

El papel de las terapias para la esclerosis múltiple en la dinámica de la microbiota intestinal humana

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

^a Departamento de Neurología, Cluj Emergency County Hospital, 400012 Cluj-Napoca, Rumania

^b Departamento de Neurociencias, Facultad de Medicina, Iuliu Hațieganu Universidad de Medicina y Farmacia, 400012 Cluj-Napoca, Rumania

^c Departamento de Farmacología, Toxicología y Farmacología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Medicina y Farmacia Iuliu Hațieganu, 400349 Cluj-Napoca, Rumania

^d Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Iuliu Hațieganu Universidad de Medicina y Farmacia, 400012 Cluj-Napoca, Rumania

^e Facultad de Medicina, Iuliu Hațieganu Universidad de Medicina y Farmacia, 400012 Cluj-Napoca, Rumania

^f Universidad del Egeo, Mitilene, Grecia

INFORMACIÓN

Palabras clave:

Esclerosis múltiple
Microbiota intestinal
Disbiosis
Terapia modificadora de la enfermedad Microbioma

RESUMEN

La microbiota intestinal, el total de microorganismos en nuestro tracto gastrointestinal podría tener una implicación en la esclerosis múltiple (EM), una enfermedad neurológica desmielinizante. Nuestro estudio incluyó a 50 pacientes con EM y 21 controles sanos (CS). Veinte pacientes recibieron una terapia modificadora de la enfermedad (TME), interferón beta 1a o teriflunomida, 19 pacientes recibieron TME con homeopatía y 11 pacientes aceptaron ser tratados únicamente con homeopatía. Recolectamos un total de 142 muestras intestinales, dos para cada individuo: en el momento de la inscripción en el estudio y ocho semanas después del tratamiento. Comparamos la microbiota intestinal de pacientes con EM (esclerosis múltiple) con CS (controles sanos), analizamos su evolución en el tiempo y el efecto del interferón beta 1a, la teriflunomida y la homeopatía. No hubo diferencia en la diversidad alfa, solo dos resultados de diversidad beta relacionados con la homeopatía. En comparación con CS, los pacientes con EM no tratados tuvieron una disminución de Actinobacteria, Bifidobacteria, Faecalibacterium prauznitzii y aumentó la Prevotella estercorea, mientras que los pacientes tratados presentaron disminución en Ruminococcus y Clostridium. En comparación con la muestra inicial, los pacientes con EM tratados tuvieron una disminución de Lachnospiraceae y Ruminococcus y un aumento en Enterococcus faecalis. Eubacterium oxidoreducens redujo después del tratamiento homeopático. El estudio reveló que los pacientes con EM pueden presentar disbiosis en la microbiota intestinal. El tratamiento con interferón beta 1a, teriflunomida u homeopatía implicó varios cambios taxonómicos. Los TME y la homeopatía podrían influir en la microbiota intestinal.

1. Introducción

La microbiota intestinal humana, compuesta por una gran diversidad de microorganismos que residen dentro de nuestro tracto gastrointestinal, se clasifica taxonómicamente en especies, géneros y filos, que contienen microbios tanto benéficos como patógenos (Rinninella et al., 2019; Camara-Lemarroy et al., 2018). Se forma principalmente en los primeros años de vida de la niñez dependiendo de varios factores, como el tipo de parto, la alimentación con leche, el destete y la medicación. Después de los primeros tres años de

vida, alcanza una estabilidad parcial, con continuos cambios sutiles provocados por factores externos: dieta, ejercicio, índice de masa corporal, medio ambiente y exposición a medicamentos (Rinninella et al., 2019). Un microbioma está formado por el total de genes, proteínas y metabolitos de todos los organismos (Maglione et al., 2021).

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central, donde las susceptibilidades genéticas se encuentran con factores ambientales. Incluye alteración de la

* Autor para correspondencia en: Departamento de Neurología, Hospital del Condado de Emergencia de Cluj, 400012 Cluj-Napoca, Rumania.
Dirección de correo electrónico: cristinapinzaru@yahoo.com (C. Nistor).

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2023.578087>

Recibido el 5 de febrero de 2023; Recibido en forma revisada el 24 de marzo de 2023; Aceptado el 6 de abril de 2023 Disponible en línea el 7 de abril de 2023
0165-5728/© 2023 Los autores. Publicado por Elsevier BV Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

integridad de la barrera hematoencefálica, inflamación, desmielinización, pérdida de oligodendrocitos, gliosis y degeneración axonal. La enfermedad es considerada con tres etapas principales, una etapa preclínica donde la combinación de factores genéticos y ambientales podría ser un desencadenante patológico, una etapa inflamatoria donde nos encontramos con episodios de disfunción neurológica, como neuritis óptica, piramidal, cerebelosa o deterioro del tronco encefálico, síntomas sensoriales, disfunción de la vejiga y una etapa neurodegenerativa final de progresión de la enfermedad cuando encontramos una discapacidad progresiva, como la capacidad de caminar del paciente, principalmente. La enfermedad tiene diferentes formas clínicas: síndrome clínicamente aislado (SCA), EM remitente-recurrente (EMRR), EM progresivo secundario (SPMS) y EM progresiva primaria (PPMS). Los factores de riesgo modificables relacionados con la EM se han analizado a profundidad para encontrar un papel específico en el proceso patológico, incluida la composición de la microbiota (Baecher-Allan et al., 2018). Estudios recientes describen que los pacientes con EM tienen una composición de microbiota distinta en comparación con los controles sanos (CS) (Mirza et al., 2020).

Debido a que la microbiota es única para cada individuo y contiene una enorme variedad de microorganismos, es difícil describir una microbiota saludable específica (Rinninella et al., 2019). Una microbiota sana proporciona muchas funciones esenciales, incluidas la permeabilidad y la motilidad intestinal, la síntesis y la absorción de vitaminas, pero también el desarrollo del sistema inmunitario innato (Chu et al., 2018). En base a este papel en la inmunomodulación, estudios recientes indican una posible conexión entre la microbiota y algunas patologías neurológicas inmunomediadas (Mirza et al., 2020).

El concepto de eje microbiota intestino-cerebro hace referencia a diferentes mecanismos de comunicación entre el sistema gastrointestinal y el nervioso (Strandwitz, 2018). La microbiota puede influir en el sistema nervioso central (SNC) por diferentes vías. En primer lugar, se relaciona con las redes cerebrales, modula diferentes neurotransmisores (como el ácido gamma aminobutírico, la serotonina, la dopamina, la histamina) y está conectado con el sistema nervioso simpático o parasimpático, especialmente con el nervio vago. En segundo lugar, está involucrado en la vía endocrina, como respuesta al estrés. Los corticoides liberados por el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal pueden alterar la composición de la microbiota y aumentar la permeabilidad intestinal. Otro mecanismo por el cual los microbios pueden alterar el sistema nervioso es la inmunorregulación. Esto incluye

presentación antigénica alterada, producción de citoquinas y linfocitos, diferenciando diferentes tipos de células T en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Chu et al., 2018). Los microorganismos intestinales pueden liberar metabolitos (lipopolisacáridos, peptidoglicanos) y el metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) están involucrados en la activación de las células microgliales y la fuga de la barrera hematoencefálica (Strandwitz, 2018).

La medicina complementaria y alternativa, incluida la homeopatía, se asocia principalmente con las formas convencionales de terapia para aliviar los síntomas generales, el dolor, la espasticidad, los problemas de sensibilidad, la dificultad para caminar, la fatiga y la pérdida de memoria. De todos los pacientes con EM, hasta el 30% usa o ha usado alguna forma de medicina complementaria y alternativa (Kim et al., 2018). Se estima que el 70-80% de los pacientes con EM presentaron una mejoría en su estado general (Olsen, 2009). El principio de la homeopatía “dejar que lo similar sea tratado por lo similar” se basa en la idea de que una enfermedad puede ser tratada con sustancias que desencadenan los mismos síntomas patológicos en individuos sanos (Fisher y Ernst, 2015). Los remedios homeopáticos son sustancias naturales altamente diluidas (Manzolini y Galeazzi, 2019), se considera que una solución más diluida tiene mayor potencia (Chikramane et al., 2010). La elección de la potencia está relacionada con el nivel de salud: un nivel de salud más bajo implica una potencia baja, como 30C, durante un período de tiempo más largo, hasta 3 meses, mientras que un tratamiento de 200C se limita a unos pocos días. Se prescriben caso por caso, teniendo en cuenta otros aspectos además de signos médicos específicos, así como detalles psicológicos particulares o hábitos cotidianos relevantes del paciente (Whitmarsh, 2003). Algunos síntomas de la EM suelen mejorar con algunas sustancias: Causticum para la disfunción urinaria, Phosphorus para la neuritis óptica, Cuprum Metallicum y Nux Vómica para los espasmos, Secale para los síntomas sensoriales (Whitmarsh, 2003).

Como se presenta más adelante en este manuscrito, numerosos estudios destacaron que los pacientes con EM tienen una microbiota distinta en comparación con los pacientes del grupo CS. Se observó que los tratamientos de la EM pueden modificar la microbiota intestinal, pero la homeopatía no ha sido estudiada en este campo.

Los objetivos de este estudio son investigar si la microbiota intestinal de los pacientes con EM cambia debido a los fármacos inmunomoduladores o a los tratamientos homeopáticos complementarios, incluido el tratamiento homeopático, y evaluar las diferencias

en la taxonomía microbiana y la diversidad entre el grupo de la EM y el grupo CS.

2. Material y métodos

2.1 Sujetos

El estudio fue de tipo prospectivo, longitudinal, analítico, observacional y de casos y controles. Incluyó a 50 pacientes diagnosticados con EM, del Departamento de Neurología del Hospital de Emergencias Cluj-Napoca, entre enero de 2019 y mayo de 2020. Se reclutaron 21 CS. Se obtuvo la autorización ética (número 2394/28.01.2020, Emergency Hospital Cluj-Napoca) y cada sujeto firmó un consentimiento informado.

El grupo de EM incluyó pacientes adultos con EM remitente recurrente confirmada (RRMS) o síndrome clínicamente aislado (SCA), según los criterios diagnósticos de McDonald (Thompson et al., 2018), con una puntuación EDSS de un máximo de 5 puntos, que no se hayan sometido a una terapia modificadora de la enfermedad (TME) un año antes de la inscripción en el estudio. Se excluyeron pacientes con EM progresiva, criterios diagnósticos poco claros, patologías gastrointestinales activas, que estuvieran embarazadas, amamantando o que estuvieran en tratamiento prolongado con probióticos, antivirales, antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos o inhibidores de la bomba de protones en los últimos 6 meses. De todos los pacientes, 7 presentaron patologías gástricas leves transitorias en el pasado, pero sin síntomas gastrointestinales activos al momento de la inscripción, 4 pacientes tenían cirugías abdominales en su historial médico y 4 pacientes tenían patologías endocrinas (en su mayoría relacionadas con la tiroides) bajo control médico. Otras patologías (hipertensión arterial, diabetes) fueron casos aislados y clínicamente compensados al inicio del estudio. El grupo CS estaba compuesto por individuos sanos sin EM, emparejados por edad y sexo con los pacientes con EM, sin diagnóstico de ninguna patología y sin tratamiento crónico. Todos los sujetos declararon que no se produjeron cambios importantes en su dieta o estilo de vida durante el estudio.

Al inicio del estudio, cada sujeto proporcionó una muestra intestinal. Después de la primera muestra, se les prescribió una forma de tratamiento dependiendo de varios factores, como la gravedad de la enfermedad, el consentimiento de los pacientes, las comorbilidades, la seguridad del medicamento y la

accesibilidad (Chikramane et al., 2010). Algunos rechazaron una terapia convencional por el momento; aceptaron sin embargo el tratamiento homeopático. La segunda muestra se obtuvo 2 meses después del inicio del tratamiento.

En cuanto a la distribución del tratamiento homeopático, cada paciente recibió una medicación individualizada diferente, de acuerdo con sus síntomas de EM, incluyendo alguno de los siguientes medicamentos homeopáticos: Phosphorus, Lycopodium, Natrum Muriaticum, Lac Caninum, Nux Vómica, Lachesis, Nitricum Acidum, Rhus Toxicodendron, Tarentula Hispanica, Pulsatilla, Calcárea Carbónica, Sulphur, Ignatia, Aconitum o Causticum, con una concentración de 20CH o 200CH. Las sustancias fueron prescritas por un neurólogo acreditado en Homeopatía y se tomaron diariamente, 7 gránulos por vía sublingual, 3 días consecutivos para los pacientes asignados con una concentración de 200CH y de 1 a 3 meses para aquellos con la concentración de 30CH.

Nuestros pacientes con EM se dividieron en grupos separados, de acuerdo con su tratamiento, como se presenta en la tabla 1. El grupo G-TME recibió un tratamiento modificador de la enfermedad: interferón beta 1a intramuscular, 30 µg/0,5 ml una vez a la semana (subgrupo G-IFN) o teriflunomida oral 14 mg diarios (subgrupo G-TER). El grupo G-TME + HOM recibió un TME combinado con homeopatía: G-IFN + HOM interferón beta1a y homeopatía, G-TER + HOM teriflunomida y homeopatía. El grupo G-HOM consistió en tratamiento homeopático. El grupo control, G-CS estaba formado por controles sanos (CS), sin tratamiento.

2.2 Sujetos

Todos los sujetos proporcionaron muestras de heces de acuerdo con las instrucciones del laboratorio: en cualquier momento del día, sin restricciones, utilizando recipientes especiales para heces. Las muestras proporcionadas se almacenaron a menos 20 grados centígrados y luego se enviaron al laboratorio para la extracción de ADN. Cada sujeto recolectó dos muestras fecales: una antes del tratamiento (muestra 1, S1) y otra dos meses después de comenzar la terapia o inscripción al estudio (muestra 2, S2).

2.3 Secuenciación de ARN16 y análisis estadístico

El análisis metagenómico del gen del ARN ribosomal (ARNr) de la subunidad 16S universalmente presente, utilizó regiones hipervariables específicas (V1-V3, V3- V4, ITS1 e ITS2) en toda la plataforma Illumina MiSeq. Los resultados son presentados en OTU (unidades taxonómicas operativas), microorganismos que tienen una similitud de ADN de al menos 97% a una base de datos de laboratorio, clasificados en taxones específicos, con su frecuencia y abundancia relativa.

La diversidad de la microbiota intestinal es una medida matemática de la variabilidad, caracterizada por la riqueza (el número de especies diferentes) y la uniformidad (la uniformidad de las diferentes especies). Para la diversidad alfa, la diversidad dentro de la muestra, el índice de Chao es un estimador de la riqueza de especies. Shannon y Simpson son parámetros tanto de riqueza como de uniformidad, sus valores aumentan con el número de especies y una distribución más uniforme (Kim et al., 2017).

Utilizando las matrices de frecuencia, cada combinación de pares se analizó mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Para la diversidad beta, la diversidad entre muestras, utilizamos los índices de Bray-Curtis y Jaccard, donde la distancia gráfica entre ellos indica la diferencia. El análisis de coordenadas principales (PCoA) se obtuvo a partir de matrices de abundancia relativa. Las cifras del tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) utilizan matrices de abundancia relativa para calcular la abundancia diferencial de organismos entre EM y CS, con un valor alfa de 0,05 y un umbral de puntuación del análisis discriminante lineal logarítmico (LDA) de 2,0. Todas las funciones tienen una puntuación inferior a - 2,0 o superior a 2,0. Las bacterias aumentadas en pacientes con EM se representan en rojo, mientras que las más abundantes en CS se colorean en verde. En la relativa abundancia de barras apiladas, cada barra representa la abundancia relativa promedio de las 25 especies principales, seleccionadas según las más abundantes en relación con ambos grupos. También se generaron mapas de calor.

3. Resultados

El grupo de EM estaba formado por 31 mujeres y 19 hombres, con una mediana de edad de 30,5 años \pm 9,9 años, 44 de ellos con diagnóstico de EMRR y 6 de SCA, una puntuación media en la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS) de 1,8 puntos y una duración media de la enfermedad de 3,4 años. Todas las características específicas de la EM se presentan en la Tabla 2. La mayoría de ellos eran

pacientes limpios (sin tratamiento modificador de la enfermedad (TME) previo), solo 4 pacientes recibieron tratamiento interrumpido en el año anterior.

El grupo de control sano (CS) se armó considerando personas con características demográficas similares al grupo de EM: 62% mujeres y 38% hombres, una mediana de edad de 28 años \pm 9,7 años.

3.1 Diversidad en la microbiota

Estudiamos las diferencias generales en la composición microbiana utilizando diversidad alfa y beta. No hubo una diferencia estadísticamente significativa en la diversidad alfa entre pacientes con EM y CS antes ($p = 0,85$) y después del tratamiento ($p = 0,95$). Además, no hubo diferencia entre otras combinaciones de grupos para la muestra 2 (S2): G-TME vs G-TME + HOM ($p=0,89$), G-TME + DOM frente a G-HOM ($p=0,98$), G-TME frente a G-HOM ($p= 0,64$), y sus subgrupos, G = IFN + HOM vs G-TER + HOM ($p=0,23$), G-IFN frente a G-IFN + HOM ($p=0,06$) entre la muestra 1 (S1) y S2 para pacientes con EM ($p=0,93$), G-TME + HOM ($p=0,38$) o G-HOM ($p=0,79$). Además, no hubo diferencia en la diversidad alfa entre los pacientes con EM tratados con TME (G-TME combinado con G-TME + HOM) y los pacientes que no siguieron TME (G-HOM), $p=0.81$. Todos los valores se presentan en la Tabla 3.

A medida que analizamos la diversidad beta, hubo una diferencia para S2 entre G-HOM y G-TER + HOM ($p=0.007$) (Figura 1) y entre G-HOM y G-IFN ($p= 0.012$), pero ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con EM y CS o entre las dos muestras para pacientes con EM (todas las $p > 0,05$). Otros resultados se describen en la Tabla 3 y Figura 1*(*archivos de datos complementarios).

3.1 Diferencias Taxonómicas

Los resultados del análisis 16S incluyen la frecuencia y abundancia relativa de la especie.

Para la cohorte de EM, identificamos 51 unidades taxonómicas operativas (OTU) a nivel de filo, con la mayoría compuesta por *Firmicutes* (49,45%), *Bacteroidetes* (34,3%), *Actinobacteria* (4,77%) y *Proteobacteria* (3,6%). A nivel de especie, analizamos 1505 UTO, con la mayor abundancia relativa para *Prevotella copri* (10,75%) y *Bacteroides* (10,3%), seguido de *Faecalibacterium prausnitzii* (6,63%) y *Vlautia* (4,49%).

Analizamos las diferencias taxonómicas entre nuestra cohorte de EM (G-MS) y CS (G-HC) antes de cualquier

Tabla 1

Convención de nomenclatura de grupos.

Grupo	Sujetos	Subgrupo	Sujetos
G-TME (TME)	20	G-IFN (interferón beta1a)	10
		G-TER (teriflunomida)	10
G2-TME + HOM (TME+ homeopatía)	19	G-IFN + HOM (interferón beta1a + homeopatía)	9
		G-TER + HOM (teriflunomida+ homeopatía)	10
G-HOM (homeopatía)	11		
G-CS (CS)	21		
G-MS (todos los MS pacientes)	50		

Tabla 1 Resume las siglas que utilizamos para la identificación de grupos. Abreviaturas: TME = tratamiento modificador de la enfermedad, CS = controles sanos.

Tabla 2

Características específicas de la esclerosis múltiple (EM) de nuestra cohorte.

Características	pacientes con EM (n=50)
Tipo de EM, n (%)	
RRMS	44 (88%)
SCA	6 (12%)
Puntuación EDSS, media (rango)	1,8 (0-5)
Duración de la enfermedad confirmada, media (DE)	3,4 (6.2)
(y) Número de recaídas, media (DE)	2,5 (2.13)
Puntuación EMRR, media	29,4
Tratamiento, n (%)	
teriflunomida	10 (14,28%)
interferón beta1a	10 (14,28%)
Teriflunomida+ homeopatía	10 (14,28%)
Interferón beta+ homeopatía	9 (12,8%)
Homeopatía	11 (15,7)

Abreviaturas: MS = esclerosis múltiple, n = número de pacientes, SD = desviación estándar, y = años, EMRR = EM recurrente-remite, SCA = síndrome clínicamente aislado, EDSS = escala ampliada del estado de discapacidad, EM progresivo secundario (SPMS) y EM progresiva primaria (PPMS)

Tabla 3

Resumen de todos los valores de p para la diversidad microbiana.

Comparación	Diversidad Alpha			Diversidad Beta	
	Chao	Shannon	Simpson	Bray-Curti	Jaccard
G-CS frente a G-MS (S1)	p = 0,85	p=0,33	p=0,55	p = 0,15	p=0,13
G-CS frente a G-MS (S2)	p = 0,95	p=0,16	p=0,39	p = 0,14	p=0,12
G-TME frente a G-TME + HOMBRE (S2)	p = 0,89	p=0,69	p=0,59	p = 0,85	p = 0,9
G-TME + HOM frente a G-HOMBRE (S2)	p = 0,98	p=0,97	p=0,87	p = 0,12	p = 0,2
G-TME frente a G-HOM (S2)	p = 0,64	p = 0,8	p=1	p = 0,15	p = 0,13
G-TME combinado con G-TME + HOM frente a G-HOM (S2)	p = 0,81	p=0,91	p = 0,91	p = 0,19	p = 0,2
IFN-G frente a IFN-G + HOM (S2)	p = 0,06	p = 1	p=0,84	p = 0,06	p = 0,06
G-TER frente a G-TER + HOM (S2)	p = 0,13	p=0,68	p = 0,68	p = 0,23	p=0,35
G-IFN + HOM frente a G-HOM (S2)	p = 0,47	p=0,41	p=0,66	p = 0,06	p = 0,06
G-TER + HOM frente a G-HOMBRE (S2)	p = 0,55	p = 0,39	p = 0,47	p = 0,007	p = 0,012
G-IFN frente a G-HOM (S2)	p = 0,2	p = 0,35	p=0,72	p = 0,012	p = 0,016
G-TER frente a G-HOM (S2)	p = 0,62	p = 0,62	p = 0,72	p = 0,62	p = 0,33
G-IFN + HOM frente a G-TER + HOMBRE (S2)	p = 0,23	p = 0,14	p = 0,14	p = 0,06	p=0,11
S1 contra S2 (G-MS)	p = 0,93	p=0,26	p=0,36	p = 0,88	p = 0,93
S1 contra S2 (G-TME + HOM)	p = 0,38	p = 0,6	p = 0,69	p = 0,95	p=0,99
S1 frente a S2 (G-HOM)	p = 0,79	p = 0,4	p=0,44	p = 0,98	p = 0,98
S1 frente a S2 (G-IFN + HOM)	p = 0,96	p=0,86	p = 0,8	p = 0,87	p = 0,93
S1 frente a S2 (G = TER + HOM)	p = 0,24	p=0,58	p = 0,68	p = 0,96	p = 0,98

* Los valores en negrita son estadísticamente significativos. Esta tabla presenta comparaciones específicas entre nuestras cohortes y los índices de diversidad aplicados, junto con el valor p de cada prueba. Abreviaturas: S1 = muestra 1; S2 = muestra 2.

tratamiento (S1). Los pacientes con EM no tratados presentaron, en comparación con los CS, una mayor abundancia relativa de *Phylum Lentisphaerae* (p = 0,005), especies de *Prevotella stercorea* (p = 0,02) (*phylum Bacteroidetes*). Tenían un nivel disminuido del filo *Actinobacteria* (p = 0,01), con sus especies *Bifidobacterium* (p = 0,01) y *Bifidobacterium adolescentis* (p = 0,007), también nivel disminuido de *Bacteroides coprophilus* (p = 0,02) (del filo *Bacteroidetes*). El filo *Firmicutes* ha reducido la abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* (p = 0,03), *Lachnospiraceae* (p = 0,01), *Staphylococcus hominis* (p = 0,02) y bacteria *Staphylococcus* (p = 0,02). El filo proteobacteria tiene una disminución en *Haemophilus* (p = 0,04) y *Escherichia coli* (p = 0,04). Las otras diferencias estadísticamente significativas se presentan en la Fig. 2A, fig. 2*-4*.

Cuando analizamos las segundas muestras, los resultados para los pacientes tratados con EM en comparación con los CS fueron ligeramente diferentes, con una reducción de *Bifidobacterium* (p = 0,02), *Ruminococcus* (p = 0,04) y *Clostridiales* (p = 0,01) y una mayor prevalencia de *Gemella* (p = 0,04), *Megasphaera* (p = 0,02) y *Prevotella stercorea* (p = 0,02) para pacientes con EM en comparación con HC (Fig. 2B, fig. 5*-7*).

Analizamos diferentes comparaciones entre grupos después de un tratamiento de dos meses. Al analizar la microbiota de los pacientes con EM que recibieron DMT (G-DMT) en comparación con los pacientes en tratamiento homeopático complementario (G-DMT + HOM), destacamos los siguientes resultados. En comparación con G-DMT + HOM, G-DMT había enriquecido la abundancia relativa de *Catenibacterium* (p = 0,02), *Lachnospiraceae* (p = 0,02), *Sharpea* (p =

0,02) y Gammaproteobacteria ($p = 0,02$) y un nivel reducido de Shuttlesworthia ($p = 0,04$), Cytophaga ($p = 0,03$) y Rumen ($p = 0,02$). Cianobacterias ($p = 0,002$), Catenibacterium ($p = 0,01$), Alloprevotella ($p = 0,03$), Lachnospiraceae ($p = 0,003$), Clostridium ($p = 0,01$), Prevotella copri ($p = 0,04$), Prevotella stercorea ($p = 0,03$) son más abundantes en el subgrupo G-IFN en comparación con G-IFN + HOM, después del tratamiento. Por otro lado, G-IFN + HOM muestra niveles más altos de Proteobacteria ($p = 0,02$), Escherichia shigella ($p = 0,01$), Barnesiella ($p = 0,03$), Serratia ($p = 0,008$), Lactobacillus zeae ($p = 0,02$). En el grupo G-TER Escherichia shigella ($p = 0,007$), Lactobacillus ($p = 0,01$), Enterobacteria ($p = 0,02$), Enterococcus faecalis ($p = 0,03$) es más prevalente que en G-TER + HOM, mientras que G-TER + HOM muestra signos superiores de Rickenellaceae ($p = 0,01$) y Lachnospiraceae ($p = 0,02$). También comparamos los dos grupos que habían recibido tratamiento homeopático, G-DMT + HOM y G-HOM. Destacamos que G-DMT + HOM presentó una mayor abundancia relativa para Megasphaera ($p = 0,04$), Eubacterium oxidoreducens ($p = 0,02$), Veillonellaceae ($p = 0,02$) y Gardnerella ($p = 0,02$), en comparación con G-HOM. G-HOM estaba enriquecido en Faecalibacterium prausnitzii ($p = 0,01$), Akkermansia muciniphila ($p = 0,02$), Lachnospiraceae ($p = 0,003$), Bacteroides acidifaciens ($p = 0,04$) y pectinophilus ($p = 0,03$), Veillonella ($p = 0,01$), en comparación con G-DMT + HOM (fig. 8*-20*).

Otro punto de interés de nuestra investigación fue enfatizar cómo cambia la microbiota en el tiempo, desde que se prescribe a los pacientes un esquema terapéutico (S1) hasta dos meses después de iniciado el tratamiento (S2). Para la cohorte EM, los cambios taxonómicos se muestran en la Fig. 3 con los 25 organismos más abundantes. Las diferencias estadísticamente significativas entre las dos muestras fueron más prevalentes para el filo Firmicutes, ya que se identificaron niveles reducidos para Ruminococcus ($p = 0,03$), Oscillospira ($p = 0,0004$), Anaerotruncus ($p = 0,02$), Lachnospiraceae ($p = 0,02$) y Eubacterium oxidoreducens ($p = 0,04$) en los pacientes con EM después del tratamiento en comparación con la muestra inicial. Los pacientes tratados con EM presentaron cambios bacterianos más diversos, con aumento en el 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 $p = 0,04$) después del tratamiento en comparación con antes (fig. 21*-25*).

El grupo G-DMT + HOM presentó una menor abundancia relativa en algunos componentes de

Firmicutes (Oscillospira $p = 0,01$, Lachnospiraceae $p = 0,03$, Lachnospiraceae $p = 0,03$) y Proteobacteria (Helicobacteraceae $p = 0,01$, Undibacterium $p = 0,03$) después del tratamiento, en comparación con la base. El grupo con solo tratamiento homeopático (G-HOM) tuvo Eubacterium oxidoreducens reducido después del tratamiento, en comparación con la primera muestra ($p = 0,03$) (fig. 25*-32*).

4. Discusión

Nuestros datos no revelaron cambios importantes en la diversidad entre pacientes con EM y CS, antes o después de cualquier tipo de tratamiento. En comparación con CS, los pacientes no tratados presentaron un aumento de Prevotella estercórea y una disminución de los niveles de Actinobacteria y Faecalibacterium prausnitzii. Los cambios taxonómicos después de dos meses de tratamiento fueron ligeramente diferentes, con un aumento en las concentraciones de Gemella y una disminución en Ruminococcus para sujetos con EM. Las comparaciones entre grupos después del tratamiento enfatizan diferentes modificaciones taxonómicas. Por ejemplo, los pacientes tratados con tratamiento homeopático tuvieron un aumento de Faecalibacterium prausnitzii, Akkermansia muciniphila y Bacteroides en comparación con la terapia combinada. Además, hubo resultados significativos de diversidad beta para el tratamiento con homeopatía versus homeopatía combinada con teriflunomida y también para homeopatía versus interferón beta1a. Analizando los cambios que han ocurrido en el tiempo, entre las dos muestras, notamos una disminución de los niveles de Ruminococcus, Lachnospiraceae y Eubacterium oxidoreducens entre los pacientes tratados con EM en comparación con su muestra inicial. La homeopatía indujo con el tiempo la reducción de Eubacterium oxidoreducens.

Existe consenso en que una microbiota saludable se caracteriza por un equilibrio entre los microorganismos y el huésped, con una gran diversidad, resiliencia y estabilidad, para mantener la homeostasis y las funciones inmunitarias del huésped (Freedman et al., 2018). Aunque los factores externos pueden modificar rápidamente la microbiota, las bacterias sanas y estables vuelven a su composición original y cambian solo con hábitos persistentes. Una mayor biodiversidad significa mayores diferencias en las especies y, por lo tanto, más funciones biológicas pueden ejercer, una mejor estabilidad, la capacidad de resistir a los cambios y recuperarse (Ricci y Rossano, 2018). La disbiosis se refiere a un desequilibrio en la composición bacteriana, con un aumento de

microorganismos nocivos y una disminución de las especies beneficiosas con un cambio hacia un estado inflamatorio (Freedman et al., 2018).

Notamos en los perfiles de microbiota de nuestra cohorte de EM un aumento en *Firmicutes* y *Actinobacteria* y una disminución en el filo *Bacteroidetes*. Estos cambios son específicos para una dieta occidental típica alta en grasas y azúcar, donde *Firmicutes* son más capaces de extraer energía de los alimentos, promoviendo el aumento de peso. Por otro lado, una dieta basada en hidratos de carbono complejos, rica en fibras, favorece el aumento de *Bacteroidetes* y metabolitos benéficos (Magne et al., 2020).

Las terapias de EM podrían modular la microbiota intestinal, pero la evidencia no está bien establecida en estudios humanos hasta el momento. El interferón beta inhibe las células T y las citoquinas proinflamatorias, estimula las células T reg. y las células B supresoras, modula la interacción entre los microbios y las células epiteliales y estabiliza la barrera intestinal mediante la regulación positiva de las proteínas de unión estrecha en las células endoteliales. La teriflunomida inhibe la dihidrofolato deshidrogenasa, la síntesis de pirimidina y las citoquinas proinflamatorias y podría influir en la microbiota intestinal al suprimir la vía de señalización STAT-6, aumentando las células T reg. específicas (Camara-Lemmaroy et al., 2018; Baecher-Allan et al., 2018).

4.1 Comparación entre pacientes con EM y pacientes CS al inicio del estudio

En nuestro estudio, ninguna de las métricas de diversidad alfa o beta difirió significativamente entre los pacientes con EM y los CS, antes de iniciar el tratamiento. Esto sugiere que la microbiota de los pacientes con EM no muestra signos de tendencias inusuales, lo que concuerda con la investigación bibliográfica (Mirza et al., 2020). A nivel de taxonomía, observamos varios organismos que tenían una abundancia relativa significativamente diferente entre los casos de EM y los de CS. Actinobacteria es un microorganismo beneficioso que tiene un papel en la formación del sistema inmunológico (Adamczyk-Sowa et al., 2017) y es menor entre los pacientes con EM. Bifidobacteria se reduce entre nuestra cohorte de EM. La literatura proporciona datos contradictorios con respecto a su papel en las enfermedades inmunitarias, pero la mayoría de los estudios han demostrado que Bifidobacteria induce una respuesta inmune antiinflamatoria (Budhram et al., 2017; Tankou et al.,

2018). El género *Prevotella* es una bacteria bien estudiada en la EM, implicada en el metabolismo de los fitoestrógenos, generalmente aceptada como menos prevalente en la EM y más presente en los pacientes tratados. Chen et al., 2016; Marrón et al., 2021). Nuestros pacientes con EM presentaron niveles más altos de una especie *Prevotella estercorea* en comparación con CS, antes o después del tratamiento, pero no hay datos relevantes sobre el género *Prevotella*. Esto probablemente se deba al hecho de que este género tiene varias especies con diferentes roles (Mirza et al., 2020).

Algunos metabolitos bacterianos pueden influir directamente en el sistema nervioso central, como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que tienen un papel inmunosupresor en la mucosa intestinal. *Faecalibacterium prausnitzii* y *Bacteroides coprófilos* participan en el metabolismo de SCFA (Freedman et al., 2018). *Bacteroides* es una bacteria beneficiosa que promueve la IL-10 y generalmente está presente en niveles más bajos en los casos de EM. *Faecalibacterium prausnitzii* se establece como un marcador de una microbiota saludable y se encuentra empobrecido entre los pacientes con EM, como se puede observar en la literatura (Tremlett et al., 2016) y también en nuestra cohorte. Todas estas diferencias en la taxonomía bacteriana en comparación con la CS sugieren una disbiosis para la microbiota de la EM.

4.2. Comparación entre grupos después del tratamiento

Al analizar si el tratamiento (de cualquier tipo) en el caso de la EM modifica significativamente la microbiota, destacamos que no hay un cambio importante en la diversidad alfa o beta para los pacientes con EM en comparación con los CS, en los dos meses posteriores al inicio de cualquier forma de terapia. como lo sugiere la investigación bibliográfica (Mirza et al., 2020). En cuanto a los cambios de taxonomía, *Ruminococcus* es una bacteria beneficiosa y generalmente se restaura en casos de EM después de TME (Zhu et al., 2020), nuestros datos reflejan una menor abundancia relativa entre los pacientes con EM en comparación con los CS de la segunda muestra. *Clostridium* es una bacteria productora de butirato involucrada en la producción de células T reguladoras y la citocina antiinflamatoria IL-10 (Miyake et al., 2015) y se reduce entre los pacientes con EM después del tratamiento.

Las diferencias entre grupos después de dos meses de terapia perfilan una posible intervención de

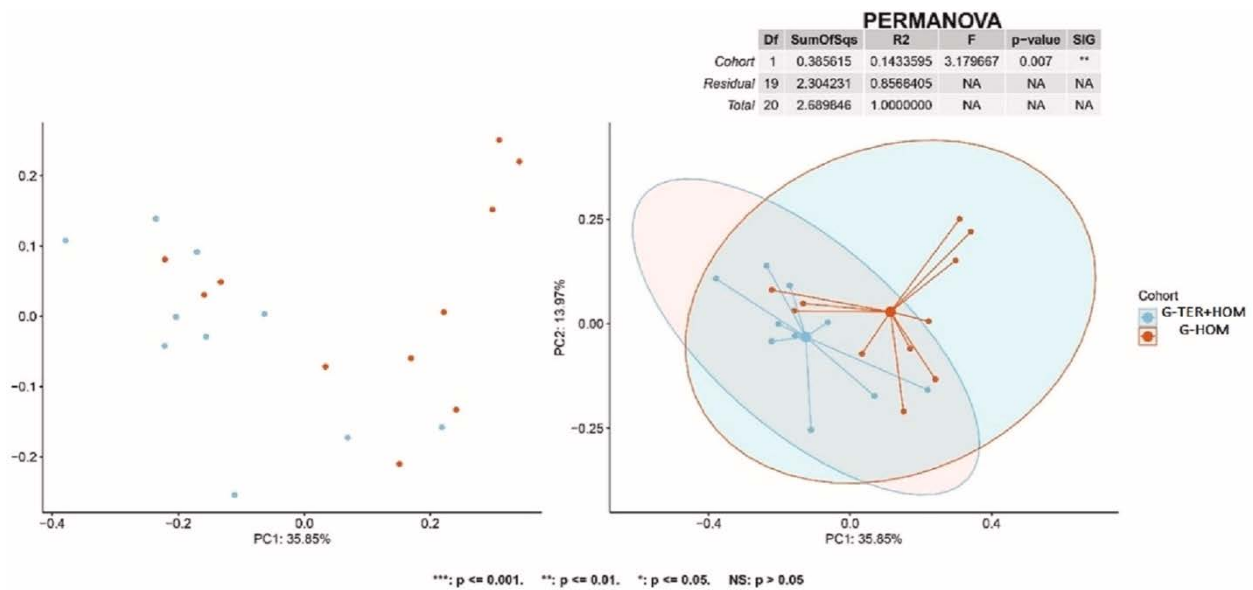


Figura 1. Análisis de las coordenadas principales de Bray-Curtis (PCoA), homeopatía + teriflunomida (G-TER + HOM) vs grupo de homeopatía (G-HOM), muestra 2. El valor de diversidad de Bray-Curtis cuantifica la diferencia entre el grupo con homeopatía y teriflunomida y el grupo con homeopatía, después de dos meses de tratamiento. La figura de la derecha muestra una elipse de confianza del 95% para cada grupo. Los resultados de la prueba PERMANOVA se incluyen en la tabla.

factores de confusión: TME o tratamiento homeopático sobre el microbioma intestinal. La homeopatía podría influir en la microbiota intestinal, como sugieren nuestros datos. Los cambios entre los pacientes que recibieron cualquier forma de TME (G-TME) y una combinación de TME y homeopatía (G-TME + HOM) son sutiles, pero notamos una gran cantidad de diferencias significativas con respecto a la abundancia relativa de bacterias entre los subgrupos, con cambios parcialmente inconsistentes y contradictorios. El par G- IFN y G-IFN + HOM destaca una posible influencia de la homeopatía en los pacientes tratados con interferón beta1a, mientras que el par G-TER y G-TER + HOM sugiere su influencia en los pacientes con teriflunomida.

En comparación con la terapia combinada, los pacientes que recibieron homeopatía presentaron un aumento de *Akkermansia muciniphila*, una especie polémica, con un papel desconocido en la maduración inmune, el cual estaba elevado entre los pacientes con EM no tratados (Cekanaviciute et al., 2017). Los experimentos in vitro destacan su papel proinflamatorio, pero los estudios in vivo no han reproducido estos efectos, sino todo lo contrario, podría tener una función benéfica para algunos trastornos metabólicos. Aunque la elección terapéutica no influencia la diversidad alfa para cualquier grupo, encontramos diferencias aisladas en la diversidad beta, similar a nuestra investigación bibliográfica (Mirza et al., 2020). Nuestros hallazgos se relacionaron con la homeopatía y el interferón beta1A como tratamientos que podrían modificar la diversidad del microbioma. La diversidad beta del grupo que recibió tratamiento homeopático fue diferente a la del grupo tratado con una combinación de homeopatía y

teriflunomida. Además, el grupo tratado con homeopatía tuvo una diversidad beta diferente al grupo tratado con interferón beta1A, todos los valores de p se presentan en Tabla 3. Con un valor de p estadísticamente no significativo de 0,06, cercano a 0,05, el grupo tratado con interferón tuvo un cambio menor en la diversidad beta en comparación con el grupo de interferón y homeopatía. Estos resultados sugieren que la homeopatía podría tener un papel en la diversidad beta de los pacientes con EM, pero se requieren más estudios.

Analizando la abundancia relativa en los filos y especies seleccionadas, notamos una disminución para Firmicutes para el grupo que recibió la terapia combinada en comparación con otros grupos, pero no estadísticamente significativo. Los Firmicutes están relacionados con tiempos de recaída más cortos en la EM (Arena y Baranzini, 2018), por lo que la combinación de estas dos terapias podría ser beneficiosa para retrasar el progreso de la enfermedad.

Las dos bacterias beneficiosas involucradas en el metabolismo de los SCFA, *Bacteroides* y *Faecalibacterium prauznitzii*, tienen abundancias relativas similares para el grupo CS y homeopatía, de aproximadamente 12% para *Bacteroides* y respectivamente 7% para *faecalibacterium*. Esto sugiere que el tratamiento homeopático podría desempeñar un papel en el mantenimiento del equilibrio de estos microorganismos saludables.

4.3. Comparación en el tiempo (entre la segunda y la primera muestra)

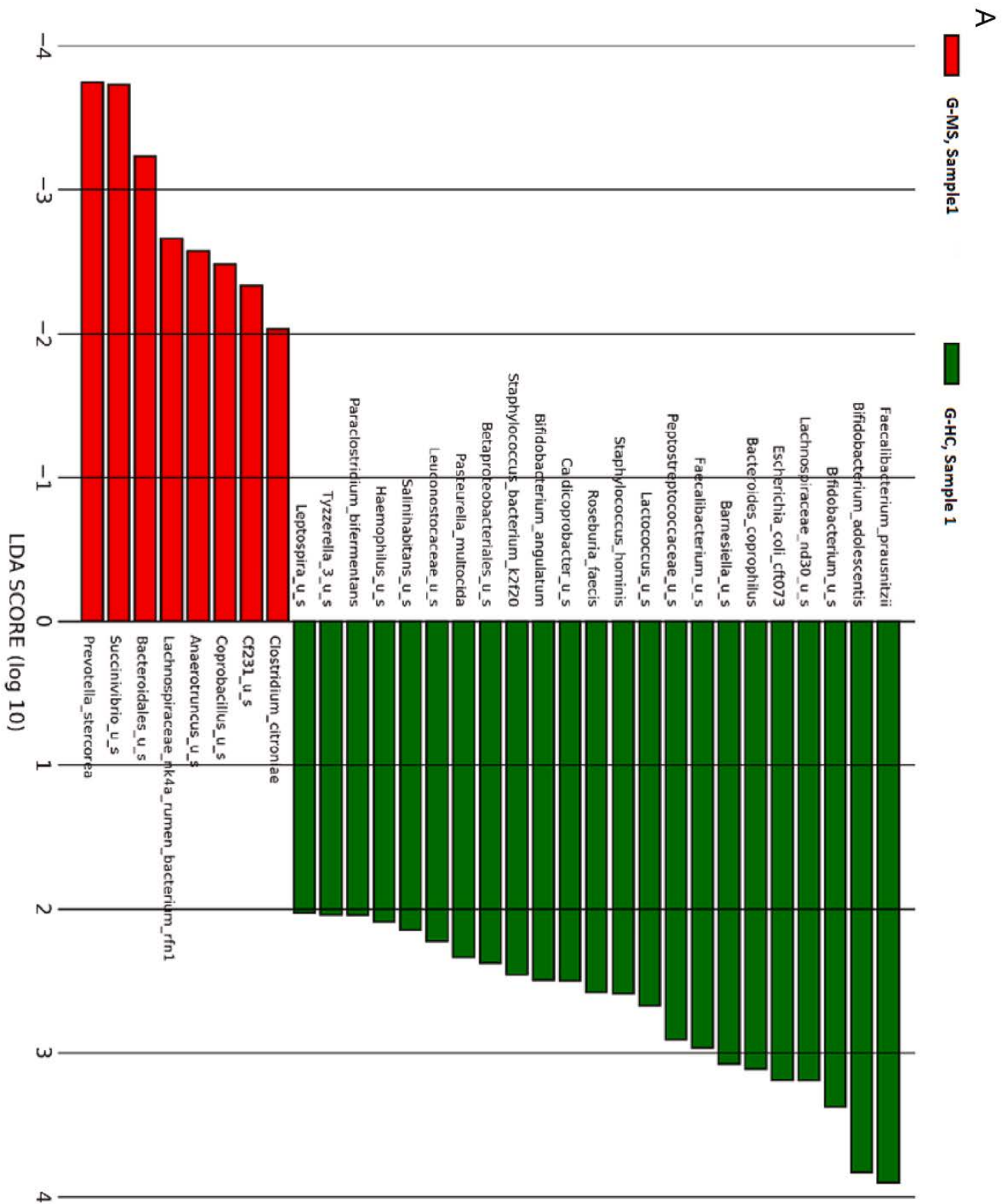


Figura 2A. Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (Lefse) a nivel de especie entre pacientes con esclerosis múltiple (G-MS) y controles sanos (G-CS) antes de cualquier tratamiento (muestra 1).

B

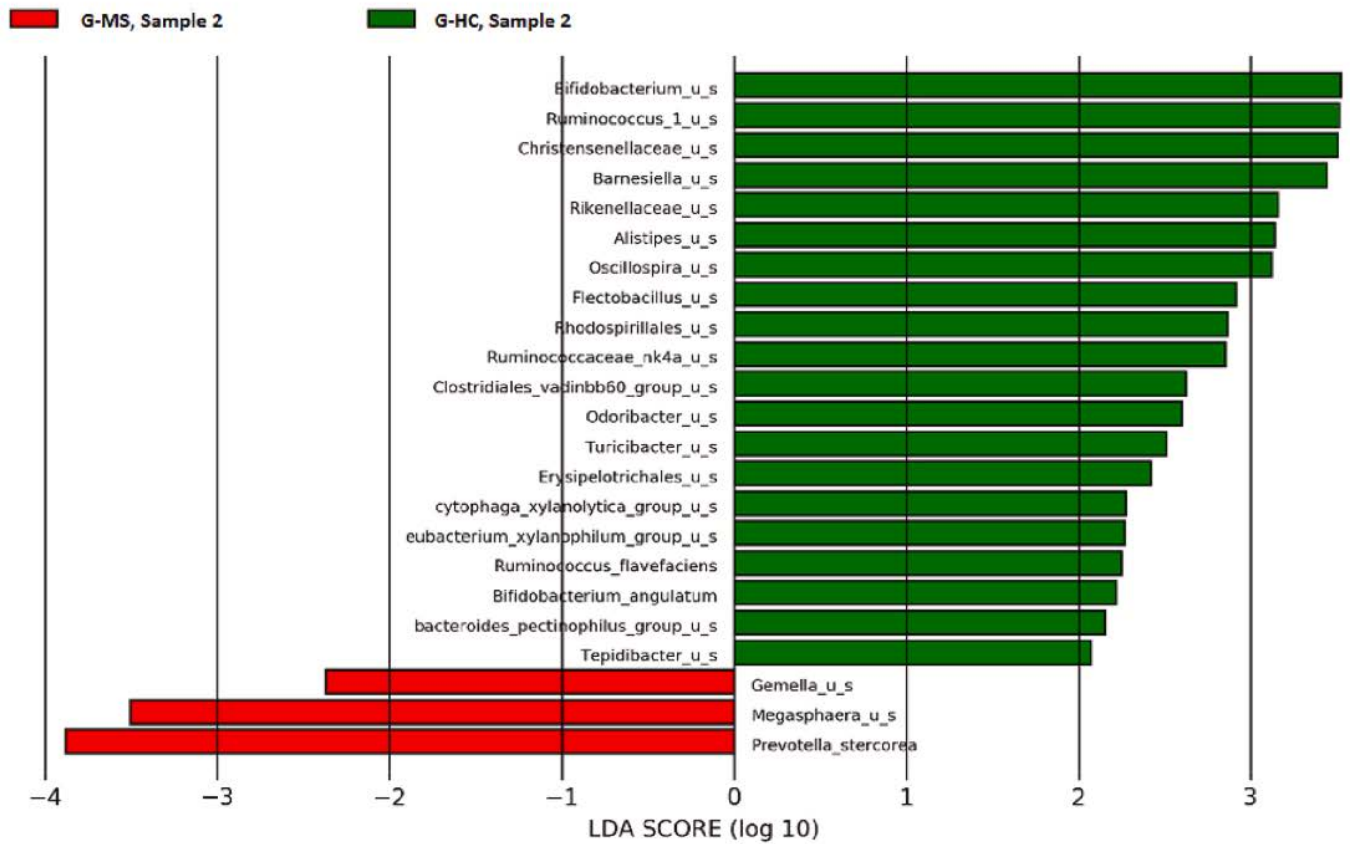


Figura 2B. Análisis de Lefse a nivel de especie entre pacientes con esclerosis múltiple (G-MS) y controles sanos (G-CS) tras dos meses de tratamiento (muestra 2).

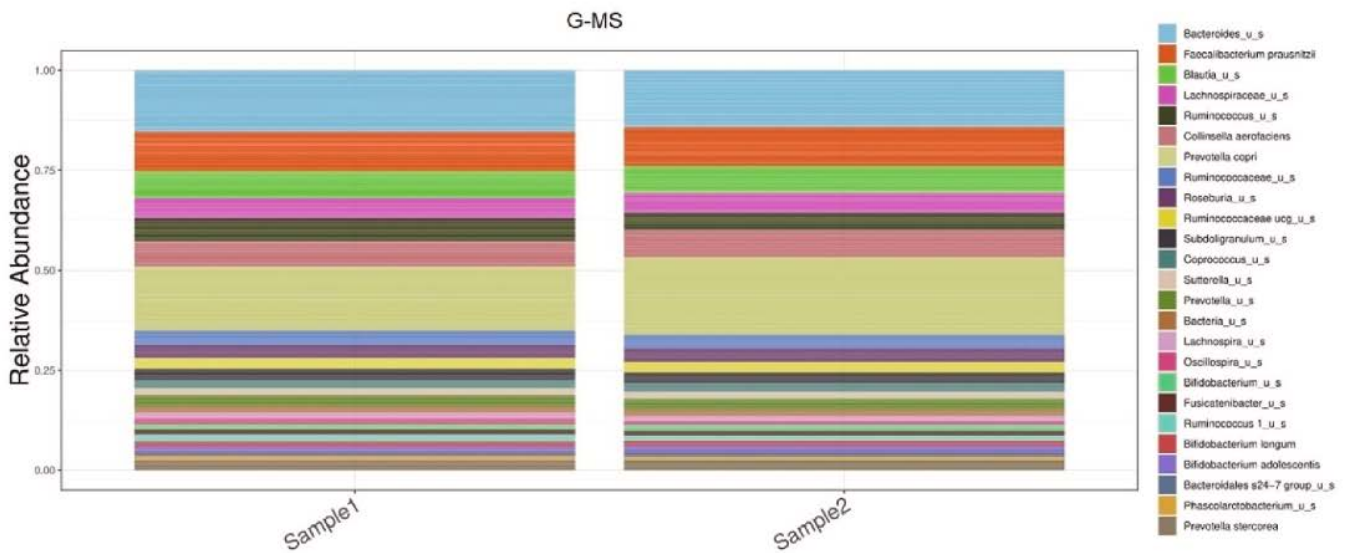


Fig. 3. Gráficos de barras apiladas: comparación entre la muestra 1 y la muestra 2 para la cohorte de MS, las 25 especies principales.

Se analizaron los cambios del microbioma en el tiempo para la cohorte de EM, donde los resultados describen los efectos de todos los tratamientos aplicados en nuestro estudio: TME, homeopatía o una combinación de ambos. Los pacientes tratados con EM presentaron cambios bacterianos más diversos, de múltiples filos, lo que sugiere que el tratamiento puede tener una influencia positiva en la microbiota en general. Los pacientes tenían una menor abundancia relativa de Lachnospiraceae, Ruminococcus, Eubacterium oxidoreducens después del tratamiento, como se esperaba por la investigación de la literatura (Mirza et al., 2020). Lachnospiraceae está involucrado en la reducción de la permeabilidad de la mucosa a través de la producción de SCFA y el aumento de la expresión de proteínas de unión estrecha en las células epiteliales (Rinninella et al., 2019).

Para los dos grupos que incluían homeopatía, G-TME + HOM y G-HOM, las bacterias más prevalentes antes del tratamiento se atenuaron en la segunda muestra. Esto sugiere que el tratamiento homeopático o su combinación con TME tuvo un impacto en la microbiota intestinal después de dos meses de tratamiento.

El tratamiento homeopático no se ha estudiado en la microbiota intestinal entre los pacientes con EM y no se encontraron estudios relevantes con los que comparar nuestros hallazgos. Nuestros pacientes que recibieron solo un tratamiento homeopático presentaron una relativa estabilidad después de 2 meses de tratamiento, con la única modificación estadísticamente significativa de Eubacterium oxidoreducens, menos abundante en la segunda muestra. Además, en el grupo tratado con una combinación de terapias, hay algunas especies bacterianas que fueron menos abundantes en la segunda muestra. Estos resultados sugieren que los pacientes tratados con homeopatía podrían tener un microbioma más estable.

4.2. Fortalezas y limitaciones

Nuestro estudio tiene una contribución en este campo médico porque analiza muestras intestinales en una forma dinámica, comparando no solo la exposición al tratamiento sino también los cambios que ocurren en el tiempo. Además, es único porque también introduce el tratamiento homeopático como un posible factor de confusión.

Como posibles factores limitantes, no se pueden excluir ni cuantificar todos los compuestos ambientales y dietéticos que puedan interferir y modificar la microbiota en dos meses. Se necesitan más estudios.

5. Conclusión

La microbiota de la EM se caracteriza por disbiosis, con varios cambios taxonómicos en comparación con la CS. En pacientes con EM no tratados encontramos una mayor abundancia de Prevotella estercórea y una reducción de actinobacterias, bifidobacterias y cambios. Los pacientes tratados con EM tenían una microbiota diferente en comparación con los CS, con Bifidobacterium, Ruminococcus y Clostridiales reducidos y una mayor prevalencia de Gemella, Megaspheara y Prevotella estercórea.

Comparando la segunda muestra con la primera, destacamos las modificaciones en la microbiota de la EM en el tiempo, como la disminución Lachnospiraceae y Ruminococcus e incremento en la Enterococcus faecalis. Estos cambios dinámicos pueden deberse al tratamiento de la EM.

En general, la exposición al tratamiento tuvo una pequeña influencia en la diversidad del microbioma. Las únicas modificaciones de diversidad estadísticamente significativas que encontramos implicaron el efecto del tratamiento homeopático en los índices de diversidad beta, en comparación con el efecto de los fármacos inmunomoduladores.

Eubacterium oxidoreducens también se redujo después del tratamiento homeopático. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento homeopático también influye en la microbiota intestinal.

Este estudio destaca el importante papel de la microbiota intestinal en la EM y plantea otras vías para estudiar. El microbioma es un vasto ecosistema, influenciado por numerosos factores que no se pueden cuantificar por completo. Nuestro proyecto se centró en los cambios dinámicos en la microbiota y la posible influencia de algunos TME específicos, así como en la homeopatía como medicina complementaria y alternativa utilizada en la práctica clínica.

Fondos

Esta investigación no recibió financiación externa.

Aprobación ética

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital del Condado de Emergencias de Cluj, código 2394/28.01.2020.

Declaración de consentimiento informado

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos involucrados en el estudio.

Declaración de contribución de autoría

Vitalie Vacaras: Conceptualización, Metodología, Recursos, Redacción – revisión y edición, Supervisión. **Dafin F. Muresanu:** Conceptualización. **Anca-Dana Buzoianu:** Conceptualización. **Cristina Nistor:** Metodología, Recursos, Análisis formal, Redacción – revisión y edición. **Stefan Cristian Vesa:** Redacción: borrador original, Redacción: revisión y edición, Supervisión. **Andreea Cristina Paraschiv:** Metodología, Recursos, Análisis formal. **Daniela Botos Vacaras:** Metodología, Recursos. **Cristiana Vacaras:** Metodología, Recursos. **George Vithoulikas,** Conceptualización, Supervisión.

Declaración de interés en competencia

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Disponibilidad de datos

Los datos y otra información de este estudio están disponibles del autor correspondiente a pedido, por cuestiones de privacidad.

Expresiones de gratitud

Agradecemos la ayuda del laboratorio CosmosID para analizar nuestras muestras y para el soporte de análisis estadístico.

Apéndice A. Datos complementarios

Los datos complementarios de este artículo se pueden encontrar en línea en <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2023.578087>.

Referencias

- 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.
- Baecher-Allan, C., Kaskow, B.J., Weiner, H.L., 2018 Feb. Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy. *Neuron*. 97 (4), 742–768.
- 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.
- Budhram, A., Parvathy, S., Kremenchutzky, M., Silverman, M., 2017 Apr. Breaking down the gut microbiome composition in multiple sclerosis. *Mult. Scler*. 23 (5), 628–636.
- Camara-Lemarray, 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.
- 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.
- Chen, J., Chia, N., Kalar, 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.
- 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.
- 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.
- Fisher, P., Ernst, E., 2015 Jul 14. Should doctors recommend homeopathy? *BMJ*. 351, h3735.
- 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.
- 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.
- 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.
- Maglione, A., Zuccala, M., Tosi, M., Clerico, M., Rolla, S., 2021 Jul 29. Host genetics and gut microbiome: perspectives for multiple sclerosis. *Genes*. 12 (8), 1181.
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, 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.
- Manzolini, A., Galeazzi, B., 2019 Aug. Explaining homeopathy with quantum electrodynamics. *Homeopathy*. 108 (03), 169–176.
- 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 Sclerosis. Relat. Disord*. 37, 101427.
- 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.
- 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.
- Riccio, P., Rossano, R., 2018 Jan. Diet, gut microbiota, and vitamins D + a in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 15 (1), 75–91.
- 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.
- 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.
- Strandwitz, P., 2018 Aug. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res*. 1693, 128–133.
- 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.
- 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.
- 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.
- Whitmarsh, T.E., 2003 Feb. Homeopathy in multiple sclerosis. *Complement Therap Nurs Midwifery* 9 (1), 5–9.
- 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.