

O papel dos tratamentos para esclerose múltipla na dinâmica da microbiota intestinal humana

Vitalie Vacaras^{a,b}, Dafin F. Muresanu^{a,b}, Anca-Dana Buzoianu^c, Cristina Nistor^{a,b,*}, Stefan Cristian Vesa^c, Andreea-Cristina Paraschiv^b, Daniela Botos-Vacaras^d, Cristiana Vacaras^e, George Vithoukas^f

a Neurology Department, Cluj Emergency County Hospital, 400012 Cluj-Napoca, Romênia

b Department of Neurosciences, Faculty of Medicine, Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, 400012 Cluj-Napoca, Romênia

c Department of Pharmacology, Toxicology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, 400349 Cluj-Napoca, Romênia

d Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, 400012 Cluj-Napoca, Romênia

e Faculty of Medicine, Iuliu Hațieganu University of Medicine and Pharmacy, 400012 Cluj-Napoca, Romênia

f University of the Aegean, Mytilene, Grécia

Tradução para o português de: Nathalia Henrique Ursino Lopes

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Palavras-chave: Esclerose múltipla, microbiota intestinal, disbiose, tratamento modificador de doença, microbioma

RESUMO

A microbiota intestinal – totalidade de microrganismos em nosso trato gastrointestinal – pode ter implicações na esclerose múltipla (EM), uma doença neurológica desmielinizante. Nosso estudo incluiu 50 pacientes com EM e 21 controles saudáveis (CS). Vinte pacientes receberam um tratamento modificador de doença (sigla em inglês *DMT*), interferon beta1a ou teriflunomida, 19 receberam *DMT* combinada com a homeopatia, e 11 pacientes receberam apenas homeopatia. Coletamos, no total, 142 amostras intestinais, duas para cada participante: no momento da inscrição para o estudo e após oito semanas de tratamento. Comparamos a microbiota dos pacientes com EM com a dos controles saudáveis, analisamos sua evolução no tempo e o efeito do interferon beta1a, da teriflunomida e da homeopatia. Não houve diferença na diversidade alfa, somente dois resultados de diversidade beta relacionados à homeopatia. Em comparação com os CS, pacientes não tratados para EM tiveram uma diminuição de *Actinobacteria*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prauznitzii* e aumento de *Prevotella stercorea*, enquanto os pacientes tratados apresentaram redução de *Ruminococcus* e *Clostridium*. Comparados à amostra inicial, os pacientes tratados para EM tiveram uma diminuição de *Lachnospiraceae* e *Ruminococcus* e um aumento de *Enterococcus faecalis*. *Eubacterium oxidoreducens* foi reduzida após o tratamento homeopático. O estudo revelou que pacientes com EM podem apresentar disbiose. O tratamento com interferon beta1a,

teriflunomida ou homeopatia implicou em várias mudanças taxonômicas. É possível que os DMTs e a homeopatia influenciem a microbiota intestinal.

1. Introdução

A microbiota humana, composta por uma grande diversidade de microrganismos que residem dentro do nosso trato gastrointestinal, é taxonomicamente classificada em espécies, gênero e filo, contendo tanto microrganismos benéficos quanto patogênicos (Rinninella et al., 2019; Camara-Lemarroy et al., 2018). Formada em sua maioria na infância, depende de diversos fatores, como o tipo de parto, amamentação, desmame e medicação.

Após os três primeiros anos de vida, ela atinge uma estabilidade parcial, com contínuas mudanças sutis, causadas por fatores externos: dieta, exercícios, índice de massa corporal, ambiente e exposição a medicamentos (Rinninella et al., 2019). Um microbioma é formado pelo total de genes, proteínas e metabólitos de todos os organismos (Maglione et al., 2021).

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune do sistema nervoso central, em que susceptibilidades genéticas aliam-se a fatores ambientais. Isso inclui danos na integridade da barreira hematoencefálica, inflamação, desmielinização, perda de oligodendrócitos, gliose e degeneração axonal. A doença é composta de três estágios principais, um estágio pré-clínico, onde a combinação da genética com fatores ambientais podem ser um gatilho patológico; um estágio inflamatório, em que encontramos episódios de disfunção neurológica, como neurite óptica, deficiência piramidal, cerebelar ou do tronco encefálico, sintomas sensoriais, disfunção vesical; e um estágio neurodegenerativo final de progressão da doença, onde identificamos uma incapacidade progressiva, principalmente nas habilidades de marcha do paciente. A doença tem diferentes formas clínicas: a síndrome clinicamente isolada (sigla em inglês *CIS*), a esclerose múltipla remitente recorrente (EMRR), esclerose múltipla secundária progressiva (EMSP) e esclerose múltipla primária progressiva (EMPP). Os fatores de risco modificáveis conectados à EM têm sido fortemente analisados para se descobrir um papel específico no processo patológico, incluindo a composição do microbioma (Baecher-Allan et al., 2018). Estudos recentes descrevem que pacientes com EM têm uma composição de microbioma distinta em comparação com os controles saudáveis (CS) (Mirza et al., 2020).

Devido ao fato de o microbioma ser único em cada indivíduo, e conter enorme variedade de microrganismos, é difícil descrever uma microbiota saudável específica (Rinninella et al., 2019). Uma microbiota saudável cumpre muitas funções essenciais, incluindo a permeabilidade e motilidade intestinal, síntese de vitaminas, absorção, mas também o desenvolvimento do sistema imune inato (Chu et al., 2018). Baseado nessa função de imunomodulação, estudos recentes indicam uma possível conexão entre o microbioma e algumas patologias neurológicas imunomediadas (Mirza et al., 2020).

O conceito de eixo microbiota intestinal-cérebro refere-se à diferentes mecanismos de comunicação entre os sistemas gastrointestinal e nervoso (Strandwitz, 2018). A microbiota pode influenciar o sistema nervoso central (SNC) por diferentes vias. Primeiramente, relaciona-se com as redes cerebrais, modula diferentes neurotransmissores (como o ácido gama aminobutírico, a serotonina, a dopamina e a histamina) e está conectada ao sistema nervoso simpático e parassimpático, especialmente com o nevo vago. Segundo, está envolvida na via endócrina, como resposta ao estresse. Os corticoides liberados pelo eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal podem alterar a composição da microbiota e aumentar a permeabilidade intestinal. Outro mecanismo pelo qual os microrganismos podem alterar a imunomodulação do sistema nervoso. Isso inclui prejuízo na apresentação de antígenos, na produção de citocinas e linfócitos, na diferenciação das células do tipo T no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (Chu et al., 2018). Os microrganismos intestinais podem liberar metabólitos (lipopolissacarídeos, peptídeos) e o metabolismo dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) está envolvido na ativação das células da micrógliia e permeabilidade da barreira hematoencefálica (Strandwitz, 2018).

A medicina complementar e alternativa, incluindo a homeopatia, está principalmente associada às formas convencionais de tratamento, para o alívio de sintomas gerais, da dor, espasticidade, problemas de sensibilidade, dificuldade de locomoção, fadiga, perda de memória. De todos os pacientes com EM, até 30% usam ou usaram uma forma complementar e alternativa de medicina (Kim et al., 2018). Estima-se que 70-80% dos pacientes com EM apresentaram melhora no estado geral (Olsen, 2009). O princípio da homeopatia “semelhante cura semelhante” baseia-se na ideia de que uma enfermidade pode ser tratada por substâncias que provocam os mesmos sintomas patológicos em indivíduos saudáveis (Fisher e Ernst, 2015). Os remédios homeopáticos são substâncias naturais altamente diluídas (Manzalini e Galeazzi, 2019), sendo que uma solução mais diluída é considerada como tendo uma potência mais alta (Chikramane et al., 2010). A escolha da potência está relacionada ao nível de saúde: um nível de saúde mais baixo sugere uma potência baixa, como a 30C, por um período mais longo, de até três meses, enquanto um tratamento com uma 200CH é limitado a alguns dias. Eles são prescritos com base em cada caso, levando-se em consideração outros aspectos além dos sinais médicos específicos, assim como detalhes psicológicos particulares ou hábitos diários relevantes do paciente (Whitmarsh, 2003). Alguns sintomas da EM são frequentemente melhorados por algumas substâncias: Causticum para disfunções urinárias, Phosphorus para neurite óptica, Cuprum metallicum e Nux vômica para espasmos, Secale para sintomas sensoriais (Whitmarsh, 2003).

Conforme apresentado mais adiante neste artigo, vários estudos delinearam que os pacientes com EM têm uma microbiota distinta em comparação com os CS. Observou-se que os tratamentos para EM podem modificar o microbioma intestinal, mas a homeopatia não foi estudada nesse campo.

Os objetivos deste estudo são investigar se a microbiota intestinal dos pacientes com EM muda devido a drogas imunomoduladoras ou tratamentos homeopáticos complementares, incluindo tratamento homeopático, e avaliar as diferenças na taxonomia e diversidade microbiana entre a EM e os CS.

2. Materiais e métodos

2.1 Sujeitos

O estudo foi prospectivo, longitudinal, analítico, observacional e do tipo caso controle. Incluiu 50 pacientes diagnosticados com EM, do departamento de Neurologia no Hospital de Emergência Cluj-Napoca (*The Emergency Hospital Cluj-Napoca*), entre janeiro de 2019 e maio de 2020. Vinte e um CS foram recrutados. A autorização ética foi obtida (número

2394/28.01.2020, Emergency Hospital Cluj-Napoca) e cada um dos sujeitos assinou o informe de consentimento.

O grupo com EM incluía pacientes adultos com EM remitente recorrente (EMRR) confirmada, ou com síndrome clinicamente isolada (CIS), em acordo com o critério diagnóstico revisado de McDonald (Thompson et al., 2018), com um escore EDSS máximo de 5 pontos, que não tinham sido submetidos a tratamento modificador de patologia (DMT) por um ano antes da inscrição no estudo. Nós excluímos pacientes com EM progressiva, com critério diagnóstico incerto, patologias gastrointestinais ativas, gestantes, lactantes ou que tinham passado por longos tratamentos com probióticos, antivirais, antibióticos, anti-inflamatórios não esteroides ou inibidores de bomba de prótons nos últimos seis meses. De todos os pacientes, 7 enfrentaram patologias gastrointestinais transitórias leves no passado, mas sem sintomas gastrointestinais ativos no momento da inscrição; 4 pacientes tinham histórico de cirurgias abdominais e 4 apresentavam patologias endócrinas (a maioria relacionadas à tireoide) sob controle médico. Outras patologias (hipertensão, diabetes) estavam presentes em casos isolados e estavam clinicamente compensadas ao início do estudo. O grupo CS era composto de indivíduos saudáveis, sem EM, correspondentes quanto ao sexo e à idade aos pacientes com EM, não diagnosticados com nenhuma doença, e sem tratamento crônico. Todos os sujeitos declararam que nenhuma grande mudança ocorreu em sua dieta ou estilo de vida durante o estudo.

No início do estudo, cada sujeito forneceu uma amostra intestinal. Após a primeira amostra, foi prescrito uma forma de tratamento dependendo de vários fatores, como severidade da doença, o consentimento dos pacientes, comorbidades, segurança das drogas e acessibilidade (Chikramane et al., 2010). Alguns recusaram a terapia convencional naquele momento; no entanto, aceitaram o tratamento homeopático. A segunda amostra foi obtida dois meses depois do início do tratamento.

Quanto à distribuição do tratamento homeopático, cada paciente recebeu um medicamento diferente, individualizado, segundo seus sintomas de EM, incluindo os seguintes remédios: Phosphorus, Lycopodium, Natrium muriaticum, Lac caninum, Nux vomica, Lachesis, Nitric acid, Rhus toxicodendron, Tarentula hispanica, Pulsatilla, Calcarea carbonica, Sulphur, Ignatia, Aconitum ou Causticum, com uma concentração de 30CH ou 200CH. As substâncias foram prescritas por um neurologista credenciado em homeopatia e foram ingeridos diariamente 7 grânulos via sublingual, por 3 dias consecutivos, pelos pacientes designados com a concentração de 200CH, e por 1 a 3 meses por aqueles com a concentração 30CH.

Nossos pacientes com EM foram divididos em grupos separados, de acordo com o tratamento, como apresentado na Tabela 1. O Grupo G-DMT recebeu um tratamento modificador de patologia: interferon beta1a via intramuscular, 30µg/0.5ml, uma vez por semana (subgrupo G-IFN) ou teriflunomida 14mg via oral, diariamente (subgrupo G-TER). O Grupo G-DMT+HOM recebeu um DMT combinado com Homeopatia: G-IFN+HOM interferon beta1a e homeopatia, G-TER+HOM teriflunomida e homeopatia. O Grupo G-HOM consistiu em tratamento homeopático. O Grupo Controle, G-HC foi formado por CS, sem nenhum tratamento.

2.2 Coleta das amostras

Todos os sujeitos forneceram amostras fecais correspondentes às instruções do laboratório: a qualquer momento do dia, sem restrições, utilizando recipientes especiais para fezes. As amostras fornecidas foram armazenadas a -20°C e depois enviadas ao laboratório para extração de DNA. Cada sujeito coletou duas amostras fecais: uma antes do tratamento (amostra 1, S1) e outra dois meses após o início do tratamento ou de inscrição no estudo (amostra 2, S2).

Tabela 1

Convenção de denominação dos grupos

Grupo	Número de sujeitos	Subgrupo	Número de sujeitos
G-DMT (DMT)	20	G-IFN (interferon beta1a)	10
		G-TER (teriflunomida)	10
G2-DMT + HOM (DMT + homeopatia)	19	G-IFN + HOM (interferon beta1a + homeopatia)	9
		G-TER + HOM (teriflunomida+ homeopatia)	10
G-HOM (homeopatia)	11		
G-HC (CS)	21		
G-EM (todos os pacientes com EM)	50		

A Tabela 1 resume os acrônimos que utilizamos para a identificação dos grupos.

Abreviações: DMT = tratamento modificador de doença, CS = controles saudáveis (sigla em inglês HC = *healthy controls*)

2.3. O sequenciamento 16rRNA e análises estatísticas

A análise metagenômica da subunidade do gene 16S RNA ribossômico (rRNA) universalmente presente, utilizou regiões hipervariáveis específicas (V1-V3, V3-V4, ITS1&ITS2) em toda a plataforma Illumina MiSeq. Os resultados são as Unidades Taxonômicas Operacionais (*OTU* em inglês), microrganismos que têm uma semelhança no DNA de pelo menos 97% com uma base de dados laboratorial, classificados em táxons específicos, com sua frequência e abundância relativa.

A diversidade da microbiota intestinal é uma medida matemática de variabilidade caracterizada por riqueza (número de diferentes espécies) e regularidade (uniformidade das diferentes espécies). Para diversidade alfa, a diversidade dentro da amostra, o índice de Chao é um estimador da riqueza de espécies. Shannon e Simpson são parâmetros para ambos, riqueza e regularidade - seus valores aumentam com o número de espécies e uma distribuição mais uniforme (Kim et al., 2017).

Usando matrizes de frequência, cada combinação de pares foi analisada utilizando-se o Teste de Wilcoxon de soma de opostos. Para diversidade beta, a diversidade entre as amostras, utilizamos os índices de Bray-Curtis e de Jaccard, onde a distância gráfica entre eles indica a diferença. A análise de coordenadas principais (PCoA) foi obtida a partir de matrizes de abundância. Os números do Tamanho do Efeito da Análise Discriminante Linear (LEfSe) usam matrizes de abundância relativa para calcular a abundância diferencial de organismos entre a EM e os CS, com um valor alfa de 0,05 e um limite de pontuação da análise discriminante linear logarítmica (LDA) de 2,0. Todos os elementos têm uma pontuação inferior a 2,0 ou superior a 2,0. As bactérias aumentadas em pacientes com EM são representadas em vermelho, enquanto as mais abundantes nos CS são coloridas em verde. Nas barras de abundância relativa sobrepostas, cada barra representa a abundância relativa média das 25 principais espécies, selecionadas de acordo com as mais abundantes em relação a ambos os grupos. Heatmaps também foram gerados.

3. Resultados

O grupo com EM consistia em 31 mulheres e 19 homens, com idade média de $30,5 \pm 9,9$ anos, 44 dos quais foram diagnosticados com EMRR e 6 com CIS, um escore médio de 1,8 pontos na Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS), e duração média da doença de 3,4 anos. Todas as características específicas da EM estão apresentadas na Tabela 2. A maioria deles era neutro (sem prévio tratamento modificador de doença (DMT)), apenas 4 pacientes receberam tratamento, o qual foi interrompido no ano anterior.

O grupo controle saudável (CS) foi organizado considerando pessoas com características demográficas semelhantes às do grupo com EM: 62% mulheres e 38% homens, com idade média de $28 \pm 9,7$ anos.

Tabela 2

Características específicas de esclerose múltipla (EM) do nosso coorte.

Características	Pacientes com EM (n=50)
<i>Tipo de EM, n (%)</i>	
EMRR	44 (88%)
CIS	6 (12%)
Escore EDSS, média (intervalo)	1.8 (0–5)
Duração confirmada da doença, média (DP) (a)	3.4 (6.2)
Número de recidivas, média (DP)	2.5 (2.13)
Escore MEEM, média	29.4
<i>Tratamento, n (%)</i>	
Teriflunomida	10 (14.28%)
Interferon beta1a	10 (14.28%)
Teriflunomida+ homeopatia	10 (14.28%)
Interferon beta+ homeopatia	9 (12.8%)
Homeopatia	11 (15.7)

Abreviações: EM = esclerose múltipla, n = número de pacientes, DP = desvio padrão, a = anos, EMRR = esclerose múltipla remitente recorrente, CIS = síndrome clinicamente isolada, EDSS = escala expandida do estado de incapacidade, MEEM = miniexame do estado mental.

3.1. Diversidade do microbioma

Nós analisamos as diferenças gerais na composição microbiana utilizando a diversidade alfa e beta. Não houve diferença estatisticamente significativa na diversidade alfa entre os pacientes com EM e os CS ($p = 0,85$) e após o tratamento ($p = 0,95$). Além disso, não houve diferença entre outras combinações de grupos para a amostra 2 (S2): G-DMT vs G-DMT + HOM ($p = 0,89$), G-DMT + DOM vs G HOM ($p = 0,98$), G-DMT vs G-HOM ($p = 0,64$), e seus subgrupos, G = IFN + HOM vs G-TER + HOM ($p = 0,23$), G-IFN vs G-IFN + HOM ($p = 0,06$) entre a amostra 1 (S1) e S2 para pacientes com EM ($p = 0,93$), G-DMT + HOM ($p = 0,38$) ou G-HOM ($p = 0,79$). Também não houve diferença na diversidade alfa dos pacientes com EM tratados com DMT (G-DMT combinado com G-DMT + HOM) e os pacientes que não receberam DMT (G-HOM), $p = 0,81$. Todos os valores de p estão apresentados na Tabela 3.

À medida que analisávamos a diversidade beta, houve diferença na S2 entre G-HOM e G-TER + HOM ($p = 0,007$) (Fig. 1) e entre G-HOM e G-IFN ($p = 0,012$), mas sem diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com EM e os CS, ou entre as duas amostras dos pacientes com EM (todos os $p > 0,05$). Outros resultados estão descritos na Tabela 3 e na Fig. 1* (*arquivos de dados complementares).

3.2. Diferenças taxonômicas

Os resultados da análise do 16S incluíram frequência e abundância relativa das espécies.

Para o coorte de EM, identificamos 51 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) a nível do filo, a maioria composta de *Firmicutes* (49,45%), *Bacteroidetes* (34,3%), *Actinobacteria* (4,77%) e *Proteobacteria* (3,6%). Em nível de espécie, analisamos 1.505 OTUs, com maior abundância relativa de *Prevotella copri* (10,75%) e *Bacteroides* (10,3%), seguido de *Faecalibacterium prausnitzii* (6,63%) e *Blautia* (4,49%).

Analisamos diferenças taxonômicas entre nosso coorte de EM (G-EM) e os CS (G-HC) antes de qualquer tratamento (S1). Pacientes com EM não tratados, quando comparados aos CS, apresentaram abundância relativa elevada do *Lentisphaerae phylum* ($p = 0,005$), espécie *Prevotella stercorea* ($p = 0,02$) (filo *Bacteroidetes*). Tiveram um nível diminuído do filo *Actinobacteria* ($p = 0,01$), com suas espécies *Bifidobacterium* ($p = 0,01$) e *Bifidobacterium adolescentis* ($p = 0,007$), nível também diminuído de *Bacteroides coprophilus* ($p = 0,02$) (do filo *Bacteroidetes*). O filo *Firmicutes* reduziu a abundância relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0,03$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,01$), *Staphylococcus hominis* ($p = 0,02$) e do *Staphylococcus bacterium* ($p = 0,02$). O filo *Proteobacteria* está diminuído no *Haemophilus* ($p=0,04$) e na *Escherichia coli* ($p=0,04$). As outras diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas na Fig. 2A, fig. 2*-4*.

Tabela 3Análise geral de todos os valores de p para diversidade microbiana.

Comparação	Diversidade Alfa			Diversidade Beta	
	Chao	Shannon	Simpson	Bray-Curtis	Jaccard
G-HC vs G-EM (S1)	$p = 0.85$	$p = 0.33$	$p = 0.55$	$p = 0.15$	$p = 0.13$
G-HC vs G-EM (S2)	$p = 0.95$	$p = 0.16$	$p = 0.39$	$p = 0.14$	$p = 0.12$
G-DMT vs G-DMT + HOM (S2)	$p = 0.89$	$p = 0.69$	$p = 0.59$	$p = 0.85$	$p = 0.9$
G-DMT + HOM vs G-HOM (S2)	$p = 0.98$	$p = 0.97$	$p = 0.87$	$p = 0.12$	$p = 0.2$
G-DMT vs G-HOM (S2)	$p = 0.64$	$p = 0.8$	$p = 1$	$p = 0.15$	$p = 0.13$
G-DMT combined with G-DMT + HOM vs G-HOM (S2)	$p = 0.81$	$p = 0.91$	$p = 0.91$	$p = 0.19$	$p = 0.2$
G-IFN vs G-IFN + HOM (S2)	$p = 0.06$	$p = 1$	$p = 0.84$	$p = 0.06$	$p = 0.06$
G-TER vs G-TER + HOM (S2)	$p = 0.13$	$p = 0.68$	$p = 0.68$	$p = 0.23$	$p = 0.35$
G-IFN + HOM vs G-HOM (S2)	$p = 0.47$	$p = 0.41$	$p = 0.66$	$p = 0.06$	$p = 0.06$
G-TER + HOM vs G-HOM (S2)	$p = 0.55$	$p = 0.39$	$p = 0.47$	$p = 0.007$	$p = 0.012$
G-IFN vs G-HOM (S2)	$p = 0.2$	$p = 0.35$	$p = 0.72$	$p = 0.012$	$p = 0.016$
G-TER vs G-HOM (S2)	$p = 0.62$	$p = 0.62$	$p = 0.72$	$p = 0.62$	$p = 0.33$
G-IFN + HOM vs G-TER + HOM (S2)	$p = 0.23$	$p = 0.14$	$p = 0.14$	$p = 0.06$	$p = 0.11$
S1 vs S2 (G-EM)	$p = 0.93$	$p = 0.26$	$p = 0.36$	$p = 0.88$	$p = 0.93$
S1 vs S2 (G-DMT + HOM)	$p = 0.38$	$p = 0.6$	$p = 0.69$	$p = 0.95$	$p = 0.99$
S1 vs S2 (G-HOM)	$p = 0.79$	$p = 0.4$	$p = 0.44$	$p = 0.98$	$p = 0.98$
S1 vs S2 (G-IFN + HOM)	$p = 0.96$	$p = 0.86$	$p = 0.8$	$p = 0.87$	$p = 0.93$
S1 vs S2 (G = TER + HOM)	$p = 0.24$	$p = 0.58$	$p = 0.68$	$p = 0.96$	$p = 0.98$

* Os valores em negrito são estatisticamente relevantes. Essa tabela apresenta comparações específicas entre nosso coortes e índices de diversidade aplicados, juntamente com o valor de p de cada teste. Abreviações: S1 = amostra 1; S2 = amostra 2.

Quando analisamos a segunda amostra, os resultados nos pacientes com EM tratados, comparados aos CS foram ligeiramente diferentes, com diminuição de *Bifidobacterium* ($p =$

0,02), *Ruminococcus* ($p = 0,04$) e *Clostridiales* ($p = 0,01$) e uma maior prevalência de *Gemella* ($p = 0,04$), *Megasphaera* ($p = 0,02$) e *Prevotella stercorea* ($p = 0,02$) em pacientes com EM comparados aos CS (Fig. 2B, fig. 5*-7*).

Analisamos diferentes comparações entre os grupos após dois meses de tratamento. Ao analisarmos a microbiota dos pacientes com EM que receberam DMT (G-DMT) em comparação com os pacientes submetidos ao tratamento homeopático complementar (G-DMT + HOM), delineamos os seguintes resultados. Comparados ao G-DMT + HOM, o G-DMT teve uma abundância relativa ampliada de *Catenibacterium* ($p = 0,02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$), *Sharpea* ($p = 0,02$) e *Gammaproteobacteria* ($p = 0,02$) e diminuição do nível de *Shuttleworthia* ($p = 0,04$), *Cytophaga* ($p = 0,03$) e *Rumen* ($p = 0,02$). *Cyanobacteria* ($p = 0,002$), *Catenibacterium* ($p = 0,01$), *Alloprevotella* ($p = 0,03$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,003$), *Clostridium* ($p = 0,01$), *Prevotella copri* ($p = 0,04$), *Prevotella stercorea* ($p = 0,03$) são mais abundantes no subgrupo G-IFN em comparação com G-IFN + HOM, após o tratamento. Por outro lado, o G-IFN + HOM apresenta níveis mais elevados de *Proteobacteria* ($p = 0,02$), *Escherichia shigella* ($p = 0,01$), *Barnesiella* ($p = 0,03$), *Serratia* ($p = 0,008$), *Lactobacillus zae* ($p = 0,02$). No grupo G-TER *Escherichia shigella* ($p = 0,007$), *Lactobacillus* ($p = 0,01$), *Enterobacter* ($p = 0,02$), *Enterococcus faecalis* ($p = 0,03$) são mais prevalentes que no G-TER + HOM, enquanto o G-TER + HOM apresenta maiores índices de *Rickenellaceae* ($p = 0,01$) e *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$). Nós também comparamos os dois grupos que receberam tratamento homeopático, o G-DMT + HOM e o G-HOM. Constatamos que o G-DMT + HOM apresentou maior abundância relativa para *Megasphaera* ($p = 0,04$), *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0,02$), *Veillonellaceae* ($p = 0,02$) e *Gardnerella* ($p = 0,02$), em comparação com o G-HOM. O G-HOM teve aumento de *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0,01$), *Akkermansia muciniphila* ($p = 0,02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,003$), *Bacteroides acidifaciens* ($p = 0,04$) e *pectinophilus* ($p = 0,03$), *Veillonella* ($p = 0,01$), em comparação com o G-DMT + HOM (fig. 8*-20*).

Outro ponto de interesse em nossa pesquisa foi enfatizar como o microbioma muda com o tempo, do momento que os pacientes receberam a prescrição do esquema terapêutico (S1) até dois meses após início do tratamento (S2). Para o coorte com EM, as mudanças taxonômicas estão mostradas na Fig.3, com os 25 organismos mais abundantes. As mudanças estatisticamente relevantes entre as duas amostras foram mais prevalentes para o *Filo Firmicutes*, pois foram identificados níveis reduzidos de *Ruminococcus* ($p = 0,03$), *Oscillospira* ($p = 0,0004$), *Anaerotruncus* ($p = 0,02$), *Lachnoclostridium* ($p = 0,01$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$) e *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0,04$) nos pacientes com EM após o tratamento, em comparação com a amostra de base. Os pacientes tratados para EM apresentaram alterações bacterianas mais diversas, com aumento de *Filo Firmicutes* (*Sulfobacillus* $p = 0,02$, *Enterococcus faecalis* $p = 0,02$), *Bacteroidetes* (*Hymenobacter* $p = 0,04$), *Proteobacteria* ($p = 0,04$), *Actinobacteria* (*Amycolatopsis* $p = 0,04$), *Fusobacterium* (*Leptotrichiaceae* $p = 0,04$) após o tratamento em comparação com antes (fig. 21*-25*).

O grupo G-DMT + HOM apresentou abundância relativa mais baixa em alguns componentes de *Firmicutes* (*Oscillospira* $p = 0,01$, *Lachnoclostridium* $p = 0,03$, *Lachnospiraceae* $p = 0,03$) e *Proteobacteria* (*Helicobacteraceae* $p = 0,01$, *Undibacterium* $p = 0,03$) após o tratamento, em comparação com a base de referência. O grupo apenas com tratamento homeopático (G-HOM) teve diminuição do *Eubacterium oxidoreducens* após o tratamento, em comparação com a primeira amostra ($p = 0,03$) (fig. 25*-32*).

4. Discussão

Nossos dados não revelaram maiores mudanças na diversidade entre pacientes com EM e os CS, antes ou depois de qualquer tipo de tratamento. Comparados aos CS, pacientes não tratados apresentaram um aumento de *Prevotella stercorea* e diminuição nos níveis de *Actinobacteria* e *Faecalibacterium prausnitzii*. As alterações taxonômicas após dois meses de tratamento foram levemente diferentes, com aumento dos níveis de *Gemella* e diminuição dos *Ruminococcus* nos sujeitos com EM. Comparações entre grupos após o tratamento ressaltam diferentes modificações taxonômicas. Por exemplo, pacientes tratados com homeopatia tiveram um aumento de *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* e *Bacteroides* em comparação com a terapia de combinação. Ademais, houve resultados significativos de beta diversidade para os tratamentos com homeopatia versus homeopatia combinada com teriflunomida e também para homeopatia versus interferon beta1a. Analisando as mudanças que ocorreram com o tempo, entre as duas amostras, percebemos uma diminuição dos níveis de *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae* e *Eubacterium oxidoreducens* entre os pacientes tratados para EM comparados às suas amostras de base. A homeopatia induziu, com o tempo, a redução do *Eubacterium oxidoreducens*.

Existe um consenso de que uma microbiota saudável é caracterizada por um equilíbrio entre os microrganismos e o hospedeiro, com grande diversidade, resiliência e estabilidade, de forma a manter a homeostase no hospedeiro e suas funções imunes (Freedman et al., 2018). Embora fatores externos possam rapidamente modificar a microbiota, bactérias saudáveis e estáveis conseguem rapidamente voltar à sua composição original e serem alteradas apenas com hábitos persistentes. Uma maior biodiversidade significa maiores diferenças nas espécies e, assim, elas conseguem exercer mais funções biológicas, maior estabilidade, habilidade de resistir às mudanças e de se recuperar (Riccio and Rossano, 2018). A disbiose refere-se a um desequilíbrio na composição bacteriana, com aumento dos microrganismos prejudiciais e diminuição das espécies benéficas, com uma alteração rumo a um estado inflamatório (Freedman et al., 2018).

Percebemos nos perfis de microbiota do nosso coorte com EM um aumento de *Firmicutes* e *Actinobacteria* e uma diminuição no filo *Bacteroidetes*. Essas mudanças são específicas de uma dieta tipicamente ocidental, rica em gorduras e açúcar, onde as *Firmicutes* são mais capazes de extrair energia dos alimentos, promovendo ganho de peso. Por outro lado, uma dieta baseada em carboidratos complexos, rica em fibras, promove o aumento dos *Bacteroidetes* e de metabólitos benéficos (Magne et al., 2020).

É possível que as terapias para EM possam modular a microbiota intestinal, mas, até então, evidências não estão bem estabelecidas em estudos com humanos. O Interferon beta inibe as células T e as citocinas pró-inflamatórias, estimula as Tregs e as células B supressivas, modula a interação entre os microrganismos e as células epiteliais, e estabiliza a barreira intestinal com uma maior expressão das proteínas de junção (*tight junctions*) nas células endoteliais. A Teriflunomida inibe a diidroorotato desidrogenase, a síntese de pirimidina e citocinas pró-inflamatórias e pode influenciar o microbioma intestinal suprimindo a via de sinalização STAT-6, aumentando as células Treg específicas (Camara-Lemarroy et al., 2018; Baecher-Allan et al., 2018).

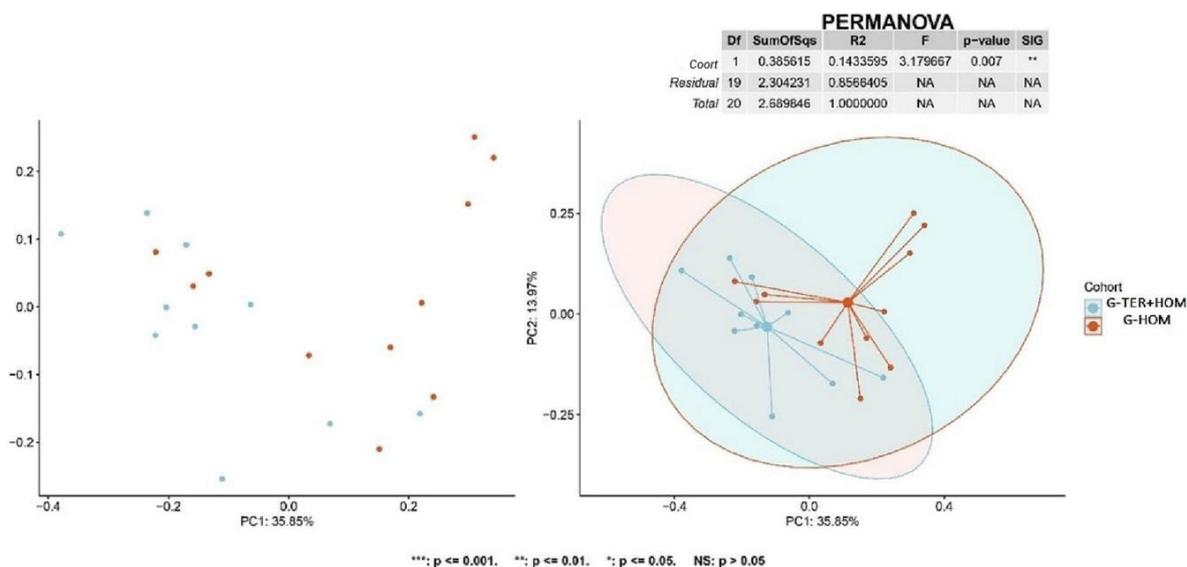


Fig. 1. Análise de coordenadas principais de Bray-Curtis (PCoA), homeopatia + teriflunomida (G-TER + HOM) vs grupo de homeopatia (G-HOM), amostra 2. O valor da diversidade de Bray-Curtis quantifica a diferença entre o grupo com homeopatia e teriflunomida e o grupo com homeopatia, após dois meses de tratamento. A figura à direita mostra uma elipse de confiança de 95% para cada grupo. Os resultados do teste PERMANOVA estão incluídos na tabela.

4.1. Comparação entre os pacientes com EM e os CS na base de referência

Em nosso estudo, nenhuma das métricas de diversidade alfa ou beta diferiu significativamente entre os pacientes com EM e os CS antes do início do tratamento. Isso sugere que a microbiota dos pacientes com EM não mostra sinal de tendências incomuns, correspondendo à pesquisa da literatura (Mirza et al., 2020). A nível de taxonomia, observamos diversos organismos que tiveram abundância relativa significativamente diferente entre os casos de EM e os CS. A *Actinobacteria* é um microrganismo benéfico que tem um papel na formação do sistema imune (Adamczyk-Sowa et al., 2017) e está reduzido entre os pacientes com EM. A *Bifidobacterium* está diminuída no coorte com EM. A literatura fornece dados conflitantes a respeito de seu papel nas doenças imunes, mas a maioria dos estudos mostraram que a *Bifidobacterium* induz uma resposta imune anti-inflamatória (Budhram et al., 2017; Tankou et al., 2018). A *Prevotella* genus é uma bactéria muito estudada na EM, envolvida no metabolismo do fitoestrógeno, geralmente aceito como menos prevalente na EM e mais presente em pacientes tratados (Chen et al., 2016; Brown et al., 2021). Nossos pacientes com EM apresentaram níveis mais elevados de uma espécie em comparação com os CS, antes e depois do tratamento, a *Prevotella stercorea*, mas nenhum dado relevante sobre a *Prevotella* genus. Isso se deve provavelmente ao fato de que esse gênero tem várias espécies com diferentes funções (Mirza et al., 2020).

Alguns metabólitos bacterianos podem influenciar diretamente o sistema nervoso central, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que têm um papel imunossupressor na mucosa intestinal. A *Faecalibacterium prausnitzii* e a *Bacteroides coprophilus* participam do metabolismo dos AGCC (Freedman et al., 2018). As *Bacteroides* são bactérias benéficas que estimulam a IL-10 e estão geralmente presentes em níveis mais baixos nos casos de EM. A *Faecalibacterium prausnitzii* foi estabelecida como um marcador para a saúde da

microbiota e está escassa ente os pacientes com EM, como pode ser observado na literatura (Tremlett et al., 2016), assim como em nosso coorte. Todas essas diferenças na taxonomia bacteriana comparada à dos CS sugerem uma disbiose na microbiota da EM.

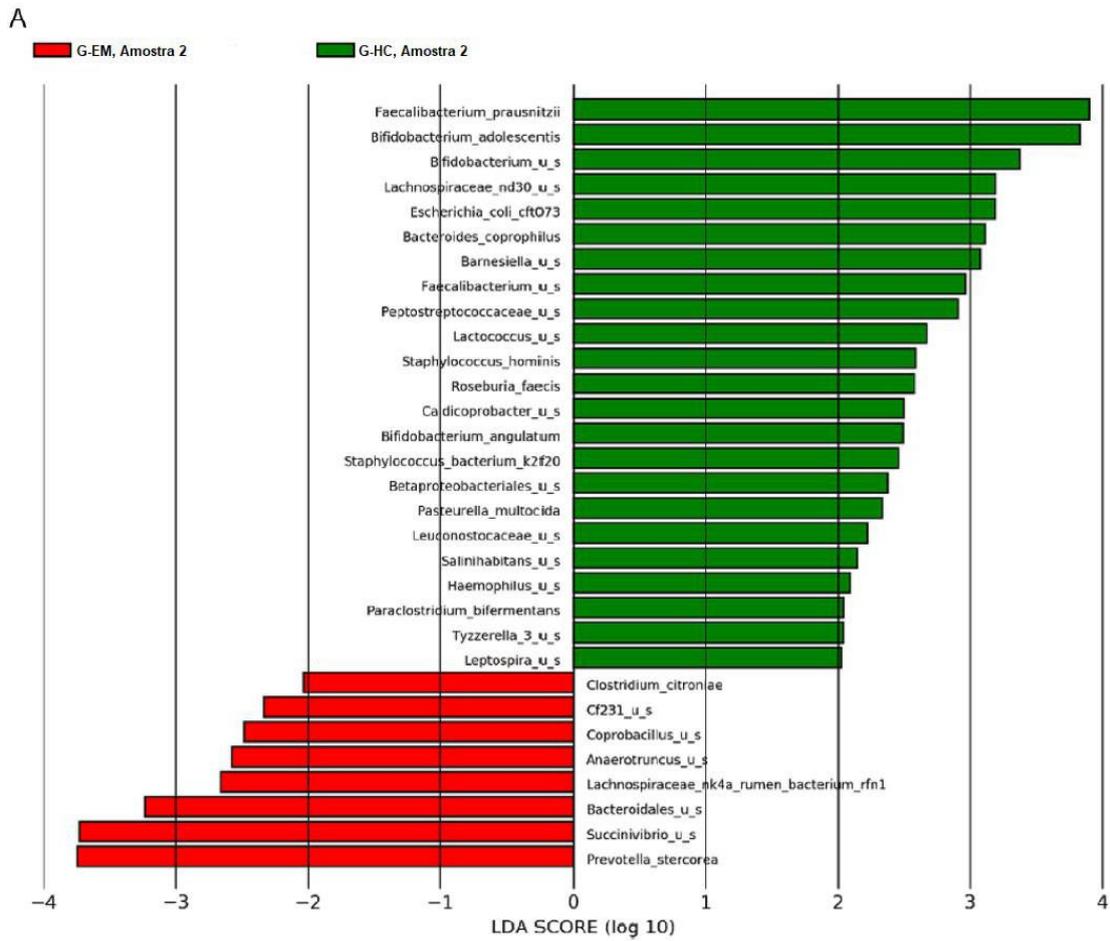


Fig.2A. Tamanho do Efeito da Análise Discriminante Linear (Lefse), a nível de espécie, entre pacientes com esclerose múltipla (G-EM) e controles saudáveis (G-HC) antes de qualquer tratamento (amostra 1).

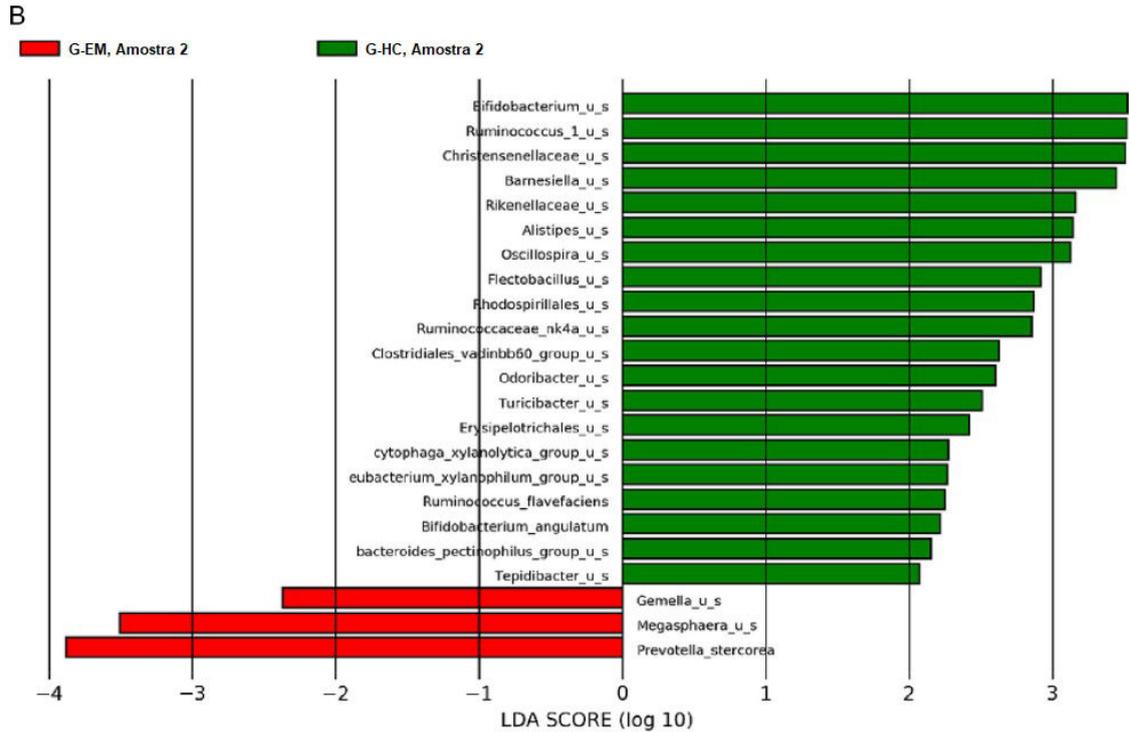


Fig. 2B. Análise Lefse, a nível de espécie, entre pacientes com esclerose múltipla (G-EM) e controles saudáveis (G-HC) após dois meses de tratamento (amostra 2).

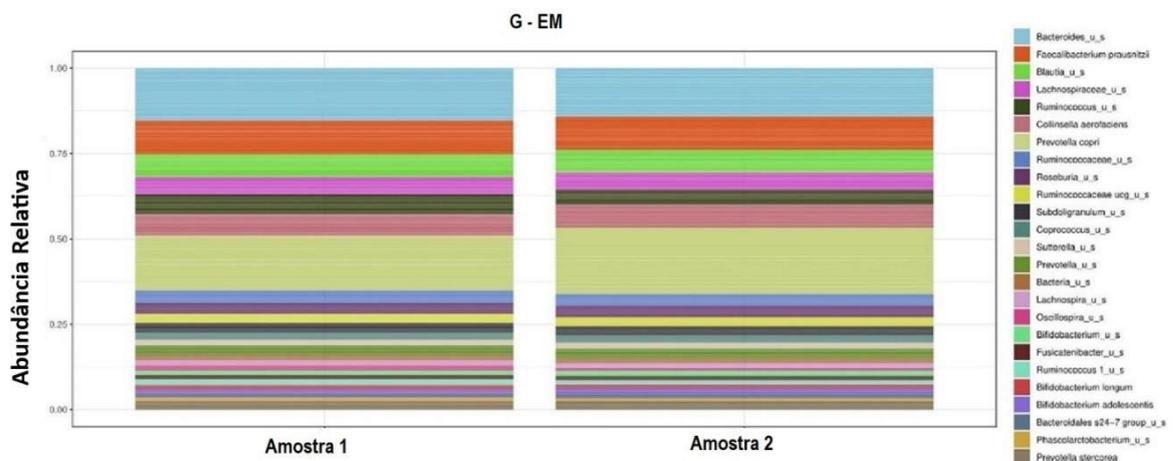


Fig. 3. Gráficos de barras empilhadas: comparação entre a amostra 1 e a amostra 2 para o coorte de EM, as 25 principais espécies.

4.2. Comparação entre os grupos após o tratamento

Quando analisamos se o tratamento (de qualquer tipo) para a EM modifica de forma significativa o microbioma, detectamos que não há maiores mudanças na diversidade alfa ou beta nos pacientes com EM comparados aos CS, nos dois meses após o início de qualquer forma de terapia, como sugerido pela pesquisa na literatura (Mirza et al., 2020). Em relação às alterações taxonômicas, o *Ruminococcus* é uma bactéria benéfica e geralmente recuperada nos casos de EM após o DMT (Zhu et al., 2020); nossos dados

refletem uma menor abundância relativa entre os pacientes com EM, em comparação aos CS na segunda amostra. O *Clostridium* é uma bactéria produtora de butirato, envolvida na produção de células T reguladoras e da citocina anti-inflamatória IL-10 (Miyake et al., 2015), e está diminuída nos pacientes com EM depois do tratamento.

As diferenças entre os grupos após dois meses de terapia demonstram a possível intervenção de fatores de confusão: o DMT ou o tratamento homeopático no microbioma intestinal. A homeopatia pode ter uma influência na microbiota intestinal, como sugerem nossos dados. Mudanças entre os pacientes que receberam qualquer forma de DMT (G-DMT) e a combinação DMT + homeopatia (G-DMT + HOM) são sutis, mas observamos um grande número de diferenças significativas em relação à abundância bacteriana relativa entre os subgrupos, com alterações parcialmente inconsistentes e contraditórias. O par G-IFN e G-IFN + HOM delinea uma possível influência da homeopatia nos pacientes tratados com o Interferon beta1a, enquanto o par G-TER e G-TER + HOM sugere sua influência nos pacientes sob teriflunomida.

Em comparação com a terapia por combinação, os pacientes que receberam homeopatia apresentaram um aumento na *Akkermansia muciniphila*, uma espécie controversa, com um papel desconhecido na maturação imunológica, elevada entre os pacientes sem tratamento para EM (Cekanaviciute et al., 2017). Experimentos in vitro traçam seu papel pro-inflamatório, mas estudos in vivo não reproduziram esses efeitos; pelo contrário, ela pode ter uma função benéfica para algumas desordens metabólicas. Embora a escolha terapêutica não tenha influenciado a diversidade alfa em nenhum grupo, nós encontramos diferenças isoladas na diversidade beta, semelhantes às de nossa pesquisa bibliográfica (Mirza et al., 2020). Nossos achados foram relacionados à homeopatia e ao Interferon beta1a como tratamentos que podem modificar a diversidade do microbioma. A diversidade beta do grupo que recebeu o tratamento homeopático foi diferente da do grupo tratado com a combinação de homeopatia e teriflunomida. Além disso, o grupo tratado com homeopatia teve uma diversidade beta diferente do grupo tratado com Interferon beta1a. Todos os valores estão apresentados na Tabela 3. Com um valor de p estatisticamente insignificante, de 0,06 - próximo de 0,05 - o grupo com tratamento do interferon teve uma menor mudança na diversidade beta quando comparado ao grupo do interferon e homeopatia. Esses resultados sugerem que a homeopatia pode ter uma função na diversidade beta dos pacientes com EM, mas mais estudos são necessários.

Analisando a abundância relativa nos filos e espécies selecionados, percebemos uma diminuição das *Firmicutes* no grupo que recebeu a terapia por combinação em comparação com os demais grupos, mas não com relevância estatística. As *Firmicutes* estão relacionadas a menores intervalos de recidiva na EM (Sand e Baranzini, 2018), portanto, combinar essas duas terapias pode ser benéfico para atrasar a progressão da doença.

As duas bactérias benéficas envolvidas no metabolismo de AGCC, as *Bacteroides* e a *Faecalibacterium prauznitzii*, têm uma abundância relativa semelhante à do grupo dos CS e do grupo de homeopatia, de 12% para as *Bacteroides* e 7% para as *Faecalibacterium prauznitzii* respectivamente. Isso sugere que o tratamento homeopático pode ter um papel na manutenção do equilíbrio desses microrganismos saudáveis.

4.3. Comparação no tempo (entre a segunda e a primeira amostra)

Mudanças no microbioma com o passar do tempo foram analisadas para o coorte de EM, onde os resultados descrevem os efeitos de todos os tratamentos aplicados em nosso estudo: DMT, homeopatia ou a combinação dos dois. Os pacientes com EM tratados apresentaram mais mudanças bacterianas, mais diversificadas, de múltiplos filos, o que sugere que o tratamento pode ter uma influência positiva na microbiota, no geral. Os pacientes tiveram uma menor abundância relativa de *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Eubacterium oxidoreducens*, após o tratamento, como esperado devido à pesquisa bibliográfica (Mirza et al., 2020). A *Lachnospiraceae* está envolvida na redução da permeabilidade da mucosa, através da produção de AGCC e do aumento da expressão das proteínas das *tight junctions* nas células epiteliais (Rinninella et al., 2019).

Para os dois grupos, incluindo a homeopatia, G-DMT + HOM e G-HOM, as bactérias mais prevalentes antes do tratamento foram atenuadas na segunda amostra. Isso sugere que o tratamento homeopático ou sua combinação com o DMT teve um impacto na microbiota intestinal após dois meses de tratamento.

O tratamento homeopático não foi estudado na microbiota intestinal entre os pacientes com EM e nenhum estudo relevante foi encontrado para comparar nossos achados. Nossos pacientes que receberam apenas o tratamento homeopático apresentaram uma relativa estabilidade após dois meses de tratamento, com mudança estatisticamente significativa unicamente da *Eubacterium oxidoreducens*, menos abundante na segunda amostra. Além disso, no grupo tratado com uma combinação de terapias, há algumas espécies bacterianas que estavam menos abundantes na segunda amostra. Esses resultados sugerem que os pacientes tratados com homeopatia podem ter um microbioma mais estável.

4.4. Pontos forte e fracos

Nosso estudo traz uma contribuição para essa área médica, pois analisa amostras intestinais de forma dinâmica, comparando não apenas a exposição ao tratamento, mas também as alterações que ocorreram com o tempo. Ademais, ele é único por introduzir o tratamento homeopático como um possível fator de confusão.

Como possível fator limitador, todos os componentes ambientais e da dieta, que podem interferir e modificar a microbiota em dois meses, não podem ser excluídos ou quantificados. Outros estudos são necessários.

5. Conclusões

A microbiota na EM é caracterizada por disbiose, com várias mudanças taxonômicas quando comparada a CS. Em pacientes não tratados para a EM, encontramos uma maior abundância de *Prevotella stercorea* e uma redução de *Actinobacteria*, *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium prauznitzii*. O tratamento com Interferon beta1a, teriflunomida e homeopatia implicaram em diversas alterações taxonômicas. Os pacientes com EM que foram tratados tiveram uma microbiota diferente em comparação aos CS, com diminuição das *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* e *Clostridiales* e uma maior prevalência de *Gemella*, *Megasphaera* e *Prevotella stercorea*.

Comparando a segunda com a primeira amostra, nós traçamos as modificações na microbiota da EM com o tempo, como a diminuição de *Lachnospiraceae* e *Ruminococcus* e aumento da *Enterococcus faecalis*. Essas mudanças dinâmicas podem ser devido ao tratamento para EM.

No geral, a exposição ao tratamento teve pouca influência na diversidade do microbioma. As únicas modificações de diversidade estatisticamente significativas que encontramos envolvem o efeito do tratamento homeopático nos índices de diversidade beta, em comparação com o efeito de drogas imunomoduladoras. *Eubacterium oxidoreducens* também foi reduzido após o tratamento homeopático. Nossos resultados sugerem que o tratamento homeopático também tem um papel na influência da microbiota intestinal.

Este estudo descreve o importante papel da microbiota intestinal na EM e traz outros caminhos a serem estudados. O microbioma é um vasto ecossistema, influenciado por inúmeros fatores que não podem ser completamente quantificados. Nosso projeto focou nas mudanças dinâmicas na microbiota e a possível influência de alguns DMTs específicos, bem como da homeopatia como medicina complementar e alternativa usada na prática clínica.

Financiamento

Essa pesquisa não recebeu financiamento externo.

Aprovação ética

O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (*Declaration of Helsinki*) e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Emergência do Condado de Cluj (*Cluj Emergency County Hospital*), código 2394/28.01.2020.

Declaração de consentimento informado

O consentimento informado foi obtido de todos os indivíduos envolvidos no estudo.

Declaração de crédito de contribuição dos autores

Vitalie Vacaras: Conceituação, Metodologia, Fontes, Redação – revisão e edição, Supervisão. **Dafin F. Muresanu:** Conceituação. **Anca-Dana Buzoianu:** Conceituação. **Cristina Nistor:** Metodologia, Fontes, Análise formal, Redação – revisão e edição. **Stefan Cristian Vesa:** Redação – rascunho original, Redação – revisão e edição, Supervisão. **Andreea Cristina Paraschiv:** Metodologia, Fontes, Análise formal. **Daniela Botos-Vacaras:** Metodologia, Fontes. **Cristiana Vacaras:** Metodologia, Fontes. **George Vithoukias:** Conceituação, Supervisão.

Declaração de Interesses Conflitantes

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Disponibilidade de dados

Os dados e outras informações deste estudo estão disponíveis com o autor correspondente mediante solicitação, devido a questões de privacidade.

Agradecimentos

Agradecemos a ajuda do laboratório CosmosID por analisar nossas amostras e pelo apoio às análises estatísticas.

Apêndice A. Dados complementares

Dados complementares a este artigo podem ser encontrados online em <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2023.578087>.

Referências

1. Adamczyk-Sowa, M., Medrek, A., Madej, P., Michlicka, W., Dobrakowski, P., 2017. Does the gut microbiota influence immunity and inflammation in multiple sclerosis pathophysiology? *J Immunol Res* 2017, 1–14.
2. Baecher-Allan, C., Kaskow, B.J., Weiner, H.L., 2018 Feb. Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy. *Neuron*. 97 (4), 742–768.
3. Brown, J., Quattrochi, B., Everett, C., Hong, B.Y., Cervantes, J., 2021 May. Gut commensals, dysbiosis, and immune response imbalance in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 27 (6), 807–811.
4. Budhram, A., Parvathy, S., Kremenutzky, M., Silverman, M., 2017 Apr. Breaking down the gut microbiome composition in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 23 (5), 628–636.
5. Camara-Lemarroy, C.R., Metz, L., Meddings, J.B., Sharkey, K.A., Wee, Yong V., 2018 Jul 1. The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain*. 141 (7), 1900–1916.
6. Cekanaviciute, E., Yoo, B.B., Runia, T.F., Debelius, J.W., Singh, S., Nelson, C.A., et al., 2017 Oct 3. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (40), 10713–10718.
7. Chen, J., Chia, N., Kalari, K.R., Yao, J.Z., Novotna, M., Paz Soldan, M.M., et al., 2016 Jun. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.* 6 (1), 28484.
8. Chikramane, P.S., Suresh, A.K., Bellare, J.R., Kane, S.G., 2010 Oct. Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective. *Homeopathy*. 99 (4), 231–242.
9. Chu, F., Shi, M., Lang, Y., Shen, D., Jin, T., Zhu, J., et al., 2018. Gut microbiota in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: current applications and future perspectives. *Mediat. Inflamm.* 2018, 1–17.
10. Fisher, P., Ernst, E., 2015 Jul 14. Should doctors recommend homeopathy? *BMJ*. 351, h3735.
11. Freedman, S.N., Shahi, S.K., Mangalam, A.K., 2018 Jan. The “gut feeling”: breaking down the role of gut microbiome in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 15 (1), 109–125.
12. Kim, B.R., Shin, J., Guevarra, R.B., Lee, J.H., Kim, D.W., Seol, K.H., et al., 2017 Dec 28. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27 (12), 2089–2093.

13. Kim, S., Chang, L., Weinstock-Guttman, B., Gandhi, S., Jakimovski, D., Carl, E., et al., 2018 Jun. Complementary and alternative medicine usage by multiple sclerosis patients: results from a prospective clinical study. *J. Altern. Complement. Med.* 24 (6), 596–602.
14. Maglione, A., Zuccal`a, M., Tosi, M., Clerico, M., Rolla, S., 2021 Jul 29. Host genetics and gut microbiome: perspectives for multiple sclerosis. *Genes.* 12 (8), 1181.
15. Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P., et al., 2020 May 19. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients.* 12 (5), 1474.
16. Manzalini, A., Galeazzi, B., 2019 Aug. Explaining homeopathy with quantum electrodynamics. *Homeopathy.* 108 (03), 169–176.
17. Mirza, A., Forbes, J.D., Zhu, F., Bernstein, C.N., Van Domselaar, G., Graham, M., et al., 2020 Jan. The multiple sclerosis gut microbiota: a systematic review. *Multiple Scleros. Relat. Disord.* 37, 101427.
18. Miyake, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T., et al., 2015 Sep 14. Dysbiosis in the gut microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. Wilson BA, editor. *PLoS One* 10 (9), e0137429.
19. Olsen, S.A., 2009 Mar. A review of complementary and alternative medicine (CAM) by people with multiple sclerosis. *Occup. Ther. Int.* 16 (1), 57–70.
20. Riccio, P., Rossano, R., 2018 Jan. Diet, gut microbiota, and vitamins D + a in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics.* 15 (1), 75–91.
21. Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., et al., 2019 Jan 10. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms.* 7 (1), 14.
22. Sand, I.K., Baranzini, S.E., 2018 Apr. The microbiome and MS: the influence of the microbiota on MS risk and progression—session chair summary. *Mult. Scler.* 24 (5), 587–589.
23. Strandwitz, P., 2018 Aug. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* 1693, 128–133.
24. Tankou, S.K., Regev, K., Healy, B.C., Cox, L.M., Tjon, E., Kivisakk, P., et al., 2018 Jan. Investigation of probiotics in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 24 (1), 58–63.
25. Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., et al., 2018 Feb. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 17 (2), 162–173.
26. Tremlett, H., Fadrosch, D.W., Faruqi, A.A., Zhu, F., Hart, J., Roalstad, S., et al., 2016 Aug. Gut microbiota in early pediatric multiple sclerosis: a case control study. *Eur. J. Neurol.* 23 (8), 1308–1321.
27. Whitmarsh, T.E., 2003 Feb. Homeopathy in multiple sclerosis. *Complement Therap Nurs Midwifery* 9 (1), 5–9.
28. Zhu, S., Jiang, Y., Xu, K., Cui, M., Ye, W., Zhao, G., et al., 2020 Dec. The progress of gut microbiome research related to brain disorders. *J. Neuroinflammation* 17 (1), 25.