, stato clinico dell'ospite e integrità della mucosa intestinale che possono influenzare il profilo di rischio-beneficio. Questa impostazione è coerente con i criteri moderni di selezione dei probiotici, che non considerano la sicurezza come un attributo astratto dalla specie ma come una caratteristica valutata in relazione allo specifico uso previsto. [27]

Il terzo criterio fondamentale è la dimostrazione di un beneficio per la salute dell'ospite, preferibilmente attraverso studi clinici umani ben disegnati. In questa prospettiva, la sola associazione tra abbondanza di un microrganismo e fenotipo di salute non è sufficiente a qualificarlo come probiotico. È necessario dimostrare, mediante intervento, che la somministrazione del microrganismo produce un esito favorevole clinicamente o biologicamente rilevante.

Questo principio è esplicitamente richiamato sia dal consenso ISAPP sia dal *framework* operativo proposto da Binda et al. [5,28]

Per *A. muciniphila* il rationale biologico è particolarmente solido. Numerosi studi preclinici e *review* mostrano effetti sulla barriera intestinale, sull' infiammazione e sul metabolismo energetico/lipidico ovvero su tre assi fisiopatologici altamente rilevanti per malattie metaboliche e infiammatorie.

La review di Cani et al. del 2022 ha contribuito in modo decisivo a consolidare questa visione, definendo *A. muciniphila* come paradigma dei *next generation beneficial microorganisms* e sottolineando che evidenze causali precliniche sono state in parte ricapitolate anche in uno studio umano *proof-of-concept*.

Il trial clinico di Depommier et al. del 2019 randomizzato e controllato, costituisce il riferimento cardine in questa fase di sviluppo. Lo studio dimostra la fattibilità, la sicurezza e la tollerabilità della supplementazione nell'uomo e fornisce segnali favorevoli su parametri metabolici. Pur essendo uno studio esplorativo,

rappresenta un passaggio cruciale nel soddisfacimento del criterio clinico richiesto per la selezione di un candidato probiotico basato sul microbiota. [7]

Più recentemente, ulteriori trial hanno suggerito che l'efficacia della supplementazione possa dipendere dall'abbondanza intestinale basale di *A. muciniphila*, evidenziando la possibile necessità di una selezione dei pazienti e di una futura stratificazione microbiota-guidata. Questo dato non indebolisce il razionale del candidato, ma al contrario lo rende più coerente con un approccio di medicina di precisione la quale sta diventando centrale anche nella valutazione di probiotici e *microbiome-based interventions*. [17]

Un elemento cruciale della definizione di probiotico è la vitalità del microrganismo al momento della somministrazione e per tutta la *shelf-life* del prodotto, in quantità tali da garantire l'effetto osservato.

Binda et al. ribadiscono chiaramente questo requisito, il quale troppo spesso viene trascurato nella comunicazione commerciale ma rimane comunque centrale dal punto di vista scientifico. [23]

Nel caso di *A. muciniphila* questo criterio apre una questione terminologica e concettuale importante. Gran parte dell'interesse traslazionale attuale riguarda infatti la forma pastorizzata, la quale ha mostrato attività biologica e sicurezza ma non soddisfa il requisito della vitalità e quindi, in senso stretto, non rientra nella definizione classica di probiotico.

In questi casi è più appropriato parlare di postbiotico in accordo con il consenso ISAPP 2021 sulla definizione e lo scopo dei postbiotici. [16] L'ISAPP definisce infatti un postbiotico come una preparazione di microrganismi inanimati e/o dei loro componenti in grado di conferire un beneficio alla salute dell'ospite, chiarendo così che anche forme non vitali possono mantenere una rilevante attività biologica.

L'espressione probiotico di nuova generazione viene utilizzata in letteratura per indicare microrganismi identificati grazie agli studi sul microbioma e selezionati non tanto per una lunga tradizione d'uso, quanto per un solido razionale meccanicistico e per la loro associazione con stati di salute. Con tale definizione

si fa quindi riferimento a batteri commensali di nuova individuazione, potenzialmente benefici per l'ospite, i quali si distinguono dai probiotici tradizionali per l'origine microbiomica della loro sezione e per il maggiore livello di caratterizzazione biologica e traslazionale.

Review recenti su *A. muciniphila* sottolineano che questo batterio rappresenta uno dei principali candidati tra i *next-generation probiotics* (NGP), ossia microrganismi commensali identificati grazie agli studi sul microbiota e selezionati per il loro potenziale beneficio sulla salute dell'ospite, supportato da studi preclinici e clinici. In questo contesto *A. muciniphila* è considerata particolarmente promettente perché associa plausibilità biologica, risultati sperimentali robusti e un progressivo sviluppo tecnologico e regolatorio. Il termine NGP non identifica quindi una categoria commerciale già definita in senso stretto, ma un insieme di candidati probiotici di nuova generazione, caratterizzati da maggiore specificità biologica e da un percorso di sviluppo più vicino a quello delle moderne strategie microbiota-based.

Per *A. muciniphila* ciò si traduce nella necessità di standardizzare ceppo e processo produttivo, definire con precisione dose e formulazione, chiarire le indicazioni e la popolazione target, verificare la sicurezza in popolazioni specifiche e produrre evidenze cliniche riproducibili e basate su endpoint più robusti.

Le *review* critiche più recenti evidenziano il fatto che, nonostante l'entusiasmo giustificato, *A. muciniphila* non dovrebbe essere presentata come soluzione universalmente efficace, ma come candidata promettente da collocare in un *framework* rigoroso di selezione, valutazione e applicazione clinica. [24]

Alla luce dei criteri sopra discussi, *A. muciniphila* occupa una posizione peculiare. Da un lato la specie soddisfa diversi elementi che giustificano l'interesse come NGP: un solido rationale biologico, meccanismi d'azione plausibili, dati preclinici consistenti e primi studi clinici sull'uomo. Dall'altro lato, l'avanzamento applicativo ha privilegiato in misura rilevante la forma pasteurizzata, spostando parte del dibattito dal terreno dei probiotici a quello dei postbiotici e dei *novel foods*. Il parere EFSA sulla sicurezza di *pasteurised A. muciniphila* documenta

proprio questa evoluzione verso un percorso regolatorio concreto per l'impiego come ingrediente alimentare e supplemento. [26]

## **4.2 Differenze tra ceppo vivo e ceppo pastorizzato**

L'inquadramento di *Akkermansia muciniphila* come microrganismo di interesse traslazionale ha portato, in modo peculiare rispetto ad altri candidati *next generation probiotics*, a una distinzione centrale tra forma vitale e forma pastorizzata.

Questa distinzione non è meramente tecnologica ma coinvolge aspetti biologici, meccanicistici, clinici, regolatori e terminologici, rappresentando uno dei punti più rilevanti per comprendere il reale potenziale applicativo di *A. muciniphila*.

Effettivamente una parte consistente delle evidenze precliniche più promettenti è stata ottenuta proprio con la forma pastorizzata, che in alcuni modelli mostra effetti pari o superiori a quelli del batterio *in vivo*.

Nel caso di molti probiotici tradizionali la vitalità del microrganismo è considerata un requisito implicito della funzionalità biologica.

Per *Akkermansia muciniphila* al contrario la letteratura ha progressivamente mostrato che l'attività benefica non dipende esclusivamente dalla colonizzazione o dalla replicazione del batterio nell'intestino, ma può essere mediata anche da componenti strutturali e molecole di superficie che mantengono la propria bioattività dopo trattamenti termici controllati. In tale prospettiva, la forma pastorizzata può essere ricondotta al concetto di postbiotico, definito dal consenso ISAPP come una preparazione di microrganismi inanimati e/o dei loro componenti in grado di conferire un beneficio alla salute dell'ospite. In letteratura è inoltre impiegato il termine paraprobiotico per indicare cellule microbiche non vitali, intere o frammentate, che, pur prive di capacità replicativa, mantengono attività biologiche rilevanti. Tali categorie risultano particolarmente pertinenti nel caso di *A. muciniphila*, poiché consentono di interpretare in modo più preciso il significato funzionale della preparazione pastorizzata e dei suoi componenti bioattivi.

Tali elementi possono interagire con l'epitelio intestinale e con il sistema immunitario esercitando effetti funzionali anche in assenza di colonizzazione o replicazione del microrganismo. In questo senso il concetto di paraprobiotico pone maggiore enfasi sulla biomassa cellulare inattivata e sulle sue proprietà strutturali, mentre quello di postbiotico è oggi più ampio e comprende anche i componenti associati alla preparazione microbica. [16,29,30]

La svolta concettuale deriva in larga misura dallo studio di Plovier et al. il quale ha mostrato in modelli murini obesi e/o diabetici come la pasteurizzazione di *Akkermansia muciniphila* potesse aumentarne la capacità di migliorare parametri metabolici rispetto alla forma viva.

In quello studio, gli autori riportano esplicitamente che la pasteurizzazione ha "enhanced" la capacità del batterio di ridurre lo sviluppo di massa grassa, insulino-resistenza e dislipidemia nei modelli murini.

Questa osservazione è particolarmente importante perché modifica il paradigma interpretativo, ovvero che la forma pasteurizzata non rappresenta semplicemente un compromesso tecnologico per facilitare l'uso del batterio, ma una è una forma biologicamente attiva con caratteristiche proprie, talvolta più favorevoli rispetto al microrganismo vivo a seconda dell'endpoint considerato. [12]

La forma viva di *A. muciniphila* conserva la capacità di interagire dinamicamente con la nicchia mucosale, utilizzare la mucina come substrato, partecipare a reti trofiche microbiche intestinali e produrre metaboliti in un complesso ecologico complesso.

Questa dimensione ecologica è una caratteristica distintiva del batterio vivo e può essere rilevante quando l'obiettivo è modulare il microbiota intestinale nel suo insieme o favorire interazioni metaboliche di comunità.

Le review più recenti evidenziano infatti che una parte degli effetti di *Akkermansia muciniphila* dipende dalla sua integrazione nell'ecosistema intestinale e dalla capacità di dialogare con altri microrganismi e con lo strato mucoso.

In questo senso la forma viva mantiene un potenziale biologico ampio, ma anche più variabile, poiché gli effetti possono dipendere da fattori quali lo stato del

microbiota di base, la disponibilità di substrati, l'ambiente intestinale dell'ospite e le condizioni dietetiche e metaboliche. [27,28]

La forma pastorizzata, pur non essendo metabolicamente attiva né replicante mantiene componenti di membrana e strutture superficiali che possono continuare a interagire con l'ospite.

Lo studio di Plovier et al. ha contribuito in modo decisivo a chiarire questo punto, mostrando che una proteina di membrana esterna, Amuc\_1100, possiede attività biologica ed è stabile al trattamento termico di pastorizzazione, costituendo uno dei principali candidati mediatori degli effetti osservati con la forma pastorizzata. In termini meccanicistici ciò implica che una parte degli effetti di *A. muciniphila* può essere attribuita non alla vitalità del microorganismo in sé, ma all'interazione di suoi determinanti molecolari con recettori dell'ospite.

Questo aspetta spiega perché in specifici modelli la forma pastorizzata possa mantenere o addirittura migliorare l'efficacia su endpoint legati a barriera, infiammazione e metabolismo. [12,31]

Un punto metodologicamente essenziale è evitare una lettura semplicistica vivo vs pastorizzato in termini di superiorità assoluta.

I dati disponibili suggeriscono piuttosto che le due forme possono avere profili di attività parzialmente differenti, con vantaggi relativi in base al modello sperimentale e all'endpoint analizzato.

Uno studio comparativo sui topi alimentati con dieta standard ha mostrato che sia la forma viva che la forma pastorizzata influenzano positivamente geni associati a integrità barriera, infiammazione e metabolismo lipidico ma con differenze quantitative tra i gruppi.

Ad esempio nel modello del Caco-2 e nel colon murino, la forma pastorizzata ha mostrato in alcuni casi un effetto più marcato su specifici marcatori di tight junction, nello stesso studio la forma viva ha mostrato un impatto più evidente su alcuni geni del metabolismo lipidico in alcuni tessuti.

Questo tipo di risultati suggerisce che la forma pastorizzata può essere particolarmente efficace su alcune componenti della risposta barriera e

immunitaria mentre la forma viva può mantenere vantaggi in contesti in cui la componente metabolica ed ecologica della colonizzazione è più rilevante.

In altri termini le due forme non vanno considerate necessariamente come equivalenti né come mutuamente esclusive, ma come preparazioni con meccanismi dominanti parzialmente distinti. [13,27]

Uno dei principali limiti della forma viva di *Akkermansia muciniphila* è di natura tecnologica e produttiva.

*Akkermansia muciniphila* è un anaerobio stretto e la sua coltivazione, manipolazione e conservazione in forma vitale richiedono condizioni controllate, con criticità legate all'esposizione all'ossigeno e alla composizione del mezzo di coltura.

Lo studio di Plovier et al. sottolinea proprio come la sensibilità all'ossigeno e alcuni requisiti del terreno rappresentassero ostacoli alla traslazione verso l'uso umano, problema affrontato anche tramite sviluppo di un mezzo sintetico compatibile con applicazioni traslazionali. [12]

Al contrario invece la forma pastorizzata offre altri importanti vantaggi:

- Maggiore stabilità del preparato
- Minore sensibilità alle condizioni di stoccaggio
- Semplificazione della produzione industriale
- Più agevole standardizzazione del contenuto biologico
- Migliore compatibilità con formulazioni commerciali

Questi aspetti hanno avuto un peso notevole nel percorso di sviluppo di *A. muciniphila*, perché rendono la forma pastorizzata più facilmente trasferibile dalla sperimentazione al prodotto finito.

Le review su *A. muciniphila* come NGP evidenziano infatti che la fattibilità industriale è uno dei fattori che hanno favorito la rapida progressione della forma pastorizzata rispetto alla forma viva.

Dal punto di vista clinico, il riferimento principale resta il trial proof-of-concept di Depommier et al. del 2019 il quale ha valutato *A. muciniphila* viva e pastorizzata

in soggetti in sovrappeso o obesi insulino-resistenti, mostrando sicurezza e tollerabilità di entrambe le forme e segnali favorevoli soprattutto per la forma pastorizzata su alcuni endpoint metabolici.

Questo studio ha avuto un ruolo chiave nel consolidare l'idea che la forma pastorizzata non sia solo una formulazione più pratica, ma una preparazione clinicamente rilevante. [27,28,31]

Il trial clinico più recente ovvero quello di Zhang et al. del 2025, pur se centrato soprattutto sulla dipendenza dell'efficacia dai livelli basali intestinali di *A. muciniphila*, rafforza la prospettiva di una supplementazione mirata e microbiota-guidata.

Il dato più rilevante nel contesto della differenziazione tra preparazioni è che la ricerca clinica su *Akkermansia muciniphila* stia evolvendo verso una logica di precisione, in cui la natura della preparazione, viva o inattivata, il ceppo e il profilo del paziente diventano variabili da integrare nel disegno terapeutico.

È opportuno tuttavia sottolineare che il confronto diretto head-to-head tra forma viva e pastorizzata nell'uomo è ancora limitato.

Pertanto la distinzione attuale si fonda su:

- Dati preclinici robusti
- Trail clinici iniziali
- Considerazioni tecnologiche e regolatorie [12,13,27,28]

La differenza tra forma viva e pastorizzata ha una conseguenza diretta sul piano terminologico.

La forma viva può essere discussa nel quadro dei probiotici di nuova generazione mentre la forma pastorizzata, non essendo vitale, non rientra nella definizione classica di probiotico e si colloca più correttamente nel dominio dei postbiotici o di preparazioni microbiche inattivate con attività biologica.

Nel caso di *Akkermansia muciniphila*, la coesistenza di queste due vie applicative costituisce una peculiarità in quanto la specie è studiata come NGP, ma la sua

forma clinicamente più avanzata e normativamente più sviluppata è spesso pasteurizzata.

Tale doppio binario non indebolisce la rilevanza del microrganismo ma al contrario ne amplia lo spettro applicativo sempre a condizione di mantenere una classificazione terminologica accurata.

La forma pasteurizzata di *A. muciniphila* ha beneficiato di un percorso regolatorio più avanzato in Europa rispetto alla forma viva come dimostrato dai pareri EFSA sulla sicurezza del *novel food* e dalle successive autorizzazioni o estensioni d'uso. Questo sviluppo riflette, almeno in parte, i vantaggi di standardizzazione e sicurezza percepita associati a una preparazione non vitale.

Il dato regolatorio non equivale a prova di superiorità clinica, ma segnala una maggiore maturità traslazionale della forma pasteurizzata. [12,27,31]

Dal punto di vista farmaceutico questa distinzione è molto rilevante perché incide su:

- Processo produttivo
- Controllo della qualità
- Stabilità del prodotto
- Classificazione regolatoria
- Comunicazione scientifica e commerciale

In prospettiva è plausibile che forma viva e pasteurizzata seguano percorsi applicativi parzialmente diversi.

La prima più orientata a interventi microbiota-based con finalità ecologiche/colonizzative mentre la seconda più adatta a prodotti standardizzati e riproducibili su larga scala.

La differenza tra vivo e pasteurizzata ha inoltre favorito lo studio dei determinanti molecolari specifici di *Akkermansia muciniphila*.

La proteina di membrana Amuc\_1100 rappresenta l'esempio più noto, Plovier et al. mostrano come una proteina purificata o il batterio pasteurizzato possono riprodurre parte dei benefici metabolici osservati nei modelli murini, suggerendo

che la bioattività sia almeno in parte trasferibile a componenti definiti del batterio. [12]

Successivi studi preclinici hanno ampliato il quadro, mostrando che il batterio pasteurizzato e/o Amuc\_1100 possono modulare parametri infiammatori e immunitari in modelli di colite e tumorigenesi colite-associata, con effetti su infiltrato immunitario e mediatori infiammatori.

Questi risultati sono importanti non solo per la fisiopatologia intestinale ma anche perché rafforzano l'idea che l'inattivazione termica non annulli la capacità del preparato di interagire con l'ospite in modo biologicamente significativo. [32]

Al tempo stesso la crescente attenzione verso altri componenti suggerisce che la dicotomia vivo/pasteurizzato debba essere letta all'interno di uno spettro più ampio di modalità di consegna della bioattività di *Akkermansia muciniphila*. [31]

Pur essendo molto promettente, il confronto tra *A. muciniphila* viva e pasteurizzata presenta ancora dei limiti:

- Eterogeneità dei ceppi utilizzati nei diversi studi
- Differenze di dose, durata e modelli sperimentali
- Endpoint non sempre sovrapponibili
- Numero ancora limitato di confronti diretti nell'uomo

La tendenza attuale indica che la forma pasteurizzata possiede una bioattività robusta, talvolta superiore per alcuni endpoint, e vantaggi tecnologico-regolatori significativi mentre però la forma viva conserva un interesse specifico per i suoi aspetti ecologici e colonizzativi e per la sua collocazione nel *framework* dei NGP in senso stretto.

In conclusione la distinzione tra *Akkermansia muciniphila* viva e pasteurizzata rappresenta uno degli elementi più originali e scientificamente rilevanti del suo sviluppo come microrganismo di nuova generazione.

Le evidenze disponibili indicano che la forma pasteurizzata non è una semplice versione inattiva, ma una preparazione che mantiene componenti bioattive capaci

di modulare barriera intestinale, infiammazione e metabolismo, con importanti vantaggi in termini di stabilità e trasferibilità industriale.

Parallelamente la forma viva conserva una rilevanza specifica legata alla dinamica ecologica e alla potenziale colonizzazione della nicchia mucosale.

Più che alternative rigidamente contrapposte, le due forme appaiono oggi come strumenti biologici differenti, con profili di applicazione e implicazioni regolatorie distinti, da valutare in funzione dell'obiettivo clinico, del tipo di formulazione e del contesto d'uso. [12,13,27,28,32]

### **4.3 Sicurezza, stabilità e tollerabilità**

La transizione di *A. muciniphila* da microrganismo commensale di interesse biologico a candidato next-generation impone una valutazione rigorosa di tre dimensioni strettamente interconnesse ovvero la sicurezza, la tollerabilità e la stabilità. Questi aspetti rappresentano uno snodo metodologico fondamentale in ambito farmacologico, poiché determinano non solo la fattibilità clinica ma anche la sostenibilità regolatoria e produttiva di un microbiota-based.

Nel contesto dei microrganismi destinati al consumo umano la sicurezza non è un attributo astratto della specie bensì il risultato di una valutazione complessiva riferita a: ceppo/preparazione, dose, popolazione target, durata d'impiego e modalità di somministrazione. Questo approccio è particolarmente rilevante per *A. muciniphila* perché la sua traslazione applicativa ha coinvolto in modo significativo la forma pastorizzata con un percorso regolatorio e tossicologico strutturato.

Un riferimento centrale per la *safety assessment* è il parere dell'EFSA del 2021 sulla sicurezza di *pasteurised A. muciniphila* come *novel food*. In tale documento, *A. muciniphila* è descritta come microrganismo ben caratterizzato, non produttore di tossine e avirulento. L'EFSA esprime un giudizio favorevole sulla sicurezza nelle condizioni proposte, includendo una dose massima giornaliera per la popolazione adulta [26]

Successivamente il report congiunto di *Food Standards Agency/ Food Standards Scotland* del 2024 fornisce una ulteriore analisi orientata alla sicurezza della forma pastorizzata di *A. muciniphila* quale supplemento alimentare, includendo aspetti compositivi e considerazioni su allergenicità e segnalazioni disponibili. In particolare il documento sottolinea che, pur trattandosi di un prodotto con quota proteica rilevante, non risultano riportate reazioni allergiche nella letteratura disponibile né nei trial di sicurezza analizzati e considera il rischio di allergenicità basso anche in virtù della presenza endogena del microrganismo nel microbiota umano. [33] L'evoluzione del dossier regolatorio è ulteriormente confermata dall'opinione EFSA 2025 relativa a un'estensione d'uso la quale valuta specificamente fasce di età più giovani e conclude per la sua sicurezza fino a dosi definite per gruppi d'età, ribadendo tuttavia che la sicurezza in gravidanza e allattamento non è stabilita per mancanza di evidenze. [34]

Anno	Documento	Oggetto	Esito principale
2021	EFSA [23]	<i>Novel food</i>	Parere favorevole sulla sicurezza nelle condizioni proposte
2024	FSA / FSS [28]	Integratore alimentare	Basso rischio allergenico e profilo di sicurezza favorevole
2025	EFSA [10]	Estensione d'uso in adolescenti	Sicurezza confermata per specifiche fasce di età; dati insufficienti in gravidanza e allattamento

Tabella 1. Sintesi dei principali documenti regolatori e delle valutazioni di sicurezza relative a *Akkermansia muciniphila* come *novel food* o integratore alimentare

Come già detto *A. muciniphila* è un batterio Gram-negativo, in termini teorici, e ciò potrebbe sollevare questioni legate alla presenza di componenti di membrana rilevanti sotto il profilo immunologico. Tuttavia i percorsi regolatori e gli studi clinici disponibili non indicano un incremento di marcatori di infiammazione o segni di tossicità sistemica nelle condizioni d'impiego testate. Al contrario in uno studio umano *proof-of-concept* i parametri di sicurezza ematochimici e clinici sono risultati stabili e non sono emersi segnali di rischio associati alla supplementazione nel breve-medio termine.

Un ulteriore rischio teorico, spesso citato, è legato all'attività mucinolitica soprattutto se si considera la forma viva. La letteratura regolatoria e gli studi clinici però non riportano segnali di danno mucosale nelle condizioni testate. Inoltre nello studio clinico di riferimento vengono inclusi *endpoint* secondari legati alla barriera come ad esempio indicatori di endotossiemia o del metabolismo dei lipopolisaccaridi, proprio per monitorare indirettamente tale dimensione.

Nella valutazione di sicurezza dei microrganismi destinati all'uso umano, due aree sono particolarmente rilevanti:

- La presenza di geni di resistenza e potenziale trasferibilità
- La presenza di determinanti di virulenza o tossinogenicità

Le valutazioni EFSA includono tipicamente questo tipo di analisi, anche se il dettaglio delle analisi genomiche non sempre è esplicitato nei riassunti. Il parere di EFSA del 2021 ribadisce la natura non tossinogena/avirulenta dell'organismo e fonda la conclusione di sicurezza su un insieme di dati come la composizione, i processi produttivi, la tossicologia e le evidenze umane.

Il trial di Depommier et al. del 2019 rappresenta il riferimento cardine per la tollerabilità clinica nell'uomo. In questo studio, la supplementazione quotidiana con *A. muciniphila*, sia viva che pastorizzata, per un periodo di tre mesi viene riportata come sicura e ben tollerata, senza evidenza di alterazioni clinicamente rilevanti dei parametri di sicurezza monitorati e senza segnali di evidenti eventi avversi significativi legati all'intervento.

Gli *endpoint* di sicurezza di solito includono:

- Funzionalità epatica e renale
- Markers infiammatori
- Parametri clinici e segnalazioni di sintomi gastrointestinali
- Eventuali modifiche indesiderate dei parametri di laboratorio

La disponibilità di questi *outcome* in un contesto controllato permette di sostenere, con rigore, che nelle condizioni sperimentali testate non emerge un problema di tollerabilità di rilievo e la tollerabilità non è necessariamente sovrapponibile tra popolazioni. Le opinioni di EFSA evidenziano chiaramente che per gravidanza e allattamento non sono stati forniti dati sufficienti a stabilirne la sicurezza. [7,34,35] Analogamente, l'opinione EFSA 2025 che affronta l'estensione d'uso agli adolescenti mostra come la tollerabilità e la sicurezza venga gestita anche tramite definizione di dosi massime per fascia d'età. Questo supporta la prospettiva dose-dipendenza tipica della farmacologia, utile per trattare *A. muciniphila* con lo stesso rigore concettuale riservato ad altri interventi biologici.

La stabilità è un requisito determinante per qualunque prodotto destinato all'uso umano. In assenza di stabilità non esiste garanzia di dose efficace, riproducibilità né affidabilità dell'intervento. Nel caso di microrganismi la stabilità riguarda almeno tre livelli ovvero:

1. Stabilità biologica funzionale
2. Stabilità microbiologica
3. Stabilità quantitativa

Per la forma viva la stabilità è tipicamente la dimensione più complessa poiché dipende dalla capacità di mantenere la vitalità in condizioni di conservazione e somministrazione. È importante sottolineare che l'industrializzazione di microrganismi aerobi comporta criticità e richiede quindi procedure importanti di controllo di qualità.

Da un punto di vista farmaceutico questi aspetti si traducono in necessità di:

- Definire parametri di processo e controlli in-process
- Garantire purezza e assenza di contaminanti
- Adottare metodi affidabili per quantificare la vitalità
- Dimostrare la stabilità fino alla fine della *shelf-life*

La sicurezza si intreccia con la stabilità ed infatti un preparato instabile rischia variazioni di dose, degradazione e potenziali contaminazioni.

La forma pastorizzata presenta in generale un vantaggio sostanziale in termini di stabilità e standardizzazione ovvero l'assenza di vitalità con conseguente eliminazione della variabile "perdita di CFU" e rende quindi la dose più facilmente quantificabile come numero di cellule nel tempo.

Questo aspetto porta a ricadute immediate ovvero:

- Migliore controllo della dose somministrata
- Maggiore riproducibilità tra i lotti
- Semplificazione della logistica di conservazione
- Minore rischio di variazioni dovute a condizioni ambientali

Questi elementi sono coerenti con il fatto che la forma pastorizzata sia stata valutata come *novel food* in contesti regolatori, dove la stabilità del prodotto e la definizione compositiva sono componenti centrali del dossier.

I documenti di *safety assessment* (EFSA e FSA/FSS) includono tipicamente considerazioni sulla composizione del prodotto e su potenziali rischi come l'allergenicità.

Il report RP1468 del 2024 discute esplicitamente la composizione proteica dei *novel food* e l'assenza di segnalazioni di reazioni allergiche nei dati disponibili, oltre a considerare basso il rischio sulla base della presenza endogena dell'organismo nel microbiota umano e dell'esperienza clinica disponibile.

Sulla base delle fonti regolatorie e cliniche disponibili è possibile affermare con rigore che:

- La *pasteurised A. muciniphila* ha un profilo di sicurezza supportato da valutazioni regolatorie strutturate e da evidenze cliniche di tollerabilità nel breve-medio termine
- La tollerabilità clinica nell'uomo, nelle popolazioni studiate e alle dosi testate, risulta favorevole, senza segnali maggiori di eventi avversi

- La stabilità rappresenta un vantaggio distintivo della forma pastorizzata in termini di standardizzazione, replicabilità e gestione della dose con impatto positivo sulla fattibilità traslazionale
- Permangono lacune per popolazioni speciali, come donne in gravidanza e in allattamento, e quindi la letteratura supporta un approccio prudente e basato su evidenze dedicate. [33,34]

## 5. Integrazione e applicazioni pratiche

### 5.1 Motivazioni per l'integrazione

L'interesse verso l'integrazione di *A. muciniphila* nasce dalla convergenza di evidenze che collegano questo microrganismo a funzioni chiave dell'asse intestino-immunometabolico.

In particolare *A. muciniphila* è stata proposta come target di intervento in virtù del suo ruolo nel mantenimento della barriera intestinale, nella modulazione dell'infiammazione cronica di basso grado e nella regolazione del metabolismo energetico e lipidico.

Il razionale per l'integrazione non si fonda soltanto su associazioni descrittive del microbiota, ma su un modello biologico coerente e, in misura crescente, su dati clinici nell'uomo, oltre che su un percorso regolatorio che ne ha reso possibile l'impiego in forma pastorizzata come *ingredient/novel food* in specifiche condizioni d'uso.

Un primo motivo per l'integrazione è legato alla rilevanza dei processi cui *A. muciniphila* sembra agire.

Molte condizioni ad alta prevalenza come obesità, insulino-resistenza, diabete di tipo 2, dislipidemie e loro complicanze condividono tre elementi ricorrenti:

- Disfunzione della funzione barriera intestinale e aumentata permeabilità
- Endotossinemia e metabolismo di LPS e attivazione immunitaria di basso grado

- Alterazioni del controllo energetico e lipidico

In questo quadro *A. muciniphila* viene descritta come *symbiont* in grado di influenzare simultaneamente più livelli dell'omeostasi intestinale e sistemica, costituendo un candidato particolarmente interessante per strategie di prevenzione o supporto metabolico.

Le principali *review* della letteratura evidenziano che la solidità del razionale scientifico deriva dalla riproducibilità dei risultati in differenti modelli sperimentali e dalla coerenza dei meccanismi ipotizzati relativi alla regolazione dello strato di muco, delle *tight junctions*, della risposta immunitaria e dei metaboliti, elementi che stanno trovando una progressiva conferma anche negli studi clinici sull'uomo. [11]

Un secondo motivo evidente per l'integrazione è la disponibilità di dati clinici.

Il *trial* randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo di Depommier et al. ha mostrato che la somministrazione quotidiana per 3 mesi di *A. muciniphila* (viva o pastorizzata) alla dose di  $10^{10}$  cellule al giorno, in individui sovrappeso od obesi con insulino resistenti risulta sicura e ben tollerata. Nello stesso studio vengono riportati segnali favorevoli per la forma pastorizzata su parametri metabolici come ad esempio, la sensibilità insulinica, l'insulinemia e il colesterolo totale e su un *endpoint* secondario legato alla barriera, coerente con il razionale immunometabolico.

Dati clinici rafforzano l'idea che l'integrazione possa avere un ruolo in specifici fenotipi metabolici, ma evidenziano anche la necessità di un approccio stratificato. Nel *trial* randomizzato del 2025 pubblicato su *Cell Metabolism*, la supplementazione per 12 settimane non ha mostrato differenze nette tra gruppi sull'*endpoint* principale in analisi complessiva, ma gli autori riportano che la risposta metabolica può dipendere dai livelli basali intestinali di *A. muciniphila*, sostenendo l'ipotesi di una supplementazione microbiota-guidata.

Queste evidenze costituiscono un motivo concreto per l'integrazione in ambito pratico in quanto non si tratta più soltanto di un candidato preclinico, ma di un vero

e proprio microrganismo con dati umani che supportano fattibilità, tollerabilità e potenziali benefici. [7,17]

Un terzo motivo emerso con chiarezza negli ultimi anni è la prospettiva di personalizzazione dell'intervento.

Il trial 2025 suggerisce che i benefici possano essere più evidenti nei soggetti con bassa abbondanza basale di *A. muciniphila*, mentre risultano attenuati in chi presenta livelli già elevati.

Questo punto è rilevante perché sposta l'integrazione da un modello *one-size-fits-all* a un modello in cui la scelta del candidato e la probabilità di risposta dipendono dal profilo microbiotico e dal fenotipo clinico.

In termini applicativi ciò giustifica l'integrazione come strumento potenzialmente più razionale in sottogruppi selezionati e sostiene la necessità di definire biomarcatori predittivi come ad esempio il microbiota, i metaboliti e i marcatori di permeabilità/infiammazione, per ottimizzare indicazioni e *outcome* clinici. [11,17]

Un ulteriore motivo per l'integrazione risiede nella presenza di *endpoint* misurabili e direttamente correlati a rischio cardiometabolico. Nel trial 2019, tra gli *outcome* secondari viene considerata la funzione barriera attraverso LPS plasmatici, In parallelo gli *outcome* metabolici sono clinicamente rilevanti e coerenti con la fisiopatologia discussa. Sebbene siano necessari studi più ampi e prolungati per confermare la portata clinica di tali effetti, la presenza di parametri oggettivi e riproducibili costituisce un motivo forte per considerare *A. muciniphila* come intervento praticabile, soprattutto nell'ambito di programmi integrati rivolti alla riduzione del rischio metabolico come la dieta, l'esercizio fisico e l'ottimizzazione farmacologica. [7]

Un motivo determinante per l'integrazione, sul piano pratico, è la possibilità di utilizzare *A. muciniphila* in forma pasteurizzata con vantaggi di standardizzazione e stabilità.

A differenza di molti interventi basati su cellule vive, una preparazione pasteurizzata consente di definire più agevolmente il contenuto, ridurre la variabilità intra-lotto e migliorare la riproducibilità della dose somministrata.

Questo aspetto è considerato centrale anche nei dossier regolatori i quali richiedono definizione compositiva e controlli di qualità. La standardizzazione è particolarmente rilevante in applicazioni pratiche perché minimizza una delle principali criticità degli integratori microbiologici ovvero la discrepanza tra dose dichiarata e dose effettivamente assunto lungo la *shelf-life*.

A ciò si aggiunge la fattibilità regolatoria dell'impiego di pasteurised *A. muciniphila* in Europa. Il parere EFSA del 2021 ha espresso un giudizio favorevole sulla sicurezza della preparazione pasteurizzata nelle condizioni d'uso proposte e il successivo Regolamento di esecuzione (UE) 2022/168 il quale ne ha autorizzato l'immissione sul mercato come *novel food*. Tale percorso è stato ulteriormente aggiornato da una successiva opinione EFSA del 2025 relativa a un'estensione d'uso la quale ribadisce la valutazione *safety-based* in ulteriori contesti e popolazioni. Questo corpus regolatorio costituisce una motivazione pratica di rilievo, poiché dimostra che l'intervento non è soltanto teoricamente promettente, ma anche industrializzabile e inseribile in prodotti destinati al consumo, entro una cornice normativa definita. [35]

Sebbene la maggior parte delle evidenze si concentri attualmente sul profilo cardiometabolico, negli ultimi anni stanno emergendo applicazioni cliniche esplorative anche in altri ambiti i quali contribuiscono ad ampliare l'interesse verso l'integrazione. Un esempio è rappresentato da uno studio del 2024 su *Nutrients* che ha valutato una preparazione pasteurizzata di *A. muciniphila* in soggetti di età pari o superiore a sessant'anni, riportando miglioramenti della forza muscolare dopo dodici settimane di trattamento. Pur richiedendo conferme e un più chiaro inquadramento meccanicistico, tale dato suggerisce possibili implicazioni anche nel contesto dell'*healthy aging*. [36]

Parallelamente la presenza di trial registrati su *ClinicalTrials.gov* che indagano l'efficacia di *pasteurised A. muciniphila* sulla sensibilità insulinica o sui sintomi gastrointestinali documenta l'esistenza di una pipeline clinica in espansione, indicativa di un interesse applicativo crescente e di una progressiva costruzione dell'evidenze.

Un ulteriore motivo pragmatico per considerare l'integrazione è rappresentato dal bisogno clinico ancora insoddisfatto in ambiti nei quali gli interventi sullo stile di vita sono essenziali, ma spesso difficili da mantenere nel lungo periodo o non completamente sufficienti. In tali contesti, un supporto aggiuntivo dotato di un buon profilo di tollerabilità può risultare di interesse. La letteratura evidenzia infatti come *A. muciniphila* rappresenti un target promettente nella gestione dell'obesità e del diabete di tipo 2 e come gli studi umani, seppur ancora limitati, stiano progressivamente definendo contesti di efficacia più specifici. [17]

Per altre condizioni, come la malattia del fegato grasso non alcolica (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* NALFD), le review più recenti indicano un potenziale soprattutto preclinico, sottolineando però la carenza di trial clinici dedicati. Questo dato, pur rappresentando un limite, costituisce anche una motivazione ulteriore per orientare la ricerca verso applicazioni più mirate, evitando generalizzazioni non supportate da evidenze. [37]

Poiché l'impiego più avanzato riguarda spesso preparazioni inattivate o pasteurizzate, una motivazione aggiuntiva deriva dall'interesse crescente verso i postbiotici come categoria di intervento nei disturbi metabolici. Una recente meta-analisi sulla supplementazione con postbiotici e sugli esiti metabolici nell'uomo contribuisce a contestualizzare l'approccio e a fornire un quadro quantitativo della direzione degli effetti osservati negli studi clinici. [38] Sebbene tale evidenza aggregata non possa sostituire la specificità di *A. muciniphila*, essa rafforza la plausibilità che preparazioni microbiche non vitali, quando standardizzate e adeguatamente valutate sotto il profilo della sicurezza, possono esercitare effetti misurabili su outcome clinicamente rilevanti.

In sintesi i motivi a favore dell'integrazione di *A. muciniphila* possono essere ricondotti a una serie di elementi convergenti in dieci punti principali:

1. Azione su nodi fisiopatologici centrali;
2. Disponibilità di trial umani con sicurezza, tollerabilità e segnali metabolici;
3. Potenziale approccio microbiota-guidato con stratificazione dei responder;

4. Endpoint clinicamente rilevanti e misurabili;
5. Standardizzazione e stabilità della forma pasteurizzata;
6. Fattibilità regolatoria;
7. Espansione delle applicazioni;
8. *Pipeline* di *trial* in corso su target clinici diversi;
9. Supporto contestuale proveniente dalla letteratura sui postbiotici;
10. Elevata rilevanza clinico-sanitaria delle condizioni target e necessità di strategie complementari.

## 5.2 Possibili formulazioni e modalità di assunzione

Le modalità di somministrazione di *A. muciniphila* dipendono strettamente dalla forma biologica utilizzata, dalle criticità tecnologiche legate alla stabilità lungo la filiera produttiva e durante il transito gastrointestinale, nonché dagli obiettivi di intervento. In ambito di integrazione, la scelta della formulazione non è neutra, poiché condiziona la dose effettivamente disponibile, la riproducibilità dell'assunzione, la protezione dalle condizioni gastriche e, più in generale la compliance del soggetto.

Attualmente la preparazione pasteurizzata rappresenta la forma più avanzata dal punto di vista della standardizzazione e dell'impiego pratico. I documenti regolatori europei descrivono un processo produttivo che comprende crescita anaerobia, pasteurizzazione, concentrazione, crioconservazione e liofilizzazione, con l'ottenimento di un prodotto finale in polvere caratterizzato da conteggio totale di cellule e da un'assenza pressoché completa di vitalità. Dal punto di vista formulativo l'*A. muciniphila* viene tipicamente utilizzata come:

- Polvere liofilizzata in capsule o in bustine
- Ingrediente in alimenti a fini medici speciali laddove previsto dalle condizioni d'uso
- In generale in prodotti in cui la stabilità fisico-chimica venga mantenuta

In ogni caso, il mantenimento della stabilità fisico-chimica del prodotto costituisce un requisito essenziale.

Negli studi clinici più citati la somministrazione avviene per via orale, con dosi giornaliere nell'ordine di  $10^{10}$  cellule/die per periodi di circa dodici settimane.

Sul piano regolatorio le condizioni d'uso autorizzate o discusse nei pareri scientifici individuano un quantitativo massimo giornaliero per la popolazione adulta e prevedono restrizioni per alcune popolazioni particolari, come donne in gravidanza e in allattamento a causa dell'assenza di dati sufficienti. Il parere EFSA 2021, ad esempio, riporta una proposta di impiego come supplemento fino a  $5 \times 10^{10}$  cellule/die per adulti. [26] Nella pratica ciò consente di ipotizzare sia formulazioni in monodose giornaliera sia una suddivisione della dose nell'arco della giornata, eventualmente utile a migliorare tollerabilità gastrointestinale e aderenza, sebbene non vi siano ancora evidenze definitive a favore di una chiara superiorità della dose frazionata rispetto alla monodose. La stabilità della forma pastorizzata è generalmente favorita dall'assenza di vitalità e dalla liofilizzazione tuttavia permangono alcuni fattori critici come:

- Umidità e attività dell'acqua, di conseguenza, c'è la necessità di avere un confezionamento barriera e spesso devono essere d'essiccati
- Temperatura, in genere la conservazione avviene a temperatura ambiente controllata o refrigerata a seconda della specifica formulazione commerciale e dei dati di stabilità
- Protezione dalla luce e dalle variazioni termiche estreme

La formulazione della forma viva risulta invece più complessa a causa dell'anaerobiosi stretta e della sensibilità del microrganismo all'ossigeno, agli stress termici e alle condizioni gastriche. Ne consegue che le tecnologie di incapsulamento e microincapsulamento diventano centrali per rendere l'assunzione praticabile e riproducibile. Una strategia ampiamente studiata è rappresentata dall'incapsulamento in matrici di calcio-alginato, selezionate per la loro resistenza meccanica, la relativa stabilità termica e la capacità di proteggere i

batteri durante il transito gastrico simulato, favorendone il successivo rilascio in ambiente intestinale. Studi sperimentali mostrano che l'incapsulamento può migliorare:

- Stabilità in stoccaggio, anche in condizioni aerobiche refrigerate, con riduzione contenuta delle log di vitalità in periodi di alcune settimane
- Sopravvivenza al passaggio gastrico simulato, mantenendo livelli di cellule vitali ritenuti rilevanti dopo transito gastrointestinale simulato [39]

Accanto a queste strategie, sono state studiate anche tecniche di microincapsulamento basate sulla gelificazione interna e su sistemi emulsione-gel, che hanno mostrato una buona efficienza di intrappolamento e una migliore sopravvivenza durante la conservazione aerobica. [40]

Dal punto di vista pratico queste tecniche rendono plausibile lo sviluppo di formulazioni in capsule, polveri da ricostituzione o sistemi multistrato con rilascio modulato. La scelta della matrice e della tecnologia utilizzata influenza non soltanto la stabilità del preparato, ma anche la cinetica di rilascio, aspetto determinante quando si intende massimizzare l'interazione con la mucosa intestinale.

Un'ulteriore opzione tecnologica di interesse industriale è rappresentata dallo *spray-drying*. Tuttavia nel caso di un anaerobio stretto come *A. muciniphila* la principale criticità consiste nella conservazione della vitalità attraverso l'impiego di eccipienti e protettori adeguati. Le evidenze sperimentali disponibili suggeriscono che, in presenza di parametri produttivi appropriati, anche questa tecnologia possa risultare efficace, aprendo la possibilità a formulazioni in capsule o bustine contenenti polveri microincapsulate, potenzialmente più maneggevoli e standardizzabili rispetto a sospensioni vive non protette.

Per l'impiego pratico la forma più comune e controllabile è la capsula perché:

- Permette un dosaggio preciso
- Riduce l'esposizione all'umidità e all'ossigeno

- Migliora l'aderenza terapeutica

Nel caso della forma viva l'impiego di capsule gastroresistenti o di strategie equivalenti è elevato, in quanto l'obiettivo è quello di aumentare la frazione vitale che riesca a superare la fase gastrica. [39] Per la forma pastorizzata, la gastroresistenza è meno rilevante in termini di sopravvivenza, ma può comunque essere valutata per finalità quali:

- Un rilascio più distale;
- Una riduzione di eventuali sintomi gastrointestinali in soggetti sensibili;
- Un'ottimizzazione dell'interazione con la mucosa;

Le bustine possono risultare utili quando siano necessarie dosi più elevate o in specifici contesti di utilizzo nei quali si voglia facilitare la somministrazione. Tuttavia per il mantenimento della stabilità sono cruciali:

- Confezionamento ad alta barriera;
- Controllo dell'umidità;
- Raccomandazioni chiare sul tipo di liquido e sulle temperature, evitare quindi acqua calda per non alterare i vari componenti;

Per le formulazioni pastorizzate liofilizzate, la bustina risulta essere particolarmente praticabile poichè la vitalità non costituisce un requisito e la stabilità è legata principalmente al mantenimento di condizioni fisiche appropriate, quali il controllo dell'umidità e dell'attività dell'acqua, la protezione da variazioni termiche e dall'esposizione alla luce, nonché l'impiego di confezionamenti ad alta barriera in grado di prevenire l'ingresso di ossigeno e vapore acqueo. Tali fattori sono determinanti per evitare fenomeni di degradazione fisico-chimica dei componenti bioattivi e garantire la costanza della dose lungo la *shelf-life*. [26]

Le forme liquide appaiono, in linea generale, meno favorevoli soprattutto per i batteri vivi anaerobi a causa delle difficoltà di stabilità, del rischio di contaminazione e della necessità di catene del freddo e sistemi conservativi più

complessi. Per *A. muciniphila* viva, la letteratura si concentra maggiormente su polveri protette e formulazioni incapsulate piuttosto che su soluzioni sospensioni liquide pronte, proprio per motivi legati alla stabilità.

Per quanto riguarda le modalità di assunzione, gli studi clinici disponibili riportano generalmente una somministrazione quotidiana per periodi di circa tre mesi, spesso accompagnata dall'indicazione di mantenere dieta e attività fisica stabile durante il trattamento.

Nella pratica la scelta di quando somministrare *A. muciniphila* può essere guidata da considerazioni farmacotecniche:

- Batteri vivi: l'assunzione con il pasto, o subito dopo, può teoricamente ridurre l'impatto del pH gastrico estremo, anche se la protezione principale deriva dalla microincapsulazione
- Pasteurizzato: il timing di assunzione ha un impatto minore sulla sopravvivenza, ma può influenzare la tollerabilità individuale.

È importante notare che, ad oggi, non esiste un consenso univoco in letteratura che definisca un timing ottimale universalmente valido, la scelta pratica tende a privilegiare la compliance e la regolarità dell'assunzione.

La durata maggiormente studiata nei trial randomizzati controllati (RCT) disponibili è pari a circa dodici settimane, periodo ritenuto sufficiente per osservare variazioni di alcuni marker metabolici e di endotossinemia. [7] un'estensione dell'assunzione oltre tale intervallo richiede tuttavia ulteriori considerazioni relative a: Sostenibilità di costo e aderenza

- Sicurezza a lungo termine
- Necessità di cicli contro un'assunzione continuativa

Una linea applicativa emergente riguarda l'impiego di formulazioni simbiotiche, nelle quali la somministrazione di *A. muciniphila* viene associata a substrati o componenti in grado di favorirne l'attività e potenziarne gli effetti. Studi recenti

discutono la sicurezza e l'efficacia di formulazioni simbiotiche contenenti *A. muciniphila* indicando che l'area è in espansione e che la progettazione della combinazione può essere orientata a massimizzare outcome specifici. [41] In pratica la co-somministrazione può essere valutata anche per:

- Aumentare la persistenza e l'efficacia della forma viva
- Potenziare l'impatto metabolico o immunologico
- Indirizzare il target di intervento

Rimane tuttavia essenziale distinguere tra le evidenze ottenute con *A. muciniphila* da sola da quelle relative a formulazioni combinate, nelle quali l'effetto osservato non è attribuibile in modo univoco al solo microrganismo.

Un ulteriore aspetto pratico rilevante riguarda l'unità con cui viene espressa la dose. Nei prodotti contenenti cellule vive, la quantità viene generalmente espressa in CFU (unità formanti colonie), mentre nei prodotti pastorizzati la dose è espressa come cellule totali o unità equivalenti. I documenti UE riportano esplicitamente che, nel prodotto pastorizzato, il conteggio vitale è al di sotto del limite di rilevabilità e che il parametro di riferimento è costituito dal numero totale di cellule per grammo. [33] Ciò implica che i prodotti non siano direttamente comparabili in rapporto uno a uno senza considerare la metrica adottata.

È quindi essenziale nella pratica e nella valutazione critica riferirsi a:

- Dose nominale
- Metodo di quantificazione
- Stabilità dichiarata fino a fine *shelf-life*

Infine le condizioni d'uso discusse nei documenti regolatori per la forma pastorizzata includono limiti per popolazioni specifiche e definiscono l'impiego come integratore o come alimento a fini medici speciali (FSMP). [26] Sul piano pratico, ciò orienta la scelta della formulazione e l'educazione del paziente o consumatore verso:

- Rispetto delle dosi autorizzate
- Scelta di prodotti con standard di qualità e specifiche chiare
- Attenzione a condizioni cliniche particolari in cui la valutazione deve essere individualizzata e basata sulle evidenze disponibili.

### **5.3 Ruolo del farmacista nella consulenza sull'uso dei probiotici**

L'impiego dei probiotici nella pratica quotidiana è aumentato in modo rilevante, con un'espansione parallela dell'offerta commerciale e una notevole eterogeneità di ceppi, dosaggi e indicazioni proposte.

In questo scenario il farmacista rappresenta spesso il primo, e talvolta l'unico, professionista sanitario consultato dal cittadino per l'automedicazione e per l'orientamento tra prodotti da banco.

La consulenza del farmacista per essere clinicamente utile e coerente con l'evidenza deve fondarsi su alcuni principi come la valutazione dell'indicazione, la scelta del ceppo e del prodotto con evidenza, definizione di dose e durata, screening del rischio monitoraggio della tollerabilità e promozione dell'uso appropriato in integrazione delle terapie standard.

Un ruolo centrale del farmacista è distinguere tra situazioni gestibili in automedicazione e situazioni che richiedono di mandare il paziente dal medico.

Nella consulenza sui probiotici questo significa inquadrare rapidamente:

- Tipo di disturbo come ad esempio diarrea acuta, gonfiore, coliche etc...
- Gravità e durata dei sintomi
- Segni d'allarme come ad esempio febbre elevata, dolore addominale, diarrea persistente e immunodepressione, tutti segnali che impongono una valutazione medica

Le linee guida internazionali evidenziano che l'efficacia dei probiotici non è generalizzabile, è ceppo-specifica e indicazione-specifica.

Le Global Guidelines della World Gastroenterology Organisation sottolineano esplicitamente la necessità di considerare ceppo, dose e condizione clinica prima di consigliare un probiotico. [41]

Nel contesto pediatrico, il *position paper* ESPGHAN 2023 rappresenta un documento di consenso della Società Europea di Gastroenterologia, Epatologia e Nutrizione Pediatrica, elaborato per fornire raccomandazioni *evidence-based* sull'uso dei probiotici nei principali disturbi gastrointestinali dell'età pediatrica. Il documento ribadisce che le indicazioni non possono essere estese ai probiotici in modo generico, ma devono essere riferite a specifici ceppi e a specifiche condizioni cliniche, scoraggiandone pertanto un uso indiscriminato

Di conseguenza il farmacista ha la responsabilità di ridurre l'overuse, quando non esiste evidenza o quando l'indicazione è vaga la consulenza deve orientare verso aspettative realistiche e se necessario verso alternative non farmacologiche o verso un consulto medico.

Uno dei contributi più concreti del farmacista è quello di trasformare l'informazione scientifica in una scelta di prodotto sensata.

Le raccomandazioni più autorevoli insistono sul fatto che parlare di probiotici in generale è fuorviante, ciò che conta è il ceppo, la dose e la formulazione.

Le WGO (*World Gastroenterology Organisation*), organizzazione internazionale che riunisce esperti nel campo della gastroenterologia, forniscono tabelle e livelli di evidenze per diverse condizioni gastrointestinali, evidenziando come l'efficacia dei probiotici sia ceppo specifica e supportata da evidenze di qualità. [41,42]

Sul piano pratico la consulenza del farmacista dovrebbe includere:

- Verifica che il prodotto riporti genere-specie-ceppo e non solo la specie
- Verifica della dose giornaliera coerente con quella studiata
- Verifica di stabilità e condizioni di conservazione<sup>7</sup>
- Verificazione di indicazioni compatibili con le evidenze e quando possibile con raccomandazioni di società scientifiche come la WGO e la ESPGHAN

Nella pratica comunitaria, molte persone acquistano probiotici senza indicazione medica e con aspettative non realistiche.

Indagini sul comportamento dei consumatori mostrano che una quota rilevante utilizza probiotici senza raccomandazione sanitaria.

Al tempo stesso studi su farmacisti evidenziano aree di miglioramento in termini di conoscenze e convinzioni.

Questo rafforza la necessità di una consulenza basata su evidenze e di aggiornamento continuo. [43]

Un contesto tipico in cui il farmacista interviene è la dispensazione di antibiotici.

Il paziente chiede frequentemente un probiotico per poter proteggere l'intestino.

In tale scenario il ruolo del farmacista è quello di:

- Chiarire l'obiettivo, quindi arrivare ad avere una riduzione del rischio di diarrea associata ad antibiotici e in alcuni casi anche la riduzione del rischio di diarrea da *C. difficile*
- Scegliere ceppi con evidenza per AAD
- Indicare la modalità di assunzione consigliando l'assunzione a una distanza temporale adeguata dall'assunzione dell'antibiotico utilizzato per alcuni batteri e che la durata di somministrazione continui anche dopo la fine dell'assunzione dell'antibiotico

Un'altra responsabilità clinicamente rilevante è quella dello screening del rischio, soprattutto quando il probiotico è percepito come sempre sicuro.

Le linee guida e la letteratura clinica riconoscono che sebbene la maggior parte dei probiotici abbia un buon profilo di sicurezza nella popolazione generale, esistono contesti in cui è richiesta prudenza come immunodepressione significativa, presenza di cateteri venosi centrali, cardiopatie valvolari a rischio di endocardite, pazienti critici, neonati prematuri o con patologie severe.

Il farmacista, in una consulenza responsabile dovrebbe:

- Chiedere attivamente condizioni di rischio

- Evitare raccomandazioni automatiche in pazienti fragili e orientate al medico
- Spiegare che naturale non significa privo di rischio, e che la sicurezza è dipendente da ceppo, paziente e contesto

L'efficacia dei probiotici è spesso modesta e clinicamente significativa solo in specifici contesti.

Qui il farmacista svolge un ruolo comunicativo essenziale ovvero evitare promesse, ridurre la frustrazione e aumentare l'aderenza quando l'indicazione è appropriata .

Alcuni dei punti critici che bisogna chiarire sono:

- I probiotici non sostituiscono reidratazione orale nella diarrea, né la terapia antibiotica quando indicata
- L'effetto se presente può richiedere giorni o settimane a seconda dell'indicazione
- Se i sintomi peggiorano o non migliorano entro una finestra ragionevole, serve una valutazione clinica

Nel pediatrico l'ESPGHAN sottolinea che le raccomandazioni sono limitate a pochi ceppi e a specifiche condizioni e che dove l'uso deve essere ragionato. [42,44]

Molti fallimenti sono percepiti tali a causa di un uso scorretto dovuto a:

- Dose insufficiente
- Conservazione errata
- Durata troppo breve
- Assunzione intermittente

La consulenza del farmacista deve includere quindi istruzioni pratiche relative a:

- Come conservare il prodotto

- Come assumerlo
- La durata raccomandata della somministrazione
- Verifica della data di scadenza e dell'integrità della confezione

La WGO evidenzia a variabilità del mercato e richiama indirettamente la necessità di scegliere prodotti di qualità, con un'etichettatura chiara e supportato da evidenze scientifiche.

In ambito comunitario il farmacista agisce anche come steward dell'uso appropriato:

- Contrasto all'idea che i probiotici riparino ogni alterazione intestinale
- Chiarimento del concetto di ceppo-specificità
- Uso corretto delle categorie ovvero il probiotico è vivo, il postbiotico è una preparazione non vitale e il sinbiotico è un microbo più il suo substrato, evitando così confusione terminologica che può aumentare claim impropri.

L'educazione è particolarmente importante perché indagini su farmacisti e operatori sanitari mostrano che conoscenze e attitudini influenzano in modo diretto la raccomandazione e quindi il comportamento di acquisto del paziente.

Il farmacista deve saper integrare la consulenza con la rete sanitaria:

- Invio al medico quando l'indicazione è poco chiara o quando si tratta di pazienti complessi
- Comunicazione con il pediatra o il MMG per allineare la scelta del ceppo quando esistono raccomandazioni specifiche
- Registrazione e segnalazione di reazioni avverse sospette, soprattutto in pazienti fragili o in caso di prodotti multi ingrediente

La pratica di segnalazione è coerente con un approccio di sicurezza proattivo, particolarmente rilevante per prodotti acquistati autonomamente.

Il rapido evolversi della letteratura rende necessario un aggiornamento continuo.

Documenti come la WGO global guidelines e il position paper ESPGHAN 2023 sono strumenti pratici per il counseling poiché traducono l'evidenza in raccomandazioni. [41,43]

## **6. Prospettive future e conclusioni**

### **6.1 Possibili sviluppi nel campo dell'integrazione alimentare**

Se in passato il settore dell'integrazione alimentare si è sviluppato soprattutto intorno a vitamine, minerali, estratti vegetali e probiotici tradizionali, oggi la ricerca si orienta verso prodotti biologicamente più definiti, supportati da meccanismi molecolari più chiari, biomarcatori di risposta e una crescente integrazione con microbiomica, metabolimica, intelligenza artificiale e *digital health*. In questa prospettiva i futuri sviluppi non riguardano soltanto l'ampliamento del numero di prodotti disponibili, ma soprattutto il miglioramento della loro specificità d'azione, della standardizzazione, della stratificazione dei pazienti e della qualità dell'evidenza clinica.

Uno dei principali indirizzi evolutivi riguarda il superamento del paradigma *one-size-fits-all*. Le *review* più recenti sulla nutrizione di precisione sottolineano infatti che la risposta a interventi nutraceutici dipende da una molteplicità di fattori individuali, tra cui l'assetto genetico, la composizione del microbiota intestinale, il profilo metabolico, le abitudini alimentari e lo stato infiammatorio di base. In tale contesto gli integratori del futuro a base di probiotici tenderanno a essere selezionati non solo in funzione della patologia o del sintomo, ma anche sulla base di caratteristiche biologiche del singolo individuo con l'obiettivo di migliorare l'efficacia e ridurre la variabilità della risposta, per trattamenti altamente specifici. Un secondo sviluppo rilevante riguarda la crescente centralità del microbiota intestinale come bersaglio -nutrizionale-salutistico. La letteratura più recente evidenzia come il microbioma non sia più considerato soltanto un modulatore aspecifico dello stato di salute, ma una piattaforma terapeutica potenzialmente manipolabile tramite probiotici, prebiotici, sinbiotici, postbiotici e strategie di

nutrizione personalizzata. Questo cambiamento concettuale amplia in modo significativo i confini della nutraceutica la quale tende a collocarsi in una zona intermedia tra alimentazione funzionale, prevenzione e *microbiome-based*. [45,51] All'interno di questo scenario i postbiotici rappresentano una delle aree più promettenti. Diverse *review* recenti sottolineano che le preparazioni costituite da microrganismi inattivati e/o dei loro componenti bioattivi possono offrire vantaggi significativi rispetto ai probiotici vivi in termini di standardizzazione, sicurezza e semplificazione formulativa. Le pubblicazioni più recenti descrivono i postbiotici come una nuova frontiera dei *functional foods* e dei *microbiome-targeted interventions*, con prospettive concrete sia nell'ambito metabolico sia in quello immunologico che in quello infiammatorio. [52,55]

Un ulteriore elemento destinato a influenzare il futuro del settore è la crescente attenzione verso la qualità dell'evidenza clinica. Un limite storico dell'integrazione alimentare è stato infatti rappresentato dalla diffusione di prodotti sostenuti soprattutto da dati preclinici osservazionali ma privi di trial randomizzati robusti.

Le prospettive future si orientano invece verso studi clinici disegnati, con endpoint più solidi, popolazioni meglio definite e una maggiore attenzione alla dose, alla durata del trattamento e all'identificazione dei responder biologici.

In altre parole, il futuro del settore dipenderà non solo dall'innovazione dei prodotti, ma anche dalla capacità di produrre evidenze comparabili, per rigore metodologico, a quelle richieste per altri interventi sanitari. [46,50,51]

Anche la digitalizzazione contribuirà in modo sostanziale a questa evoluzione. Le *review* recenti sull'intelligenza artificiale e nutrizione personalizzata mostrano che algoritmi predittivi, dati multi-omici e strumenti digitali possono essere utilizzati per stimare la risposta individuale a nutrienti, fibre, prebiotici e altri interventi diretti sul microbiota. Questo approccio potrebbe consentire, in futuro, di selezionare il nutraceutico più appropriato per specifici fenotipi clinici e microbiologici, riducendo l'empirismo che ha caratterizzata parte del settore. [45,48,56]

In questo quadro generale, *Akkermansia muciniphila* occupa una posizione di particolare rilievo. La specie è considerata da numerose *review* come uno dei paradigmi più convincenti dei cosiddetti *next-generation beneficial microorganism*, ovvero microrganismi identificati attraverso la ricerca sul microbioma e selezionati non tanto per tradizione d'uso quanto per un solido rationale biologico e traslazionale.

Le *review* del 2024 e del 2025 evidenziano come *A. muciniphila* abbia progressivamente superato la fase in cui veniva considerata un semplice marcatore di eubiosi, divenendo invece un candidato concreto per applicazioni nutraceutiche e *microbiome-based*, grazie alle evidenze accumulate in relazione a barriera intestinale, metabolismo, immunità e infiammazione.

Le prospettive future di *Akkermansia muciniphila* possono essere distinte in almeno quattro direttrici principali.

La prima riguarda il consolidamento del suo impiego come ingrediente nutraceutico standardizzato, soprattutto nella forma pastorizzata. La disponibilità di preparazioni inattivate dotate di attività biologica, già valutate in ambito regolatorio, ha reso *A. muciniphila* particolarmente interessante rispetto ad altri candidati *next generation* (NGP) poiché combina rationale biologico, sicurezza e maggiore stabilità tecnologica. Le *review* recenti sui postbiotici e su *A. muciniphila* sottolineano che proprio questa transizione da microrganismo vivo a preparazione funzionale standardizzabile potrebbe favorirne la diffusione in ambito nutraceutico, dove la robustezza del prodotto rappresenta un requisito essenziale.

La seconda direttrice riguarda lo sviluppo di derivati bioattivi specifici. La ricerca su *A. muciniphila* ha già identificato molecole di interesse, tra cui proteine di membrana, metaboliti e altri componenti strutturali impiegati negli effetti osservati a livello metabolico e immunitario. In futuro l'attenzione potrebbe quindi spostarsi dal batterio intero verso prodotti più definiti, costituiti da frazioni attive o miscele caratterizzate, con potenziali vantaggi in termini di precisione farmaceutica, stabilità e targeting. Le *review* più recenti su *A. muciniphila* e sui postbiotici

indicano chiaramente questa direzione, la quale conduce dal concetto di microrganismo benefico a quello di piattaforma bioattiva modulare. [52,55,57,58]

La terza prospettiva riguarda la personalizzazione dell'integrazione. I dati clinici più recenti suggeriscono che la risposta alla supplementazione con *A. muciniphila* possa dipendere dai livelli basali del microrganismo nell'intestino e, più in generale, dalla configurazione complessiva del microbiota del soggetto. Questo implica che il futuro impiego nutraceutico di *A. muciniphila* potrebbe non essere uniforme nella popolazione generale ma selettivo per determinati fototipi come ad esempio soggetti con ridotta abbondanza basale, sindrome metabolica o specifici pattern immunometabolici. Tale prospettiva risulta pienamente coerente con la più ampia evoluzione della nutraceutica verso modelli di nutrizione di precisione. [47,48,59]

La quarta direttrice riguarda l'ampliamento delle aree applicative. Sebbene l'ambito cardiometabolico resti a oggi il più studiato, le *review* più recenti documentano un crescente interesse per il ruolo di *A. muciniphila* in altri contesti tra cui invecchiamento, asse intestino-cervello, patologie neurologiche, immunoregolazione e malattie infiammatorie intestinali. Questo non significa che tutte queste indicazioni siano già pronte per l'applicazione clinica ma suggerisce che il potenziale nutraceutico della specie potrebbe estendersi oltre il solo metabolismo, secondo una logica multi-target tipica degli interventi basati sul microbiota. [57,60,61]

A fronte di tali prospettive rimangono tuttavia alcune criticità. Una prima criticità riguarda la necessità di distinguere con precisione tra evidenza preclinica ed evidenza clinica. Per *A. muciniphila* come per molti altri candidati nutraceutici microbiota-based, il volume delle evidenze animali e meccanicistiche è attualmente superiore a quello dei trial nell'uomo.

Una seconda criticità è legata alla standardizzazione delle formulazioni, dalla definizione delle dosi ottimali e dalla scelta degli endpoint più informativi.

Una terza criticità riguarda la necessità di chiarire meglio la collocazione regolatoria di questi prodotti, soprattutto quando si collocano al confine tra integratore, *novel food*, postbiotico e *live biotherapeutic product*.

Le *review* dedicate al futuro delle *microbiome therapeutics* e dei LBP (*live biotherapeutic products*, ossia prodotti terapeutici contenenti microrganismi vivi) evidenziano che il progresso di questo settore dipenderà non soltanto dall'identificazione di nuovi microrganismi promettenti, ma anche dalla capacità di tradurre tali scoperte in prodotti realmente applicabili. Ciò richiede l'integrazione tra innovazione biologica, necessaria per individuare nuovi candidati con potenziale terapeutico; qualità produttiva, indispensabile per ottenere formulazioni stabili sicure e standardizzate; e validità clinica, fondamentale per dimostrare nell'uomo l'efficacia e la sicurezza osservate nei modelli sperimentali [50,51]

Nel complesso il futuro dell'integrazione alimentare appare orientato verso prodotti più mirati, standardizzati e supportati da evidenze cliniche di maggiore qualità, inseriti in modelli di intervento sempre più personalizzati supportati da strumenti digitali. In questo scenario *Akkermansia muciniphila* rappresenta uno dei candidati più promettenti, non solo per il forte razionale biologico che la sostiene, ma anche perché incarna in modo esemplare il passaggio da approcci empirici a interventi di nuova generazione fondata sui meccanismi noti. La sua evoluzione futura dipenderà dalla capacità di consolidare i dati clinici, sviluppare formulazioni sempre più stabili e mirate e collocarne l'impiego all'interno di un modello di nutraceutica personalizzata [47,55,57]

## **6.2 Conclusioni**

Nel complesso, il percorso sviluppato in questa tesi consente di delineare con chiarezza il ruolo sempre più rilevante del microbiota intestinale nella fisiologia umana e all'interno di esso la posizione peculiare di *Akkermansia muciniphila* come uno dei microrganismi più promettenti del punto di vista biologico, nutraceutico e traslazionale. La trattazione è partita da un inquadramento generale

del microbiota intestinale come ecosistema complesso, dinamico e funzionalmente integrato con l'organismo ospite, per concentrarsi progressivamente sul significato fisiologico, immunologico e metabolico di *A. muciniphila*, fino ad arrivare alle sue possibili applicazioni come probiotico di nuova generazione, postbiotico e strumento di integrazione mirata.

Dall'analisi complessiva emerge con evidenza che il valore di *A. muciniphila* non risiede esclusivamente nella sua presenza quantitativa all'interno del microbiota, ma soprattutto nella sua capacità di inserirsi in nodi regolatori centrali dell'omeostasi intestinale e sistemica. Il microbiota intestinale non può essere considerato soltanto come un insieme di microrganismi conviventi, ma come una vera piattaforma biologica capace di influenzare digestione, funzione batterica, metabolismo, infiammazione e risposta immunitaria.

In questa prospettiva, *A. muciniphila* si distingue per la sua localizzazione nella nicchia mucosale e per la sua capacità di utilizzare la mucina come substrato, collocandosi in una posizione strategica all'interfaccia tra lume intestinale ed epitelio. Questa specificità ecologica spiega, almeno in parte, perché la specie sia oggi considerata un regolatore chiave dell'asse intestino-immunometabolico e uno dei candidati di maggiore interesse nel panorama dei microrganismi benefici di nuova generazione.

Un aspetto centrale, ampiamente discusso nel corso dell'elaborato, riguarda il contributo di *A. muciniphila* al mantenimento dell'integrità intestinale. Le evidenze esaminate mostrano infatti che, nonostante la sua attività mucinolitica, questo batterio non compromette la protezione della mucosa ma al contrario sembra favorire il rinnovamento dello strato di muco, l'espressione delle proteine delle *tight junctions* e la stabilità funzionale dell'epitelio. In altre parole *A. muciniphila* non deve essere interpretata come un semplice degradatore di mucina, bensì come un modulatore dinamico dell'omeostasi mucosale.

Tale capacità assume una rilevanza particolare se si considera che l'alterazione della barriera intestinale rappresenta uno dei passaggi più importanti nella

patogenesi di numerose condizioni croniche tra cui obesità, diabete di tipo 2, sindrome metabolica e infiammazione sistemica di basso grado.

A questa funzione di sostegno della barriera si associa una significativa attività immunomodulante. Dai contenuti sviluppati nella tesi emerge infatti che *A. muciniphila* è in grado di influenzare sia l'immunità innata sia quella adattativa attraverso l'interazione con componenti cellulari dell'ospite e tramite la produzione di metaboliti bioattivi. La modulazione di *pathways* pro-infiammatori, la riduzione di citochine come TNF- $\alpha$ , IL-6 e il-1- $\beta$  e il contestuale incremento di segnali anti-infiammatori contribuiscono a delineare un profilo biologico orientato al mantenimento della tolleranza immunitaria e al contenimento dell'infiammazione cronica di basso grado. In questo senso la specie si configura come un mediatore dell'equilibrio tra barriera intestinale, microbiota e sistema immunitario, confermando la stretta interdipendenza tra questi tre livelli fisiologici.

Un ulteriore punto di forza emerso dalla letteratura analizzata riguardo il coinvolgimento di *A. muciniphila* nella regolazione del metabolismo energetico e lipidico. La tesi ha evidenziato come, nei modelli sperimentali e nei primi studi sull'uomo, una maggiore presenza di questo microrganismo sia associata a una migliore sensibilità insulinica, a un miglior controllo del metabolismo glucidico e a un profilo lipidico più favorevole. Sebbene tali effetti non possano essere interpretati in modo semplicistico come azioni farmacologiche dirette, essi suggeriscono con coerenza che *A. muciniphila* possa contribuire a riequilibrare processi metabolici disfunzionali, soprattutto nei contesti caratterizzati da obesità, dieta iperlipidica e insulino-resistenza.

Il legame tra metabolismo, infiammazione e funzione barriera sviluppato nei capitoli precedenti, rende questo quadro particolarmente plausibile e rafforza l'idea di *A. muciniphila* come modulatore multi-livello piuttosto che come agente a bersaglio singolo.

In questa cornice le evidenze cliniche disponibili, seppur ancora limitate, rappresentano un elemento di grande interesse. La tesi ha mostrato come gli studi

sull'uomo, benché numericamente ridotti e condotti su popolazioni selezionate, abbiano fornito risultati coerenti con il razionale biologico emerso dai modelli preclinici. In particolare, i dati relativi a sicurezza, tollerabilità e segnali favorevoli su sensibilità insulinica, insulinemica, profilo lipidico e marcatori indiretti di permeabilità intestinale hanno contribuito a far evolvere *A. muciniphila* da semplice biomarcatore di eubiosi a vero candidato per applicazioni cliniche e nutraceutiche. Al tempo stesso, l'analisi critica della letteratura invita alla prudenza, poiché il numero ancora contenuto di trial, la durata relativamente breve degli interventi e la selezione di popolazioni prevalentemente metaboliche non consentono, allo stato attuale, di formulare conclusioni definitive circa l'efficacia clinica in senso ampio.

Uno degli aspetti più originali emersi nel corso dell'elaborato è la natura peculiare di *A. muciniphila* come candidato probiotico di nuova generazione. Diversamente dai probiotici tradizionali, la specie non si colloca esclusivamente nel paradigma del microrganismo vivo somministrato in quantità adeguata ma apre il dibattito verso categorie più recenti e concettualmente più complesse quali postbiotici e *novel foods microbiota-based*. In questo contesto è opportuno ricordare che il termine postbiotico indica una preparazione costituita da microrganismi inattivati e/o dai loro componenti bioattivi, in grado di conferire un beneficio alla salute dell'ospite. In letteratura compare anche il termine paraprobiotico utilizzato più specificatamente per indicare cellule microbiche non vitali, intere o frammentate, le quali pur avendo perso la capacità replicativa conservano una rilevante attività biologica. Queste categorie risultano particolarmente pertinenti nel caso di *A. muciniphila* poiché consentono di interpretare in modo più preciso il valore funzionale della forma pastorizzata.

La distinzione tra ceppo vivo e preparazione pastorizzata è emersa come uno snodo centrale della trattazione, non soltanto per ragioni terminologiche, ma soprattutto perché la forma pastorizzata ha mostrato una bioattività significativa, in alcuni casi paragonabile o addirittura superiore a quella del batterio vivo, con vantaggi evidenti in termini di stabilità, standardizzazione, sicurezza e trasferibilità

industriale. Questo elemento rende *A. muciniphila* un caso paradigmatico del passaggio dalla probiotica classica a una nuova generazione di interventi microbiota-based più definiti e più compatibili con le esigenze della pratica farmaceutica.

La riflessione sulla sicurezza, sulla stabilità e sulla tollerabilità rafforza ulteriormente questa interpretazione. Dai dati raccolti nella tesi emerge che la forma pasteurizzata di *A. muciniphila* dispone oggi di un profilo di sicurezza meglio documentato rispetto alla forma viva, grazie sia ai trial clinici sia ai percorsi valutativi di tipo regolatorio. In tale prospettiva la forma pasteurizzata può essere considerata non soltanto un'alternativa tecnologicamente più stabile rispetto al batterio vivo, ma anche un esempio concreto di applicazione dei concetti di postbiotico e paraprobiotico in ambito farmaceutico.

Questo non significa che la forma viva perda interesse, ma suggerisce che almeno nell'attuale fase di sviluppo la preparazione pasteurizzata rappresenti la via più concreta per un impiego standardizzabile in ambito nutraceutico. Rimane tuttavia essenziale considerare la sicurezza in modo contestuale, cioè in relazione a dose, durata, popolazione target e condizioni cliniche del soggetto, evitando una generalizzazione eccessiva del concetto di innocuità.

Per quanto riguarda l'integrazione e le applicazioni pratiche il lavoro mette in evidenza che l'interesse verso *A. muciniphila* nasce dalla convergenza di motivazioni biologiche, cliniche e tecnologiche. La specie appare infatti particolarmente promettente nei contesti in cui coesistono alterazione della barriera intestinale, disfunzione immunometabolica e infiammazioni cronica di basso grado. Inoltre la possibilità di disporre di formulazioni standardizzate, soprattutto nella forma pasteurizzata, rende più realistico un suo impiego come supporto complementare nei soggetti con profilo metabolico alterato.

Tuttavia anche in questo caso la tesi mostra con chiarezza che *A. muciniphila* non deve essere interpretata come una soluzione universale, né come un sostituto della terapia farmacologica o delle modificazioni dello stile di vita, ma piuttosto come

un possibile strumento aggiuntivo all'interno di strategie integrate di prevenzione e supporto.

Particolarmente rilevante in una prospettiva di area farmaceutica è il ruolo attribuito al farmacista nella consulenza sull'uso dei probiotici e dei prodotti microbiota-based. Come emerge nell'ultima parte della tesi, il farmacista non svolge soltanto una funzione distributiva, ma può rappresentare un presidio di appropriatezza, educazione sanitaria e orientamento nell'uso razionale di prodotti spesso percepiti dal pubblico come genericamente benefici e sempre privi di rischio. Nel caso di *A. muciniphila*, così come più in generale dei probiotici e postbiotici, il farmacista è chiamato a riconoscere la ceppo-specificità, la differenza tra le forme vitali e non vitali, i limiti delle evidenze disponibili, le condizioni di impiego e i potenziali fattori di rischio nei soggetti fragili.

Le prospettive future delineate nel capitolo conclusivo si inseriscono in un quadro più ampio di evoluzione della nutraceutica verso modelli di precisione, standardizzazione e validazione clinica più rigorosa. La tesi evidenzia come *A. muciniphila* possa rappresentare uno degli esempi più convincenti di questa trasformazione: un microrganismo identificato attraverso studi sul microbioma, caratterizzato da un forte razionale meccanicistico, da un crescente numero di evidenze cliniche e da un possibile impiego personalizzato sulla base del profilo del soggetto. In questo caso *A. muciniphila* incarna in modo particolarmente efficace il passaggio da una nutraceutica empirica ad una nutraceutica di nuova generazione, nella quale il prodotto non viene scelto soltanto per tradizione o per popolarità commerciale ma per la sua plausibilità biologica, per la sua qualità formulativa e per il suo potenziale di integrazione in un modello di salute personalizzata.

Alla luce dell'intero percorso sviluppato si può quindi affermare che *A. muciniphila* rappresenti oggi uno dei candidati più interessanti nel panorama delle strategie microbiota-based ma anche uno dei più complessi da interpretare correttamente. Il suo valore scientifico risiede nel fatto che consente di collegare in modo coerente temi apparentemente distinti come barriera intestinale,

immunità, infiammazione, metabolismo, nutraceutica e regolazione del microbiota all'interno di un unico modello fisiopatologico integrato.

Allo stesso tempo, il suo valore applicativo dipende dalla capacità della ricerca futura di rispondere ad alcuni interrogativi ancora aperti: quali siano le popolazioni che possono trarre il maggior beneficio, quali siano le dosi e le durate ottimali, quali endpoint clinici siano più appropriati per misurare l'efficacia, quale sia il ruolo relativo della forma viva rispetto alla forma pastorizzata e come inserire questi prodotti in una cornice regolatoria e professionale chiara.

In conclusione, l'insieme delle evidenze esaminate in questa tesi permette di considerare *A. muciniphila* non più come una semplice curiosità del microbiota intestinale ma come un protagonista emergente della ricerca biomedica e nutraceutica contemporanea. La specie si colloca al crocevia tra fisiologia intestinale, immunologia, metabolismo e innovazione farmaceutica, offrendo un modello particolarmente istruttivo per comprendere come il microbiota possa essere trasformato da oggetto di osservazione a bersaglio di intervento.

Pur restando necessaria una maggiore solidità clinica prima di una piena applicazione su larga scala, *A. muciniphila* appare oggi uno dei candidati più promettenti per lo sviluppo di approcci nutraceutici avanzati, personalizzati e diventa emblematica di una nuova fase della ricerca sul microbiota, nella quale la comprensione dei meccanismi biologici si traduce in prospettive concrete di prevenzione, supporto terapeutico e innovazione in ambito farmaceutico.

In tale prospettiva, il crescente interesse verso paraprobiotici e postbiotici conferma come le potenzialità di *A. muciniphila* si estendano oltre l'impiego del microrganismo vitale, delinendo prospettive promettenti per future applicazioni nell'integrazione alimentare.

## 7. Bibliografia

- [1] Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J.* 2017 May 16;474(11):1823-1836. doi: 10.1042/BCJ20160510. PMID: 28512250; PMCID: PMC5433529.
- [2] Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol.* 2014 Aug;28(8):1221-38. doi: 10.1210/me.2014-1108. Epub 2014 Jun 3. PMID: 24892638; PMCID: PMC5414803.
- [3] Mo C, Lou X, Xue J, Shi Z, Zhao Y, Wang F, Chen G. The influence of *Akkermansia muciniphila* on intestinal barrier function. *Gut Pathog.* 2024 Aug 3;16(1):41. doi: 10.1186/s13099-024-00635-7. PMID: 39097746; PMCID: PMC11297771.
- [4] van Passel MW, Kant R, Zoetendal EG, Plugge CM, Derrien M, Malfatti SA, Chain PS, Woyke T, Palva A, de Vos WM, Smidt H. The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. *PLoS One.* 2011 Mar 3;6(3):e16876. doi: 10.1371/journal.pone.0016876. PMID: 21390229; PMCID: PMC3048395.
- [5] Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014 Aug;11(8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66. Epub 2014 Jun 10. PMID: 24912386.
- [6] FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization; 2002
- [7] Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, Falony G, Raes J, Maiter D, Delzenne NM, de Barse M, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, de Vos WM, Cani PD. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med.* 2019 Jul;25(7):1096-1103. doi: 10.1038/s41591-019-0495-2. Epub 2019 Jul 1. PMID: 31263284; PMCID: PMC6699990.
- [8] <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/health-claims>
- [9] Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001. *OJ L 327*, 11.12.2015, p. 1-22.
- [10] EFSA BIOHAZ Panel, Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bortolaia, V., Bover-Cid, S., De Cesare, A., Dohmen, W., Guillier, L., Jacxsens, Liesbeth., Nauta, M., Mughini-Gras, L., Ottoson, J., Peixe, L., Perez-Rodríguez, F., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., ... Barizzzone, F. (2026). Updated list of QPS-recommended microorganisms for safety risk assessments carried out by EFSA [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.18329226>
- [11] Cani PD, Depommier C, Derrien M, Everard A, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila*: paradigm for next-generation beneficial microorganisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022 Oct;19(10):625-637. doi: 10.1038/s41575-022-00631-9. Epub 2022 May 31. Erratum in: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022 Oct;19(10):682. doi: 10.1038/s41575-022-00650-6. PMID: 35641786.
- [12] Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, van der Ark KC, Aalvink S, Martínez LO, Dumas ME, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, Belzer C, de Vos WM, Cani PD. A purified membrane

protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med.* 2017 Jan;23(1):107-113. doi: 10.1038/nm.4236. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27892954.

[13] Ashrafian F, Keshavarz Azizi Raftar S, Shahryari A, Behrouzi A, Yaghoobfar R, Lari A, Moradi HR, Khatami S, Omrani MD, Vaziri F, Masotti A, Siadat SD. Comparative effects of alive and pasteurized *Akkermansia muciniphila* on normal diet-fed mice. *Sci Rep.* 2021 Sep 9;11(1):17898. doi: 10.1038/s41598-021-95738-5. PMID: 34504116; PMCID: PMC8429653.

[14] Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes.* 2016 May 3;7(3):189-200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26963409; PMCID: PMC4939913.

[15] Segers A, de Vos WM. Mode of action of *Akkermansia muciniphila* in the intestinal dialogue: role of extracellular proteins, metabolites and cell envelope components. *Microbiome Res Rep.* 2023 Mar 13;2(1):6. doi: 10.20517/mrr.2023.05. PMID: 38045608; PMCID: PMC10688800.

[16] Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM, Sanders ME, Shamir R, Swann JR, Szajewska H, Vinderola G. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021 Sep;18(9):649-667. doi: 10.1038/s41575-021-00440-6. Epub 2021 May 4. Erratum in: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021 Sep;18(9):671. doi: 10.1038/s41575-021-00481-x. Erratum in: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022 Aug;19(8):551. doi: 10.1038/s41575-022-00628-4. PMID: 33948025; PMCID: PMC8387231.

[17] Zhang Y, Liu R, Chen Y, Cao Z, Liu C, Bao R, Wang Y, Huang S, Pan S, Qin L, Wang J, Ning G, Wang W. *Akkermansia muciniphila* supplementation in patients with overweight/obese type 2 diabetes: Efficacy depends on its baseline levels in the gut. *Cell Metab.* 2025 Mar 4;37(3):592-605.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2024.12.010. Epub 2025 Jan 28. PMID: 39879980.

[18] Depommier C, Van Hul M, Everard A, Delzenne NM, De Vos WM, Cani PD. Pasteurized *Akkermansia muciniphila* increases whole-body energy expenditure and fecal energy excretion in diet-induced obese mice. *Gut Microbes.* 2020 Sep 2;11(5):1231-1245. doi: 10.1080/19490976.2020.1737307. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32167023; PMCID: PMC7524283.

[19] Wu W, Kaicen W, Bian X, Yang L, Ding S, Li Y, Li S, Zhuge A, Li L. *Akkermansia muciniphila* alleviates high-fat-diet-related metabolic-associated fatty liver disease by modulating gut microbiota and bile acids. *Microb Biotechnol.* 2023 Oct;16(10):1924-1939. doi: 10.1111/1751-7915.14293. Epub 2023 Jun 28. PMID: 37377410; PMCID: PMC10527187.

[20] Wu Z, Li K, Hou A, Wang Y, Li Z. The Positive Effect of *Akkermansia muciniphila* postbiotics on the Glycolipid Metabolism of *Caenorhabditis elegans* Induced by High-Glucose Diet. *Nutrients.* 2025 Mar 11;17(6):976. doi: 10.3390/nu17060976. PMID: 40290025; PMCID: PMC11945073.

[21] Depommier, C.; Vitale, R.M.; Iannotti, F.A.; Silvestri, C.; Flamand, N.; Druart, C.; Everard, A.; Pelicaen, R.; Maiter, D.; Thissen, J.-P.; et al. Beneficial Effects of *Akkermansia muciniphila* Are Not Associated with Major Changes in the Circulating Endocannabinoidome but Linked to Higher Mono-Palmitoyl-Glycerol Levels as New PPAR $\alpha$  Agonists. *Cells* 2021, 10, 185. <https://doi.org/10.3390/cells10010185>

[22] Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewsky J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, Kayser BD, Levenez F, Chilloux J, Hoyles L; MICRO-Obes Consortium; Dumas ME, Rizkalla SW, Doré J, Cani PD, Clément K. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome

richness and ecology. *Gut*. 2016 Mar;65(3):426-36. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308778. Epub 2015 Jun 22. PMID: 26100928.

[23] Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, Tremblay A, Ouwehand AC. Criteria to Qualify Microorganisms as "Probiotic" in Foods and Dietary Supplements. *Front Microbiol*. 2020 Jul 24;11:1662. doi: 10.3389/fmicb.2020.01662. PMID: 32793153; PMCID: PMC7394020.

[24] Chiantera V, Laganà AS, Basciani S, Nordio M, Bizzarri M. A Critical Perspective on the Supplementation of *Akkermansia muciniphila*: Benefits and Harms. *Life (Basel)*. 2023 May 24;13(6):1247. doi: 10.3390/life13061247. PMID: 37374030; PMCID: PMC10301191.

[25] Jian H, Liu Y, Wang X, Dong X, Zou X. *Akkermansia muciniphila* as a Next-Generation Probiotic in Modulating Human Metabolic Homeostasis and Disease Progression: A Role Mediated by Gut-Liver-Brain Axes? *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 15;24(4):3900. doi: 10.3390/ijms24043900. PMID: 36835309; PMCID: PMC9959343.

[26] EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA); Turck D, Bohn T, Castenmiller J, De Henauw S, Hirsch-Ernst KI, Maciuk A, Mangelsdorf I, McArdle HJ, Naska A, Pelaez C, Pentieva K, Siani A, Thies F, Toubour S, Vinceti M, Cubadda F, Frenzel T, Heinonen M, Marchelli R, Neuhäuser-Berthold M, Poulsen M, Prieto Maradona M, Schlatter JR, van Loveren H, Ackerl R, Knutsen HK. Safety of pasteurised *Akkermansia muciniphila* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J*. 2021 Sep 1;19(9):e06780. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6780. PMID: 34484452; PMCID: PMC8409316.

[27] Luo, Y., Lan, C., Li, H. et al. Rational consideration of *Akkermansia muciniphila* targeting intestinal health: advantages and challenges. *npj Biofilms Microbiomes* 8, 81 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00338-4>

[28] Yifei Zhang, Ruixin Liu, Yufei Chen, Zhiwen Cao, Cong Liu, Riqiang Bao, Yufan Wang, Shan Huang, Shijia Pan, Li Qin, Jiqiu Wang, Guang Ning, Weiqing Wang, *Akkermansia muciniphila* supplementation in patients with overweight/obese type 2 diabetes: Efficacy depends on its baseline levels in the gut, *Cell Metabolism*, Volume 37, Issue, 2025, Pages 592-605.e6, ISSN 1550-4131, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.12.010>.

[29] Akter S, Park JH, Jung HK. Potential Health-Promoting Benefits of Paraprobiotics, Inactivated Probiotic Cells. *J Microbiol Biotechnol*. 2020 Apr 28;30(4):477-481. doi: 10.4014/jmb.1911.11019. PMID: 31986247; PMCID: PMC9728361.

[30] Lee NK, Park YS, Kang DK, Paik HD. Paraprobiotics: definition, manufacturing methods, and functionality. *Food Sci Biotechnol*. 2023 Jul 17;32(14):1981-1991. doi: 10.1007/s10068-023-01378-y. PMID: 37860741; PMCID: PMC10581967.

[31] Mierlan, O.L.; Busila, C.; Amaritei, O.; Elena, D.; Raileanu, C.R.; Maftei, N.-M.; Matei, M.N.; Gurau, G. *Akkermansia muciniphila* in Metabolic Disease: Far from Perfect. *Int. J. Mol. Sci.* 2025, 26, 11602. <https://doi.org/10.3390/ijms262311602>

[32] Wang L, Tang L, Feng Y, Zhao S, Han M, Zhang C, Yuan G, Zhu J, Cao S, Wu Q, Li L, Zhang Z. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurised bacterium blunts colitis associated tumourigenesis

by modulation of CD8+ T cells in mice. *Gut*. 2020 Nov;69(11):1988-1997. doi: 10.1136/gutjnl-2019-320105. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32169907; PMCID: PMC7569398.

[33] Food Standards Agency & Food Standards Scotland (RP1468). Safety Assessment on Pasteurised *Akkermansia muciniphila* Used as a Food Supplement. 2024. doi:10.46756/001c.125531.

[34] EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA); Turck D, Bohn T, Cámara M, Castenmiller J, De Henauw S, Jos Á, Maciuk A, Mangelsdorf I, McNulty B, Naska A, Pentieva K, Siani A, Thies F, Aguilera-Gómez M, Frenzel T, Marcon F, McArdle HJ, Moldeus P, Neuhäuser-Berthold M, Poulsen M, Prieto Maradona M, Schlatter JR, van Loveren H, Ackerl R, Hirsch-Ernst KI. Safety of an extension of use of pasteurised *Akkermansia muciniphila* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA J*. 2025 Sep 25;23(9):e9632. doi: 10.2903/j.efsa.2025.9632. PMID: 41018002; PMCID: PMC12461158.

[35] EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens), Turck D, Bohn T, Castenmiller J, De Henauw S, Hirsch-Ernst KI, Maciuk A, Mangelsdorf I, McArdle HJ, Naska A, Pelaez C, Pentieva K, Siani A, Thies F, Tsabouri S, Vinceti M, Cubadda F, Frenzel T, Heinonen M, Marchelli R, Neuhäuser-Berthold M, Poulsen M, Prieto Maradona M, Schlatter JR, van Loveren H, Ackerl R and Knutsen HK, 2021. Scientific Opinion on the safety of pasteurised *Akkermansia muciniphila* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* 2021;19(9):6780, 18 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6780>

[36] Kang, C.-H.; Jung, E.-S.; Jung, S.-J.; Han, Y.-H.; Chae, S.-W.; Jeong, D.Y.; Kim, B.-C.; Lee, S.-O.; Yoon, S.-J. Pasteurized *Akkermansia muciniphila* HB05 (HB05P) Improves Muscle Strength and Function: A 12-Week, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients* 2024, 16, 4037. <https://doi.org/10.3390/nu16234037>

[37] Asghari P, Ahmadi-Khorram M, Hatami A, Talebi S, Afshari A. Therapeutic potential of *Akkermansia muciniphila* in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. *BMC Gastroenterol*. 2025 Nov 19;25(1):822. doi: 10.1186/s12876-025-04436-3. PMID: 41257640; PMCID: PMC12628924.

[38] Li S, Sohoulou MH, Li Z. The effect of postbiotics supplementation on obesity and metabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *Nutr Metab (Lond)*. 2025 Nov 13;22(1):140. doi: 10.1186/s12986-025-01037-5. PMID: 41233893; PMCID: PMC12613684.

[39] Machado D, Fonseca M, Vedor R, Sousa S, Barbosa JC, Gomes AM. *Akkermansia muciniphila* Encapsulated in Calcium-Alginate Hydrogelated Matrix: Viability and Stability over Aerobic Storage and Simulated Gastrointestinal Conditions. *Gels*. 2023 Nov 1;9(11):869. doi: 10.3390/gels9110869. PMID: 37998959; PMCID: PMC10670611.

[40] Diana Almeida, Daniela Machado, Sérgio Sousa, Catarina Leal Seabra, Joana Cristina Barbosa, José Carlos Andrade, Ana Maria Gomes, Ana Cristina Freitas, Effect of emulsification/internal gelation-based microencapsulation on the viability of *Akkermansia muciniphila* upon prolonged storage and simulated gastrointestinal passage, *Food Hydrocolloids for Health*, Volume 2, 2022, 100084, ISSN 2667-0259, <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100084>.

[41] Guarner F, Sanders ME, Szajewska H, Cohen H, Eliakim R, Herrera-deGuise C, Karakan T, Merenstein D, Piscocoya A, Ramakrishna B, Salminen S, Melberg J. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Probiotics and Prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2024 Jul 1;58(6):533-553. doi: 10.1097/MCG.0000000000002002. PMID: 38885083.

- [42] Szajewska H, et al. 2023 Probiotics for the Management of Pediatric Gastrointestinal Disorders – ESPGHAN Position Paper.
- [43] Abbas MO, Ahmed H, Hamid E, Padayachee D, Abdulbadia MT, Khalid S, Abuelhana A, Abdul Rasool BK. Pharmacists' Knowledge, Perception, and Prescribing Practice of Probiotics in the UAE: A Cross-Sectional Study. *Antibiotics (Basel)*. 2024 Oct 13;13(10):967. doi: 10.3390/antibiotics13100967. PMID: 39452233; PMCID: PMC11505214.
- [44] Zemla M, Kotowska-Bąbol M, Szajewska H. An update on probiotics in paediatrics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2025 Nov 28. doi: 10.1097/MCO.0000000000001192. Epub ahead of print. PMID: 41334956.
- [45] Agrawal K, Goktas P, Kumar N, Leung MF. Artificial intelligence in personalized nutrition and food manufacturing: a comprehensive review of methods, applications, and future directions. *Front Nutr*. 2025 Jul 23;12:1636980. doi: 10.3389/fnut.2025.1636980. PMID: 40771216; PMCID: PMC12325300.
- [46] Pitashny M, Kesten I, Shlon D, Hur DB, Bar-Yoseph H. The Future of Microbiome Therapeutics. *Drugs*. 2025 Feb;85(2):117-125. doi: 10.1007/s40265-024-02107-3. Epub 2025 Jan 23. PMID: 39843757; PMCID: PMC11802617.
- [47] Abeltino A, Hatem D, Serantoni C, Riente A, De Giulio MM, De Spirito M, De Maio F, Maulucci G. Unraveling the Gut Microbiota: Implications for Precision Nutrition and Personalized Medicine. *Nutrients*. 2024 Nov 6;16(22):3806. doi: 10.3390/nu16223806. PMID: 39599593; PMCID: PMC11597134.
- [48] Arshad MT, Ali MKM, Maqsood S, Ikram A, Ahmed F, Aljameel AI, Al-Farga A, Hossain MS. Personalized Nutrition in the Era of Digital Health: A New Frontier for Managing Diabetes and Obesity. *Food Sci Nutr*. 2025 Sep 26;13(10):e71006. doi: 10.1002/fsn3.71006. PMID: 41019177; PMCID: PMC12474561.
- [49] Frutos-Grilo E, Ana Y, Gonzalez-de Miguel J, Cardona-I-Collado M, Rodriguez-Arce I, Serrano L. Bacterial live therapeutics for human diseases. *Mol Syst Biol*. 2024 Dec;20(12):1261-1281. doi: 10.1038/s44320-024-00067-0. Epub 2024 Oct 23. PMID: 39443745; PMCID: PMC11612307.
- [50] Kim DY, Lee SY, Lee JY, Whon TW, Lee JY, Jeon CO, Bae JW. Gut microbiome therapy: fecal microbiota transplantation vs live biotherapeutic products. *Gut Microbes*. 2024 Jan-Dec;16(1):2412376. doi: 10.1080/19490976.2024.2412376. Epub 2024 Oct 8. PMID: 39377231; PMCID: PMC11469438.
- [51] Monday L, Tillotson G, Chopra T. Microbiota-Based Live Biotherapeutic Products for Clostridioides Difficile Infection- The Devil is in the Details. *Infect Drug Resist*. 2024 Feb 15;17:623-639. doi: 10.2147/IDR.S419243. PMID: 38375101; PMCID: PMC10876012.
- [52] Wei L, Wang B, Bai J, Zhang Y, Liu C, Suo H, Wang C. Postbiotics are a candidate for new functional foods. *Food Chem X*. 2024 Jul 14;23:101650. doi: 10.1016/j.fochx.2024.101650. PMID: 39113733; PMCID: PMC11304867.
- [53] Zdybel K, Śliwka A, Polak-Berecka M, Polak P, Waśko A. Postbiotics Formulation and Therapeutic Effect in Inflammation: A Systematic Review. *Nutrients*. 2025 Jun 30;17(13):2187. doi: 10.3390/nu17132187. PMID: 40647290; PMCID: PMC12251375.

- [54] Pattapulavar V, Ramanujam S, Kini B, Christopher JG. Probiotic-derived postbiotics: a perspective on next-generation therapeutics. *Front Nutr.* 2025 Jul 17;12:1624539. doi: 10.3389/fnut.2025.1624539. PMID: 40747333; PMCID: PMC12311805.
- [55] Calvanese CM, Villani F, Ercolini D, De Filippis F. Postbiotics versus probiotics: Possible new allies for human health. *Food Res Int.* 2025 Oct;217:116869. doi: 10.1016/j.foodres.2025.116869. Epub 2025 Jun 16. PMID: 40597563.
- [56] Liu YY. Deep learning for microbiome-informed precision nutrition. *Natl Sci Rev.* 2025 Apr 16;12(6):nwaf148. doi: 10.1093/nsr/nwaf148. PMID: 40475064; PMCID: PMC12139001.
- [57] Zhao Y, Yang H, Wu P, Yang S, Xue W, Xu B, Zhang S, Tang B, Xu D. *Akkermansia muciniphila*: A promising probiotic against inflammation and metabolic disorders. *Virulence.* 2024 Dec;15(1):2375555. doi: 10.1080/21505594.2024.2375555. Epub 2024 Aug 27. PMID: 39192579; PMCID: PMC11364076.
- [58] Abbasi A, Bazzaz S, Da Cruz AG, Khorshidian N, Saadat YR, Sabahi S, Ozma MA, Lahouty M, Aslani R, Mortazavian AM. A Critical Review on *Akkermansia muciniphila*: Functional Mechanisms, Technological Challenges, and Safety Issues. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2024 Aug;16(4):1376-1398. doi: 10.1007/s12602-023-10118-x. Epub 2023 Jul 11. PMID: 37432597.
- [59] Nisa P, Kirthi AV, Sinha P. Microbiome-based approaches to personalized nutrition: from gut health to disease prevention. *Folia Microbiol (Praha).* 2025 Oct;70(5):961-978. doi: 10.1007/s12223-025-01337-6. Epub 2025 Sep 24. PMID: 40991166.
- [60] Xu W, Li A, Jing H, Zhang X, Dong X, Song Z, Wu N, Zheng S. The role of *Akkermansia muciniphila* in the regulation of inflammatory bowel disease: intestinal immunity and metabolism. *Front Immunol.* 2025 Dec 19;16:1653472. doi: 10.3389/fimmu.2025.1653472. PMID: 41488633; PMCID: PMC12757376.
- [61] Yuan H, Shi J, Gu C, Yuan J, Huang C, Li X, Zhou K, Qi J. *Akkermansia muciniphila*: A next-generation gut probiotic supporting neurorepair and functional recovery. *Neural Regen Res.* 2025 Sep 29. doi: 10.4103/NRR.NRR-D-25-00701. Epub ahead of print. PMID: 41017717.