

Per quanto riguarda **NK CD8⁺**, si osserva (*figura 18*) invece un pattern inverso: i valori risultano significativamente più bassi nel gruppo Anti-CD20 rispetto a NT e S1P (valori mediani: 39.8, 48.9 e 54.5; KW $p = 0.0165$).

SCFA: il butirrato è specificamente elevato nel gruppo Anti-CD20 indipendentemente dagli altri immunosoppressori

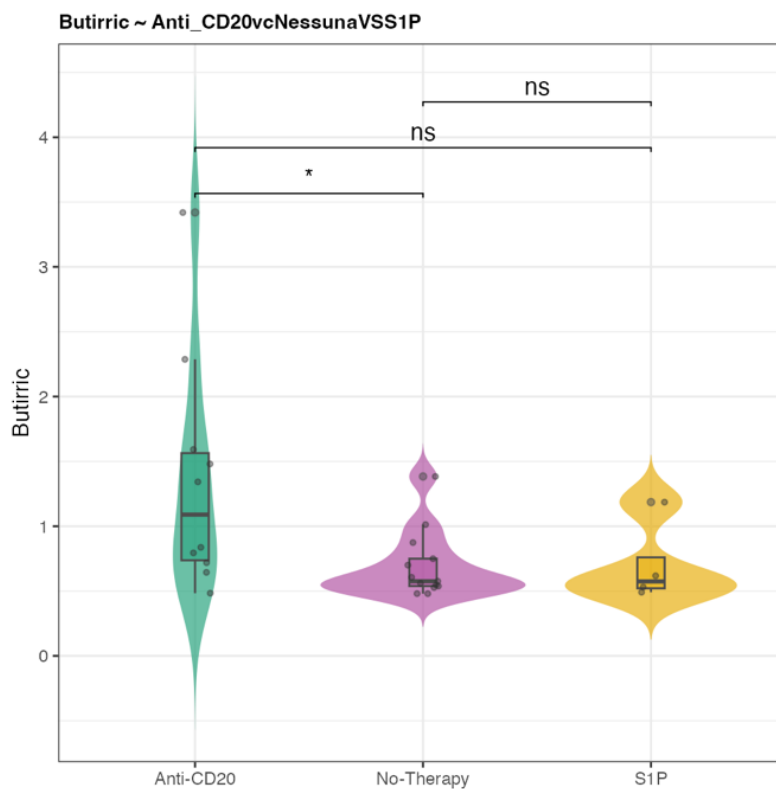


Figura 19

Il butirrato mostrava livelli significativamente più elevati nel gruppo Anti-CD20 rispetto sia ai NT sia ai pazienti con modulatori S1P ($p=0,0426$). Questo risultato conferma che l'arricchimento del butirrato fecale è specificamente associato alla terapia Anti-CD20, indipendentemente da altri farmaci immunosoppressori. Gli altri SCFA non presentavano differenze significative tra i tre gruppi (*figura 19*).

Metaboliti del triptofano: metaboloma del triptofano non discrimina Anti-CD20, NT e S1P nel confronto a tre gruppi

Il confronto a tre gruppi tra Anti-CD20, non trattati (NT) e modulatori S1P non ha evidenziato differenze statisticamente significative nei metaboliti del triptofano. I valori dei metaboliti della via chinureninica e indolica erano comparabili tra i tre gruppi.

Pazienti in terapia Anti-CD20 vs terapia moderata vs non trattati

Fenotipo delle cellule NK: attivazione NK CD69+ comune ai pazienti trattati rispetto ai non trattati

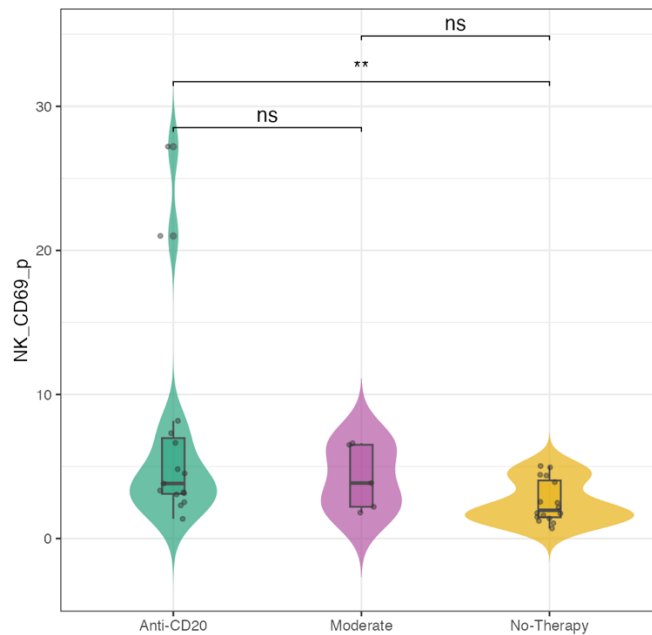


Figura 21

Nell'analisi citofluorimetrica, NK CD69⁺ risulta significativamente più elevata in entrambi i gruppi trattati rispetto ai non trattati (valori mediani: Anti-CD20 3.82, Moderata 3.85, NT 1.96; KW $p = 0.023$), con i due gruppi in terapia che mostrano livelli quasi raddoppiati rispetto al gruppo NT (*figura 21*).

Il trend suggerisce che la terapia farmacologica, indipendentemente dall'intensità, sia associata a un incremento dell'attivazione delle cellule Natural Killer. Per NKG2C⁺, il gruppo con terapia moderata presenta i valori più elevati (mediana 14.1), mentre il gruppo Anti-CD20 (mediana 4.73) mostra livelli persino inferiori ai non trattati (mediana 8.62); la differenza non raggiunge la significatività statistica nominale, pur con un p molto prossimo alla soglia (KW $p = 0.067$).

SCFA: gradiente con andamento crescente dell'acido valerico

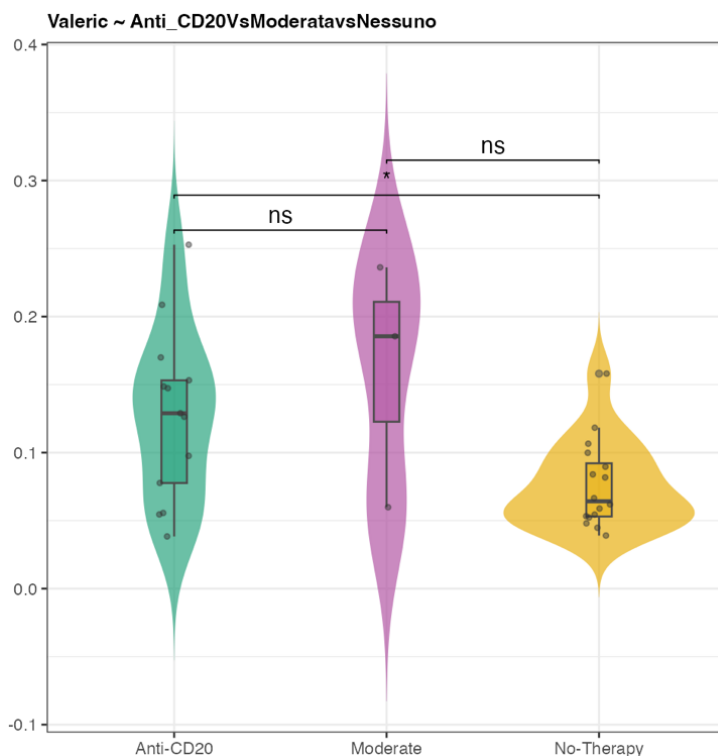


Figura 22

Nell'analisi metabolomica (*figura 22*) degli SCFA, l'acido valerico risulta più elevato nei pazienti trattati, con i valori più alti nel gruppo a terapia moderata (mediana 0.186), intermedi nel gruppo Anti-CD20 (mediana 0.129) e più bassi nei non trattati (mediana 0.064; KW $p = 0.034$). Un trend analogo si osserva per l'acido butirrico, con livelli più elevati nei gruppi trattati (Anti-CD20: 1.09; Moderata: 0.938) rispetto ai non trattati (0.576), sebbene la differenza si avvicini alla significatività senza raggiungerla (KW $p = 0.068$).

Va sottolineato che la durata di malattia alla diagnosi differisce significativamente tra i gruppi (Anti-CD20: 23 mesi; Moderata: 37 mesi; NT: 39 mesi; KW $p = 0.030$), rappresentando un potenziale fattore confondente: non è possibile escludere che i trend osservati per i marcatori NK o per i metaboliti SCFA riflettano in parte la precocità diagnostica nei pazienti in terapia Anti-CD20 piuttosto che l'effetto diretto del farmaco.

Metaboliti del triptofano sovrapponibili tra i tre gruppi

Il confronto tra Anti-CD20, terapia moderata (Teriflunomide, Dimetilfumarato, Interferone beta) e NT non ha mostrato differenze significative nei metaboliti del

triptofano. La distribuzione dei metaboliti chinurenici e indolici risultava sovrapponibile tra i tre gruppi, indicando che l'effetto sul metaboloma triptofanico non differenzia il profilo delle terapie moderate rispetto ai non trattati.

Analisi integrata multiomics: valerico e CD69+ discriminano i gruppi; asse NK-SCFA-triptofano emerge nell'integrazione multiomics

L'analisi multivariata DIABLO ha consentito di identificare pattern di separazione tra i gruppi terapeutici che non emergevano dalla sola analisi univariata.

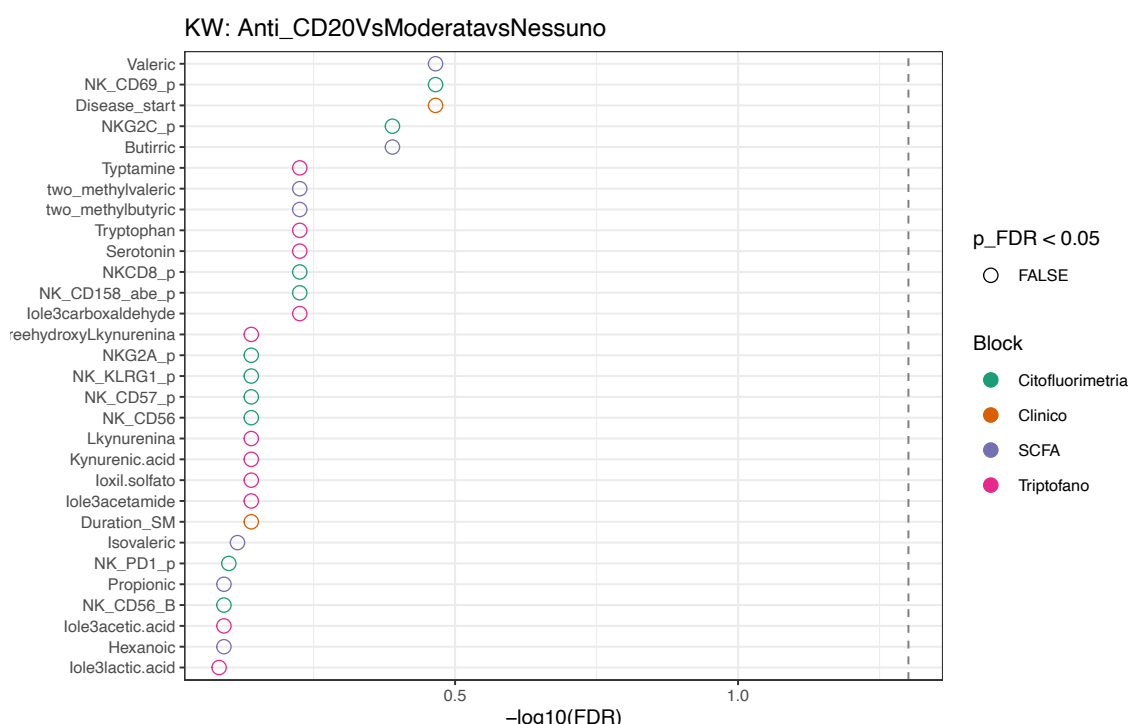


Figura 23

Al fine di identificare le variabili con il maggiore contributo discriminante tra i gruppi nel modello multivariato, è stato generato un dot plot DIABLO (figura 23). Ogni punto rappresenta una variabile; la sua distanza dall'origine indica il peso nel componente latente, ovvero la capacità di separare i gruppi nello spazio multiomics integrato. Nel dot plot multivariato, i parametri con il contributo discriminante più marcato tra i tre gruppi risultano essere l'acido valerico e NK CD69⁺, confermando questi due marcatori come i più interessanti nella distinzione del profilo immunometabolico associato alla terapia.

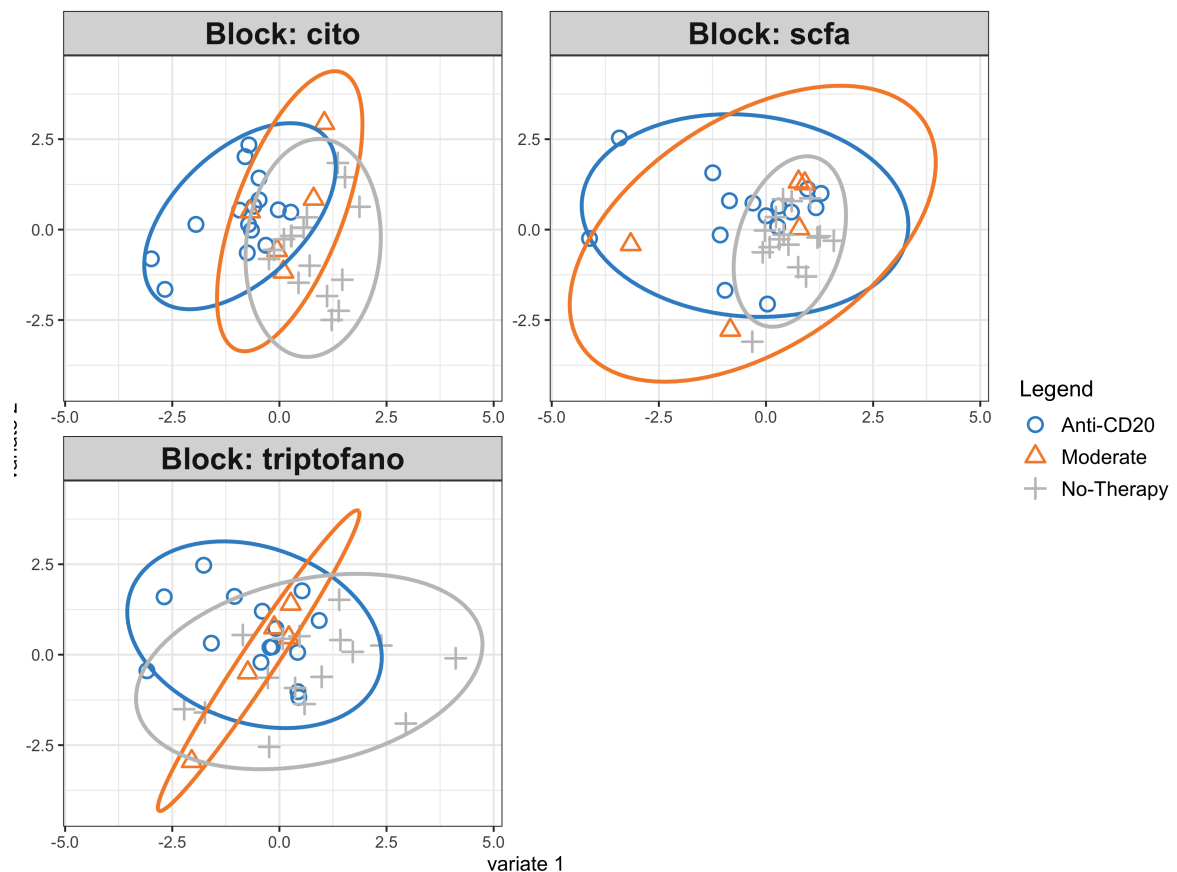


Figura 24

Per valutare la separazione multivariata per ciascun blocco omico separatamente, è stato generato un sample plot per blocco. Ogni soggetto è rappresentato come punto nello spazio dei componenti latenti del proprio blocco (citofluorimetria, triptofano, SCFA); le ellissi di confidenza al 95% illustrano la coerenza interna di ciascun gruppo. Questo approccio permette di identificare quale dominio omico contribuisce maggiormente alla separazione tra i gruppi.

Nel Sample plot (figura 24) per blocco, il blocco citofluorimetrico mostra la separazione più netta: i pazienti Anti-CD20 e Moderata tendono a raggrupparsi nella porzione superiore sinistra dello spazio multivariato, mentre i No-Therapy risultano spostati verso destra, suggerendo che il profilo immunologico globale si modifica in modo coerente con l'esposizione terapeutica. Il blocco triptofano evidenzia una separazione lungo il primo vettore (variante 1, ovvero asse delle ascisse) discriminante tra il gruppo Anti-CD20 e i No-Therapy: pur in assenza di significatività dei singoli metaboliti all'analisi univariata, la loro azione combinata genera una distinzione rilevabile tra pazienti in terapia biologica e non trattati. Il blocco SCFA presenta invece la maggiore dispersione interna, con l'ellisse del gruppo a terapia moderata particolarmente ampia, indicativa di elevata variabilità individuale o della ridotta numerosità campionaria di quel gruppo.

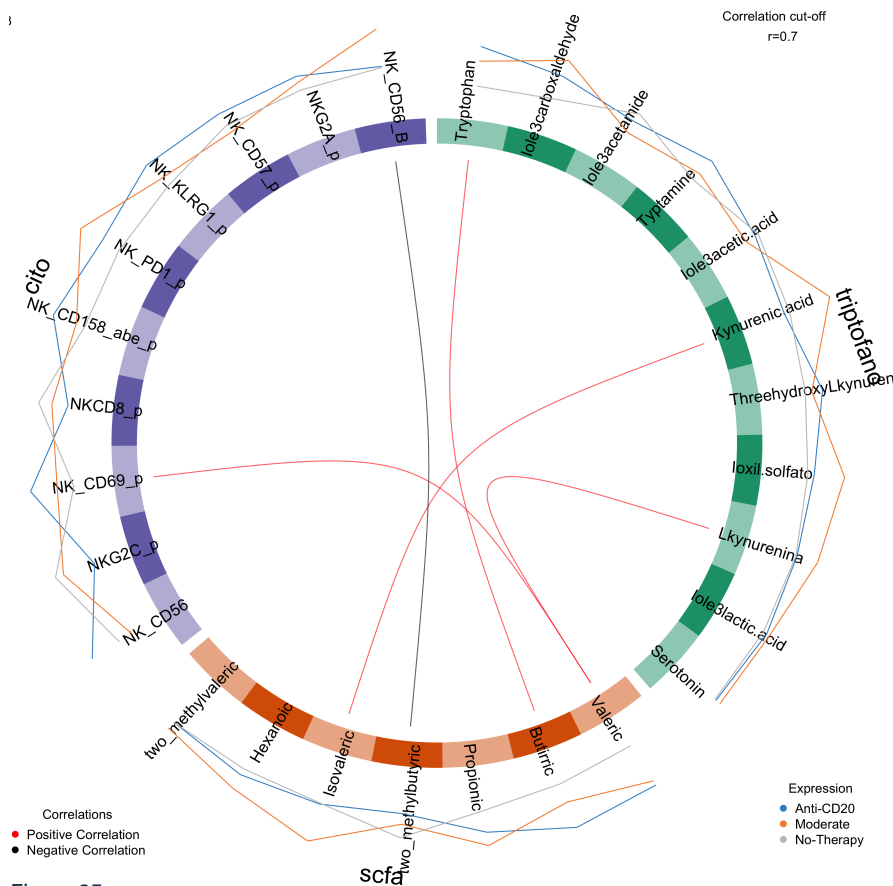


Figura 25

Le connessioni tra questi tre domini emergono nel circo plot (figura 25), che visualizza le correlazioni inter-omiche più rilevanti. L'acido isovalerico mostra una correlazione positiva con l'acido chinourenico. L'acido butirrico correla positivamente con il triptofano. Il 2-metilbutirrico, che risulta più elevato nel gruppo No-Therapy e più basso negli Anti-CD20, presenta una correlazione negativa con le cellule NK CD56bright. Infine, si delinea un asse correlativo che collega NK CD69⁺, acido valerico e L-chinourenico in sequenza positiva, suggerendo una possibile interazione funzionale tra l'attivazione delle cellule Natural Killer e il metabolismo del triptofano mediata dagli SCFA.

Pazienti in terapia Anti-CD20 verso pazienti non trattati

Nel confronto diretto tra il gruppo Anti-CD20 e i pazienti No-Therapy, diversi parametri raggiungono la significatività statistica nominale nel test KW.

Fenotipo delle cellule NK: CD69+ aumentato e NKG2C+ ridotto nel gruppo Anti-CD20 rispetto ai non trattati

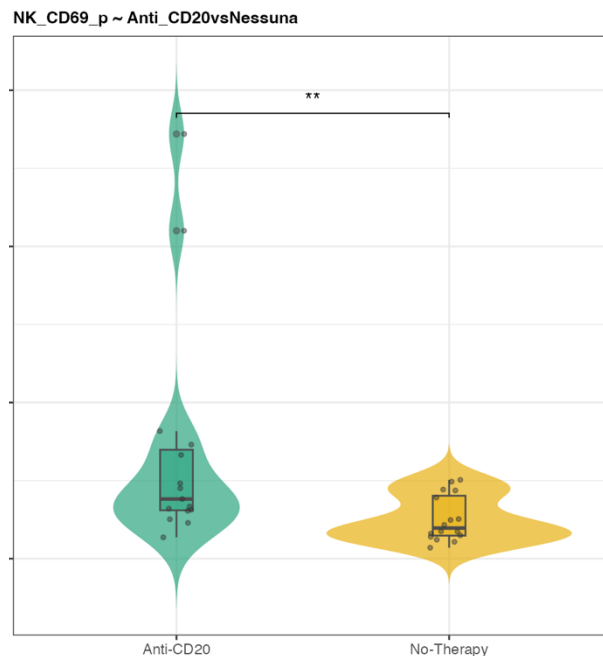


Figura 26

Nell'analisi citofluorimetrica (figura 26), NK CD69⁺ risulta significativamente più elevata nel gruppo Anti-CD20 rispetto ai non trattati (mediane: 3.82 vs 1.96; KW p = 0.0102), confermando uno stato di maggiore attivazione delle cellule NK in associazione al trattamento.

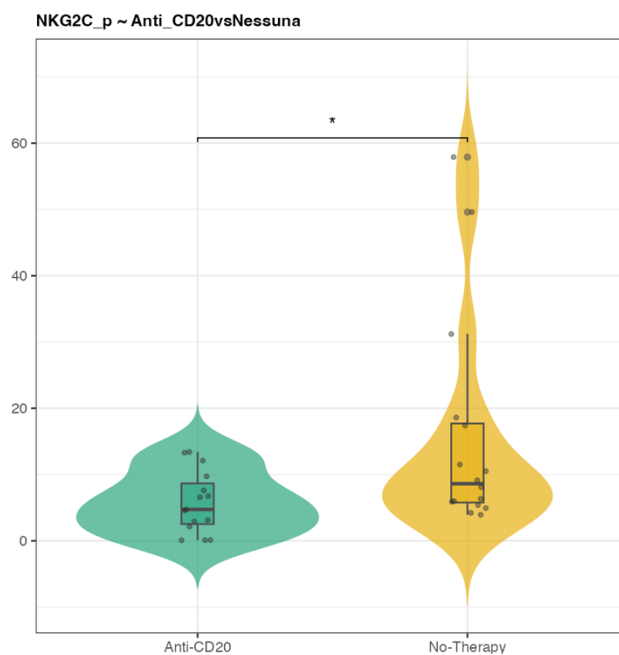


Figura 27

NKG2C⁺ mostra (figura 27) invece un pattern inverso, con valori più bassi nel gruppo Anti-CD20 rispetto ai NT (mediane: 4.73 vs 8.62; KW $p = 0.0362$), suggerendo un differente orientamento del compartimento NK in risposta alla terapia biologica.

SCFA: Butirrato e valerico entrambi significativamente piu' elevati nel gruppo Anti-CD20

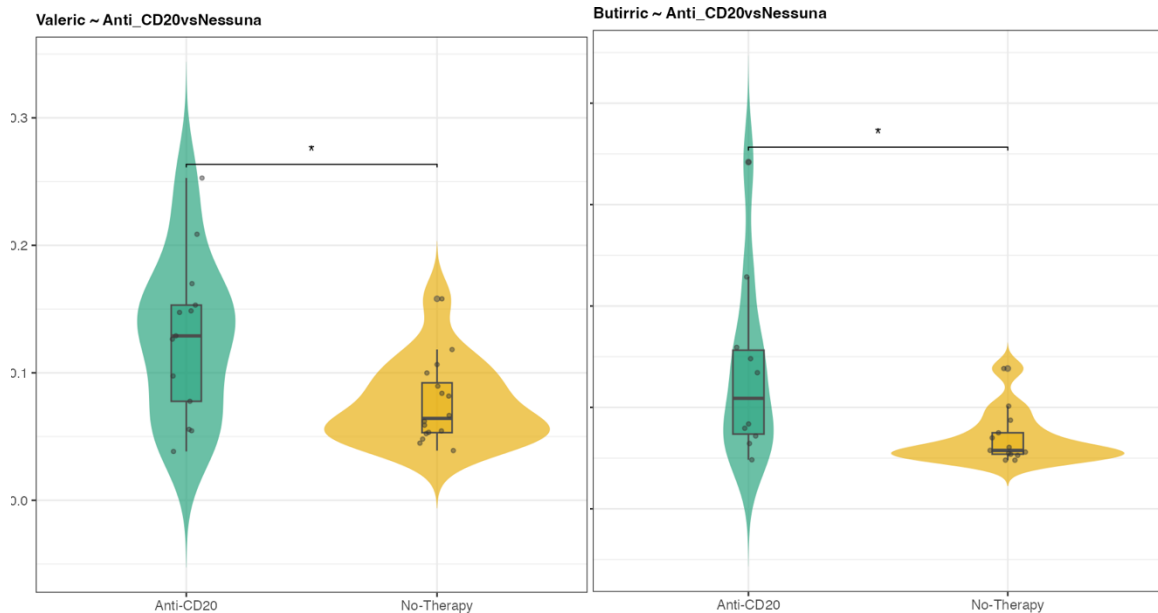


Figura 28

Figura 29

Nell'analisi degli SCFA, sia l'acido butirrico (figura 28) che l'acido valerico (figura 29) risultano significativamente più elevati nel gruppo Anti-CD20 (butirrico: 1.09 vs 0.576, $p = 0.0184$; valerico: 0.129 vs 0.064, KW $p = 0.0226$). Il butirrato, noto per le sue proprietà antinfiammatorie e per il ruolo nel mantenimento dell'integrità della barriera intestinale, suggerisce che i pazienti trattati con Anti-CD20 possano presentare un profilo metabolico intestinale potenzialmente più protettivo rispetto ai non trattati.

Metaboliti del triptofano: il triptofano risulta più elevato nei pazienti Anti-CD20 rispetto ai non trattati

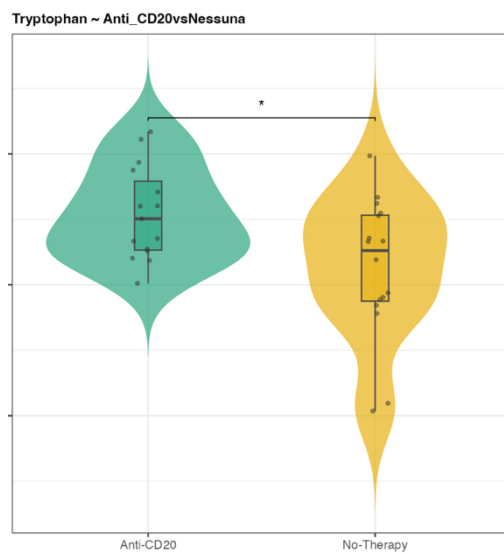


Figura 30

I livelli plasmatici di triptofano (*figura 30*) risultano significativamente più elevati nel gruppo Anti-CD20 rispetto ai No-Therapy (mediane: 60.17 vs 50.43; KW $p = 0.0438$), suggerendo un'alterazione della disponibilità del precursore lungo la via metabolica del triptofano in associazione alla terapia.

Metaboliti del triptofano: il triptofano risulta più elevato nei pazienti Anti-CD20 rispetto ai non trattati

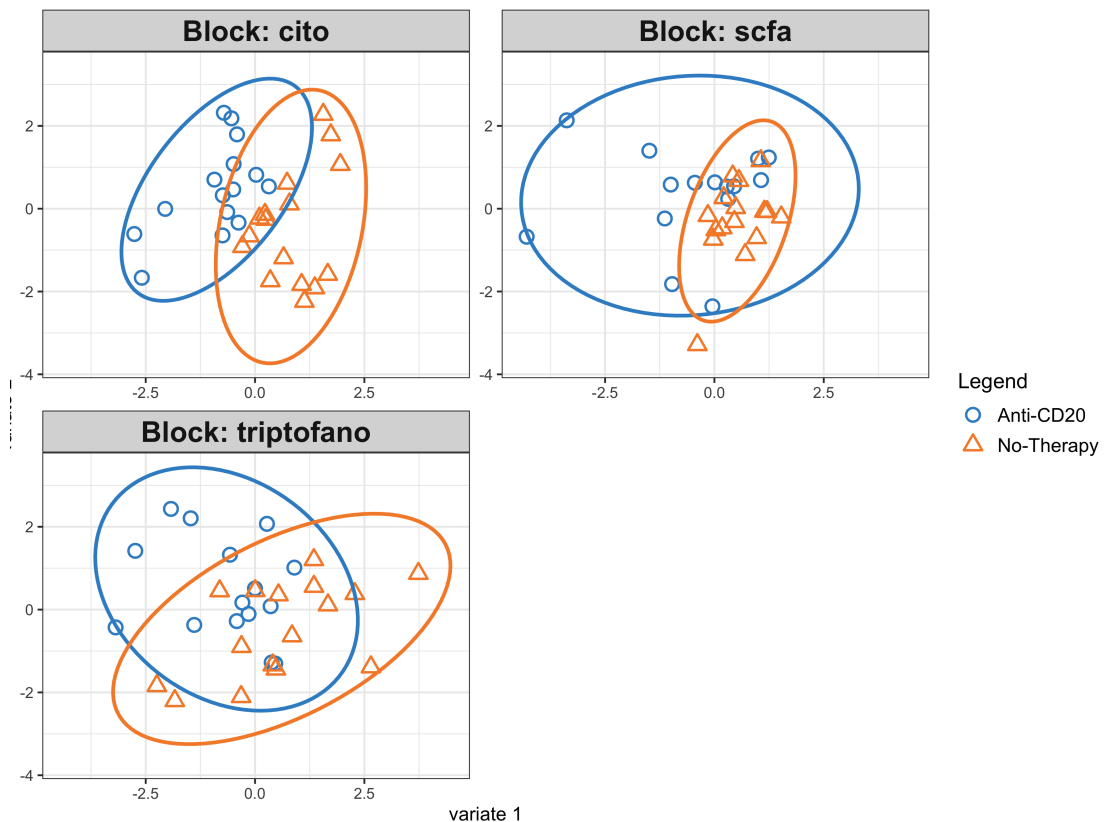


Figura 31

Nel Sample plot (*figura 31*), il blocco citofluorimetrico mostra la separazione più netta tra i due gruppi, con i pazienti Anti-CD20 raggruppati nella porzione sinistra dello spazio multivariato e i No-Therapy a destra lungo il primo vettore discriminante. Il blocco SCFA evidenzia un fenomeno di particolare interesse: il gruppo No-Therapy presenta un'ellisse compatta, indicativa di un profilo di acidi grassi a catena corta omogeneo tra i pazienti non trattati, mentre il gruppo Anti-CD20 mostra una dispersione marcata, suggerendo che l'impatto della terapia sul microbiota intestinale sia altamente variabile tra i singoli pazienti. Il blocco triptofano risulta il meno discriminante, con le ellissi dei due gruppi sostanzialmente sovrapposte, confermando che la via metabolica del triptofano, considerata isolatamente, non è sufficiente a distinguere in modo affidabile i due gruppi.

stratificato permette di identificare alterazioni metaboliche e immunologiche associate alle differenti fisiopatologie della SM.

Forme recidivante-remittente, secondariamente progressiva e primariamente progressiva

Nel confronto tra i tre gruppi clinici, l'analisi univariata identifica alcune associazioni di interesse nominale.

SCFA: Il propionato è ridotto nella forma PP rispetto a RR e SP

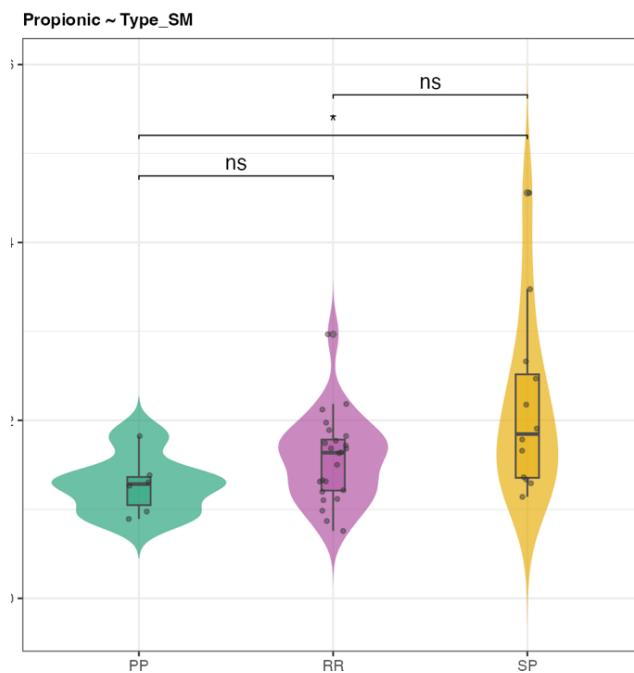


Figura 33

Nell'analisi degli SCFA, l'acido propionico (*figura 33*) risulta diversamente distribuito tra i gruppi (mediana PP=1.284 vs RR=1.636 vs SP=1.846; KW $p = 0.03467$).

Metaboliti del triptofano: l'indolo-3-acetammide differisce tra le forme di malattia

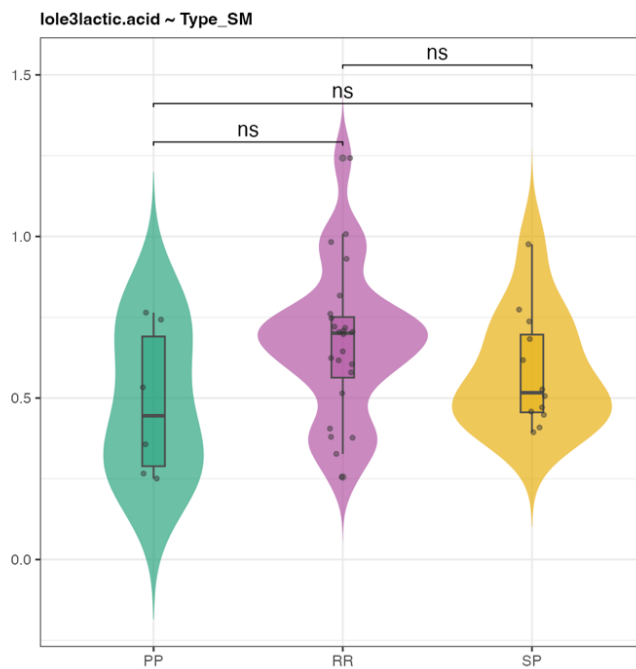


Figura 34

Nell'analisi dei metaboliti del triptofano (*figura 34*), l'indolo-3-acetammide mostra una distribuzione significativamente differente tra i gruppi (mediana PP=0.004 vs RR=0.004 vs SP=0.002; KW $p = 0.03467$);).

Fenotipo delle cellule NK: nessuna differenza significativa nel fenotipo NK tra le tre forme cliniche

Nessun marcatore NK mostrava differenze statisticamente significative tra le tre forme di malattia dopo correzione per test multipli. Questo risultato suggerisce che le alterazioni del fenotipo NK nella SM siano prevalentemente associate all'esposizione terapeutica e al processo di invecchiamento piuttosto che alla specifica forma clinica.

Analisi integrata multiomics: l'indolo-3-acetammide si associa inversamente agli SCFA e al subset NK senescente

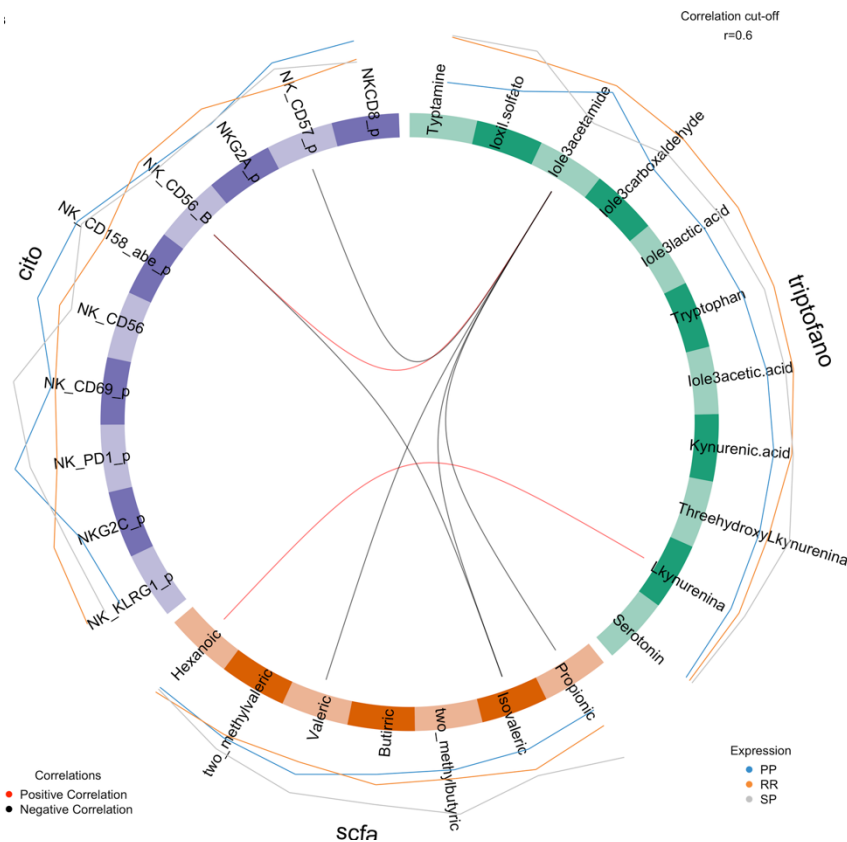


Figura 35

Nel circos plot (figura 35) relativo al confronto PP vs RR vs SP (soglia $r = 0.06$), emergono correlazioni di particolare interesse. L'indolo-3-acetamide mostra correlazioni negative con l'acido valerico, l'acido isovalerico, l'acido propionico e NK CD57⁺, suggerendo che a livelli più elevati di questo metabolita corrispondano concentrazioni ridotte di SCFA a catena ramificata e una minore espressione del marcatore di maturità/senescenza NK. In direzione opposta, l'indolo-3-acetamide correla positivamente con NK CD56^{bright}.

Forme ad elevata componente infiammatoria (RR e SP) versus forma primariamente progressiva (PP)

La triptamina risulta significativamente più elevata nel gruppo RR+SP rispetto ai pazienti PP (KW $p = 0.01768$), nonostante i valori assoluti siano di entità molto modesta. Analogamente, l'indolo-3-carbossalide mostra una distribuzione significativamente differente tra i gruppi (KW $p = 0.03709$), con concentrazioni più elevate nelle forme

recidivante-remittente e secondariamente progressiva rispetto alla forma primariamente progressiva.

L'indolo-3-acetamide nel confronto RR vs SP+PP mostra una tendenza non significativa (KW $p = 0.05827$), con valori medi praticamente sovrapponibili tra i gruppi (RR = 0.004, SP+PP = 0.004), e non raggiunge la soglia di significatività statistica nominale.

Nel circos plot relativo a questo confronto, nessuna correlazione inter-blocco supera la soglia prespecificata, indicando che le differenze osservate nei metaboliti del triptofano tra le forme cliniche non si traducono in pattern di covariazione strutturata con i blocchi SCFA e citofluorimetrico a livello multivariato.

11.2.3 Metaboliti derivati dal microbiota e fenotipo NK in pazienti di diversa età

Per esplorare l'effetto dell'età sull'asse microbiota-immunità innata nella SM, la popolazione è stata stratificata in due sottogruppi estremi: pazienti di età inferiore a 40 anni ($n=10$) e pazienti di età superiore a 60 anni ($n=11$), escludendo la fascia intermedia per massimizzare la separazione biologica. Questo approccio permette di distinguere le alterazioni associate all'immunosenescenza da quelle legate alla progressione di malattia.

Pazienti di età inferiore a 40 anni versus pazienti di età superiore a 60 anni

Fenotipo delle cellule NK: CD57⁺ e immunosenescenza NK negli Over 60; KLRG1⁺ e CD56^{bright} negli Under 40

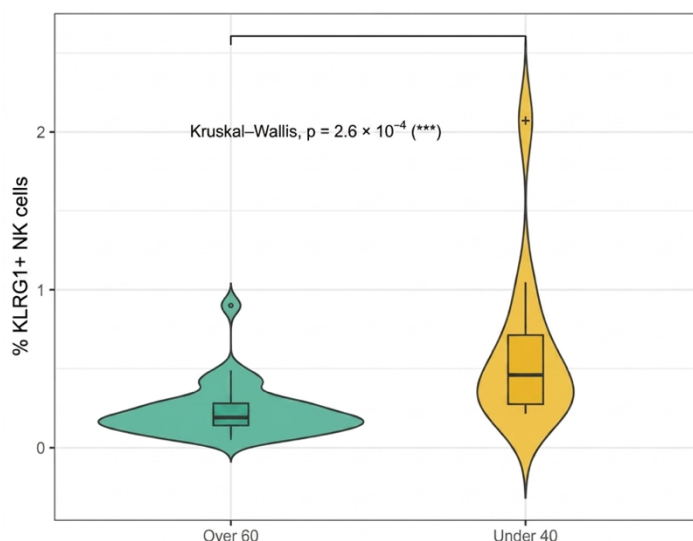


Figura 36

Nella distribuzione per età (*figura 36*) e confrontando il gruppo under 40 con il gruppo over 60, emergono differenze interessanti nel compartimento delle cellule NK. Il marcatore con la maggiore capacità discriminante tra i due gruppi è risultato NK KLRG1⁺, che mostra la differenza statistica più robusta (KW p=0.0003), con valori significativamente più elevati nel gruppo più giovane.

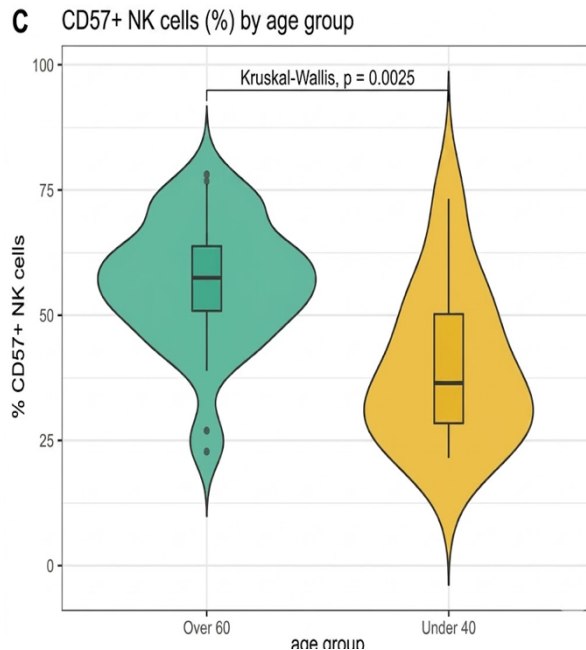


Figura 37

All'estremo opposto (*figura 37*), NK CD57⁺, marcatore consolidato di immunosenescenza, risulta più rappresentato nel gruppo anziano, con una mediana superiore rispetto agli under 40 (56.161 vs 39.733, KW p=0.0025), dato biologicamente atteso e coerente con il progressivo accumulo di cellule NK terminalmente differenziate nel corso dell'invecchiamento.

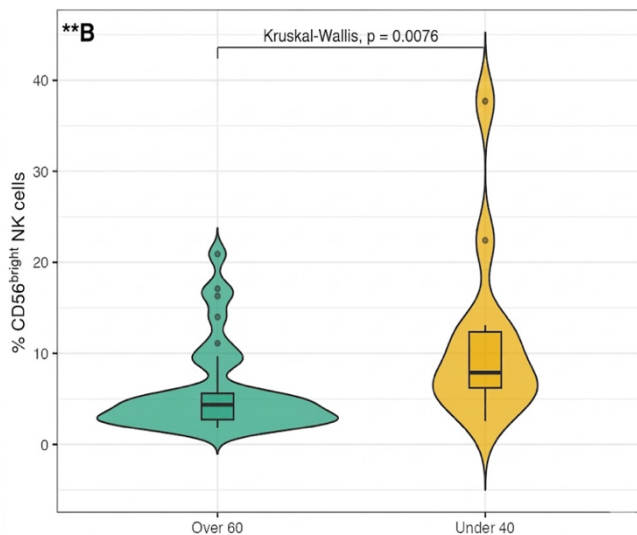


Figura 38

Anche la sottopopolazione (figura 38) NK CD56^{bright} mostra una differenza rilevante (KW $p=0.0076$), con valori più elevati negli under 40 (mediana 11.49 vs 5.948 negli over 60). Questa osservazione è di particolare interesse, poiché le NK CD56^{bright} rappresentano la sottopopolazione funzionalmente più attiva, con spiccate capacità citotossiche e immunoregatorie: la loro riduzione con l'avanzare dell'età si iscrive coerentemente nel quadro di contrazione funzionale del compartimento NK associata all'immunosenescenza.

I restanti marcatori analizzati tra cui NKG2A⁺, NK CD56, NK CD8⁺, NK CD158a/b/e⁺, NK PD1⁺, NK CD69⁺ e NKG2C⁺ non raggiungono la significatività statistica, con p nominali compresi tra 0.47 e 0.88, suggerendo che le differenze legate all'età nel compartimento NK siano selettive e non investano uniformemente tutte le sottopopolazioni.

Metaboliti del triptofano: la via chinureninica (IDO) è più attiva nei pazienti Over 60

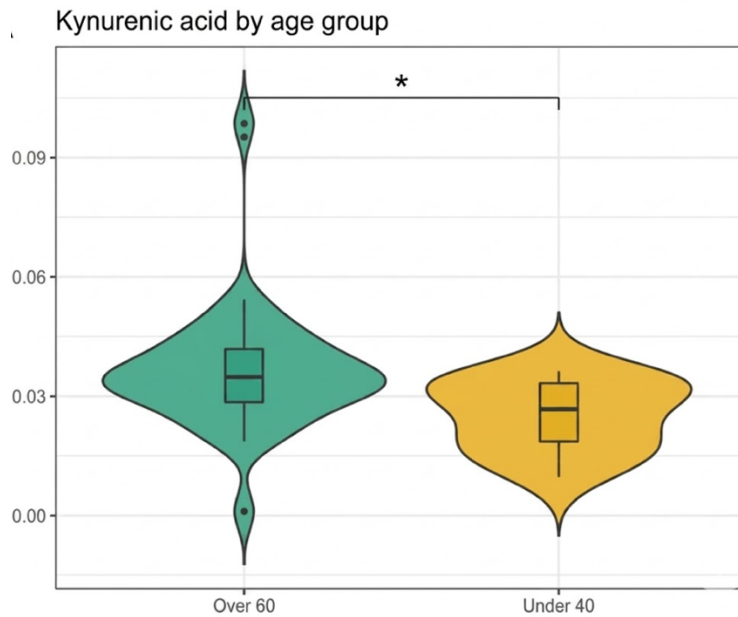


Figura 39

L'Acido chinurenico (figura 39) raggiunge la significatività statistica ($p=0.0082$, $FDR=0.0574$) con mediana superiore negli Over 60 (0.036 vs 0.025), suggerendo una maggiore attivazione della via delle chinurenine nel gruppo anziano.

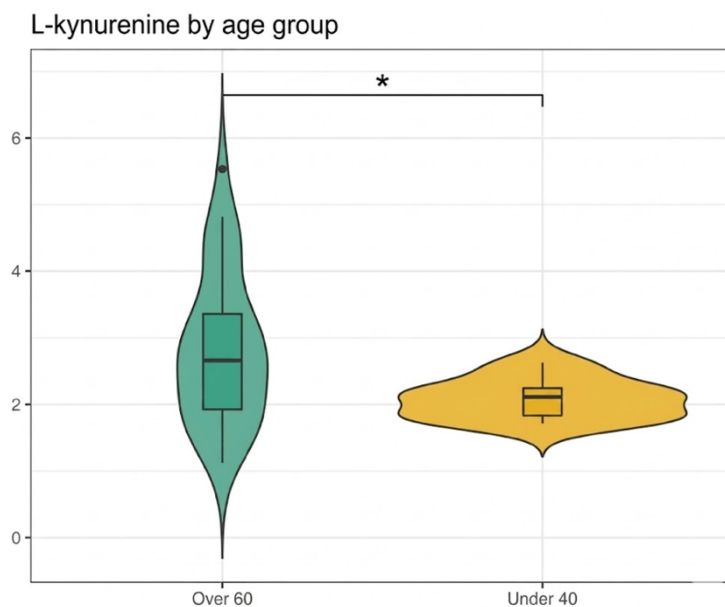


Figura 40

La L-kinurenina (figura 40) mostra una differenza statisticamente significativa ($p=0.0453$) con mediana più elevata negli Over 60 (2.825 vs 2.081), in linea con una maggiore attività dell'enzima indolamina 2,3-diossigenasi (IDO) negli individui anziani.

Il **triptofano** risulta superiore negli Under 40 (mediana 62.837 vs 52.382) senza raggiungere la significatività ($p=0.0903$), suggerendo comunque un trend verso una maggiore disponibilità del precursore nei soggetti giovani.

Gli altri metaboliti del percorso indolico (indossil solfato, 3-OH-L-kinurenina, indolo-3-carbossaldeide, indolo-3-acetamide, triptamina, serotonina, indolo-3-acido lattico) non mostrano differenze rilevanti tra i gruppi (p 0.43–0.98).

SCFA: Nessuna differenza significativa negli SCFA tra le due fasce d'età

Nessun acido grasso a catena corta raggiunge la significatività statistica nel confronto per fascia d'età. Tuttavia, emergono trend descrittivi rilevanti:

-**Esanoico** presenta una mediana tendenzialmente superiore negli Under 40 (0.471 vs 0.425, $p=0.2669$).

- **2-metilbutirrico** mostra mediana superiore negli Over 60 (0.182 vs 0.142, $p=0.241$), orientato verso il gruppo anziano.

- **Valerico** risulta anch'esso tendenzialmente più elevato negli Over 60 (0.108 vs 0.087, $p=0.3937$).

- **Butirrico**, propionico e isovalerico non mostrano differenze di rilievo tra i gruppi.

Nell'analisi multivariata DIABLO, si sono identificati i seguenti dati.

Analisi integrativa multiomics: L'esanoico correla negativamente con CD57+ e chinurenina, il 2-metilbutirrato con L-chinurenina

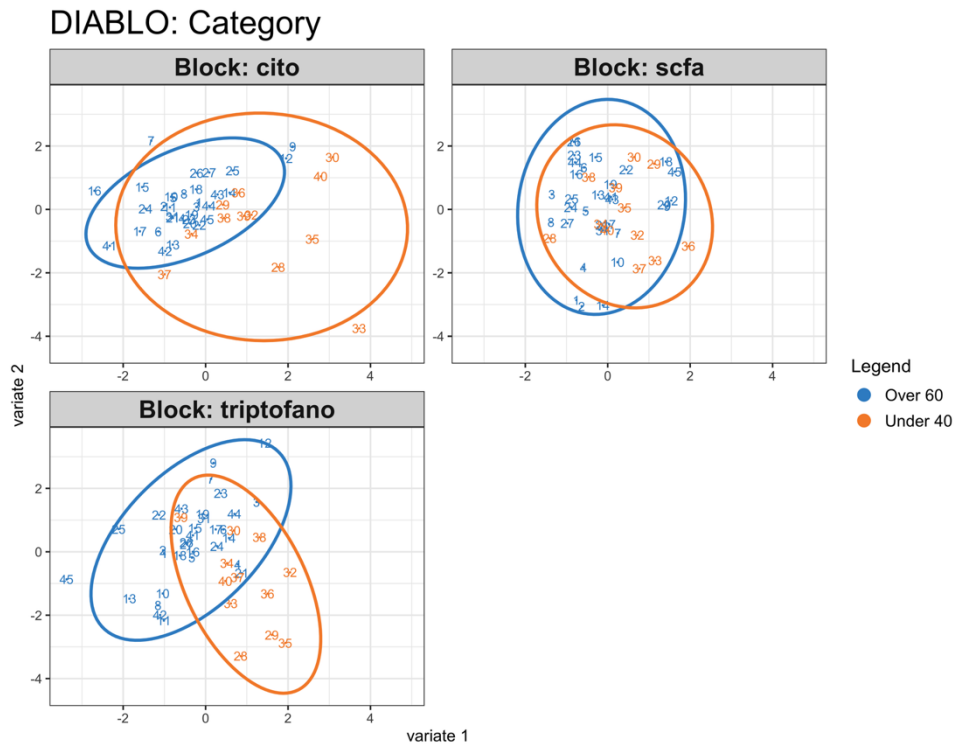


Figura 41

Il sample plot (*figura 41*) nel vettore di separazione evidenzia una distinzione tra le due fasce d'età che risulta più marcata nel blocco citofluorimetrico, con le ellissi di confidenza che mostrano una sovrapposizione limitata. Il blocco triptofano presenta una separazione modesta ma apprezzabile. Il blocco SCFA mostra invece le ellissi con la maggiore sovrapposizione tra i due gruppi, confermando il minor potere discriminante di questo blocco rispetto all'età.

Da rilevare che l'ellisse del gruppo Under 40 risulta considerevolmente più ampia rispetto a quella degli Over 60 nel blocco citofluorimetrico, indicando una maggiore eterogeneità fenotipica nel gruppo giovane.

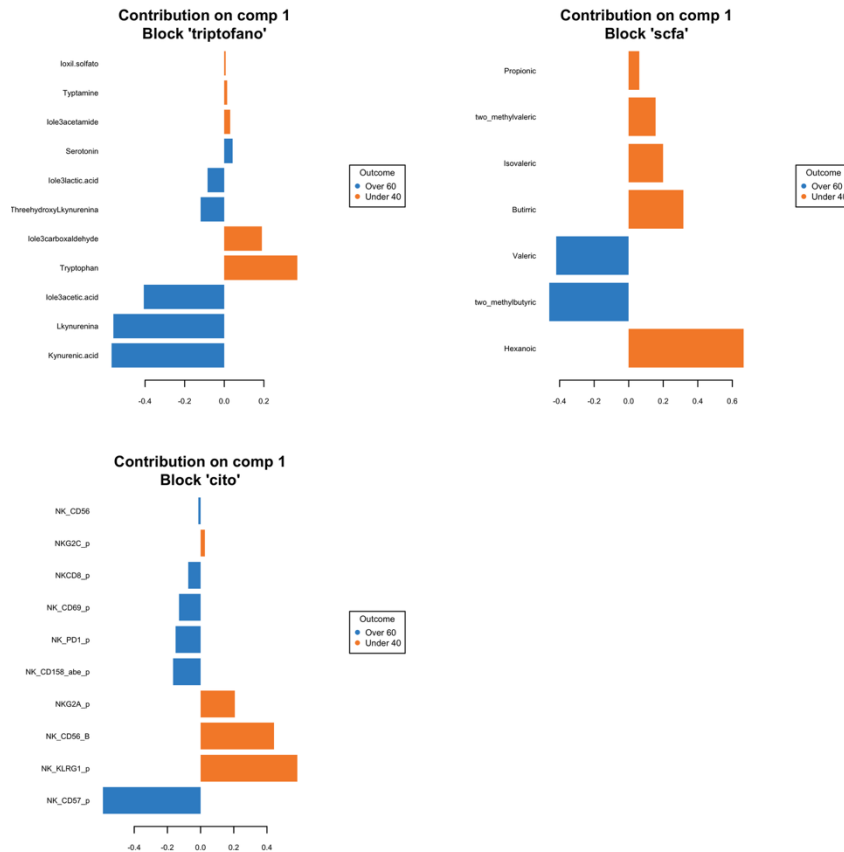


Figura 42

Per identificare quali variabili guidano questa separazione, i loading plot (figura 42) descrivono i principali contribuenti per ciascun blocco.

- **Blocco triptofano:** acido kinurenico e L-kinurenina presentano loading negativi, associandosi al gruppo Over 60; triptofano e indolo-3-carbossaldeide presentano invece loading positivi, associandosi al gruppo Under 40.
- **Blocco SCFA:** esanoico è il contribuente dominante con loading positivo (+0.6) orientato verso Under 40; butirrico presenta un loading intermedio nella stessa direzione; valerico e 2-metilbutirrico mostrano loading orientati verso Over 60.
- **Blocco citofluorimetrico:** NK KLRG1+ e NK CD56bright presentano loading positivi fortemente associati agli Under 40; NK CD57+ presenta il loading negativo più marcato, associandosi al gruppo Over 60.

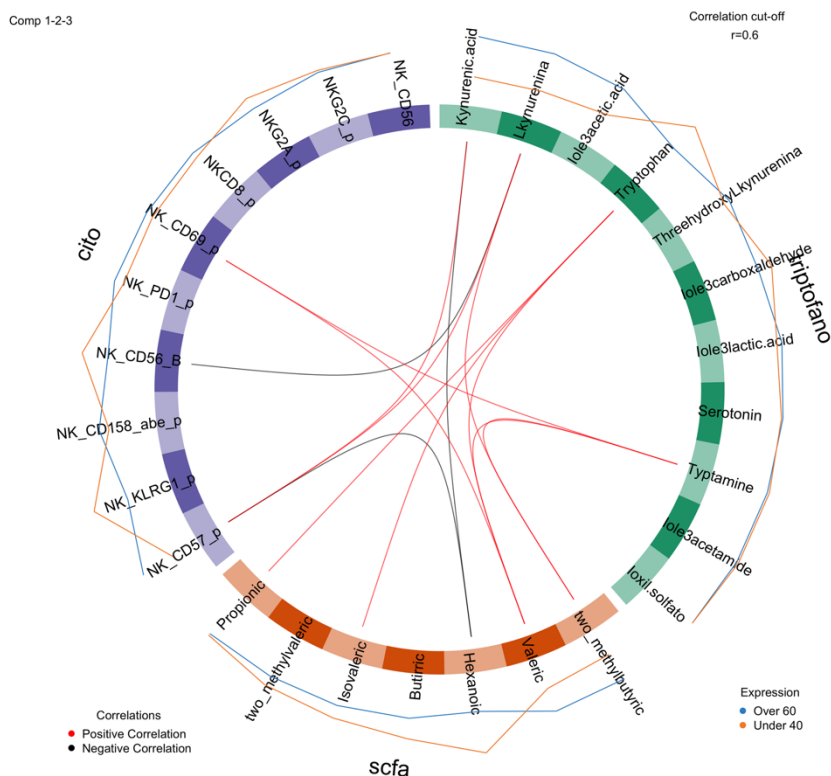


Figura 43

Le relazioni funzionali tra questi contribuenti emergono nel circos plot (con cutoff $r=0.6$) rivelando tre assi biologici principali (figura 43):

L'Esanoico ($\uparrow$ Under 40) presenta correlazioni negative con NK CD57+ e acido kinurenico. NK CD57+ e acido kinurenico sono a loro volta correlati positivamente tra loro e risultano entrambi più elevati negli Over 60, delineando un triangolo funzionale interessante.

Il 2-metilbutirrico ($\uparrow$ Over 60) correla positivamente con L-kinurenina ($\uparrow$ Over 60), e quest'ultima correla negativamente con NK CD56^{bright} ($\uparrow$ Under 40), suggerendo che l'attivazione della via delle chinurenine negli anziani si associa a una riduzione della sottopopolazione NK con maggiore capacità regolatoria.

Il Valerico ($\uparrow$ Over 60) correla positivamente con NK CD69⁺ e con il triptofano (superiore negli under 40).

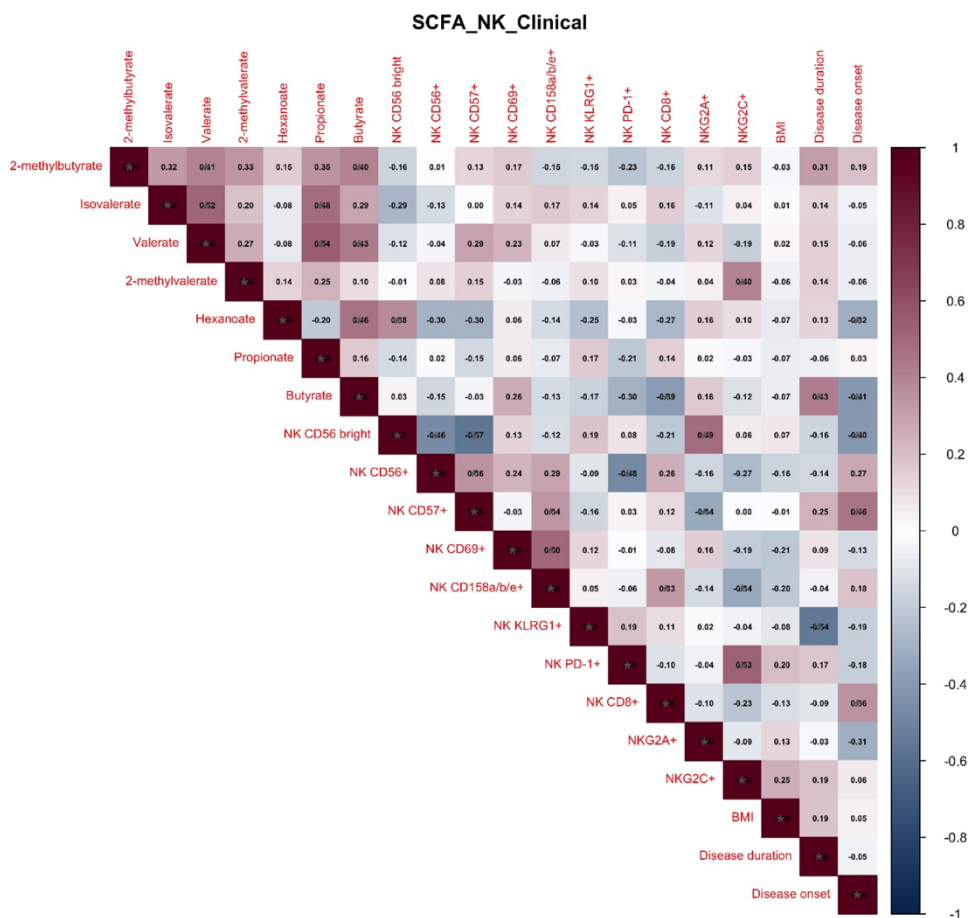


Figura 44

Per ampliare questa lettura integrando le correlazioni intra-blocco e le associazioni con variabili cliniche, non catturabili dalla soglia del circos plot, è stata generata una matrice di correlazione (figura 44) estesa tra SCFA, marcatori NK e parametri clinici (durata di malattia, BMI). La matrice di correlazione SCFA–NK–variabili cliniche evidenzia una struttura di covariazione interna all'interno di ciascun blocco analitico e alcune associazioni interblocco di interesse clinico.

All'interno del compartimento NK, si osservano correlazioni che riflettono la progressione maturativa delle cellule Natural Killer: NK CD56^{bright} correla negativamente con NK CD57⁺ ($r = -0.57$). NK CD56⁺ correla positivamente con NK CD158a/b/e⁺ ($r = +0.29$) e NK PD-1⁺ ($r = +0.53$), mentre NK CD56^{bright} correla positivamente con NKG2A⁺ ($r = +0.49$). NK PD-1⁺ mostra una correlazione negativa con NKG2C⁺ ($r = -0.48$).

All'interno del blocco SCFA, si rileva una struttura di covariazione interna tra gli acidi grassi a catena ramificata e lineare: isovalerato correla positivamente con valerato ($r =$

+0.52) e propionato ($r = +0.48$); 2-metilbutirrato correla con butirrato ($r = +0.40$) e valerato con butirrato ($r = +0.40$), indicando che la produzione fermentativa di questi metaboliti tende a variare in modo coordinato tra i pazienti.

Rispetto alla durata di malattia, il butirrato mostra una correlazione positiva significativa ($r = +0.43$, $p = 0.023$), suggerendo che i pazienti con decorso più prolungato presentino livelli plasmatici più elevati di questo acido grasso. In direzione opposta, NK KLRG1⁺ correla negativamente con la durata di malattia ($r = -0.54$), indicando una progressiva riduzione di questa sottopopolazione NK a fenotipo terminalmente differenziato e citotossico all'aumentare degli anni di malattia. Il 2-metilbutirrato mostra una correlazione positiva di entità più modesta con la durata ($r = +0.31$). Queste associazioni non risultano alterate dal BMI, che non mostra correlazioni di rilievo con i parametri citofluorimetrici né con gli SCFA (butirrato–BMI: $r = -0.07$, KW $p = 0.74$).

Sul piano inter-omico, il butirrato correla positivamente con NK CD69⁺ ($r = +0.26$) e NK CD8⁺ ($r = +0.39$), mentre esanoato correla positivamente con NK CD56^{bright} ($r = +0.38$). Il 2-metilvalerato mostra una correlazione positiva con NKG2C⁺ ($r = +0.40$). L'isovalerato correla negativamente con NK CD56^{bright} ($r = -0.29$), in direzione opposta rispetto all'esanoato, suggerendo effetti differenziali dei singoli SCFA sul compartimento NK regolatorio.

11.2.4 Distribuzione per Sesso

Per quanto concerne la variabile sesso, solo il blocco citofluorimetrico contribuisce alla separazione tra i due gruppi, con CD56, CD57⁺ e CD8⁺ come loading principali. Il blocco metabolomico sia per gli SCFA che per il triptofano non mostra alcun contributo discriminante, con loading pressoché nulli in entrambe le configurazioni analitiche.

12. Discussione

Da un singolo prelievo ematico abbiamo ricostruito tre livelli biologici interdipendenti: gli acidi grassi a catena corta (SCFA), i metaboliti del triptofano e il fenotipo del compartimento NK. La integrazione multi-omica (DIABLO) consente di leggere la SM come un asse microbiota–metabolico–immunitario unitario. Da questa tesi emergono quattro firme coerenti, qui discusse in sequenza: (i) un'impronta di immunosenescenza età-dipendente, che accoppia l'espansione delle NK CD57⁺ a uno shift metabolico IDO–chinurenina; (ii) una firma proteolitica condivisa dalle forme cliniche progressive, con

l'indolo-3-acetamide come hub molecolare; (iii) una firma immuno-metabolica classe-specifica della terapia Anti-CD20, di tipo fermentativo e triptofano-preservante; (iv) il butirrato come hub immunomodulatorio trasversale a tutti i confronti. I limiti metodologici dello studio sono discussi nella sezione conclusiva

12.1 Immunosenescenza NK, metabolismo chinureninico e circolo

IDO–NK: meccanismi integrati

Il confronto tra Under 40 e Over 60 rivela un'impronta immunosenescente che coinvolge in modo coordinato il compartimento NK e il metabolismo del triptofano. La significatività più robusta riguarda NK KLRG1⁺ ($p = 0,0003$), la cui up-regolazione, sulla sottopopolazione CD56^{bright}, è già documentata nella SMRR in fase attiva [62]. La sua elevazione negli Under 40 e riduzione negli Over 60 è verosimilmente interpretabile come espressione dell'attivazione infiammatoria del compartimento NK in fase di malattia attiva, distinta dalla senescenza età-dipendente. Quest'ultima è invece rappresentata in modo solido da NK CD57⁺, biomarcatore consolidato di differenziazione terminale e senescenza replicativa [59,60], significativamente più elevato negli Over 60 (mediana 56,16 vs 39,73, $p = 0,0025$): le cellule CD57⁺ hanno perso la capacità proliferativa e rappresentano un pool effettore esaurito che si accumula con l'invecchiamento, riducendo progressivamente la plasticità del compartimento NK. I due marcatori delineano traiettorie biologiche distinte: CD57⁺ negli Over 60 configura una senescenza replicativa consolidata età-dipendente, mentre l'elevazione isolata di KLRG1⁺ negli Under 40, in assenza di co-espressione con CD57, non è sovrapponibile a tale fenotipo. Questi dati suggeriscono verosimilmente che l'interpretazione di KLRG1 come marcatore di senescenza NK richieda cautela in coorti SM eterogenee per fenotipo clinico e fascia d'età e che la sua elevazione in soggetti giovani con malattia attiva possa riflettere prevalentemente una risposta infiammatoria del compartimento NK piuttosto che senescenza replicativa vera. Mentre NK CD56^{bright}, la sottopopolazione con il maggiore potenziale regolatorio, si riduce negli over 60 (11,49 vs 5,95, $p = 0,0076$). Nella SM, la riduzione delle CD56^{bright} impoverisce il comparto di sorveglianza innato, poiché queste cellule normalmente sopprimono i linfociti T autoreattivi tramite granzima B e NCRs; il loro deficit funzionale è già documentato nella malattia attiva [58] e la presente analisi suggerisce che l'invecchiamento ne amplifichi la riduzione quantitativa.

Sul versante metabolico, acido chinurenico e L-chinurenina sono significativamente più elevati negli Over 60 ($p = 0,0082$ e $p = 0,0453$ rispettivamente), coerentemente con la

maggior attività basale dell'enzima indolamina 2,3-diossigenasi (IDO) descritta nell'invecchiamento. Questo dato non è semplicemente un epifenomeno: L-chinurenina attraversa passivamente la BEE [126] e il suo accumulo plasmatico è tradotto, in altri studi, in eccitotossicità glutammatergica, attraverso il metabolita a valle acido quinolico (agonista NMDA), che alimenta la neurodegenerazione progressiva. La riduzione contestuale del triptofano disponibile, aumentato negli Under 40 (mediana 62,8) rispetto agli Over 60 (mediana 52,4), si presenta con trend non significativo ma è coerente con la deplezione dei triptofani: l'iperattivazione IDO sottrae precursore alla via della serotonina e dell'indolo, con ricadute neuroimmunologiche sistemiche [128].

In questa sezione emerge dall'integrazione multi-omica: L-chinurenina correla negativamente con NK CD56^{bright} nel circos plot, e il 2-metilbutirrico correla positivamente con L-chinurenina. Questo pattern configura un circolo di immunosenescenza accelerato dal microbiota: la prevalenza di batteri proteolitici negli anziani, produttori di acidi grassi ramificati come 2-metilbutirrico, si associa a maggior attivazione IDO e conseguente riduzione della sottopopolazione NK regolatoria. Il meccanismo molecolare che connette questi livelli è biologicamente plausibile: la chinurenina inibisce direttamente le cellule NK riducendo l'espressione dei recettori attivanti NKp46 e NKG2D [160] e può indurre l'apoptosi tramite stress ossidativo ROS-mediato [159]. La via IDO funge quindi da ponte funzionale tra disbiosi proteolitica e collasso del comparto NK regolatorio: un asse non precedentemente documentato con dati metabolomici e citofluorimetrici integrati in una singola coorte SM.

Un meccanismo ulteriore, distinto dall'IDO, merita attenzione: l'esanoico ($\uparrow$ Under 40) correla negativamente con NK CD57⁺ e con l'acido chinurenico. L'acido esanoico è un SCFA prodotto dalla fermentazione saccarolitica; comune agli altri SCFA saccarolitici oltre all'inibizione HDAC, attiva selettivamente GPR109A con effetti antinfiammatori documentati in modelli murini [181]. Nei soggetti giovani della coorte, livelli più elevati di esanoico si associano a un compartimento NK meno senescente (CD57⁺ basso) e quindi ad una minore attivazione IDO. Tale triangolo: esanoico–CD57⁺–acido chinurenico, suggerisce verosimilmente che gli SCFA saccarolitici possano esercitare un effetto anti-senescenza sul comparto NK non solo attraverso la modulazione delle Treg o dei macrofagi, ma anche indirettamente attraverso la soppressione dell'attivazione IDO.

Sebbene questa relazione richieda conferma sperimentale diretta, rappresenta un'ipotesi biologicamente nuova che integra il ruolo degli SCFA nell'immunosenescenza con la via triptofano.

Sul piano dei correlati clinici, la durata di malattia mostra correlazione positiva con il butirrato plasmatico ($r = +0,43$, $p = 0,023$), indipendente dal BMI ($r = -0,07$, $p = 0,74$). Il dato è interpretabile come risposta adattativa compensatoria: con il progredire della flogosi e della permeabilità intestinale, la produzione batterica di butirrato aumenterebbe come meccanismo di ripristino dell'omeostasi mucosale. Alternativamente, nei pazienti con decorso più lungo sopravvivono prevalentemente quelli con microbiota produttore di SCFA antinfiammatori, configurando un possibile bias di sopravvivenza selettiva. Sul piano inter-omico, le correlazioni di butirrato con NK CD69⁺ ($r = +0,26$) è coerente con la recente dimostrazione che il butirrato potenzia l'attività citotossica delle NK CD56^{bright} verso i linfociti T attivati modificando l'accessibilità della cromatina [179], suggerendo che l'incremento di butirrato nei pazienti con malattia di lunga durata possa contribuire a sostenere il compartimento NK in un quadro di progressiva riduzione della componente regolatoria CD56^{bright}.

12.2 Fenotipo clinico e firma del triptofano: indolo-3-acetamide come hub molecolare

Nel confronto tra fenotipi clinici (RR vs SP vs PP), l'indolo-3-acetamide emerge come hub molecolare: correla negativamente con SCFA saccarolitici (valerico, propionico) e NK CD57⁺, e positivamente con NK CD56^{bright}. Questo asse rispecchia quello identificato nella distribuzione per età suggerendo che progressione di malattia e invecchiamento immunitario condividano una firma metabolica comune, probabilmente mediata dall'impoverimento progressivo dei ceppi microbici produttori di indoli (*Ruminococcus gnavus*, *Clostridium sporogenes* [133]).

Triptamina e indolo-3-carbossaldeide sono significativamente più elevate nei gruppi RR+SP rispetto alla PP ($p = 0,018$ e $p = 0,037$ rispettivamente). La riduzione di questi metaboliti indolici nelle forme progressive è coerente con quanto osservato in letteratura, in cui i pazienti SM non trattati presentano un profilo della via dell'indolo significativamente più alterato rispetto ai soggetti in terapia Anti-CD20 [110]. Entrambi i metaboliti operano attivando AhR [153, 154]. La loro riduzione nella SMPP inoltre configura un impoverimento della segnalazione AhR intestinale nelle forme progressive. Nel circos plot l'indolo-3-acetammide mostra associazioni negative con gli SCFA saccarolitici e le cellule NK CD57⁺, e un'associazione positiva con le cellule CD56^{bright}.

12.3 Effetto della terapia: firma anti-CD20 e fenotipi NK classe-specifici

Butirrato, terapia Anti-CD20 e modulazione del compartimento NK

Uno dei dati più robusti è l'associazione tra terapia Anti-CD20 e livelli plasmatici di acido butirrico. I pazienti trattati mostrano concentrazioni di butirrato significativamente più elevate rispetto a tutti i gruppi di confronto (vs Other: $p = 0,023$; vs NT: $p = 0,0184$; vs S1P vs NT: $p = 0,0426$).

Parallelamente, il gruppo Anti-CD20 presenta espansione di NK CD69⁺ (3.82% vs 2.1%, $p = 0,011$ vs Other; 3.82% vs 1.96%, $p = 0,0102$ vs NT) e riduzione di NKG2C⁺ (4,73% vs 8,39%, $p = 0,014$ vs Other). NKG2C⁺ identifica NK adattative indotte da stimolazione cronica da infezione di CMV. La sua riduzione nel contesto di deplezione B potrebbe riflettere la perdita dello stimolo che alimenta l'espansione di questo sottogruppo.

Il triptofano plasmatico è significativamente più elevato nel gruppo Anti-CD20 vs NT (mediane 60,17 vs 50,43, $p = 0,0438$). Questo dato è coerente con quanto riportato in letteratura, in cui è stato dimostrato, in una coorte prospettica, come i pazienti SM trattati con Ocrelizumab presentino, già a 6 mesi dall'inizio della terapia, livelli di triptofano e metaboliti indolici significativamente più vicini ai controlli sani rispetto ai pazienti non trattati, suggerendo un effetto classe-specifico degli Anti-CD20 sulla preservazione del precursore triptofano [110]. Il circos plot identifica un asse correlativo positivo tra NK CD69⁺, acido valerico e triptamina. Triptofano correla positivamente con butirrato e valerico. Questo pattern configura una firma immunometabolica specifica Anti-CD20: preservazione del precursore (Trp), produzione saccarolitica di SCFA (butirrato/valerico), attivazione NK precoce (CD69⁺) opposta al profilo Other (L-chinurenina elevata, BCFA prevalenti, NKG2C⁺ espanso). Questa dicotomia non era stata precedentemente documentata e costituisce uno dei risultati di maggiore originalità della tesi. È importante contestualizzare questo dato alla luce di quanto riportato in letteratura [152] in cui è stato osservato che nella SMRR naïve al trattamento il butirrato plasmatico correla positivamente con citochine pro-infiammatorie quali IFN- γ e TNF- α , suggerendo che in un contesto di infiammazione acuta attiva il butirrato circolante possa riflettere una risposta adattativa piuttosto che un effetto protettivo diretto. In questo contesto, l'elevazione del butirrato appare più verosimilmente attribuibile alla ripopolazione di

ceppi produttori come *Faecalibacterium prausnitzii* [106, 109] che a una risposta reattiva all'infiammazione in atto. Tuttavia, in assenza di misurazione contestuale delle citochine sieriche nello stesso campione, questa distinzione rimane un'ipotesi interpretativa che richiede conferma in studi con profilo citochinico integrato.

Evidenze fenotipiche NK specifiche per classe terapeutica

Il confronto tra Anti-CD20, S1P-modulatori e non trattati (NT) rivela pattern NK significativamente differenziati per classe terapeutica. I dati mostrano una triade fenotipica opposta tra Anti-CD20 e S1P. Il gruppo Anti-CD20 presenta NK CD69⁺ elevata (3,82), NKG2A⁺ elevato (38,3) e NK CD8⁺ basso (39,8). Il gruppo S1P presenta il pattern inverso: NK CD69⁺ bassa (1,72), NKG2A⁺ basso (24,3) e NK CD8⁺ alto (54,5). I NT si collocano in posizione intermedia per tutti e tre i marcatori (CD69⁺: 1,96; NKG2A⁺: 32,0; CD8⁺: 48,9; $p = 0,0157, 0,0203$ e $0,0165$ rispettivamente).

Questa triade non è casuale ma riflette meccanismi d'azione opposti delle due classi. Gli S1P-modulatori agiscono tramite downregulation del recettore S1PR sui linfociti, determinando il sequestro delle cellule immunitarie nei linfonodi e impedendo la loro migrazione verso il SNC [49].

Negli anti-CD20 il risultato è un compartimento NK con freno inibitorio conservato (NKG2A⁺ alto). Quest'ultimo dato merita una considerazione aggiuntiva: l'elevazione di NKG2A⁺ nel gruppo Anti-CD20 è compatibile con un'espansione della componente CD56^{bright} immunoregolatoria. Questo dato va letto con cautela: nella SM, i linfociti T iper-esprimono HLA-E, il cui eccesso iper-stimola NKG2A sulle stesse CD56^{bright} bloccandone l'azione regolatoria [57, 58]. Un NKG2A⁺ elevato potrebbe quindi riflettere un compartimento CD56^{bright} numericamente espanso ma funzionalmente soppresso, qualora l'infiammazione T-mediata non sia completamente spenta.

In questo stesso confronto, l'acido butirrico risulta significativamente più elevato nel gruppo Anti-CD20 rispetto a NT e S1P ($p = 0,0426$). L'assenza di elevazione del butirrico sotto S1P è coerente con i dati di letteratura che non documentano per gli S1P-modulatori un effetto specifico sulla ripopolazione di batteri produttori di butirrico come *Faecalibacterium prausnitzii*, effetto invece descritto per gli Anti-CD20 [106, 109]. Ciò rafforza l'ipotesi che l'elevazione del butirrico sia un effetto classe-specifico degli Anti-CD20 mediato dalla modulazione del microbiota, e non una conseguenza generica del

controllo dell'infiammazione. In questo contesto, l'elevazione contemporanea di butirrato e NK NKG2A⁺ nel gruppo Anti-CD20 acquisisce un potenziale significato funzionale: se da un lato l'asse HLA-E/NKG2A limita la capacità regolatoria delle CD56^{bright} sui linfociti T, il butirrato agendo tramite inibizione delle HDAC e rimodellamento della cromatina potrebbe verosimilmente rappresentare un effetto endogeno capace di abbassare la soglia di attivazione citotossica delle NK sui cloni T iperattivati, in modo selettivo e indipendente dal freno NKG2A-dipendente [178].

Valerico come discriminante multivariato e gradiente SCFA

Nel dot plot multivariato del confronto tripartito (Anti-CD20 vs terapia moderata vs NT), i due parametri con il contributo discriminante più marcato sono acido valerico e NK CD69⁺. Il valerico mostra un gradiente terapeutico coerente: NT (0,064) < Anti-CD20 (0,129) < terapia moderata (0,186), con $p = 0,034$. Questo gradiente suggerisce che qualsiasi esposizione farmacologica si associ a un profilo SCFA più favorevole rispetto all'assenza di terapia, con effetti differenziati per classe: la terapia moderata, associata a durata di malattia più lunga (37 mesi vs 23 negli Anti-CD20), mostra valerico più elevato, coerentemente con la correlazione positiva tra durata e SCFA. NK CD69⁺ risulta similmente elevata in entrambi i gruppi trattati (Anti-CD20: 3,82; moderata: 3,85) rispetto ai NT (1,96; $p = 0,023$), indicando che l'attivazione NK precoce è un effetto di classe delle DMT piuttosto che specifico degli Anti-CD20.

12.4 Il butirrato come hub immunomodulatorio trasversale

Indipendentemente dai confronti per età, fenotipo clinico e terapia, il butirrato è il singolo metabolita con il ruolo immunomodulatorio più ricorrente. Il dato che lo collega alla dimensione clinica è la correlazione positiva con la durata di malattia ($r = +0,43$, $p = 0,023$), indipendente dal BMI ($r = -0,07$, $p = 0,74$): un'osservazione interpretabile come risposta adattativa compensatoria che determina l'aumento della produzione batterica di butirrato volto al ripristino dell'omeostasi mucosale con il progredire della flogosi e della permeabilità intestinale o, in alternativa, come bias di sopravvivenza selettiva di pazienti con microbiota produttore di SCFA antinfiammatori.

Sul piano inter-omico, il butirrato correla con NK CD69⁺ ($r = +0,26$) e NK CD8⁺ ($r = +0,39$): coerentemente con il meccanismo HDAC-dipendente già discusso per la terapia Anti-CD20 [178], il suo incremento nei pazienti con malattia di lunga durata potrebbe

contribuire a sostenere il compartimento NK a fronte della progressiva riduzione della componente regolatoria CD56^{bright}.

Letti insieme, questi dati posizionano il butirrato come hub di convergenza tra i tre assi: cresce con la durata di malattia, caratterizza selettivamente la terapia Anti-CD20 e accompagna un fenotipo NK precocemente attivato (CD69⁺).

12.5 Considerazioni metodologiche e limiti

La numerosità campionaria (N = 45) riduce la potenza statistica dei confronti multi-gruppo e diversi risultati non sopravvivono alla correzione FDR, configurando il lavoro come studio pilota. Considerando i diversi età e BMI come fattori confondenti, potrebbe essere utile applicare un approccio longitudinale. Sarà inoltre fondamentale validare questi risultati in coorti più ampie di pazienti e confrontarli con persone sane delle stesse classi di età.

13. Conclusioni

I risultati di questo studio suggeriscono che nei pazienti con SM l'invecchiamento si associa a una ridistribuzione coordinata del compartimento NK verso fenotipi differenziati e senescenti, parallelamente a un'attivazione progressiva della via IDO con accumulo di L-chinurenina e acido chinurenico. L'integrazione multi-omica ha permesso di identificare correlazioni tra questi due piani: metabolico e immunologico. Per quanto noto, l'integrazione simultanea della metabolomica degli SCFA, metaboliti del triptofano e citofluorimetria NK in una singola coorte SM non è stata precedentemente riportata in letteratura. In particolare, l'associazione tra l'asse IDO-kynurenine e il compartimento CD56^{bright}, nonché il potenziale ruolo a degli SCFA saccarolitici mediato dalla soppressione di IDO, rappresentano ipotesi originali che emergono dall'analisi inter-omica del presente studio. Sul piano terapeutico, è presente la firma immuno-metabolica specifica degli Anti-CD20 con elevazione del butirrato, preservazione del triptofano e attivazione NK precoce. Questo suggerisce che questa classe eserciti effetti sul microbiota con ricadute sul compartimento NK non riducibili al solo controllo dell'infiammazione,

aprendo prospettive per la comprensione dei meccanismi d'azione non convenzionali di questi farmaci.

Nel complesso, i dati supportano l'ipotesi che il microbiota intestinale, attraverso la produzione differenziale di SCFA e metaboliti del triptofano, partecipi attivamente alla modulazione del compartimento NK e al mantenimento dell'omeostasi immunitaria nella SM. La conferma di questi risultati in coorti prospettiche più ampie, con integrazione di dati e stratificazione per microbiota basale pre-trattamento, rappresenta una potenziale strategia per tradurre queste osservazioni in strumenti di stratificazione clinica e in potenziali target terapeutici microbiota-mediati nella Sclerosi Multipla.

14. Abbreviazioni

2MBA / MB2: Acido 2-metilbutirrico

3-HAA: Acido 3-idrossiantranilico

AhR: Aryl Hydrocarbon Receptor

Arg-1: Arginasi-1

ATAC-seq: Assay for Transposase-Accessible Chromatin with sequencing

ATP: Adenosina trifosfato

BA: Acidi biliari (Bile Acids)

BCFA: Acidi grassi a catena ramificata (Branched-Chain Fatty Acids)

BCP: Bone Cancer Pain

BEE: Barriera emato-encefalica

BMI: Body Mass Index

100Breg: Linfociti B regolatori

BSH: Bile Salt Hydrolases

BUT: Acido butirrico

C3G: Cianidina-3-O-glucoside

cAMP: AMP ciclico

CDCA: Acido chenodeossicolico

CIS: Sindrome Clinicamente Isolata

COX-2: Ciclossigenasi-2

DCA: Acido desossicolico

DIABLO: Data Integration Analysis for Biomarker discovery using Latent

variable approaches for Omics

DMT: Disease-Modifying Therapies

EAE: Encefalomielite Autoimmune Sperimentale

EBNA: Epstein-Barr Nuclear Antigen

EBV: Virus di Epstein-Barr

EDSS: Expanded Disability Status Scale

FFAR2 / GPR43: Free Fatty Acid Receptor 2

FFAR3 / GPR41: Free Fatty Acid Receptor 3

FXR: Farnesoid X Receptor

GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue

GPCR: G Protein-Coupled Receptors

GPR109A / HCAR2: Hydrocarboxylic Acid Receptor 2

H3K9ac: Acetilazione della lisina 9 dell'istone H3

HCAR2: Hydrocarboxylic Acid Receptor 2

HDAC: Istone deacetilasi (Histone Deacetylase)

HEX: Acido esanoico

HIAA: Acido idrossiindolo-3-acetico

HIF1: Hypoxia-Inducible Factor 1

HLA: Human Leukocyte Antigen

101IA: Acido 3-indolo acrilico

IAA: Indolo-3-acido acetico

IAAld: Indolo-3-acetaldeide

IDO: Indolamina 2,3-diossigenasi

IFNG: Interferone gamma

IL-1 β : Interleuchina 1 beta

IL-6: Interleuchina 6

IL-8: Interleuchina 8

IL-10: Interleuchina 10

IL-17: Interleuchina 17

IL-23: Interleuchina 23

IL-33: Interleuchina 33

iMac: Macrofagi infiammatori

iNOS: Ossido nitrico sintasi inducibile

INO: Oftalmoplegia internucleare

IPA: Indolo-3-acido propionico

IS: Standard interno

KA: Acido chinurenico

KIR: Killer Immunoglobulin-like Receptor

KYN: Chinurenina

LC-MS/MS: Cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem

LCA: Acido litocolico

LIPUS: Low-Intensity Pulsed Ultrasound

LOD: Limite di rilevabilità (Limit of Detection)

LPC: Lisolecitina

MAG: Myelin-Associated Glycoprotein

MBP: Myelin Basic Protein

MOG: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

102MSNQ-S: Multiple Sclerosis Neuropsychological Questionnaire

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

NaB: Sodio butirrato

NARCOMS: North American Research Committee on Multiple Sclerosis

NCE: Normalized Collision Energy

NCR: Natural Cytotoxicity Receptors

nDMT: Terapie non modificanti la malattia

NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK: Cellule Natural Killer

NLRP3: NOD-like receptor family pyrin domain containing 3

NMO: Neuromielite Ottica

NMOSD: Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder

OPC: Oligodendrocyte Precursor Cells

OTU: Operational Taxonomic Units

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PI3K/Akt: Phosphoinositide 3-kinase / Protein Kinase B

PIRA: Progression Independent of Relapse Activity

PLP: Proteolipid Protein

PPAR- γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma

PRM: Parallel Reaction Monitoring

PROP: Acido propionico

QA: Acido quinolico

RIS: Sindrome radiologicamente isolata

RLS: Restless Legs Syndrome

ROR- γ : RAR-related Orphan Receptor gamma

ROS: Reactive Oxygen Species

S1PR: Recettore della sfingosina-1-fosfato

SASP: Senescence-Associated Secretory Phenotype

SCFA: Short-Chain Fatty Acids

103SM: Sclerosi Multipla

SMPP: Sclerosi Multipla Primariamente Progressiva

SMRR: Sclerosi Multipla Recidivante-Remittente

SMSP: Sclerosi Multipla Secondariamente Progressiva

SNC: Sistema Nervoso Centrale

sPLS-DA: Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis

STAT1: Signal Transducer and Activator of Transcription 1

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription 6

TBI: Traumatic Brain Injury

TCA: Ciclo degli acidi tricarbossilici

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TGR5: Takeda G protein-coupled Receptor 5

TH1: Linfociti T helper di tipo 1

TH2: Linfociti T helper di tipo 2

TH17: Linfociti T helper di tipo 17

TLR4: Toll-Like Receptor 4

tMac: Macrofagi tollergenici

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

TPH1: Triptofano idrossilasi 1

Tr1: Cellule T regolatorie di tipo 1

TREC: T-cell Receptor Excision Circles

Treg: Linfociti T regolatori

Trp: Triptofano

TSA: Tricostatina A

UDCA: Acido ursodesossicolico

VAL: Acido valerico

VDR: Vitamin D Receptor

104VPT: Vibration Perception Threshold

15. Bibliografia

1. Reich, D.S., C.F. Lucchinetti, and P.A. Calabresi, *Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2018. **378**(2): p. 169–180.
2. Thompson, A.J., et al., *Multiple sclerosis*. Lancet, 2018. **391**(10130): p. 1622–1636.
3. Pelletier, J., et al., *Multiple Sclerosis: An Emergency Medicine-Focused Narrative Review*. Journal of Emergency Medicine, 2024. **66**(4): p. e441–e456.
4. Dobson, R. and G. Giovannoni, *Multiple sclerosis - a review*. Eur J Neurol, 2019. **26**(1): p. 27–40.
5. Lassmann, H., *Multiple Sclerosis Pathology*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(3).
6. Lublin, F.D., et al., *Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions*. Neurology, 2014. **83**(3): p. 278–86.
7. Weinshenker, B.G., *Natural history of multiple sclerosis*. Ann Neurol, 1994. **36 Suppl**: p. S6–11.
8. Kappos, L., et al., *Contribution of Relapse-Independent Progression vs Relapse-Associated Worsening to Overall Confirmed Disability Accumulation in Typical Relapsing Multiple Sclerosis in a Pooled Analysis of 2 Randomized Clinical Trials*. JAMA Neurol, 2020. **77**(9): p. 1132–1140.
9. Thompson, A.J., et al., *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria*. Lancet Neurol, 2018. **17**(2): p. 162–173.
10. Koch, M., et al., *The natural history of primary progressive multiple sclerosis*. Neurology, 2009. **73**(23): p. 1996–2002.
11. Wijnands, J.M.A., et al., *Health-care use before a first demyelinating event suggestive of a multiple sclerosis prodrome: a matched cohort study*. Lancet Neurol, 2017. **16**(6): p. 445–451.
12. Lebrun-Frenay, C., et al., *Radiologically Isolated Syndrome: 10-Year Risk Estimate of a Clinical Event*. Ann Neurol, 2020. **88**(2): p. 407–417.
13. Kluger, B.M., L.B. Krupp, and R.M. Enoka, *Fatigue and fatigability in neurologic illnesses: proposal for a unified taxonomy*. Neurology, 2013. **80**(4): p. 409–16.
14. Braley, T.J. and R.D. Chervin, *Fatigue in multiple sclerosis: mechanisms, evaluation, and treatment*. Sleep, 2010. **33**(8): p. 1061–7.
15. Pleșa, A., et al., *Eyes as Windows: Unveiling Neuroinflammation in Multiple Sclerosis via Optic Neuritis and Uhthoff's Phenomenon*. Diagnostics (Basel), 2024. **14**(19).

16. Frohman, T.C., et al., *Uhthoff's phenomena in MS--clinical features and pathophysiology*. Nat Rev Neurol, 2013. **9**(9): p. 535–40.
 17. Toosy, A.T., D.F. Mason, and D.H. Miller, *Optic neuritis*. Lancet Neurol, 2014. **13**(1): p. 83–99.
 18. Sobhanian, M.J., et al., *Identification and treatment of the visual processing asymmetry in MS patients with optic neuritis: The Pulfrich phenomenon*. J Neurol Sci, 2018. **387**: p. 60–69.
 19. Nij Bijvank, J.A., et al., *Diagnosing and quantifying a common deficit in multiple sclerosis: Internuclear ophthalmoplegia*. Neurology, 2019. **92**(20): p. e2299–e2308.
 20. Valiukevicius, P., et al., *CXCL12 Gene Polymorphisms and Serum Levels: Associations with Multiple Sclerosis Prevalence and Clinical Parameters in Lithuania*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(17).
 21. Jones, S.L. and R.E.A. van Emmerik, *Impaired foot vibration sensitivity is related to altered plantar pressures during walking in people with multiple sclerosis*. Mult Scler Relat Disord, 2023. **75**: p. 104767.
 22. Freiha, J., et al., *Paroxysmal Symptoms in Multiple Sclerosis-A Review of the Literature*. J Clin Med, 2020. **9**(10).
 23. Amaechi, O., *Trigeminal Neuralgia: Rapid Evidence Review*. Am Fam Physician, 2025. **111**(5): p. 427–432.
 24. Teoli, D., et al., *Lhermitte Sign*, in StatPearls. 2025, StatPearls Publishing
- Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
25. Hamasaki, S., et al., *[Beneficial effects of acetazolamide on paroxysmal attacks of girdle sensation in multiple sclerosis]*. Rinsho Shinkeigaku, 1998. **38**(7): p. 697–9.
 26. Reder, A.T., *Thoracic flexion provokes circumferential dysesthesia: A symptom of thoracic cord lesions in MS*. Mult Scler, 2021. **27**(7): p. 1008–1013.
 27. O'Neill, J.H., K.R. Mills, and N.M. Murray, *McArdle's sign in multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1987. **50**(12): p. 1691–3.
 28. Declémy, A., et al., *Prevalence of comorbidities in multiple sclerosis patients with neurogenic bladder*. Prog Urol, 2021. **31**(12): p. 732–738.
 29. Emmanuel, A., *Neurogenic bowel dysfunction*. F1000Res, 2019. **8**.
 30. Gulick, E.E., *Neurogenic Bowel Dysfunction Over the Course of Multiple Sclerosis: A Review*. Int J MS Care, 2022. **24**(5): p. 209–217.
 31. Weissbart, S.J., et al., *The impact of pontine disease on lower urinary tract symptoms in patients with multiple sclerosis*. Neurourol Urodyn, 2017. **36**(2): p. 453–456.
 32. Sharrad, D., et al., *Defining progression independent of relapse activity (PIRA) in adult patients with relapsing multiple sclerosis: A systematic review(☆)*. Mult Scler Relat Disord, 2023. **78**: p. 104899.
 33. Müller, J., et al., *Standardized Definition of Progression Independent of Relapse Activity (PIRA) in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis*. JAMA Neurol, 2025. **82**(6): p. 614–625.
 34. Makhoul, K., et al., *Tremor in Multiple Sclerosis-An Overview and Future Perspectives*. Brain Sci, 2020. **10**(10).

35. Rinker, J.R., 2nd, et al., *Prevalence and characteristics of tremor in the NARCOMS multiple sclerosis registry: a cross-sectional survey*. BMJ Open, 2015. **5**(1): p. e006714.
36. McGinley, M.P., C.H. Goldschmidt, and A.D. Rae-Grant, *Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review*. Jama, 2021. **325**(8): p. 765–779.
37. Askari, M., et al., *Prevalence of cognitive impairment (CI) in patients with multiple sclerosis (MS): A systematic review and meta-analysis*. Caspian J Intern Med, 2024. **15**(3): p. 392–413.
38. Meca-Lallana, V., et al., *Cognitive impairment in multiple sclerosis: diagnosis and monitoring*. Neurol Sci, 2021. **42**(12): p. 5183–5193.
39. Bar-Or, A. and R. Li, *Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances*. Lancet Neurol, 2021. **20**(6): p. 470–483.
40. Weiner, H.L., *Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease*. Arch Neurol, 2004. **61**(10): p. 1613–5.
41. Lucchinetti, C.F., et al., *Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2011. **365**(23): p. 2188–97.
42. Butovsky, O., et al., *Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia*. Nat Neurosci, 2014. **17**(1): p. 131–43.
43. Lassmann, H., *Cortical lesions in multiple sclerosis: inflammation versus neurodegeneration*. Brain, 2012. **135**(Pt 10): p. 2904–5.
44. Oksenberg, J.R., et al., *Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis*. Nature, 1993. **362**(6415): p. 68–70.
45. Ambrosius, W., et al., *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Disease: Current Insights into the Disease Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Int J Mol Sci, 2020. **22**(1).
46. Jarius, S., et al., *Pattern II and pattern III MS are entities distinct from pattern I MS: evidence from cerebrospinal fluid analysis*. J Neuroinflammation, 2017. **14**(1): p. 171.
47. Yu, P., et al., *Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6772–80.
48. Davidson, T.S. and E.M. Shevach, *Polyclonal Treg cells modulate T effector cell trafficking*. Eur J Immunol, 2011. **41**(10): p. 2862–70.
49. Dombrowski, Y., et al., *Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system*. Nat Neurosci, 2017. **20**(5): p. 674–680.
50. Moretta, A., et al., *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 197–223.
51. Vilches, C. and P. Parham, *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 217–51.
52. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633–40.
53. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167–76.
54. Marcenaro, E., et al., *NK cells and their receptors during viral infections*. Immunotherapy, 2011. **3**(9): p. 1075–86.

59. Laroni, A., et al., *Immunosenescence in multiple sclerosis: New insights and clinical implications*. Mult Scler, 2025. **31**(10): p. 1147–1154.
60. Adamczyk-Sowa, M., et al., *Immunosenescence and multiple sclerosis*. Neurol Neurochir Pol, 2022. **56**(3): p. 220–227.
61. Bolton, C., *Review of evidence linking exposure to environmental stressors and associated alterations in the dynamics of immunosenescence (ISC) with the global increase in multiple sclerosis (MS)*. Immun Ageing, 2024. **21**(1): p. 73.
62. Canto-Gomes, J., et al., *Low Memory T Cells Blood Counts and High Naïve Regulatory T Cells Percentage at Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Diagnosis*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 901165.
63. Ascherio, A. and M. Munch, *Epstein-Barr virus and multiple sclerosis*. Epidemiology, 2000. **11**(2): p. 220–4.
64. Bray, P.F., et al., *Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein*. Neurology, 1992. **42**(9): p. 1798–804.
65. Simpson, S., Jr., et al., *Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: an updated meta-analysis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2019. **90**(11): p. 1193–1200.
66. Jacobs, B.M., et al., *BMI and low vitamin D are causal factors for multiple sclerosis: A Mendelian Randomization study*. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2020. **7**(2).
67. VanAmerongen, B.M., et al., *Multiple sclerosis and vitamin D: an update*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(8): p. 1095–109.
68. Willer, C.J., et al., *Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study*. Bmj, 2005. **330**(7483): p. 120.
69. Banwell, B.L., *Pediatric multiple sclerosis*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2004. **4**(3): p. 245–52.
70. Willer, C.J., et al., *Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12877–82.
71. Ramagopalan, S.V., J.C. Knight, and G.C. Ebers, *Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex*. Curr Opin Neurol, 2009. **22**(3): p. 219–25.
72. Dunalska, A., K. Saramak, and N. Szejko, *The Role of Gut Microbiome in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and Related Disorders*. Cells, 2023. **12**(13).
73. Nicholson, J.K., et al., *Host-gut microbiota metabolic interactions*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1262–7.
74. Rooks, M.G. and W.S. Garrett, *Gut microbiota, metabolites and host immunity*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 341–52.
75. Ohara, H., M. Owaki, and K. Sonomoto, *Xylooligosaccharide fermentation with Leuconostoc lactis*. J Biosci Bioeng, 2006. **101**(5): p. 415–20.
76. Rodríguez, J.M., et al., *The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life*. Microb Ecol Health Dis, 2015. **26**: p. 26050.
77. Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe, *Prokaryotes: the unseen majority*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6578–83.
78. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59–65.

79. Odamaki, T., et al., *Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study*. BMC Microbiol, 2016. **16**: p. 90.
80. Guarner, F. and J.R. Malagelada, *Gut flora in health and disease*. Lancet, 2003. **361**(9356): p. 512–9.
81. Cryan, J.F. and T.G. Dinan, *Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour*. Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(10): p. 701–12.
82. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 141–53.
83. Belkaid, Y. and O.J. Harrison, *Homeostatic Immunity and the Microbiota*. Immunity, 2017. **46**(4): p. 562–576.
84. Belkaid, Y. and S. Naik, *Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals*. Nat Immunol, 2013. **14**(7): p. 646–53.
85. Donaldson, G.P., S.M. Lee, and S.K. Mazmanian, *Gut biogeography of the bacterial microbiota*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(1): p. 20–32.
86. Cerutti, A. and M. Rescigno, *The biology of intestinal immunoglobulin A responses*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 740–50.
87. Pérez-Cano, F.J., et al., *Developmental changes in intraepithelial T lymphocytes and NK cells in the small intestine of neonatal rats*. Pediatr Res, 2005. **58**(5): p. 885–91.
88. Mahr, B. and T. Wekerle, *Murine models of transplantation tolerance through mixed chimerism: advances and roadblocks*. Clin Exp Immunol, 2017. **189**(2): p. 181–189.
89. Mowat, A.M., *To respond or not to respond - a personal perspective of intestinal tolerance*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(6): p. 405–415.
90. Belkaid, Y. and T.W. Hand, *Role of the microbiota in immunity and inflammation*. Cell, 2014. **157**(1): p. 121–41.
91. Smith, K., K.D. McCoy, and A.J. Macpherson, *Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota*. Semin Immunol, 2007. **19**(2): p. 59–69.
92. Westfall, S., et al., *Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(20): p. 3769–3787.
93. Chen, J., et al., *Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28484.
94. Jangi, S., et al., *Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12015.
95. Suzuki, Y., et al., *Are the effects of alpha-glucosidase inhibitors on cardiovascular events related to elevated levels of hydrogen gas in the gastrointestinal tract?* FEBS Lett, 2009. **583**(13): p. 2157–9.
96. Ohsawa, I., et al., *Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals*. Nat Med, 2007. **13**(6): p. 688–94.
97. Fujita, K., et al., *Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7247.

98. Mendiola, A.S., et al., *Transcriptional profiling and therapeutic targeting of oxidative stress in neuroinflammation*. Nat Immunol, 2020. **21**(5): p. 513–524.
99. Cekanaviciute, E., et al., *Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(40): p. 10713–10718.
100. Haghighi, A., et al., *Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine*. Immunity, 2015. **43**(4): p. 817–29.
101. Ordoñez-Rodríguez, A., et al., *Changes in Gut Microbiota and Multiple Sclerosis: A Systematic Review*. Int J Environ Res Public Health, 2023. **20**(5).
102. Clemente, J.C., J. Manasson, and J.U. Scher, *The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease*. Bmj, 2018. **360**: p. j5145.
103. Kadowaki, A., et al., *Gut microbiota-dependent CCR9+CD4+ T cells are altered in secondary progressive multiple sclerosis*. Brain, 2019. **142**(4): p. 916–931.
104. Takewaki, D., et al., *Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(36): p. 22402–22412.
105. Vacaras, V., et al., *The role of multiple sclerosis therapies on the dynamic of human gut microbiota*. J Neuroimmunol, 2023. **378**: p. 578087.
106. Pilotto, S., et al., *Disease-modifying therapy for multiple sclerosis: Implications for gut microbiota*. Mult Scler Relat Disord, 2023. **73**: p. 104671.
107. Ferri, C., et al., *Gut Microbiota Changes during Dimethyl Fumarate Treatment in Patients with Multiple Sclerosis*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(3).
108. Paraschiv, A.C., et al., *The effect of multiple sclerosis therapy on gut microbiota dysbiosis: a longitudinal prospective study*. Microb Cell, 2024. **11**: p. 106–115.
109. Troci, A., et al., *B-cell-depletion reverses dysbiosis of the microbiome in multiple sclerosis patients*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 3728.
110. Ricci, C., et al., *Tryptophan pathway profiling in multiple sclerosis patients treated with ocrelizumab*. Front Immunol, 2025. **16**: p. 1603663.
111. Louis, P., G.L. Hold, and H.J. Flint, *The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(10): p. 661–72.
112. Rothhammer, V., et al., *Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor*. Nat Med, 2016. **22**(6): p. 586–97.
113. Elie-Fadrosh, E.A. and D.A. Rasko, *The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis*. Annu Rev Med, 2013. **64**: p. 145–63.
114. Koh, A., et al., *From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites*. Cell, 2016. **165**(6): p. 1332–1345.
115. Ganesan, B., P. Dobrowolski, and B.C. Weimer, *Identification of the leucine-to-2-methylbutyric acid catabolic pathway of Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(6): p. 4264–73.

116. Reichardt, N., et al., *Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota*. *Isme j*, 2014. **8**(6): p. 1323–35.
117. Vital, M., A.C. Howe, and J.M. Tiedje, *Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data*. *mBio*, 2014. **5**(2): p. e00889.
118. Louis, P. and H.J. Flint, *Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine*. *FEMS Microbiol Lett*, 2009. **294**(1): p. 1–8.
119. Louis, P. and H.J. Flint, *Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota*. *Environ Microbiol*, 2017. **19**(1): p. 29–41.
120. Liu, Y., et al., *Model-Guided Rational Construction of Escherichia coli Synthetic Consortia for Enhanced 2-Methylbutyric Acid Production*. *Adv Sci (Weinh)*, 2025. **12**(22): p. e2416272.
121. Oya, M., et al., *The composition of the human fecal microbiota might be significantly associated with fecal SCFA levels under hyperbaric conditions*. *Biosci Microbiota Food Health*, 2021. **40**(4): p. 168–175.
122. Kanova, M. and P. Kohout, *Tryptophan: A Unique Role in the Critically Ill*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(21).
123. Dodd, D., et al., *A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites*. *Nature*, 2017. **551**(7682): p. 648–652.
124. Yano, J.M., et al., *Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis*. *Cell*, 2015. **161**(2): p. 264–76.
125. Chen, Y., J. Xu, and Y. Chen, *Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders*. *Nutrients*, 2021. **13**(6).
126. Russell, W.R., et al., *Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein*. *Mol Nutr Food Res*, 2013. **57**(3): p. 523–35.
127. Skorobogatov, K., et al., *Brain Versus Blood: A Systematic Review on the Concordance Between Peripheral and Central Kynurenine Pathway Measures in Psychiatric Disorders*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 716980.
128. Lim, C.K., et al., *Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 41473.
129. Tan, L.S.Y., H.M. Francis, and C.K. Lim, *Exploring the roles of tryptophan metabolism in MS beyond neuroinflammation and neurodegeneration: A paradigm shift to neuropsychiatric symptoms*. *Brain Behav Immun Health*, 2021. **12**: p. 100201.
130. Roager, H.M. and T.R. Licht, *Microbial tryptophan catabolites in health and disease*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 3294.
131. Wlodarska, M., et al., *Indoleacrylic Acid Produced by Commensal Peptostreptococcus Species Suppresses Inflammation*. *Cell Host Microbe*, 2017. **22**(1): p. 25–37.e6.
132. Smith, E.A. and G.T. Macfarlane, *Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate*

- availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol*, 1996. **81**(3): p. 288–302.
133. Cervantes-Barragan, L., et al., *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4(+)CD8αα(+) T cells. *Science*, 2017. **357**(6353): p. 806–810.
 134. Williams, B.B., et al., *Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine*. *Cell Host Microbe*, 2014. **16**(4): p. 495–503.
 135. Guzior, D.V. and R.A. Quinn, *Review: microbial transformations of human bile acids*. *Microbiome*, 2021. **9**(1): p. 140.
 136. Bourgin, M., et al., *Bile Salt Hydrolases: At the Crossroads of Microbiota and Human Health*. *Microorganisms*, 2021. **9**(6).
 137. Fiorucci, S., et al., *Bile Acid Signaling in Inflammatory Bowel Diseases*. *Dig Dis Sci*, 2021. **66**(3): p. 674–693.
 138. Quinn, R.A., et al., *Global chemical effects of the microbiome include new bile-acid conjugations*. *Nature*, 2020. **579**(7797): p. 123–129.
 139. Russell, D.W., *The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis*. *Annu Rev Biochem*, 2003. **72**: p. 137–74.
 140. Foley, M.H., et al., *Lactobacillus bile salt hydrolase substrate specificity governs bacterial fitness and host colonization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. **118**(6).
 141. Coleman, J.P. and L.L. Hudson, *Cloning and characterization of a conjugated bile acid hydrolase gene from Clostridium perfringens*. *Appl Environ Microbiol*, 1995. **61**(7): p. 2514–20.
 142. Harris, S.C., et al., *Bile acid oxidation by Eggerthella lenta strains C592 and DSM 2243(T)*. *Gut Microbes*, 2018. **9**(6): p. 523–539.
 143. Lee, J.Y., et al., *Contribution of the 7β-hydroxysteroid dehydrogenase from Ruminococcus gnavus N53 to ursodeoxycholic acid formation in the human colon*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(11): p. 3062–9.
 144. Haase, S., et al., *Impacts of microbiome metabolites on immune regulation and autoimmunity*. *Immunology*, 2018. **154**(2): p. 230–238.
 145. Eslick, S., et al., *Weight Loss and Short-Chain Fatty Acids Reduce Systemic Inflammation in Monocytes and Adipose Tissue Macrophages from Obese Subjects*. *Nutrients*, 2022. **14**(4).
 146. Park, J., et al., *Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway*. *Mucosal Immunol*, 2015. **8**(1): p. 80–93.
 147. Geuking, M.B., et al., *Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses*. *Immunity*, 2011. **34**(5): p. 794–806.
 148. Furusawa, Y., et al., *Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells*. *Nature*, 2013. **504**(7480): p. 446–50.
 149. Schiering, C., et al., *The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine*. *Nature*, 2014. **513**(7519): p. 564–568.
 150. Shao, X., et al., *Bacteroides fragilis restricts colitis-associated cancer via negative regulation of the NLRP3 axis*. *Cancer Lett*, 2021. **523**: p. 170–181.

151. Scott, N.A., et al., *Antibiotics induce sustained dysregulation of intestinal T cell immunity by perturbing macrophage homeostasis*. Sci Transl Med, 2018. **10**(464).
152. Rosser, E.C., et al., *Microbiota-Derived Metabolites Suppress Arthritis by Amplifying Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation in Regulatory B Cells*. Cell Metab, 2020. **31**(4): p. 837–851.e10.
153. Olsson, A., et al., *Serum Short-Chain Fatty Acids and Associations With Inflammation in Newly Diagnosed Patients With Multiple Sclerosis and Healthy Controls*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 661493.
154. Huang, Z., et al., *3,3'-Diindolylmethane alleviates oxazolone-induced colitis through Th2/Th17 suppression and Treg induction*. Mol Immunol, 2013. **53**(4): p. 335–44.
155. Goudot, C., et al., *Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages*. Immunity, 2017. **47**(3): p. 582–596.e6.
156. Apetoh, L., et al., *The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 854–61.
157. Shen, J., et al., *Indole-3-Acetic Acid Alters Intestinal Microbiota and Alleviates Ankylosing Spondylitis in Mice*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 762580.
158. Mascanfroni, I.D., et al., *Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α* . Nat Med, 2015. **21**(6): p. 638–46.
159. Frumento, G., et al., *Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase*. J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 459–68.
160. Song, H., et al., *L-kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(8): p. 932–8.
161. Della Chiesa, M., et al., *The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function*. Blood, 2006. **108**(13): p. 4118–25.
162. Wen, J., et al., *Efficacy of N-Acetylserotonin and Melatonin in the EAE Model of Multiple Sclerosis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2016. **11**(4): p. 763–773.
163. Kibbie, J.J., et al., *Butyrate directly decreases human gut lamina propria CD4 T cell function through histone deacetylase (HDAC) inhibition and GPR43 signaling*. Immunobiology, 2021. **226**(5): p. 152126.
164. Giovannini, M., L. Lodi, and S. Ricci, *T-cell immunomodulation by bile acid metabolites*. Allergy, 2020. **75**(7): p. 1833–1834.
165. Fiorucci, S., et al., *Bile Acids Activated Receptors Regulate Innate Immunity*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1853.
166. Xu, T., et al., *Metabolic control of T(H)17 and induced T(reg) cell balance by an epigenetic mechanism*. Nature, 2017. **548**(7666): p. 228–233.
167. Fassett, M.S., et al., *Nuclear receptor Nr4a1 modulates both regulatory T-cell (Treg) differentiation and clonal deletion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(10): p. 3891–6.

168. Song, X., et al., *Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR γ (+) regulatory T cell homeostasis*. *Nature*, 2020. **577**(7790): p. 410–415.
169. Hang, S., et al., *Bile acid metabolites control T(H)17 and T(reg) cell differentiation*. *Nature*, 2019. **576**(7785): p. 143–148.
170. Hartai, Z., et al., *Kynurenine metabolism in multiple sclerosis*. *Acta Neurol Scand*, 2005. **112**(2): p. 93–6.
171. Rinninella, E., et al., *What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases*. *Microorganisms*, 2019. **7**(1).
172. Wang, Y.D., et al., *The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor κ light-chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) in mice*. *Hepatology*, 2011. **54**(4): p. 1421–32.
173. Guo, C., et al., *Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome*. *Immunity*, 2016. **45**(4): p. 944.
174. Shi, Y., et al., *TGR5 Regulates Macrophage Inflammation in Nonalcoholic Steatohepatitis by Modulating NLRP3 Inflammasome Activation*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 609060.
175. Correale, J., R. Hohlfeld, and S.E. Baranzini, *The role of the gut microbiota in multiple sclerosis*. *Nat Rev Neurol*, 2022. **18**(9): p. 544–558.
176. Kim, C.H., *Complex regulatory effects of gut microbial short-chain fatty acids on immune tolerance and autoimmunity*. *Cell Mol Immunol*, 2023. **20**(4): p. 341–350.
177. Park, J., et al., *Bidirectional regulatory potentials of short-chain fatty acids and their G-protein-coupled receptors in autoimmune neuroinflammation*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 8837.
178. Lorefice, L. and M. Zoledziewska, *Propionic Acid Impact on Multiple Sclerosis: Evidence and Challenges*. *Nutrients*, 2024. **16**(22).
179. Mann, E.R., Y.K. Lam, and H.H. Uhlig, *Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2024. **24**(8): p. 577–595.
180. Carlini, F., et al., *Butyrate enhances CD56(bright) NK cell-driven killing of activated T cells and modulates NK cell chromatin accessibility*. *Genes Immun*, 2025. **26**(4): p. 342–351.
181. Chen, T., et al., *Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination*. *J Neuroinflammation*, 2019. **16**(1): p. 165.
182. Wei, H., et al., *Butyrate ameliorates chronic alcoholic central nervous damage by suppressing microglia-mediated neuroinflammation and modulating the microbiome-gut-brain axis*. *Biomed Pharmacother*, 2023. **160**: p. 114308.
183. Liu, Z., et al., *Oxymatrine and Gut Microbiota Modulation: A Potential Therapeutic Strategy for Bone Cancer Pain Management*. *J Pain*, 2024. **25**(10): p. 104588.
184. Wuerch, E., G.R. Urgoiti, and V.W. Yong, *The Promise of Niacin in Neurology*. *Neurotherapeutics*, 2023. **20**(4): p. 1037–1054.
185. Altieri, C., et al., *Gut-Microbiota, and Multiple Sclerosis: Background, Evidence, and Perspectives*. *Nutrients*, 2023. **15**(4).

186. Porbahaie, M., et al., *Short-chain fatty acids inhibit the activation of T lymphocytes and myeloid cells and induce innate immune tolerance*. *Benef Microbes*, 2023. **14**(4): p. 401–419.
187. Verma, S.C., et al., *Cathelicidin antimicrobial peptide expression in neutrophils and neurons antagonistically modulates neuroinflammation*. *J Clin Invest*, 2024. **135**(3).
188. Sanjay, et al., *Cyanidin-3-O-Glucoside Regulates the M1/M2 Polarization of Microglia via PPAR γ and A β 42 Phagocytosis Through TREM2 in an Alzheimer's Disease Model*. *Mol Neurobiol*, 2022. **59**(8): p. 5135–5148.
189. Hsu, C.H., et al., *Ultrasound reduces inflammation by modulating M1/M2 polarization of microglia through STAT1/STAT6/PPAR γ signaling pathways*. *CNS Neurosci Ther*, 2023. **29**(12): p. 4113–4123.
190. Chausse, B., P.A. Kakimoto, and O. Kann, *Microglia and lipids: how metabolism controls brain innate immunity*. *Semin Cell Dev Biol*, 2021. **112**: p. 137–144.
191. Liu, C., et al., *The role of intestinal homeostasis in sevoflurane-induced myelin development and cognitive impairment in neonatal mice*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2025. **15**: p. 1541757.
192. Celorrio, M., et al., *Short-chain fatty acids are a key mediator of gut microbial regulation of T cell trafficking and differentiation after traumatic brain injury*. *Exp Neurol*, 2025. **392**: p. 115349.
193. Rohart, F., et al., *mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration*. *PLoS Comput Biol*, 2017. **13**(11): p. e1005752.
194. Singh, A., et al., *DIABLO: an integrative approach for identifying key molecular drivers from multi-omics assays*. *Bioinformatics*, 2019. **35**(17): p. 3055–3062.

16. Ringraziamenti

Inizio ringraziando la mia Relatrice, la Professoressa Alice Laroni, che mi ha accolto, ha riposto fiducia in me e mi ha supportato in questo percorso, trasmettendomi insegnamenti preziosi che porterò con me nel mio futuro.

Vorrei ringraziare il team di Proteomica e Spettrometria di Massa dell'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino diretto dal Prof. Camillo Profumo, in particolare la Dott.ssa Kateryna Tkachenko che mi ha aiutato nella parte tecnica e nella comprensione dei dati. Ringrazio tutte le persone che hanno partecipato a questo progetto, chi ha contribuito in altri modi e i pazienti che, in primo luogo, si sono resi disponibili ad aiutarci. Ringrazio Davide Maioli per avermi accompagnato in questo percorso ed essere stato un punto di riferimento.

Ringrazio il Professore Antonio Scalfari e tutta la squadra dell'Imperial College, per essere stati disponibili fin da subito. Ho potuto vedere e apprezzare un nuovo mondo, punti di vista differenti e persone splendide.

Un ringraziamento a Maria Grazia e a tutto il team di Villa Sorriso per aver creduto in me. Vi ho incontrati negli ultimi metri di questa lunga maratona, eppure l'ambiente che ho trovato mi ha permesso di imparare tanto fin da subito. Grazie per tutto ciò che continuate a trasmettermi.

Ringrazio Amma e Appa, sappiamo quanta fatica abbiamo fatto e quello che abbiamo passato. Se sono arrivato ad essere ciò che sono è grazie a voi. Grazie per aver affiancato le mie idee senza mai obbligarmi a fare nulla, grazie per essere stati e continua ad essere Casa in ogni momento della mia vita. *I thank Amma and Appa, we know how much effort we put in and what we went through. If I have become who I am today, it is thanks to you. Thank you for supporting my ideas without ever forcing me to do anything, thank you for having been, and for continuing to be, Home in every moment of my life.*

Ringrazio la mia famiglia allargata! Lilli e Pier per esservi assorbiti in questi sei anni la mia ansia pre-esame, i discorsi monotematici sulla medicina e le mie indecisioni sul futuro. A parte gli scherzi, vi ringrazio per la vostra presenza costante e bontà che avete avuto nei confronti.

Grazie alle due bimbe più belle che io conosca, Alessia e Maddalena: siete una gioia e sono felicissimo di essere vostro zio. Ovviamente grazie anche ai genitori di queste due bellissime bambine: siete un po' i fratelli che non ho mai avuto.

Ringrazio Chri e Mati, componenti solidi della Bandà Balù! Contento ed orgoglioso della nostra amicizia sempre presente e costante.

Ringrazio Davide e Juli: tanti anni insieme, felice di ritrovarmi ancora insieme a voi.

Ringrazio Ale, per aver condiviso con me questo percorso. Sono stati anni lunghi e difficili, meglio di chiunque altro sai quanti sacrifici abbiamo fatto, sono sicuro che ne sarà valsa la pena. Ringrazio Marcolino e Chiarina: tanti bei momenti insieme. Un team di acchiappa-presenze clamoroso, forse sarebbe il caso di vendere un nostro corso.

Ringrazio Sebastiano e Nunzia, perché siete l'essenza di ciò che intendo per Nonni. Ormai parte di me, grazie per continuare ad esserci in ogni mio momento difficile o bello che sia. Siete il consiglio più maturo che porto ogni giorno con me.

Grazie Marco: mi hai insegnato il valore dello sport e, prima di tutto, il valore del sacrificio. Sei stato quel Maestro non sempre buono ma giusto. Rivedo nella vita tante cose che mi hai insegnato standomi a fianco su quel gommone. 'Mai domi!!!'

Infine, ringrazio la mia persona, Mari. Mi hai dato forza quando ne avevo poca e hai saputo, soprattutto, ascoltare i miei silenzi. Ci siamo vissuti tanto, siamo cresciuti giorno dopo giorno insieme. Sei stata parte vitale di questo percorso. Nonostante le mie mille insicurezze, durante questa maratona hai saputo sempre darmi coraggio. Grazie per avermi accompagnato fin qui e per essere al mio fianco nel nostro futuro inizio, l'avventura più bella. Sempre l'uno a supporto dell'altro, un po' come l'uno e il tre di un gozzo. Sarai sempre la mia unica capovoga.

Grazie anche a te Balù.

Rileggendo queste righe, mi rendo conto che nella mia vita sono più le persone 'acquisite' di quelle 'consanguinee'. Essere figlio di due immigrati non è stato facile: ho vissuto a lungo con la sensazione di non voler essere srilankese, perché non ero percepito abbastanza italiano. In questi anni, però, ho capito che la cosa più importante per me è la gratitudine verso la mia famiglia e verso le persone che mi circondano. Alla fine, quello che ho imparato tra mille sbobine e libri è questo: siete voi la mia vera medaglia d'oro alla fine di questa maratona.