

Rolul terapiilor pentru scleroza multiplă asupra dinamicii microbiotei intestinale umane

Vitalie Văcăraș^{a, b}, Dafin F. Mureșanu^{a, b}, Anca-Dana Buzoianu^c, Cristina Nistor^{a, b,*}, Ștefan Cristian Vesa^c, Andreea-Cristina Paraschiv^b, Daniela Botos-Văcăraș^d, Cristiana Văcăraș^e, George Vithoulkas^f

a Secția de Neurologie, Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj, 400012 Cluj-Napoca, România

b Departamentul de Neuroștiințe, Facultatea de medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu, 400012 Cluj-Napoca, România

c Departamentul de Farmacologie, toxicologie și farmacologie clinică, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu, 400349 Cluj-Napoca, România

d Departamentul de Medicină internă, Facultatea de medicină, Universitatea de medicină și farmacie Iuliu Hațieganu, 400012 Cluj-Napoca, România

e Facultatea de Medicină, Universitatea de medicină și farmacie Iuliu Hațieganu, 400012 Cluj-Napoca, România

f Universitatea din Marea Egee, Mytilene, Grecia

* Autor corespondent la: Secția neurologie, Spitalul județean de Urgență Cluj, 400012 Cluj-Napoca, România.

Adresa de e-mail: cristinapinzaru@yahoo.com (C. Nistor).

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

Primit 5 februarie 2023; Primit în formă revizuită la 24 martie 2023; Acceptat la 6 aprilie 2023

Disponibil on-line pe 7 aprilie 2023

0165-5728/© 2023 Autorii. Publicat de Elsevier B.V. Acesta este un articol cu acces deschis sub licența CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

INFO ARTICOL

Cuvinte cheie:

Scleroză multiplă

Microbiota intestinală

Dizbioză

Terapia de modificare a bolii

Microbiom

ABSTRACT

Microbiota intestinală, totalul microorganismelor din tractul nostru gastrointestinal, ar putea avea o implicație în scleroza multiplă (SM), o boală neurologică demielinizantă. Studiul nostru a inclus 50 de pacienți cu SM și 21 de martori sănătoși (HC). Douăzeci de pacienți au primit o terapie de modificare a bolii (DMT), interferon beta1a sau teriflunomidă, 19 DMT combinat cu homeopatie și 11 pacienți au acceptat doar homeopatie. Am colectat în total 142 de probe de materii fecale, două pentru fiecare individ: la înscrierea la studiu și la 8 săptămâni după tratament. Am comparat microbiomul pacienților cu SM cu cei HC, am analizat evoluția acestuia în timp și efectul interferonului beta1a, teriflunomidei și homeopatiei. Nu a existat nicio diferență în diversitatea alfa, dar au fost două rezultate semnificative legate de diversitatea beta legate și homeopatie. Comparativ cu HC, pacienții cu SM netratați au prezentat o scădere a abundenței relative pentru

Actinobacteria, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prauznitzii* și creșterea *Prevotella stercorea*, în timp ce pacienții tratați prezentau *Ruminococcus* și *Clostridium* scăzut. Comparativ cu proba inițială, pacienții SM tratați au prezentat o scădere a *Lachnospiraceae* și *Ruminococcus* și o creștere a *Enterococcus faecalis*. *Eubacterium oxidoreducens* a fost redus după tratamentul homeopat. Studiul a arătat că pacienții cu SM pot prezenta disbioză. Tratamentul cu interferon beta1a, teriflunomidă sau homeopatie a implicat câteva modificări taxonomice. DMT-urile și homeopatia ar putea influența microbiota intestinală.

1. Introducere

Microbiota intestinală umană, compusă dintr-o mare diversitate de microorganisme care se află în interiorul tractului nostru gastrointestinal, este clasificată taxonomic în specii, genuri și îngrengături, conținând atât microbi benefici, cât și patogeni ([Rinninella et al., 2019](#); [Camara-Lemarroy et al., 2018](#)). Este modelat în cea mai mare parte la începutul vieții, în copilărie, în funcție de mai mulți factori, cum ar fi tipul de naștere, alăptarea, înțarcarea și medicația. După primii trei ani de viață, atinge o parțială stabilitate, cu modificări subtile continue cauzate de factori externi: alimentație, exerciții fizice, indicele de masă corporală, expunerea la mediu și medicamente ([Rinninella et al., 2019](#)). Un microbiom este format din totalul genelor, proteinelor și metaboliților tuturor organismelor ([Maglione et al., 2021](#)).

Scleroza multiplă (SM) este o boală autoimună a sistemului nervos central, în care susceptibilitățile genetice se întâlnesc cu factorii de mediu. Include afectarea integrității barierei hematoencefalice, inflamația, demielinizarea, pierdere de oligodendrocite, glioză și degenerare axonală. Boala este considerată a fi alcătuită din trei etape principale, o etapă preclinică în care combinația dintre genetică și factorii de mediu ar putea fi un factor declanșator al patologiei, o etapă inflamatoare în care întâlnim episoade de disfuncție neurologică, precum nevrita optică, piramidală, cerebeloasă sau tulburări ale trunchiului cerebral, simptome senzoriale, disfuncție a vezicii urinare și un stadiu final neurodegenerativ al progresiei bolii atunci când găsim o incapacitate progresivă, mai ales incapacitatea de mers a pacientului. Boala are diferite forme clinice: sindrom izolat clinic (CIS), SM recurent-remisivă (RRMS), SM secundar progresivă (SPMS) și SM primar progresivă (PPMS). Factorii de risc modificabili legați de SM au fost puternic analizați pentru a găsi un rol specific în procesul patologic, inclusiv compoziția microbiomului ([Baecher-Allan et al., 2018](#)). Studii recente subliniază că pacienții cu SM au o compoziție distinctă a microbiomului în comparație cu martorii sănătoși (HC) ([Mirza et al., 2020](#)).

Datorită faptului că microbiomul este unic pentru fiecare individ și conține o varietate enormă de microorganisme, este dificil de descris o anumită microbiotă sănătoasă ([Rinninella et al., 2019](#)). O microbiotă sănătoasă asigură multe funcții esențiale, inclusiv permeabilitatea și motilitatea intestinală, sinteza vitaminelor, absorbția, dar și dezvoltarea sistemului imunitar ereditar ([Chu et al., 2018](#)). Pe baza acestui rol în imunomodulare, studii recente indică o posibilă legătură între microbiom și unele patologii neurologice mediate imun ([Mirza et al., 2020](#)).

Conceptul de axă microbiotă intestinală-creier se referă la diferite mecanisme de comunicare între sistemul gastrointestinal și sistemul nervos ([Strandwitz, 2018](#)). Microbiota poate influența sistemul nervos central (SNC) prin diferite căi. În primul rând, se referă la rețelele creierului, modulează diferiții neurotransmițători (cum ar fi acidul gamma aminobutiric, serotonina, dopamina, histamina) și este conectat cu sistemul nervos simpatic sau parasimpatic, în special cu nervul vag. În al doilea rând, este implicat în calea endocrină, ca răspuns la stres. Corticoizii eliberați de axul hipotalamo-hipofizo-suprarenal pot modifica compoziția microbiotei și pot crește permeabilitatea intestinală. Un alt mecanism al cărui microbi pot altera sistemul nervos este imunoreglarea. Aceasta include prezentarea afectată a antigenului, producția de citokine și limfocite, diferențierea diferitelor tipuri de celule T în țesutul limfoid asociat intestinului (GALT)

([Chu et al., 2018](#)). Microorganismele intestinale pot elibera metaboliți (lipopolizaharide, peptidoglicani), iar metabolismul acizilor grași cu lanț scurt (SCFA) este implicat în activarea celulelor microgliale și în scurgerea barierei hematoencefalice ([Strandwitz, 2018](#)).

Medicina complementară și alternativă, inclusiv homeopatia, este asociată în cea mai mare parte cu formele convenționale de terapie, pentru ameliorarea simptomelor generale, a durerii, spasticității, problemelor de sensibilitate, afectarea mersului, oboseala, pierderea memoriei. Dintre toți pacienții cu SM, până la 30% folosesc sau au folosit o formă de medicină complementară și alternativă ([Kim et al., 2018](#)). Se estimează că 70-80% dintre pacienții cu SM au prezentat o îmbunătățire a stării lor generale ([Olsen, 2009](#)). Principiul homeopatiei, „lasă asemănătorul să fie tratat asemănător”, se bazează pe ideea că o boală poate fi tratată prin substanțe care declanșează aceleași simptome patologice la indivizii sănătoși ([Fisher and Ernst, 2015](#)). Remediile homeopate sunt substanțe naturale foarte diluate ([Manzalini and Galeazzi, 2019](#)), soluția mai diluată fiind considerată a avea o potență mai înaltă ([Chikramane et al., 2010](#)). Alegerea potenței este legată de nivelul de sănătate: un nivel de sănătate mai jos implică o potență scăzută, precum 30CH, pentru o perioadă mai lungă de timp, până la 3 luni, în timp ce un tratament cu 200CH este limitat pentru câteva zile. Acestea sunt prescrise de la caz la caz, luând în considerare alte aspecte în afară de semnele medicale specifice, precum și detalii psihologice particulare sau obiceiuri cotidiene relevante ale pacientului ([Whitmarsh, 2003](#)). Unele simptome în SM sunt frecvent ameliorate de unele substanțe: Causticum pentru disfuncția urinară, Phosphorus pentru nevrita optică, Cuprum metallicum și Nux vomica pentru spasme, Secale pentru simptome senzoriale ([Whitmarsh, 2003](#)).

După cum este prezentat mai departe în acest manuscris, numeroase studii au subliniat că pacienții cu SM au o microbiotă distinctă în comparație cu HC. S-a observat că tratamentele SM pot modifica microbiomul intestinal, dar homeopatia nu a fost studiată în acest domeniu

Scopul acestui studiu este de a investiga dacă microbiota intestinală a pacienților cu SM este modificată de medicamentele imunomodulatoare sau tratamentele complementare, inclusiv a tratamentului homeopat și de a evalua diferențele în taxonomia microbială și diversitatea dintre SM și HC.

Materiale și metode

2.1 Subiecți

Studiul a fost de tip prospectiv, longitudinal, analitic, observațional și de tip caz-control. Acesta a inclus 50 de pacienți diagnosticați cu SM, de la Secția de Neurologie a Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj-Napoca, în perioada ianuarie 2019 – mai 2020. Au fost recrutați 21 de HC. A fost obținută autorizația etică (număr 2394/28.01.2020, Spitalul de urgență Cluj-Napoca) și fiecare subiect a semnat un consimțământ informat.

Grupul cu SM a inclus pacienți adulți cu SM confirmată, forma recurent-remisivă (RRMS) sau cu sindrom izolat clinic (CIS), conform criteriilor de diagnostic McDonald revizuite ([Thompson et al., 2018](#)), cu un scor EDSS de maxim 5 puncte, care nu au fost supuși unei terapii modificatoare de boală (DMT) cu un an înainte de înscrierea în studiu. Am exclus pacienții cu SM progresivă, diagnostic neclar, patologii gastrointestinale active, femei însărcinate, care alăptează sau care au urmat tratament pe termen lung cu probiotice, antivirale, antibiotice, antiinflamatoare nesteroidiene sau inhibitori ai pompei de protoni în ultimele 6 luni. Dintre toți pacienții, 7 au avut patologii gastrice ușoare tranzitorii în trecut, dar fără simptome gastrointestinale active la înscriere, 4 pacienți au avut intervenții chirurgicale abdominale în istoricul lor medical și 4 pacienți au patologii endocrine (în mare parte legate de tiroidă) sub control medical. Alte patologii (hipertensiune arterială, diabet zaharat) au fost la cazuri izolate și compensate clinic la debutul

studiului. Grupul HC a fost compus din indivizi sănătoși fără SM, potriviți ca vârstă și sex cu pacienții cu SM, nediagnosticați cu nicio patologie și fără tratament cronic. Toți subiecții au declarat că nu au avut schimbări majore în dieta sau stilul lor de viață în timpul studiului.

La începutul studiului, fiecare subiect a furnizat o probă de microbiotă intestinală. După primul eșantion, s-a prescris o formă de tratament în funcție de mai mulți factori, cum ar fi severitatea bolii, consimțământul pacienților, comorbiditățile, siguranța medicamentelor și accesibilitatea ([Chikramane et al., 2010](#)). Unii au refuzat pentru moment o terapie convențională; au acceptat însă tratamentul homeopat. A doua probă a fost obținută la 2 luni după inițierea tratamentului.

În ceea ce privește distribuția tratamentului homeopat, fiecare pacient a primit o medicație individualizată, diferită, în funcție de simptomele SM, care a inclus unul dintre următoarele: Phosphorus, Lycopodium, Natrum muriaticum, Lac caninum, Nux vomica, Lachesis, Acid azotic, Rhus toxicodendron, Tarentula hispanica, Pulsatilla, Calcarea carbonica, Sulphur, Ignatia, Aconitum sau Causticum, cu o concentrație de 30CH sau 200CH. Substanțele au fost prescrise de un neurolog acreditat în homeopatie și au fost administrate zilnic, 7 granule sublingual, 3 zile consecutiv pentru pacienții care au primit diluția de 200CH și 1 până la 3 luni pentru cei care au primit diluția 30CH.

Pacienții noștri cu SM au fost împărțiți în grupuri separate, în funcție de tratamentul lor, așa cum este prezentat în [Tabelul 1](#). Grupul G-DMT a primit un tratament de modificare a bolii: interferon beta 1a intramuscular, 30 μg / 0,5 ml o dată pe săptămână (subgrupul G-IFN) sau teriflunomidă per os 14 mg pe zi (subgrupa G-TER). Grupul G-DMT + HOM a primit un DMT combinat cu homeopatie: G-IFN + HOM interferon beta1a și homeopatie, G-TER +HOM teriflunomidă și homeopatie, Grupul G-HOM nu a primit tratament homeopat. Grupul martor, G-HC a fost format din HC, fără tratament.

2.2 Colectarea probelor

Toți subiecții au furnizat probe de materii fecale corespunzător instrucțiunilor de laborator: în orice moment al zilei, fără restricții, folosind recipiente speciale pentru recoltare. Probele furnizate au fost păstrate la -20⁰ Celsius și apoi expediate la laborator pentru extragerea ADN-ului. Fiecare subiect a colectat două probe de fecale: una înainte de tratament (proba 1, S1) și una la două luni după începerea terapiei sau înscrierea studiului (proba 2, S2).

Tabel 1
Convenția de denumire a grupurilor

Grup	Nr. subiecți	Subgrup	Nr. subiecți
G-DMT (DMT)	20	G-IFN (interferon beta1a)	10
		G-TER (teriflunomide)	10
G2-DMT + HOM (DMT+ homeopathy)	19	G-IFN + HOM (interferon beta1a + homeopatie)	9
		G-TER + HOM (teriflunomide+ homeopatie)	10
G-HOM (homeopathy)	11		
G-HC (HC)	21		
G-MS (all MS patients)	50		

Tabelul 1 rezumă acronimele pe care le folosim pentru identificarea grupurilor.
 Abrevieri: DMT = tratament modificator de boală, HC = subiecți sănătoși

Tabelul 2. Caracteristicile specifice ale sclerozei multiple (SM) ale grupului nostru.

Caracteristici	Pacienți cu SM (n = 50)
tip MS, n (%)	
RRMS	44 (88%)
CIS	6 (12%)
Scorul EDSS, medie (interval)	1,8 (0–5)
Durata confirmată a bolii, medie (SD) (y)	3,4 (6,2)
Număr de recăderi, medie (SD)	2,5 (2,13)
Scorul MMSE, medie	29,4
Tratament, n (%)	
Teriflunomidă	10 (14,28%)
Interferon beta1a	10 (14,28%)
Teriflunomidă + homeopatie	10 (14,28%)
Interferon beta+ homeopatie	9 (12,8%)
Homeopatie	11 (15,7)

Abrevieri: MS = scleroză multiplă, n = numărul de pacienți, SD = abatere standard, y = ani, RRMS = SM recidivant-remisivă, CIS = sindrom izolat clinic, EDSS = scala extinsă a stării de dizabilitate, MMSE = mini examinare a stării mentale.

2.3. Succesiunea 16rARN și analiza statistică

Analiza metagenomică a genei ARN subunitatea ribozomală 16S (ARN_r) prezintă universal, a folosit regiuni hipervariabile specifice (V1-V3, V3-V4, ITS1 și ITS2), prin platforma Illumina MiSeq. Rezultatele sunt OTU-urile (unități taxonomice operaționale), microorganisme care au o asemănare ADN de cel puțin 97% cu o bază de date de laborator, clasificate în taxoni specifici, cu frecvența și abundența relativă a acestora.

Diversitatea microbiotei intestinale este o măsură matematică a variabilității, caracterizată prin bogăție (numărul de specii diferite) și uniformitate (uniformitatea diferitelor specii). Pentru diversitatea alfa, diversitatea din cadrul eșantionului, indicele Chao este un indicator al bogăției speciilor. Shannon & Simpson sunt parametri atât pentru bogăție, cât și pentru uniformitate, valorile lor cresc cu numărul de specii și o distribuție mai uniformă (Kim et al., 2017).

Folosind matricele de frecvență, fiecare combinație de perechi a fost analizată folosind testul Wilcoxon Rank-Sum. Pentru diversitatea beta, diversitatea dintre eșantioane, am folosit indicii

Bray-Curtis și Jaccard, unde distanța grafică dintre aceștia indică diferența. Analiza coordonatelor principale (PCoA) a fost obținută din matricea de abundență relativă. Cifrele privind mărimea efectului analizei discriminante liniară (LEfSe) utilizează matrice de abundență relativă pentru a calcula abundența diferențială a organismului între SM și HC, cu o valoare alfa de 0,05 și un prag de scor al analizei discriminante liniare logaritmice (LDA) de 2,0. Toate caracteristicile au un scor fie mai mic de -2,0, fie mai mare de 2,0. Bacteriile îmbogățite pentru pacienții cu SM sunt reprezentate în roșu, în timp ce acelea mai abundente în HC sunt colorate în verde. În barele stivuite cu abundență relativă, fiecare bară reprezintă abundența relativă medie a primelor 25 de specii, selectate în funcție de abundență în raport cu ambele grupuri. Au fost generate și hărți termice.

3. Rezultate

Grupul cu SM a fost format din 31 de femei și 19 bărbați, cu o vârstă medie de $30,5 \pm 9,9$ ani, 44 dintre ei fiind diagnosticați cu RRMS și 6 cu CIS, un scor mediu al Scalei Statusului de Dizabilitate Extinsă (EDSS) de 1,8 puncte și o boală medie cu o durată de 3,4 ani. Toate caracteristicile specifice SM sunt prezentate în [tabelul 2](#). Majoritatea acestora au fost naivi [fără tratament anterior de modificare a bolii (DMT)], doar 4 pacienți au primit tratament, care a fost întrerupt în anul precedent.

Grupul de control sănătos (HC) a fost asamblat luând în considerare persoane cu caracteristici demografice similare cu grupul SM: 62% femei și 38% bărbați, o vârstă medie de $28 \pm 9,7$ ani.

3.1. Diversitatea microbiomului

Am studiat diferențele generale în compoziția microbiană utilizând diversitatea alfa și beta. Nu a existat nicio diferență semnificativ statistic în diversitatea alfa între pacienții cu SM și HC înainte ($p = 0,85$) și după tratament ($p = 0,95$). De asemenea, nu a existat nicio diferență între alte combinații de grup pentru proba 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 ($p = 0,64$) și subgrupurile lor, G = IFN + HOM vs G-TER + HOM ($p = 0,23$), G-IFN vs G-IFN + HOM ($p = 0,06$) între eșantionul 1 (S1) și S2 pentru pacienții cu SM ($p = 0,93$), G-DMT + HOM ($p = 0,38$) sau G-HOM ($p = 0,79$). De asemenea, nu a existat nicio diferență în diversitatea alfa între pacienții cu SM tratați cu DMT (G-DMT combinat cu G-DMT + HOM) și pacienții care nu au urmat DMT (G-HOM), $p = 0,81$. Toate valorile p sunt prezentate în [tabelul 3](#).

Pe măsură ce am analizat diversitatea beta, a existat o diferență pentru S2 între G-HOM și G-TER + HOM ($p = 0,007$) (Fig. 1) și între G-HOM și G-IFN ($p = 0,012$), dar fără o diferență statistic semnificativă între pacienții cu SM și HC sau între cele două eșantioane pentru pacienții cu SM (toate $p > 0,05$). Alte rezultate sunt prezentate în [tabelul 3](#) și [Fig. 1*](#) (*fișiere de date suplimentare).

3.2. Diferențele taxonomice

Rezultatele analizei 16S includ frecvența și abundența relativă a speciei.

Pentru grupul SM, am identificat 51 de Unități Taxonomice Operaționale (OTU) la nivel de filum, majoritatea compuse din *Firmicutes* (49,45%), *Bacteroidetes* (34,3%), *Actinobacteria* (4,77%) și *Proteobacterii* (3,6%). La nivel de specie, am analizat 1505 OTU, cu cea mai mare abundență relativă de *Prevotella copri* (10,75%) și *Bacteroides* (10,3%), urmate de *Faecalibacterium prausnitzii* (6,63%) și *Blautia* (4,49%).

Am analizat diferențele taxonomice dintre grupul nostru de SM (G-MS) și HC (G-HC) înainte de orice tratament (S1). Pacienții cu SM netratați au prezentat, comparativ cu HC, o abundență

relativă crescută a filului *Lentisphaerae* ($p = 0,005$), a speciilor *Prevotella stercorea* ($p = 0,02$) (*filum Bacteroidetes*). Au avut un nivel scăzut al *filum Actinobacteria* ($p = 0,01$), cu speciile sale *Bifidobacterium* ($p = 0,01$) și *Bifidobacterium adolescentis* ($p=0,007$), de asemenea, un nivel scăzut al *Bacteroides coprophilus* ($p=0,02$) (din *filum Bacteroidetes*). *Filum Firmicutes* are abundența relativă redusă a *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0,03$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,01$), *Staphylococcus hominis* ($p = 0,02$) și a bacteriei *Staphylococcus* ($p = 0,02$). *Filum Proteobacterii* are o scădere a *Haemophilus* ($p = 0,04$) și *Escherichia coli* ($p = 0,04$). Celelalte diferențe semnificative statistic sunt prezentate în [fig. 2A](#), fig. 2*-4*.

Prezentare generală a tuturor valorilor p pentru diversitatea microbiană

Tabelul 3. Prezentare generală a tuturor valorilor p pentru diversitatea microbiană.

Comparație	Diversitate Alpha			Diversitate Beta	
	Chao	Shannon	Simpson	Bray-Curtis	Jaccard
G-HC vs G-MS (S1)	$p = 0.85$	$p = 0.33$	$p = 0.55$	$p = 0.15$	$p = 0.13$
G-HC vs G-MS (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 combinat ce 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)	$p = 0.23$	$p = 0.14$	$p = 0.14$	$p = 0.06$	$p = 0.11$
S1vsS2 (G-MS)	$p = 0.93$	$p = 0.26$	$p = 0.36$	$p = 0.88$	$p = 0.93$
S1vsS2 (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)	$p = 0.24$	$p = 0.58$	$p = 0.68$	$p = 0.96$	$p = 0.98$

*Valorile cu bold sunt semnificative din punct de vedere statistic. Acest tabel prezintă comparații specifice între grupele noastre și indicii de diversitate aplicate, împreună cu valoarea p a fiecărui test. Abrevieri: S1 = proba 1; S2 = proba 2.

Când am analizat a doua probă a microbiotei, rezultatele pentru pacienții tratați cu SM comparativ cu HC au fost ușor diferite, cu *Bifidobacterium* ($p = 0,02$), *Ruminococcus* ($p = 0,04$) și *Clostridiales* ($p = 0,01$) reduse și o prevalență mai mare de *Gemella*. ($p = 0,04$), *Megasphaerae* ($p = 0,02$) și *Prevotella stercorea* ($p = 0,02$) pentru pacienții cu SM comparativ cu HC ([fig. 2B](#), fig. 5*-7*).

Am analizat diferite comparații între grupuri după un tratament de 2 luni. La analizarea microbiotei pacienților cu SM care au primit DMT (G-DMT) în comparație cu pacienții care urmează tratament homeopatic complementar (G-DMT + HOM), am subliniat următoarele rezultate. Comparativ cu G-DMT + HOM, G-DMT a avut o abundență relativă îmbogățită pentru

Catenibacterium ($p = 0,02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$), *Sharpea* ($p = 0,02$) și *Gammaproteobacteria* ($p = 0,02$) și un nivel scăzut de *Shuttleworthia* ($p = 0,04$), *Cytophaga* ($p = 0,03$) și *Rumen* ($p = 0,02$). *Cianobacterii* ($p = 0,002$), *Catenibacterium* ($p = 0,01$), *Alloprevotella* ($p = 0,03$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,003$), *Clostridium* ($p = 0,01$), *Prevotella copri* ($p = 0,04$), *Prevotella stercorea* ($p = 0,003$) sunt mai abundente în subgrupul G-IFN comparativ cu G-IFN + HOM, după tratament. Pe de altă parte, G-IFN + HOM prezintă niveluri mai mari de *Proteobacterii* ($p = 0,02$), *Escherichia shigella* ($p = 0,01$), *Barnesiella* ($p = 0,03$), *Serratia* ($p = 0,008$), *Lactobacillus zeae* ($p = 0,02$). În grupul G-TER *Escherichia shigella* ($p = 0,007$), *Lactobacillus* ($p = 0,01$), *Enterobacter* ($p = 0,02$), *Enterococcus faecalis* ($p = 0,03$) este mai răspândit decât în G-TER + HOM, în timp ce G-TER + HOM prezintă semne mai mari ale *Rickenellaceae* ($p = 0,01$) și *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$). De asemenea, am comparat cele două grupuri care au primit tratament homeopat, G-DMT + HOM și G-HOM. Am subliniat că G-DMT + HOM a prezentat o abundență relativă mai mare pentru *Megasphaera* ($p = 0,04$), *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0,02$), *Veillonellaceae* ($p = 0,02$) și *Gardnerella* ($p = 0,02$), comparativ cu G-HOM. G-HOM a fost îmbogățit în *Faecalibacterium prausnitzii* ($p = 0,01$), *Akkermansia muciniphila* ($p = 0,02$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,003$), *Bacteroides acidifaciens* ($p = 0,04$) și *pectinophilus* ($p = 0,03$), *Veilonella* ($p = 0,03$) = 0,003 , comparativ cu G-DMT + HOM (fig. 8*-20*).

Un alt punct de interes în cercetarea noastră a fost acela de a sublinia modul în care microbiomul se modifică în timp, din momentul în care pacienților li s-a prescris o schemă terapeutică (S1) până la 2 luni de la începerea tratamentului (S2). Pentru grupul SM, modificările taxonomice sunt prezentate în fig. 3 cu cele mai abundente 25 de organisme. Diferențele semnificative statistic între cele două probe au fost mai răspândite pentru *Firmicutes*, deoarece au fost identificate niveluri reduse pentru *Ruminococcus* ($p = 0,03$), *Oscillospira* ($p = 0,0004$), *Anaerotruncus* ($p = 0,02$), *Lachnoclostridium* ($p = 0,01$), *Lachnospiraceae* ($p = 0,02$) și *Eubacterium oxidoreducens* ($p = 0,04$) la pacienții cu SM după tratament, comparativ cu proba inițială. Pacienții tratați cu SM au prezentat modificări bacteriene mai diverse, cu o creștere a filumului *Firmicutes* (*Sulfobacillus* $p = 0,02$, *Enterococcus faecalis* $p = 0,02$), *Bacteroidetes* (*Hymenobacter* $p = 0,04$), *Proteobacteria* ($p = 0,04$), *Actinobacteria* $p = 0,004$ (*Amycolatopsis* $p = 0,04$).), *Fusobacterium* (*Leptotrichiaceae* $p = 0,04$) după tratament comparativ cu înainte (fig. 21*-25*).

Grupul G-DMT + HOM a prezentat o abundență relativă mai mică în unele componente *Firmicutes* (*Oscillospira* $p = 0,01$, *Lachnoclostridium* $p = 0,03$, *Lachnospiraceae* $p = 0,03$) și *Proteobacterii* (*Helicobacteraceae* $p = 0,01$, *Undibacterium* $p = 0,03$) după tratament de bază. Grupul doar cu tratament homeopat (G-HOM) a avut *Eubacterium oxidoreducens* redus după tratament, comparativ cu prima probă ($p = 0,03$) (fig. 25*-32*).

4. Discuții

Datele noastre nu au evidențiat schimbări majore în diversitate între pacienții cu SM și HC, înainte sau după orice fel de tratament. În comparație cu HC, pacienții netratați au prezentat o creștere pentru *Prevotella stercorea* și scăderea nivelurilor de *Actinobacteria* și *Faecalibacterium prausnitzii*. Modificările taxonomice după 2 luni de tratament au fost ușor diferite, cu niveluri crescute de *Gemella* și scăzute a celor de *Ruminococcus* la subiecții cu SM. Comparațiile între grupuri după tratament subliniază diferite modificări taxonomice. De exemplu, pacienții tratați cu tratament homeopat au avut o creștere pentru *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* și *Bacteroides* comparativ cu terapia combinată. De asemenea, au existat rezultate semnificative de diversitate beta pentru tratamentul cu homeopatie versus homeopatie combinată cu teriflunomidă și, de asemenea, pentru homeopatie versus interferon beta1a. Analizând modificările care au apărut în timp, între cele două probe, am observat o scădere a nivelurilor de *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae* și *Eubacterium oxidoreducens* în rândul pacienților cu SM tratați

comparativ cu proba lor inițială. Homeopatia a indus în timp reducerea *Eubacterium oxidoreducens*.

Există un consens că o microbiotă sănătoasă se caracterizează printr-un echilibru între microorganisme și gazdă, cu o mare diversitate, rezistență și stabilitate, pentru a menține homeostazia gazdei și funcțiile imune (Freedman et al., 2018). Deși factorii externi pot modifica rapid microbiota, bacteriile sănătoase stabile revin la compoziția lor originală și se schimbă doar prin obiceiuri persistente. O biodiversitate mai mare înseamnă diferențe mai mari de specii și astfel, mai multe funcții biologice pe care le pot exercita, o stabilitate mai bună, capacitatea de a rezista la schimbări și de a se recupera (Ricchio și Rossano, 2018). Disbioza se referă la un dezechilibru al compoziției bacteriene, cu o creștere a microorganismelor dăunătoare și o scădere a speciilor benefice cu o schimbare spre o stare inflamatoare (Freedman et al., 2018).

Observăm în profilurile de microbiotă ale grupurilor noastre de SM o creștere a *Firmicutes* și *Actinobacteria* și o scădere a filumului *Bacteroidetes*. Aceste modificări sunt specifice unei diete tipice occidentale bogate în grăsimi și zahăr, unde *Firmicutes* sunt mai capabili să extragă energie din alimente, favorizând creșterea în greutate. Pe de altă parte, o dietă bazată pe carbohidrați complecși, bogată în fibre, favorizează creșterea *Bacteroidetes* și a metaboliților benefici (Magne et al., 2020).

Terapiile SM ar putea modula microbiota intestinală, dar dovezile nu sunt bine stabilite în studiile pe oameni până acum. Interferonul beta inhibă celulele T și citokinele proinflamatorii, stimulează celulele T reglatoare și celulele B supresoare, modulează interacțiunea dintre microbi și celulele epiteliale și stabilizează bariera intestinală prin reglarea în creștere a proteinelor din joncțiunea strânsă în celulele endoteliale. Teriflunomida inhibă di-hidro-rotat-dehidrogenaza, sinteza de pirimidină și citokinele proinflamatorii și ar putea influența microbiomul intestinal prin suprimarea căii de semnalizare STAT-6, crescând celulele T reglatoare specifice (Camara-Lemarroy et al., 2018; Baecher-Allan et al., 2018).

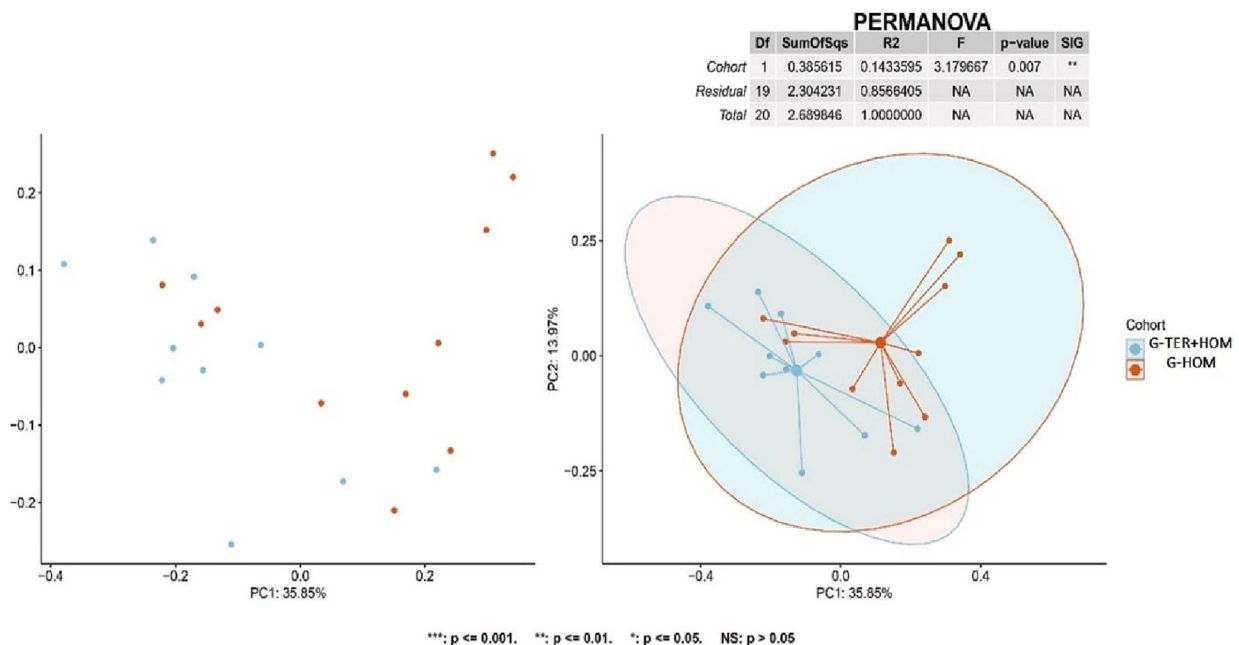


Fig. 1. Bray-Curtis Analiza coordonatelor principale (PCoA), homeopatie + teriflunomidă (G-TER + HOM) vs grup homeopatie (G-HOM), proba 2. Valoarea diversității Bray-Curtis cuantifică diferența dintre lotul cu homeopatie și teriflunomidă și grupul cu homeopatie, după 2 luni de tratament. Figura din dreapta arată o elipsă de încredere de 95% pentru fiecare grup. Rezultatele testului PERMANOVA sunt incluse în tabel.

4.1. Comparații între pacienții SM și HC la momentul inițial

În studiul nostru, niciuna dintre valorile de diversitate alfa sau beta nu a fost diferită semnificativ între pacienții cu SM și HC, înainte de a începe tratamentul. Acest lucru sugerează că microbiota pacienților cu SM nu prezintă semne de tendințe neobișnuite, corespunzând cercetărilor din literatură (Mirza și colab., 2020). La nivel de taxonomie, am observat mai multe organisme care au avut o abundență relativă semnificativ diferită între cazurile de SM și HC. *Actinobacteria* este un microorganism benefic care are un rol în formarea sistemului imunitar (Adamczyk-Sowa et al., 2017) și este mai scăzut în rândul pacienților cu SM. *Bifidobacterium* este scăzut în rândul grupei noastre cu SM. Literatura de specialitate oferă date contradictorii cu privire la rolul său în bolile imunitare, dar majoritatea studiilor au arătat că *Bifidobacterium* induce un răspuns imun antiinflamator (Budhram et al., 2017; Tankou et al., 2018). Genul *Prevotella* este o bacterie bine studiată în SM, implicată în metabolismul fitoestrogenului, în general acceptată ca fiind mai puțin răspândită în SM și mai prezentă la pacienții tratați (Chen et al., 2016; Brown et al., 2021). Pacienții noștri cu SM au prezentat niveluri mai mari ale unei specii în comparație cu HC, înainte sau după tratament, *Prevotella stercorea*, dar nu există date relevante despre genul *Prevotella*. Acest lucru se datorează probabil faptului că acest gen are mai multe specii cu roluri diferite (Mirza et al., 2020).

Unele bacterii metabolice pot influența direct sistemul nervos central, cum ar fi acidul gras cu lanț scurt (SCFA), care are un rol imunosupresor în mucoasa intestinală. *Faecalibacterium prausnitzii* și *Bacteroides coprophilus* participă la metabolismul SCFA (Freedman et al., 2018). *Bacteroides* este o bacterie benefică care promovează IL-10 și este în general prezentă în niveluri mai scăzute în cazurile de SM. *Faecalibacterium prausnitzii* este stabilit ca un marker pentru o microbiotă sănătoasă și este epuizat în rândul pacienților cu SM, așa cum se poate observa în literatură (Tremlett et al., 2016) și, de asemenea, în grupa noastră. Toate aceste diferențe în taxonomia bacteriană în comparație cu HC sugerează o disbioză pentru microbiota SM.

4.2. Comparație între grupuri după tratament

Când am analizat dacă tratamentul (de orice fel) pentru SM modifică semnificativ microbiomul, am subliniat că nu există o schimbare majoră a diversității alfa sau beta pentru pacienții cu SM comparativ cu HC, în cele 2 luni de la începerea oricărei forme de terapie, așa cum sugerează cercetările în literatură (Mirza et al., 2020). În ceea ce privește modificările taxonomiei, *Ruminococcus* este o bacterie benefică și este de obicei restaurată în cazurile de SM după DMT (Zhu et al., 2020), datele noastre reflectă o abundență relativă mai mică în rândul pacienților cu SM comparativ cu HC pentru a doua probă. *Clostridium* este o bacterie producătoare de butirat, implicată în producerea celulelor T reglatoare și a citokinei antiinflamatorii IL-10 (Miyake et al., 2015) și este redusă în rândul pacienților cu SM după tratament.

Diferențele dintre grupuri după 2 luni de terapie conturează o posibilă intervenție a factorilor de confuzie: DMT sau tratament homeopat asupra microbiomului intestinal. Homeopatia ar putea avea o influență asupra microbiotei intestinale, așa cum sugerează datele noastre. Modificări între pacienții care au primit orice formă de DMT (G-DMT) și o combinație de DMT și homeopatia (G-DMT + HOM) sunt subtile, dar observăm un număr mare de diferențe semnificative în ceea ce privește abundența relativă bacteriană între subgrupe, cu modificări parțial inconsistente și contradictorii. Perechea G-IFN și G-IFN + HOM subliniază o posibilă influență a homeopatiei asupra pacienților tratați cu interferon beta1a, în timp ce perechea G-TER și G-TER + HOM sugerează influența acesteia asupra pacienților cu teriflunomidă.

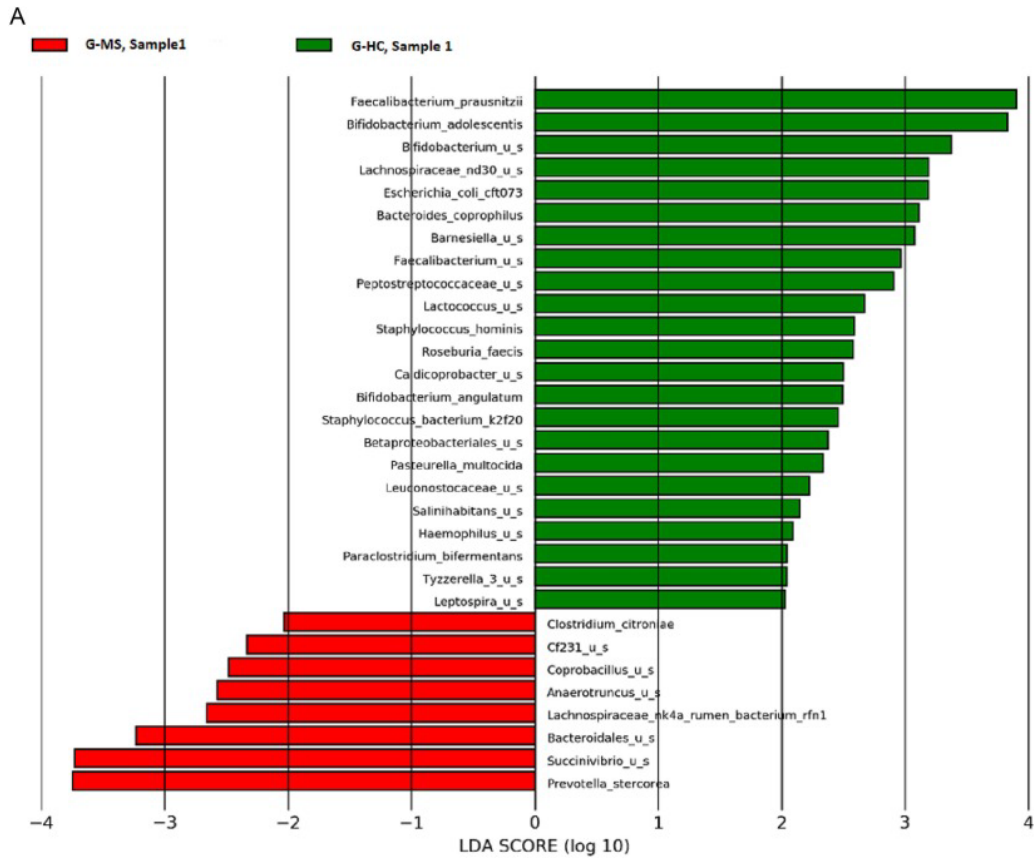


Fig. 2A. Linear Analiza lineară discriminatorie. Mărima efectului (Lefse) la nivel de specie între pacienții cu scleroză multiplă (G-MS) și martorii sănătoși (G-HC) înainte de orice tratament (proba 1).

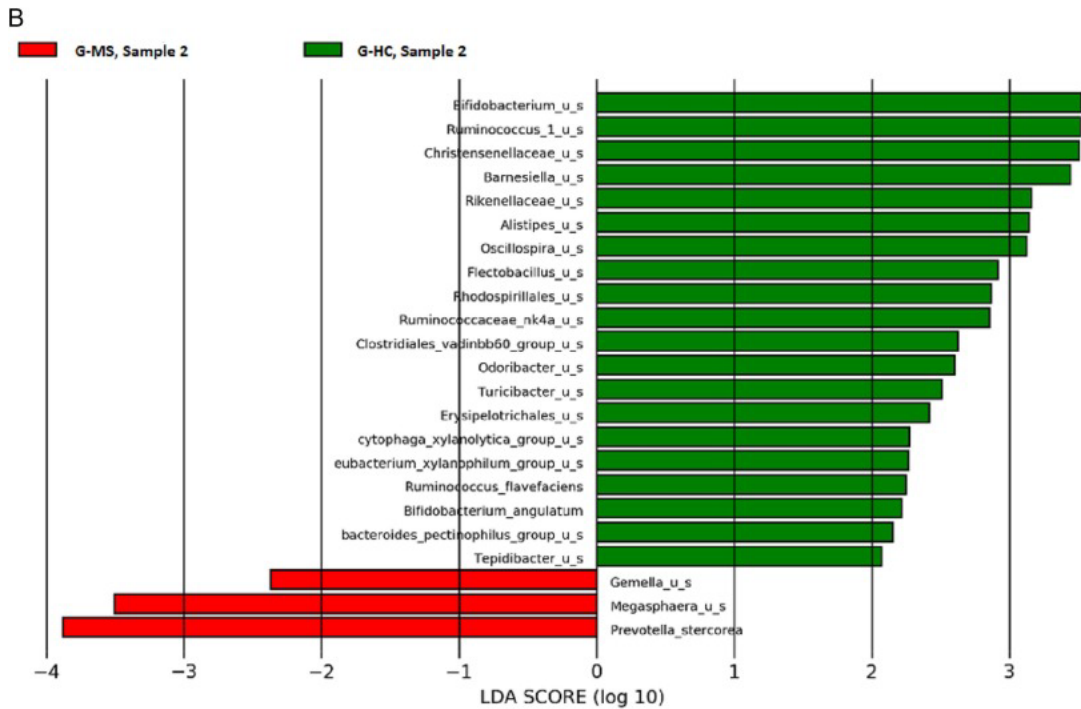


Fig. 2B. Analiză Lefse la nivel de specie între pacienții cu scleroză multiplă (G-MS) și martori sănătoși (G-HC) după 2 luni de tratament (proba 2).

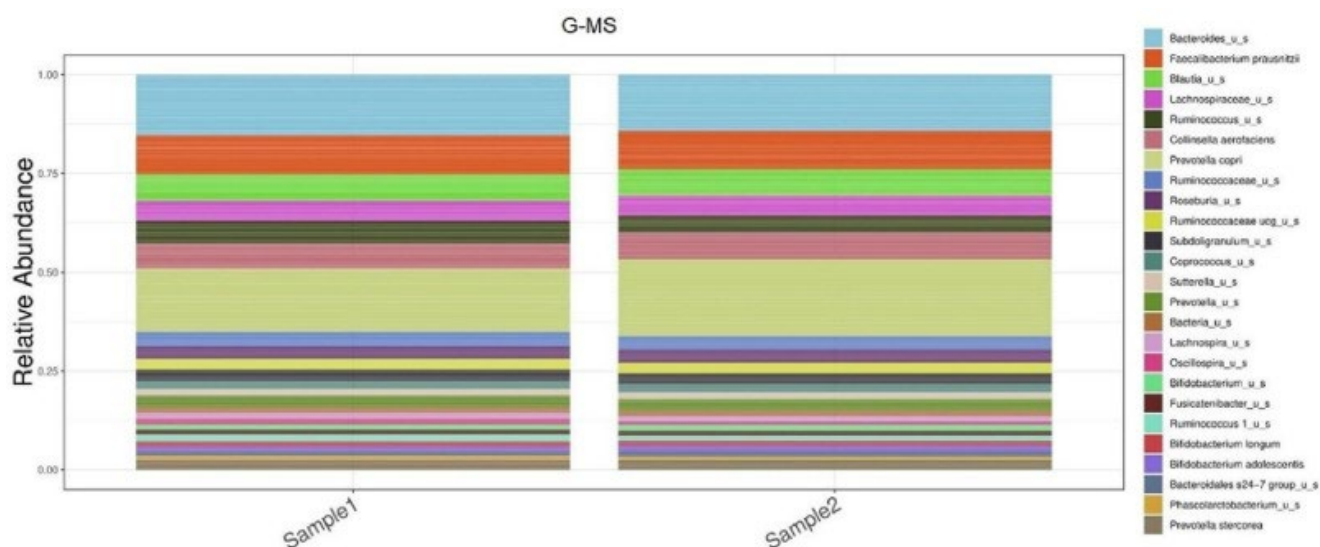


Fig. 3. Diagrame cu bare stivuite: comparație între eșantionul 1 și eșantionul 2 pentru grupul SM, primele 25 de specii.

În comparație cu terapia combinată, pacienții cărora li s-a administrat homeopatie au prezentat o creștere a *Akkermansia muciniphila*, o specie controversată, cu rol necunoscut în maturizarea imună, crescută în rândul pacienților cu SM netratați (Cekanaviciute et al., 2017). Experimentele *in vitro* subliniază rolul său pro-inflamator, dar studiile *in vivo* nu au reprodus aceste efecte, ci dimpotrivă, ar putea avea o funcție benefică pentru unele tulburări metabolice. Deși alegerea terapeutică nu a influențat diversitatea alfa pentru niciun grup, am găsit diferențe izolate în diversitatea beta, similare cercetării noastre din literatură (Mirza et al., 2020). Descoperirile noastre au fost legate de homeopatie și interferon beta1A ca tratamente care ar putea modifica diversitatea microbiomului. Diversitatea beta a grupului care a primit tratament homeopat a fost diferită de grupul tratat cu o combinație de homeopatie și teriflunomidă. De asemenea, grupul tratat cu homeopatie a avut o diversitate beta diferită de grupul tratat cu interferon beta1A, toate valorile p sunt prezentate în tabelul 3. Cu o valoare p nesemnificativă statistic de 0,06, aproape de 0,05, grupul cu tratament cu interferon a avut o valoare minoră. modificarea diversității beta în comparație cu grupul de interferon și homeopatie. Aceste rezultate sugerează că homeopatia ar putea avea un rol în diversitatea beta a pacienților cu SM, dar sunt necesare studii suplimentare.

Analizând abundența relativă în fila și speciile selectate, observăm o scădere pentru *Firmicutes* pentru grupul care primește terapia combinată comparativ cu alte grupuri, dar nesemnificativă statistic. *Firmicutes* sunt legate de timpi mai scurți de recidivă în SM (Sand și Baranzini, 2018), astfel combinarea acestor două terapii ar putea fi benefică în întârzierea progresului bolii.

Cele două bacterii benefice implicate în metabolismul SCFA, *Bacteroides* și *Faecalibacterium prausnitzii*, au abundențe relative similare pentru grupul HC și homeopatie, de aproximativ 12% pentru *Bacteroides* și respectiv 7% pentru *Faecalibacterium*. Acest lucru sugerează că tratamentul homeopat ar putea avea un rol în menținerea echilibrului acestor microorganisme sănătoase.

4.3. Comparație în timp (între al doilea și primul eșantion)

Modificările microbiomului în timp au fost analizate pentru grupul SM, unde rezultatele subliniază efectele tuturor tratamentelor aplicate în studiul nostru: DMT, homeopatie sau o

combinație a ambelor. Pacienții cu SM tratați au prezentat modificări bacteriene mai diverse, din multiple fila, ceea ce sugerează că tratamentul poate avea o influență pozitivă asupra microbiotei în general. Pacienții au avut o abundență relativă mai mică de *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*, *Eubacterium oxidoreducens* după tratament, așa cum era de așteptat din cercetările din literatură (Mirza et al., 2020). *Lachnospiraceae* este implicată în reducerea permeabilității mucoasei prin producția de SCFA și exprimarea crescută a proteinelor de joncțiune strânsă în celulele epiteliale (Rinninella et al., 2019).

Pentru cele două grupuri, inclusiv homeopatie, G-DMT + HOM și G-HOM, bacteriile mai răspândite înainte de tratament au fost atenuate în a doua probă. Acest lucru sugerează că tratamentul homeopat sau combinația sa cu DMT a avut un impact asupra microbiotei intestinale după 2 luni de tratament.

Efectul tratamentului homeopat asupra microbiotei intestinale în rândul pacienților cu SM nu a fost studiat și nu au fost găsite studii relevante pentru a compara descoperirile noastre. Pacienții noștri care au primit doar un tratament homeopat au prezentat o stabilitate relativă după 2 luni de tratament, cu singura modificare semnificativă statistic a *Eubacterium oxidoreducens*, mai puțin abundentă în a doua probă. De asemenea, în grupul tratat cu o combinație de terapii, există câteva specii bacteriene care au fost mai puțin abundente în a doua probă. Aceste rezultate sugerează că pacienții tratați cu homeopatie ar putea avea un microbiom mai stabil.

4.4. Puncte forte și limitări

Studiul nostru are o contribuție în acest domeniu medical deoarece analizează probele intestinale în dinamică, comparând nu numai expunerea la tratament, ci și schimbările care apar în timp. De asemenea, este unic și prin introducerea tratamentului homeopat ca posibil întemeietor.

Ca posibili factori de limitare, toți compușii de mediu și dietetici care pot interfera și modifica microbiota în 2 luni nu pot fi excluși sau cuantificați. Sunt necesare studii suplimentare.

5. Concluzii

Microbiota SM se caracterizează prin disbioză, cu diverse modificări taxonomice în comparație cu HC. La pacienții cu SM netratați găsim o abundență mai mare de *Prevotella stercorea* și o reducere a *Actinobacteria*, *Bifidobacterium* și *Faecalibacterium prauznitzii*. Tratamentul cu interferon beta1a, teriflunomidă sau homeopatie a implicat mai multe modificări taxonomice. Pacienții tratați cu SM au avut o microbiotă diferită față de HC, cu *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* și *Clostridiales* redus și o prevalență mai mare a *Gemella*, *Megasphaera* și *Prevotella stercorea*.

Comparând al doilea cu primul eșantion, am subliniat modificările în timp în microbiota SM, cum ar fi scăderea *Lachnospiraceae* și *Ruminococcus* și creșterea *Enterococcus faecalis*. Aceste modificări dinamice se pot datora tratamentului SM.

În general, expunerea la tratament a avut o influență mică asupra diversității microbiomului. Singurele modificări semnificative statistic ale diversității pe care le-am găsit au implicat efectul tratamentului homeopat asupra indicilor de diversitate beta, în comparație cu efectul medicamentelor imunomodulatoare. *Eubacterium oxidoreducens* a fost, de asemenea, redus după tratamentul homeopat. Rezultatele noastre sugerează că tratamentul homeopat are și un rol în influențarea microbiotei intestinale.

Acest studiu subliniază rolul important al microbiotei intestinale în SM și aduce în discuție căi suplimentare care trebuie studiate. Microbiomul este un ecosistem vast, influențat de numeroși factori care nu pot fi complet cuantificați. Proiectul nostru s-a concentrat pe schimbările dinamice ale microbiotei și pe posibila influență a unor DMT-uri specifice, precum și pe homeopatia ca medicină complementară și alternativă utilizată în practica clinică.

Finanțarea

Această cercetare nu a primit finanțare externă.

Aprobare etică

Studiul a fost realizat în conformitate cu Declarația de la Helsinki și aprobat de Comitetul de Etică al Spitalului Județean de Urgență Cluj, cod 2394/28.01.2020.

Declarație de consimțământ informat

Consimțământul informat a fost obținut de la toți subiecții implicați în studiu.

Declarație de contribuție a autorului CREDIT

Vitalie Vacaraș: Conceptualizare, Metodologie, Resurse, Redactare – revizuire & editare, Supraveghere. **Dafin F. Mureșanu:** Conceptualizare. **Anca-Dana Buzoianu:** Conceptualizare. **Cristina Nistor:** Metodologie, Resurse, Analiză formală, Scriere – revizuire și editare. **Ștefan Cristian Vesa:** Scriere – schiță originală, Scriere – revizuire și editare, Supraveghere. **Andreea Cristina Paraschiv:** Metodologie, Resurse, Analiză formală. **Daniela Botos-Vacaraș:** Metodologie, Resurse. **Cristiana Vacaraș:** Metodologie, Resurse. **George Vithoukas:** Conceptualizare, Supraveghere.

Declarație de interese concurente

Autorii nu declară niciun conflict de interese.

Disponibilitatea datelor

Datele și alte informații ale acestui studiu sunt disponibile de la autorul corespunzător la cerere, din cauza problemelor de confidențialitate.

Mulțumiri

Apreciem ajutorul laboratorului CosmosID pentru analiza probelor noastre și pentru suportul analizelor statistice.

Anexa A. Date suplimentare

Date suplimentare la acest articol pot fi găsite online la <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2023.578087>

Referințe

- 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-Lemarroy, C.R., Metz, L., Meddings, J.B., Sharkey, K.A., Wee, Yong V., 2018 Jul 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., 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.

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., Zuccalà, 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.

Manzalini, 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 Scler. 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., Fadrosh, D.W., Faruqi, A.A., Zhu, F., Hart, J., Roalstad, S., et al., 2016 Aug. Gut microbiota in early pediatri *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.